

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

LAURA CÉLIA DE OLIVEIRA SOUZA VICENTE

**ADIÇÃO DE GRILO PRETO EM PÓ E FARINHA DE SOJA COMBINADOS OU
NÃO NA DIETA DE RATOS WISTAR: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTEICA
E EFEITOS SOBRE MARCADORES METABÓLICOS E SAÚDE INTESTINAL**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2024**

LAURA CÉLIA DE OLIVEIRA SOUZA VICENTE

**ADIÇÃO DE GRILO PRETO EM PÓ E FARINHA DE SOJA COMBINADOS OU
NÃO NA DIETA DE RATOS WISTAR: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTEICA
E EFEITOS SOBRE MARCADORES METABÓLICOS E SAÚDE INTESTINAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Ceres Mattos Della Lucia

Coorientadoras: Hércia Stampini Duarte Martino

Bárbara Pereira da Silva

Reggiani Vilela Gonçalves

Izabela Maria Montezano de Carvalho

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

V632a
2024

Vicente, Laura Célia de Oliveira Souza, 1995-

Adição de grilo preto em pó e farinha de soja combinados ou não na dieta de ratos Wistar: avaliação da qualidade proteica e efeitos sobre marcadores metabólicos e saúde intestinal / Laura Célia de Oliveira Souza Vicente. – Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (80 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Ceres Mattos Della Lucia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Nutrição e Saúde, 2024.

Referências bibliográficas: f. 65-79.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.546>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Alimentos - Teor proteico. 2. *Gryllus assimilis*.
3. Insetos comestíveis. 4. Digestibilidade. 5. Alimentos -
Combinação. I. Della Lucia, Ceres Mattos, 1984-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e
Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição.
III. Título.

CDD 22. ed. 613.282

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523


LAURA CÉLIA DE OLIVEIRA SOUZA VICENTE

**ADIÇÃO DE GRILO PRETO EM PÓ E FARINHA DE SOJA COMBINADOS OU
NÃO NA DIETA DE RATOS WISTAR: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTEICA
E EFEITOS SOBRE MARCADORES METABÓLICOS E SAÚDE INTESTINAL**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de maio de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 LAURA CELIA DE OLIVEIRA SOUZA VICENTE
Data: 04/09/2024 10:54:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Laura Célia de Oliveira Souza Vicente
Autora

Documento assinado digitalmente
 CERES MATTOS DELLA LUCIA
Data: 04/09/2024 14:52:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ceres Mattos Della Lucia
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por me dar força e coragem em todas os momentos vividos até aqui! Aos meus pais, em especial minha mãe, por acreditar em mim mais que eu mesma e sempre me dar o colo necessário nos momentos em que precisei, ao meu irmão, por ser meu porto seguro e aos meus amigos, pelo apoio incondicional de sempre. Agradeço à minha orientadora e amiga Ceres, pelo apoio, acolhimento e confiança. Meu amor e admiração por todos vocês são enormes!

Aos amigos do nosso Laboratório de Análises de Vitaminas, por todos os ensinamentos, companheirismo e oportunidades, em especial à Karina por ter vivido esse projeto comigo, como se fosse dela, em todos os momentos. Aos meus coorientadores e aos integrantes do Laboratório de Nutrição Experimental, Laboratório de Patologia Experimental, Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros, Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde, Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios e Microbiota Animal, bem como com a Embrapa Agroindústria de Alimentos, obrigada pela disponibilidade, pela ajuda com as análises e pela parceria! Ao BioAgro, pelo fornecimento da matéria prima!

Dividi esse mestrado com pessoas que tenho grande admiração e carinho e tenho certeza que por isso o percurso foi mais leve. Obrigada por compartilharem comigo suas experiências e conhecimentos, e me ajudarem a chegar até aqui. Agradeço também aos meus amigos da vida pelo apoio, torcida e por serem ponto de paz, carinho e calma quando precisei.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, por todas as oportunidades de aprendizado e crescimento desde a graduação! À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado, e à FAPEMIG, pelo financiamento do projeto. O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (código de financiamento APQ-01494-21).

Com todo carinho que existe em mim, meu muito obrigada!

RESUMO

VICENTE, Laura Célia de Oliveira Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2024. **Adição de grilo preto em pó e farinha de soja combinados ou não na dieta de ratos *Wistar*: avaliação da qualidade proteica e efeitos sobre marcadores metabólicos e saúde intestinal.** Orientadora: Ceres Mattos Della Lucia. Coorientadoras: Hércia Stampini Duarte Martino; Bárbara Pereira da Silva; Reggiani Vilela Gonçalves e Izabela Maria Montezano de Carvalho.

Os insetos são considerados uma promissora fonte de proteínas em um cenário de aumento da demanda global por alimentos. Além do alto conteúdo proteico, eles contêm carboidratos na forma de exoesqueleto quitinoso, que podem chegar intactos ao intestino grosso, e beneficiar a saúde intestinal. O grilo preto (*Gryllus assimilis*) tem gerado interesse devido ao seu valor nutricional, entretanto, a aversão dos consumidores ainda limita a sua aceitação em diversos países ocidentais. Uma alternativa é transformá-lo em pó e incorporá-lo a uma matriz alimentar comumente utilizada, como a soja, como forma de complementação nutricional. O objetivo deste estudo foi, portanto, avaliar a qualidade proteica do grilo preto em pó, associado à farinha de soja, e seus efeitos sobre marcadores metabólicos e saúde intestinal de ratos *Wistar*. Quarenta animais foram distribuídos em 5 grupos (n=8): AIN-93G: controle caseína; GP: 100% da proteína do grilo preto em pó; GPFS: 30% da proteína do grilo preto em pó e 70% da farinha de soja; FS: 100% da proteína da farinha de soja; e AP: dieta aprotéica. A qualidade proteica foi avaliada pelos índices de coeficiente de eficiência alimentar (CEA), coeficiente de eficiência proteica (PER), razão proteica líquida (NPR) e digestibilidade verdadeira (DV). Os marcadores metabólicos foram avaliados por parâmetros bioquímicos, balanço oxidativo e histologia do fígado. O efeito na saúde intestinal foi avaliado por histomorfometria do cólon, além da coloração, consistência, umidade e pH das fezes e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Ao final de 30 dias, após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com isoflurano a 3% e eutanasiados por punção cardíaca. O sangue, fígado, cólon e fezes do ceco foram coletadas para análises. A ingestão alimentar do grupo GP foi maior que o grupo controle. O CEA, PER, NPR e DV foram maiores no grupo AIN-93G; apesar disso, todos os grupos apresentaram um PER acima de 2,0, indicando uma proteína de alta qualidade. Quanto à DV, todos os grupos apresentaram valores maiores que 90%, o que remete à boa digestibilidade. A avaliação histológica do fígado demonstrou similaridade entre GPFS, FS e AIN-93G para inflamação e esteatose hepática, entretanto, o grupo GP apresentou aumento dessas variáveis. Os grupos que continham grilo em sua composição (GP e GPFS) apresentaram atividade de superóxido dismutase (SOD) e glutatona-S-transferase (GST) semelhantes ao controle,

enquanto o grupo FS apresentou maior atividade de GST comparado aos demais. O grupo GP apresentou redução de malondialdeído (MDA) e aumento de óxido nítrico (ON), quando comparado aos grupos teste. O grupo GPFS foi semelhante ao controle para os produtos de oxidação e o grupo FS apresentou redução na produção de ON. O grupo GP demonstrou redução de glicose e colesterol total em relação ao controle, e o GPFS apresentou redução de colesterol total e triglicerídeos em comparação ao controle e FS. Todos os grupos teste reduziram o colesterol LDL em relação ao controle. Houve aumento nos níveis de ureia e creatinina no grupo FS, enquanto as concentrações de AST reduziram nos grupos GPFS e FS. Quanto à saúde intestinal, o grupo GPFS demonstrou aumento da umidade fecal, comparado ao controle. O pH, coloração e consistência das fezes foram semelhantes entre os grupos experimentais. A produção de ácido propiônico nos grupos teste foi similar, porém menor que o controle, enquanto o ácido butírico foi menor no grupo FS em comparação ao controle. Não houve diferenças nos parâmetros histomorfométricos do cólon entre os grupos. Com base nos resultados, conclui-se que o grilo preto em pó é uma alternativa promissora de alta qualidade proteica, com efeitos benéficos na saúde intestinal, sem prejuízos à saúde hepática quando associado à farinha de soja.

Palavras-chave: entomofagia; *Gryllus assimilis*; insetos comestíveis; *Glycine max L.*; digestibilidade proteica; estresse oxidativo; funcionamento intestinal.

ABSTRACT

VICENTE, Laura Célia de Oliveira Souza, M.Sc., Federal University of Viçosa, May, 2024. **Addition of black cricket powder and soy flour combined or not in the diet of *Wistar* rats: evaluation of protein quality and effects on metabolic markers and intestinal health.** Adviser: Ceres Mattos Della Lucia. Coadvisers: Hércia Stampini Duarte Martino; Bárbara Pereira da Silva; Reggiani Vilela Gonçalves and Izabela Maria Montezano de Carvalho.

Insects are considered a promising protein source in the context of increasing global demand for food. In addition to their high protein content, they contain carbohydrates in the form of chitinous exoskeletons, which can reach the large intestine intact and benefit intestinal health. The black cricket (*Gryllus assimilis*) has garnered interest due to its nutritional value; however, consumer aversion still limits its acceptance in many Western countries. One alternative is to process it into powder and incorporate it into commonly used food matrices like soy, as a nutritional supplement. Therefore, the aim of this study was to evaluate the protein quality of black cricket powder, combined with soy flour, and its effects on metabolic markers and intestinal health of *Wistar* rats. Forty animals were divided into 5 groups (n=8): AIN-93G: casein control; GP: 100% black cricket powder protein; GPFS: 30% black cricket powder protein and 70% soy flour; FS: 100% soy flour protein; and AP: protein-free diet. Protein quality was assessed using feed efficiency ratio (FER), protein efficiency coefficient (PER), net protein ratio (NPR) and true digestibility (TD). Metabolic markers were evaluated by biochemical parameters, oxidative balance, and liver histology. The effect on intestinal health was assessed through colon histomorphometry, as well as stool color, consistency, moisture, and pH, and short-chain fatty acid (SCFA) production. At the end of 30 days, after a 12-hour fast, the animals were anesthetized with 3% isoflurane and euthanized by cardiac puncture. Blood, liver, colon, and cecal stools were collected for analysis. Food intake in the GP group was higher than in the control group. FER, PER, NPR, and TD were higher in the AIN-93G group; despite this, all groups showed a PER above 2.0, indicating high-quality protein. Regarding TD, all groups presented values above 90%, which suggests good digestibility. Histological evaluation of the liver showed similarity between GPFS, FS, and AIN-93G for inflammation and hepatic steatosis; however, the GP group showed an increase in these variables. The groups containing cricket in their composition (GP and GPFS) showed superoxide dismutase (SOD) and glutathione-S-transferase (GST) activities similar to the control, while the FS group showed higher GST activity compared to the others. The GP group showed a reduction in malondialdehyde (MDA) and an increase in nitric oxide (NO) compared to the test groups. The GPFS group was similar to the control in terms of oxidation products,

and the FS group showed a reduction in NO production. The GP group showed a reduction in glucose and total cholesterol compared to the control, and the GPFS group showed a reduction in total cholesterol and triglycerides compared to the control and FS. All test groups reduced LDL cholesterol compared to the control. There was an increase in urea and creatinine levels in the FS group, while AST concentrations decreased in the GPFS and FS groups. Regarding gut health, the GPFS group showed an increase in stool moisture compared to the control. The pH, color, and consistency of the stool were similar among the experimental groups. Propionic acid production in the test groups was similar but lower than the control, while butyric acid was lower in the FS group compared to the control. There were no differences in colon histomorphometric parameters between the groups. Based on the results, it is concluded that black cricket powder is a promising alternative of high protein quality, with beneficial effects on gut health, without detriment to liver health when associated with soybean flour.

Keywords: entomophagy; *Gryllus assimilis*; edible insects; *Glycine max L.*; protein digestibility; oxidative stress; intestinal functioning.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Delineamento experimental	38
Figura 2 Escala de Bristol	49
Quadro 1 Variáveis utilizadas para o cálculo amostral	37
Quadro 2 Diluições para construção da curva analítica	45
Figura 3 Representações da morfologia do fígado de cada grupo experimental, coloração com Hematoxilina-Eosina (H&E) e Picro Sirius	54
Figura 4 Análises de estresse oxidativo no fígado	55
Figura 5 Representações da morfologia do cólon de cada grupo experimental, coloração com Hematoxilina-Eosina (H&E)	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição química do grilo preto em pó e da farinha de soja	31
Tabela 2 Composição das dietas experimentais	39
Tabela 3 Efeito do grilo preto em pó associado à farinha de soja no peso corporal, consumo alimentar, CEA, peso seco das fezes e índices de qualidade proteica em ratos Wistar, após um período de 14 dias de experimento	51
Tabela 4 Perfil de aminoácidos essenciais, escore químico e PDCAAS de acordo com o padrão FAO (2013) para o grilo preto em pó, associado à farinha de soja	52
Tabela 5 Efeito do consumo de grilo preto em pó associado à farinha de soja no peso corporal de ratos <i>Wistar</i> , após um período de 30 dias	52
Tabela 6 Histologia do fígado de ratos Wistar submetidos à dieta contendo grilo preto em pó associado à farinha de soja, após 30 dias	53
Tabela 7 Efeito da ingestão de grilo preto em pó associado à farinha de soja sobre variáveis bioquímicas em ratos Wistar, após 30 dias	56
Tabela 8 Efeito do grilo em pó associado à farinha de soja na saúde intestinal em ratos Wistar, após 30 dias	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: grau Celsius

μL: microlitro

μm: micrômetro

μmol: micromol

AGCC: ácidos graxos de cadeia curta

AIN-93G: dieta padrão para roedores em fase de crescimento

ALT: alanina aminotransferase

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*

AQC: aminoquinolil-succimidil-carbamato

AST: aspartato aminotransferase

CAT: catalase

CDNB: 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno

CEA: coeficiente de eficiência alimentar

CLAE: cromatográfica líquida de alta eficiência

CT colesterol total

DC: densidade calórica

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

DP: desvio padrão

DV: digestibilidade verdadeira

ELN: extrato livre de nitrogênio

ERNS: espécies reativas de nitrogênio

EROs: espécies reativas de oxigênio

FAO: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

FS: farinha de soja

GAGs glicosaminoglicanos

GP: grilo preto em pó

GPFS: grilo preto em pó + farinha de soja

GSH: glutathiona reduzida

GST: glutathiona-S-transferase

H&E: hematoxilina e eosina

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

H₂SO₄: ácido sulfúrico

H₃BO₃: ácido bórico

H₃PO₄: ácido fosfórico

HCl: ácido clorídrico

HCS: hidróxido de cálcio

HDL: lipoproteína de alta densidade

IA: ingestão alimentar

L: litro

LDL: lipoproteína de baixa densidade

MDA: malondialdeído

mg: miligrama

mL: mililitro

mM: milimol

N: nitrogênio

n: número

NaOH: hidróxido de sódio

NF-κB: fator nuclear kappa β

nm: nanômetros

NO₂: dióxido de nitrogênio

NO₃⁻: nitrato

NPR: razão proteica líquida

ON: óxido nítrico

PCN: proteína carbonilada

PDCAAS: escore químico corrigido pela digestibilidade

PER coeficiente de eficiência proteica

pH: potencial hidrogeniônico

SAN: Segurança Alimentar e Nutricional

SOD: superóxido dismutase

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TGL: triglicerídeos

TMPO: 1,1,3,3-tetrametoxipropano

U: unidade

v/v: volume/volume

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. HIPÓTESE	16
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo geral.....	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
4.1. Entomofagia: histórico e importância	17
4.2. Entomofagia e segurança alimentar e nutricional	19
4.3. Entomofagia e sustentabilidade.....	20
4.4. Aspectos nutricionais	21
4.5. <i>Gryllus assimilis</i>	22
4.6. Qualidade proteica	24
4.7. Segurança alimentar no uso de farinhas de insetos	25
4.8. Soja.....	25
4.9. Saúde intestinal	27
5.1. Localização	29
5.2. Grilo preto em pó	29
5.3. Farinha de soja	30
5.4. Determinação da composição centesimal	30
5.4.1. <i>Determinação da umidade</i>	30
5.4.2. <i>Determinação de lipídios</i>	31
5.4.3. <i>Determinação de cinzas totais</i>	31
5.4.4. <i>Determinação de proteínas</i>	32
5.4.5. <i>Fibra alimentar total</i>	32
5.4.6. <i>Cálculo de carboidratos</i>	34
5.5. Perfil de aminoácidos	34
5.6. Determinação do escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS).....	35
5.7. Cálculo amostral.....	35
5.8. Ensaio biológico.....	36
5.9. Dietas experimentais	37
5.10. Avaliação da saúde intestinal e marcadores metabólicos	39
5.10.1. <i>Animais e manutenção</i>	39

5.11. Avaliação da qualidade proteica	39
5.11.1. Animais e manutenção.....	39
5.12. Dados murinométricos	39
5.13. Eutanásia	39
5.14. Cálculo dos índices	40
5.15. Balanço oxidativo – avaliação do perfil antioxidante	41
5.15.1. Preparação do homogenato	41
5.15.2. Quantificação de proteínas totais	41
5.15.3. Atividade da enzima catalase (CAT).....	42
5.15.4. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	42
5.15.5. Atividade da glutationa-S-transferase (GST).....	43
5.15.6. Malondialdeído (MDA)	43
5.15.7. Óxido nítrico (ON)	44
5.15.8. Proteína carbonilada (PCN).....	45
5.16. Análise de variáveis bioquímicas.....	45
5.17. Análises histomorfométricas	46
5.18. Análise da saúde intestinal	46
5.18.1. Umidade fecal.....	46
5.18.2. pH do conteúdo cecal	46
5.18.3. Conteúdo de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)	47
5.18.4. Histomorfometria do cólon	47
5.18.5. Coloração e consistência das fezes	48
5.19. Análise estatística.....	49
5.20. Aspectos éticos.....	49
6. RESULTADOS	49
7. DISCUSSÃO	58
8. CONCLUSÃO.....	64
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO A – Aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	80

1. INTRODUÇÃO

A prática da entomofagia, definida como o consumo de insetos (Lucas et al., 2020), embora não seja comum nos países ocidentais, tem raízes históricas e é parte integrante da dieta em aproximadamente 113 países em todo o mundo (Barennes et al., 2015). Essa cultura é mais prevalente em regiões da Ásia, África e América Latina, onde mais de 2.100 espécies de insetos já foram identificadas como comestíveis (Jongema, 2017).

Os insetos emergem como uma alternativa promissora na produção de proteína para consumo humano, auxiliando na segurança alimentar, especialmente à medida que a demanda global por alimentos e proteínas aumenta em um mundo cada vez mais populoso (Van Huis, 2013). Com ciclos de vida curtos em comparação com os animais de produção convencionais, além da necessidade de pouco espaço para produzir rendimentos elevados, os insetos estão se tornando uma indústria de alto valor econômico e sustentável (Jensen et al., 2017).

Sistemas de produção de carne requerem elevada quantidade de terra, energia e água, contribuem para a poluição do solo e das águas subterrâneas e emitem grandes quantidades de gases de efeito estufa (Bhat et al., 2015). Em comparação com animais produtores de proteínas convencionais, como gado, porcos e aves, os insetos podem fornecer quantidade equivalente de proteína animal usando menos terra e água, além de produzir níveis muito mais baixos de gases de efeito estufa e, por isso, são considerados fontes de proteína ambientalmente sustentáveis (Oonincx et al., 2010).

Essa crescente popularidade da entomofagia ressalta a importância sobre a composição nutricional dos insetos, com destaque para seu alto teor de proteínas, variando de 12 a 74% entre os diversos gêneros, representando a maior porção de sua composição (Bessa et al., 2020; Van Huis, 2013).

Além disso, os insetos contêm carboidratos estruturais na forma de exoesqueleto quitinoso, equivalentes aos encontrados em fibras e em proporções semelhantes à celulose em alimentos à base de grãos (Bukkens, 2005). A quitina pode chegar intacta ao intestino grosso, onde tem potencial para atuar como prebiótico, promovendo o crescimento de bactérias benéficas, contribuindo assim para a melhora da saúde intestinal.

Alguns estudos também mostraram que os insetos possuem maiores concentrações de minerais como ferro e cálcio do que a carne bovina, e que alguns insetos são ricos em vitaminas do complexo B, β -caroteno e vitamina E (Bukkens, 2005; Raubenheimer, Rothman, 2013; Rumpold & Schlüter, 2013). Em trabalho realizado por nossa equipe de pesquisa (Oliveira et al., 2023), verificou-se que o grilo preto em pó se mostrou boas fontes de magnésio e fontes de

cálcio. Ademais, mostrou-se excelentes fontes de proteína e fontes de potássio e niacina. No entanto, não foram encontradas quantidades significativas de carotenoides e riboflavina.

O conhecimento da segurança alimentar em relação ao uso de insetos na produção de alimentos é limitado, o que provavelmente se torna uma barreira para sua introdução na alimentação humana nos países ocidentais (Lange & Nakamura, 2021). Entretanto, de acordo com a FAO (2013), a produção de insetos para consumo humano é segura.

Dentre os insetos com potencial de utilização na alimentação humana, o *Gryllus assimilis* tem gerado interesse no meio científico, devido ao seu valor nutricional (Araújo et al., 2019; Bisconsin-Junior et al., 2018). Embora se destaque pelo seu valor nutricional, a aversão dos consumidores ainda constitui umas das principais barreiras para a sua adoção como uma fonte viável de nutrientes em diversos países ocidentais (Van Huis et al., 2021). Diante disso, uma estratégia para aumentar a sua aceitação é retirar o inseto de sua forma original, transformando-o em pó. Ainda, acrescentar esse pó em uma matriz alimentar amplamente consumida em todo o mundo, como a soja, como forma de complementação nutricional, também pode ser considerada uma opção (Aboge et al., 2022; Bisconsin-Junior et al., 2022; Haber et al., 2020; Montevecchi et al., 2021; Oibiokpa et al., 2018; Tao e Li, 2018).

A adição de farinha de soja contribui para a melhoria da composição nutricional do produto, oferecendo um equilíbrio entre macronutrientes e adicionando fibras alimentares que promovem a saúde intestinal. Funcionalmente, a farinha de soja melhora a textura, a estrutura e a estabilidade térmica do produto final, além de conferir propriedades emulsificantes que são fundamentais para a consistência e a estabilidade dos alimentos processados (Liu et al., 2020). Sensorialmente, a adição de soja suaviza o sabor característico da farinha de grilo e melhora a aparência visual do produto, tornando-o mais atrativo para o consumidor. Do ponto de vista econômico, essa combinação também permite um produto mais acessível, já que a soja é uma matéria-prima relativamente barata e amplamente disponível, contribuindo para a redução dos custos de produção e ampliando as possibilidades de aplicação do produto final (Garcia et al., 2021). Por fim, a soja adiciona compostos bioativos, como as isoflavonas, que trazem benefícios adicionais à saúde, como a potencial redução do colesterol e propriedades antioxidantes, aumentando ainda mais o valor funcional da mistura final (Messina et al., 2019); Rodrigues et al., 2021). Assim, a combinação dessas duas farinhas resulta em um alimento mais completo, versátil e comercialmente viável.

Mesmo com o crescente interesse no uso de insetos na alimentação humana, especialmente do *Gryllus assimilis*, estudos que tenham avaliado sua qualidade proteica, e os

seus efeitos sobre marcadores metabólicos e saúde intestinal *in vivo* são inexistentes. O presente projeto visou, portanto, preencher essa lacuna do conhecimento, contribuindo com dados que poderão ser utilizados para o desenvolvimento de produtos a partir desse pó, caso ele apresente boa qualidade proteica e não altere e/ou melhore a saúde intestinal e os marcadores metabólicos dos animais.

2. HIPÓTESE

O grilo preto em pó, associado à farinha de soja, apresenta boa qualidade proteica e efeito positivo em marcadores metabólicos e saúde intestinal de ratos *Wistar*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a qualidade proteica do grilo preto em pó, associado ou não à farinha de soja, e seus efeitos sobre marcadores metabólicos e saúde intestinal em ratos *Wistar*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a composição centesimal: umidade, cinzas, proteínas, lipídios, carboidratos e conteúdo de fibra alimentar do grilo preto em pó e da farinha de soja;
- Avaliar o perfil de aminoácidos da farinha de soja;
- Avaliar índices murinométricos como: consumo alimentar, coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e ganho de peso dos animais;
- Avaliar a qualidade proteica do grilo preto em pó em ratos *Wistar* de acordo com o cálculo dos índices: coeficiente de eficiência proteica (PER), razão proteica líquida (NPR) e digestibilidade verdadeira (DV);
- Avaliar as concentrações plasmáticas de: glicose, colesterol total e frações, atividade da aspartato aminotransferase (AST), atividade da alanina aminotransferase (ALT), triglicerídeos, creatinina, ureia e ácido úrico;
- Analisar a histologia do fígado dos animais;
- Analisar os marcadores oxidativos no fígado dos animais por meio da quantificação dos produtos da oxidação (malondialdeído, óxido nítrico e proteína carbonilada) e da atividade das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutathione-S-transferase);

- Analisar os efeitos do consumo de grilo preto em pó, associado ou não à farinha de soja, sobre a saúde intestinal dos animais de acordo com a consistência, coloração, umidade e pH das fezes, produção de AGCC, além da avaliação da histomorfometria do cólon.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Entomofagia: histórico e importância

A prática de consumir insetos, conhecida como entomofagia, remonta ao período Pleistoceno, que compreende um intervalo de tempo entre 2,588 milhões e 11,7 mil anos atrás (Schabel, 2010). Os primeiros hominídeos já se alimentavam de insetos e, hoje em dia, essa prática está presente em mais de 100 países ao redor do mundo (Payne et al., 2019).

A origem da entomofagia pode ser rastreada em três estágios principais: tempos antigos, Idade Média e entomofagia moderna. Na antiguidade, certos insetos, como grilos, eram considerados iguarias e muito cobiçados pelos romanos como parte dos banquetes reais, principalmente no Oriente Médio e na Grécia. Já na Idade Média, a entomofagia estava relacionada à busca pelos benefícios medicinais dos insetos, como observado em culturas asiáticas e na medicina chinesa (Zugravu, 2023). A entomofagia moderna se refere à redescoberta da prática pela cultura ocidental, trazida de volta ao século XIX por exploradores que observaram a alimentação em condados tropicais da África Central e do Norte ou práticas alimentares indígenas na América do Norte e do Sul (Lockwood, 2014; Van Huis, 2017).

Os astecas eram conhecidos por utilizarem cerca de 91 espécies de insetos como alimento, preparados de diversas maneiras, como assados, fritos, branqueados, como temperos ou mesmo *in natura* (Tao, Li 2018).

Os insetos apresentam grande versatilidade no consumo, podendo ser consumidos de diversas maneiras e em diferentes estágios evolutivos. Além do consumo direto, eles também possuem grande importância comercial devido aos produtos que produzem ou excretam, como o mel e a seda (FAO, 2013). As abelhas, por exemplo, produzem cerca de 1,2 milhão de toneladas de mel comercial por ano, enquanto os bichos-da-seda produzem mais de 90.000 toneladas de seda (FAO, 2009). Outro exemplo é o corante carmim, produzido por cochonilhas (ordem Hemiptera), que é amplamente utilizado para colorir alimentos, tecidos e produtos farmacêuticos (Maatsch & Gras, 2016)

Atualmente, há mais de 2100 espécies de insetos comestíveis identificadas em todo o mundo (Mitsuhahi, 2019). Essas espécies podem ser coletadas na natureza, em estado selvagem, semicultivadas ou cultivadas em países do sudeste asiático, Tailândia e China (Hanboonsong et

al., 2013). A prática da entomofagia é mais comum em países como África, Colômbia, México, China, Tailândia, Indonésia, Japão e Austrália. No entanto, em países onde os padrões alimentares são ocidentalizados, o consumo de insetos ainda é raro ou culturalmente inapropriado, resultando em uma discussão pouco comum nas agendas de sustentabilidade e segurança alimentar (Van Huis, 2017).

Desde 2003, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) tem se dedicado a temas relacionados à entomofagia em vários países do mundo. O foco tem sido gerar e compartilhar conhecimento sobre o tema, bem como fornecer suporte aos países membros (FAO, 2013).

Em 2014, foi realizada a Conferência Mundial sobre Insetos para Alimentar o Mundo, com o objetivo de discutir questões relacionadas ao uso de insetos como alimentos e rações. Representantes de 42 países concluíram que os principais desafios incluem aumentar a conscientização do público em geral para promover os insetos como uma opção saudável para humanos e animais, influenciar os formuladores de políticas a aprovarem legislações de alimentos e rações que incluam insetos e aumentar os esforços de pesquisa para fornecer dados validados e evidências científicas dos benefícios do uso de insetos nas cadeias alimentares (FAO/WUR, 2014).

Atualmente, os insetos mais utilizados na alimentação humana são besouros (Coleoptera), lagartas (Lepidoptera) e abelhas, vespas e formigas (Hymenoptera), representando, respectivamente, 31%, 18% e 14% do total consumido. Em seguida, estão gafanhotos, grilos (Orthoptera), cigarras, cochonilhas e percevejos (Hemiptera), cupins (Isoptera), libélulas (Odonata), moscas (Diptera) e outras ordens (5%) (FAO, 2013).

No Brasil, apesar de a entomofagia estar relacionada a hábitos de comunidades marginalizadas, quatro insetos principais são consumidos em algumas comunidades: içá ou tanajura (*Atta spp.*); a larva do bicho-da-taquara (*Morpheis smerintha*, Lepidoptera); as larvas de bicho-das-palmeiras (*Rhynchophorus palmarum* e *Rhinobarbistrotris*) e a larva do bicho-do-coco (*Pachymerus nucleorum*, Coleoptera) (Costa-Neto & Dunkel 2016). Apesar de ainda pouco consumidos no país, o grilo preto (*Gryllus assimilis*) vêm sendo estudado como uma iniciativa para promover a difusão de alimentos alternativos (Araújo et al., 2019; Feng, 2018; Singson et al., 2016).

4.2. Entomofagia e segurança alimentar e nutricional

A Segurança Alimentar e Nutricional (SAN) é conceituada pela Lei nº 11.346, de 15 de julho de 2006, como o direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente, sem prejudicar o acesso a outras necessidades básicas, que respeitem a diversidade cultural e que sejam sustentáveis do ponto de vista social, econômico e ambiental (Brasil, 2006).

Atualmente, há questões iminentes em todo o mundo sobre a produção sustentável de alimentos em quantidade suficiente para alimentar toda a população mundial. Considerando as projeções da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), de que a população mundial atingirá 9,8 bilhões de pessoas até 2050, é evidente a necessidade de reavaliar a forma como os alimentos são produzidos e consumidos (ONU, 2015). Nesse sentido, é crucial buscar novas formas sustentáveis de cultivo de alimentos, especialmente em países desenvolvidos e industrializados, onde a porcentagem do consumo de proteína derivada da carne é maior do que nos países em desenvolvimento (Batat, Peter, 2020).

Diante desse cenário, a insegurança alimentar e nutricional é um desafio cada vez mais complexo e de crescente importância. Nesse sentido, a utilização de insetos comestíveis pode representar uma alternativa valiosa e sustentável para enfrentar questões como fome, superexploração de recursos naturais e superprodução e consumo de proteínas animais, bem como gerar oportunidades de emprego, uma vez que essa prática é considerada uma biotecnologia emergente (Batat, Peter, 2020).

A FAO (2013) considera os insetos como uma potencial fonte alimentar para lidar com as preocupações globais de segurança alimentar e incentiva a ampliação do seu uso na alimentação. Em todo o mundo, a entomofagia desempenha papel importante na segurança alimentar humana.

Apesar disso, ainda são limitados os estudos que avaliam de forma abrangente a composição nutricional e a viabilidade alimentar, econômica e de produção desses insetos destinados ao consumo humano. Dessa forma, é necessário um maior investimento em pesquisas que possam aprofundar o conhecimento sobre as possibilidades e limitações da utilização de insetos comestíveis para a promoção da segurança alimentar e nutricional em diferentes contextos (Batat, Peter, 2020).

4.3. Entomofagia e sustentabilidade

Atualmente, os insetos comestíveis são um recurso alimentar natural para muitos grupos étnicos na Ásia, África, México e América do Sul, onde a entomofagia é uma prática sustentável que oferece benefícios econômicos, nutricionais e ecológicos para as comunidades rurais (Jongema, 2017; Yen, 2010).

Tradicionalmente em países tropicais, os insetos comestíveis são colhidos da natureza. Entretanto, a criação de insetos comestíveis em instalações industriais confinadas está sendo investigada como uma alternativa viável para suprir a crescente demanda global por proteína (Van Huis, 2017). Esse aumento na busca por fontes alternativas de proteína surge como uma necessidade devido ao aumento do consumo de alimentos de origem animal, impulsionado pelo crescimento da população humana, aumento da renda e urbanização nos últimos 50 anos. Conseqüentemente, o setor pecuário cresce em uma taxa acelerada, competindo cada vez mais por recursos e exercendo pressões ambientais generalizadas em muitas partes do mundo (Herrero et al., 2015; Rehman et al., 2021).

Atualmente, a produção de carne representa cerca de 15% da energia total na dieta humana, enquanto aproximadamente 80% das terras agrícolas são usadas para pastagem animal ou produção de ração para rebanhos (Herrero et al., 2015; Herrero et al., 2016). No entanto, o impacto ambiental do setor é significativo, contribuindo para a acidificação devido à lixiviação de amônia, mudança climática devido às emissões de gases de efeito estufa, desmatamento, erosão do solo, desertificação, perda de biodiversidade vegetal e poluição da água com emissões de gases de efeito estufa, desmatamento, erosão do solo, poluição da água e perda de biodiversidade vegetal (Gerber et al., 2013; Steinfeld et al., 2006).

Visando adotar práticas alimentares mais sustentáveis do ponto de vista ambiental, a redução do consumo de carne vermelha pode ser estabelecida pela substituição por proteínas vegetais ou por uma transição de ruminantes para espécies de menor impacto, como porcos e aves (Smil, 2002). Ainda assim, possibilidades de outras fontes alternativas de proteína são investigadas, tais como carne cultivada *in vitro*, algas marinhas, microalgas e insetos (Onwezen et al., 2020).

Segundo Smetana et al. (2015), vários substitutos de carne foram comparados em relação ao seu impacto ambiental, usando vários indicadores. Entre eles, os produtos à base de insetos e farelo de soja apresentaram o menor impacto ambiental. Os insetos são uma possível alternativa, pois produzem quantidades muito menores de gases responsáveis pelo efeito estufa, como metano e óxido nitroso, em comparação com o gado convencional (Bhat et al., 2015;

Ooninx et al., 2010). Além disso, a criação de insetos pode ser realizada facilmente em espaços pequenos e por um curto período, devido ao seu ciclo de vida curto e alta taxa de crescimento. Os insetos comestíveis também não precisam ser alimentados com grãos, tornando a criação mais ecológica que a do gado tradicional (Ooninx et al., 2010).

Os insetos comestíveis podem ser alimentados com uma variedade de alimentos, incluindo ração para animais, frutas, verduras e cereais, o que torna sua produção flexível (Simplício, 2022). Além disso, a produção de insetos é mais sustentável que outras proteínas convencionais. Para produzir 1 kg de inseto comestível, são necessários cerca de 151 litros de água, 3 kg de ração e 15 m² de espaço. Em contraste, a produção de carne bovina e suína requer cerca de 30.000 litros de água, 40 kg de ração, 250 m² de espaço para carne bovina e 3.500 litros de água, 7 kg de ração, e 55 m² para carne suína (FAO, 2013).

4.4. Aspectos nutricionais

De maneira geral, é possível afirmar que os insetos apresentam alto conteúdo de nutrientes e podem ser uma excelente fonte de proteínas e lipídeos, além de apresentarem concentrações significativas de minerais, vitaminas e energia (Gómez et al., 2019; Oliveira et al., 2023). Entre as diversas ordens de insetos, os principais componentes são proteínas e lipídios, seguidos por fibra alimentar, extrato livre de nitrogênio (ELN) e cinzas (Oliveira et al., 2023; Rumpold & Schlüter, 2013).

O principal interesse no uso de insetos na alimentação humana tem foco no seu alto conteúdo de proteína. Em base seca, a proteína é o componente prevalente em insetos comestíveis. Vale ressaltar que o conteúdo proteico e de vitaminas encontrado nos insetos não é apenas atribuído à espécie, mas também ao substrato ao qual o inseto se alimenta (Bessa et al., 2020; Chen et al., 2009; Ramos-Elorduy et al., 2002; Rumpold & Schlüter, 2013; Van Huis, 2021).

A composição nutricional de insetos comestíveis pode variar significativamente. O conteúdo proteico, por exemplo, em algumas espécies pode variar entre 35 a 77% da matéria seca (Rumpold & Schlüter, 2013; Oliveira et al., 2023). Considerando os lipídios, os ácidos graxos palmítico e esteárico são os principais saturados encontrados em insetos comestíveis, variando entre 19 e 26% do seu conteúdo. Já os monoinsaturados são representados pelos ácidos palmitoleico e oleico, podendo representar cerca de 30% do conteúdo total de ácidos graxos, enquanto no grupo dos poli-insaturados, destacam-se o ácido linoleico (ômega-6), alfa-linolênico (ômega-3) e gama-linolênico, variando entre 12 e 32% em algumas espécies

(Chakravorty et al., 2014; Janssen et al., 2017). Alguns insetos também apresentam o ácido láurico em sua composição lipídica (Van Huis, 2021).

No que se refere aos carboidratos, é predominante a presença de quitina, quitosana e quitto-oligossacarídeos, um polissacarídeo encontrado no exoesqueleto dos insetos, que também oferece benefícios prebióticos, promovendo a saúde intestinal (Khusro et al., 2020). O conteúdo de fibra alimentar nos insetos comestíveis é significativo e varia amplamente entre as diferentes espécies. Em geral, a fibra alimentar, predominando a fibra insolúvel, pode representar uma importante fração do conteúdo nutricional dos insetos, contribuindo para benefícios à saúde intestinal. Estudos têm mostrado que os insetos comestíveis possuem uma média de 5 a 13% de fibra alimentar (Rumpold & Schlüter, 2013; Van Huis, 2013).

Além disso, os insetos são ricos em micronutrientes como ferro, zinco, magnésio e vitaminas do complexo B, que são essenciais para a saúde (Belluco et al., 2013). Dentre as vitaminas, estudos relatam que os mesmos apresentam riboflavina, biotina e ácido pantotênico (Van Huis, 2021). Em uma pesquisa do nosso grupo, Oliveira et al. (2023) verificaram que o *Tenebrio molitor* em pó mostrou-se fonte de vitamina E e niacina, já o grilo preto (*Gryllus assimilis*) em pó apresentou-se como fonte de niacina.

Ainda, dependendo do modo de preparo e tamanho da porção, os insetos comestíveis podem ser considerados boas fontes de cálcio (20,0 a 130,0 mg), cobre (1,35 a 2,0 mg), manganês (1,0 a 2,0 mg), magnésio (90,0 a 200,0 mg) e zinco (8 a 12mg) (De Castro et al., 2018). Estes achados vão de acordo com os resultados obtidos por Oliveira et al. (2023), nos quais elevadas concentrações de cálcio, ferro, cobre, zinco, magnésio e manganês foram observadas em amostras de *Tenebrio molitor* e *Gryllus assimilis* em pó. Além dos macros e micronutrientes, os insetos comestíveis apresentam alguns compostos bioativos, como peptídeos bioativos com ação antioxidante, polifenóis, fitoesteróis e glicosaminoglicanos (Van Huis, 2021). Esses atributos nutricionais tornam os insetos comestíveis uma opção promissora para a população global crescente.

4.5. *Gryllus assimilis*

O *Gryllus assimilis*, comumente conhecido como grilo preto, grilo do campo ou grilo jamaicano, é uma espécie de grilo monomórfico totalmente alado, com três pares de asas longas. É amplamente distribuído nas Índias Ocidentais, América do Sul e Central (Feng et al., 2018; Skerrett, 2019). Na natureza, os grilos podem ser considerados pragas eventuais, causando danos econômicos em áreas agrícolas (Barbosa et al., 2009).

O gênero *Gryllus* é composto por cerca de 2 mil espécies descritas, e uma das mais frequentes no Brasil é o *Gryllus assimilis*. Esses insetos são polívoros, ou seja, têm o hábito de se alimentar de uma ampla variedade de fontes alimentares, como matéria vegetal e orgânica, incluindo, folhas, gramíneas, sementes, frutos caídos, raízes e brotos (Barbosa et al., 2009; Simplício, 2022).

De modo geral, os grilos são criaturas noturnas que habitam ambientes com vegetação rasteira, como campos nativos ou lavouras com cobertura vegetal deficiente. Durante o dia, eles se abrigam em locais úmidos e escuros, como debaixo de detritos e em galerias subterrâneas (Barbosa et al., 2009; Castedo, 2018; Garber, 2013).

Com o intuito de introduzir o consumo de grilo preto na alimentação humana, pesquisas têm explorado diversas formas de consumo do *Gryllus assimilis*, como o uso de suplementos ou aditivos ricos em proteínas, bem como a incorporação do inseto como uma nova fonte de proteína alternativa em pães sem glúten (Machado et al., 2019; Montowska et al., 2019).

O perfil nutricional do *Gryllus assimilis* também tem despertado interesse, uma vez que ele apresenta alta concentração de proteínas, correspondendo a cerca de 61,0 a 67,97% de sua composição em termos de macronutrientes (Araújo et al., 2019; Bisconsin-Junior et al., 2018; Oliveira et al., 2023). Além disso, o inseto também contém uma quantidade significativa de lipídios (20,96%), fibra alimentar total, (11,24%) e cinzas (3,19%) (Machado et al., 2019; Oliveira et al., 2023).

Dentre os minerais encontrados em sua composição, destacam-se o ferro (9,5 mg) e cálcio, sendo os minerais mais significativos e com valores superiores ou semelhantes aos encontrados em outras fontes de proteína animal, como no lombo suíno (Araújo et al., 2019; Latunde-Dada, Yang & Alviles 2016; Mlcek et al., 2014; Rumpold & Schlüter, 2013). Estes achados são semelhantes aos resultados obtidos em um estudo prévio da nossa equipe (Oliveira et al., 2023).

Embora haja poucos dados disponíveis sobre o conteúdo de vitaminas neste inseto, um estudo realizado por Schmidt et al. (2019) encontrou 2,88 µg de vitamina B₁₂/100 g em sua composição, indicando que o *Gryllus assimilis* é uma excelente fonte de vitamina B₁₂ e pode contribuir significativamente para as necessidades nutricionais desse nutriente.

Além de seu perfil nutricional interessante, a incorporação de grilos na alimentação é facilitada pelo seu sabor, que é descrito como semelhante ao de frutas secas e amêndoas, enquanto a textura é descrita como crocante (Sogari, 2015).

4.6. Qualidade proteica

As proteínas são componentes estruturais essenciais encontrados em todas as células do corpo humano, e são fundamentais na construção e manutenção de tecidos, formação de enzimas, hormônios e anticorpos, além de regular processos metabólicos e fornecer energia (Oibiokpa, 2018).

As proteínas fornecem aminoácidos, e os mesmos são divididos em três categorias: os indispensáveis, que incluem, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina, os quais devem ser consumidos por meio da alimentação; os dispensáveis, cisteína, tirosina, glicina, arginina, glutamina, prolina, serina que são produzidos naturalmente pelo organismo em condições fisiológicas normais; e os condicionalmente indispensáveis, os quais são essenciais para certas fases da vida, como o crescimento, gravidez ou em condições específicas (patologias ou condição imunológica comprometida) (Kirby; Danner, 2009).

Uma mistura proteica de boa qualidade é caracterizada por uma combinação adequada de aminoácidos essenciais e nitrogênio total, além de apresentar uma boa digestibilidade (Mendes, 2009; Pires et al., 2006; Sarwar et al., 1997). Essa qualidade trata da capacidade do organismo humano em satisfazer as necessidades nutricionais para fins de síntese proteica, o que ocorre por meio do consumo de aminoácidos indispensáveis e dispensáveis (Mendes, 2009).

Os insetos têm sido descritos pela literatura como ricos em proteínas, podendo ser uma fonte alternativa de nutrientes na alimentação humana. Além disso, a digestibilidade das proteínas de insetos é alta, o que significa que uma maior proporção de aminoácidos é absorvida pelo corpo em comparação com outras fontes de proteína (Van Huis, 2013).

Além do alto teor proteico, os insetos comestíveis apresentam amplo perfil de aminoácidos, com destaque para os indispensáveis, que podem variar entre espécies e até mesmo dentro de uma mesma espécie. Geralmente, os aminoácidos limitantes são a lisina e o triptofano (Nongonierma, Fitzgerald, 2017; Raheem et al., 2019). Estudos realizados por Montowska et al., (2019) em três amostras de farinha de grilo (*Acheta domesticus*), mostraram um conteúdo de proteína variando entre 42 e 45,8%, enquanto Araújo et al., (2021) encontraram um conteúdo proteico de 65,52% para o *Gryllus assimilis*.

No entanto, pouco se sabe sobre a qualidade proteica dos insetos e sua capacidade de fornecer aminoácidos indispensáveis e nitrogênio não essencial para a síntese proteica (Rostom & Shine, 2018). Nesse sentido, é de grande interesse avaliar a qualidade da proteína do grilo

preto (*Gryllus assimilis*), a partir da análise de sua composição química, digestibilidade, eficiência de crescimento e manutenção de peso (Araújo, et al., 2021; Malla; Nørgaard; Roos, 2023).

4.7. Segurança alimentar no uso de farinhas de insetos

Devido ao crescente interesse global no uso de insetos como fonte de alimento e ao aumento rápido do consumo em países ocidentais, surgiram preocupações sobre a segurança alimentar e os riscos associados ao consumo desses insetos. O conhecimento da segurança alimentar em relação ao uso de insetos na produção de alimentos é limitado, o que provavelmente se torna uma barreira para a introdução e promoção do uso de insetos em dietas humanas nos países ocidentais (Lange & Nakamura, 2021).

De acordo com a FAO (2013), a produção de insetos para consumo humano é segura e pode ser realizada de forma sustentável, com baixo impacto ambiental e alta eficiência na conversão de alimentos em proteínas. Os insetos utilizados para a produção de farinha apresentam baixo risco de transmissão de patógenos, como bactérias, vírus e parasitas, quando produzida e manuseada corretamente. No entanto, o risco de insetos comestíveis transmitirem doenças aos seres humanos não foi suficientemente explorado (Lange & Nakamura, 2021; Van Huis, 2021).

Apesar desses benefícios, existem desafios específicos no processamento de farinhas de insetos que precisam ser abordados para garantir a segurança alimentar. A contaminação cruzada durante o processamento, armazenamento e distribuição é um risco potencial que requer atenção. Regulamentações claras e protocolos de controle de qualidade são necessários para prevenir a contaminação e garantir que as farinhas de insetos sejam seguras para consumo (Rumpold & Schlüter, 2013). Além disso, alguns insetos podem conter alérgenos que são capazes de desencadear reações alérgicas em pessoas sensíveis, destacando a necessidade de pesquisas adicionais para identificar e minimizar esses riscos (EFSA, 2015).

À medida que o interesse nos insetos comestíveis cresce, a adoção de práticas seguras de manejo, processamento e consumo será fundamental para superar barreiras culturais e garantir a aceitação generalizada dos insetos como fonte de alimento.

4.8. Soja

A soja, pertencente ao gênero *Glycine max L.*, é uma planta herbácea amplamente cultivada no Brasil. Suas variedades comerciais apresentam caules pouco ramificados e raízes

com eixo principal e múltiplas ramificações, com vagens levemente arqueadas. Ao amadurecerem, as vagens adquirem uma variedade de cores, que vão do verde ao amarelo-pálido, marrom-claro, marrom ou cinza, e podem conter de uma a cinco sementes lisas, de formato elíptico ou globoso, com tegumento de tonalidade amarelo-pálido e hilo preto, marrom ou amarelo-palha (Embrapa, 2021).

A soja é rica em uma variedade de nutrientes, incluindo vitaminas (tocoferol, tiamina, riboflavina, filoquinona e ácido fólico), fosfolipídios e minerais (potássio, magnésio, fósforo, ferro, zinco, cálcio, sódio, silício, enxofre, molibdênio, manganês e cobre) (Embrapa, 2021; Esteves & Monteiro, 2001; Mandarino, 2008).

Dentre as fontes de proteína vegetal, como cereais e leguminosas, a soja destaca-se pelo seu elevado conteúdo de proteínas (40%), seguido de lipídios (20%). Além disso, seus compostos bioativos, como os isoflavonoides, têm a capacidade de gerir e reduzir o risco de doenças crônicas não transmissíveis (Achouri et al., 2005; Berno, Lopes & Canniatti-Brazaca, 2008).

Por meio do melhoramento genético, novos cultivares de soja são desenvolvidos para aprimorar o sabor e modificar sua composição química. O cultivar UFVTN 105 AP, a ser utilizado no estudo, foi desenvolvido pelo Programa de Melhoramento de Soja do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Viçosa e apresenta maior quantidade de proteínas e ausência de lipoxigenases em sua composição (Carvalho, et al., 2013; Martino, et al., 2011; Oliveira et al., 2007).

A soja, embora seja rica em proteínas e minerais, também contém compostos bioativos como ácido fítico, oligossacarídeos e inibidores de tripsina, os quais podem afetar negativamente a absorção de proteínas e a biodisponibilidade de minerais (Esteves et al., 2017; Mandarino, 2008). Entretanto, estudos mostraram que o processamento térmico é capaz de inativar esses compostos, contribuindo para uma melhor digestibilidade das proteínas presentes na soja (Martino, et al., 2011).

Embora as melhores fontes de proteína sejam de origem animal, como carne, leite e ovos, a soja é considerada uma boa alternativa vegetal, com variação no teor de proteína de 31,32% a 44,07% entre os cultivares estudados (Felix e Canniatti-Brazaca, 2008; Martino et al., 2007; Mendes et al., 2007; Oliveira et al., 2007; Toledo et al., 2012). No entanto, sua biodisponibilidade é menor em comparação às proteínas de origem animal, devido à presença de compostos bioativos e à limitação de aminoácidos sulfurados (Monteiro et al., 2004; Qin, Wang e Luo, 2022).

A digestibilidade reduzida das proteínas das leguminosas pode ser causada por diversos fatores, incluindo casca (taninos), cotilédones (fitatos e inibidores de proteases), além da forma de processamento e armazenamento (Martinez, 2011). Embora as melhores fontes proteicas sejam de origem animal, como carne, leite e ovos, a soja é considerada uma boa opção vegetal, com variação de teor de proteína de 31,32% a 44,07% entre os cultivares estudados (Felix e Canniatti-Brazaca, 2008; Martino et al., 2007; Mendes et al., 2007; Oliveira et al., 2007; Toledo et al., 2012). No entanto, biodisponibilidade é menor se comparada às proteínas de origem animal, devido à presença de compostos bioativos e por ser limitante em aminoácidos sulfurados (Monteiro et al., 2004; Qin, Wang e Luo, 2022).

Com isso, se faz interessante a combinação do grilo preto (*Gryllus assimilis*) em pó e a farinha de soja, a fim de melhorar a qualidade proteica do produto final, uma vez que os aminoácidos sulfurados limitantes na soja estão presentes na farinha de grilo preto de forma não limitante (Oliveira et al., 2023; Qin, Wang e Luo, 2022).

4.9. Saúde intestinal

A saúde intestinal é um componente essencial do bem-estar geral, influenciada por diversos fatores, incluindo a dieta. Nos últimos anos, os insetos comestíveis têm ganhado destaque não apenas por seu alto teor proteico, mas também pela significativa quantidade de fibras alimentares, particularmente na forma de quitina. A quitina, uma fibra insolúvel composta por um polímero de N-acetilglicosamina, forma a maior parte do exoesqueleto dos insetos e é resistente à digestão pelas enzimas dos mamíferos, chegando intacta ao intestino grosso. Aqui, a quitina atua como um prebiótico, promovendo seletivamente o crescimento de bactérias benéficas, o que pode contribuir para a melhora da saúde intestinal (Araújo et al., 2019; Hu et al., 2010; Young et al., 2020).

Estudos em humanos indicam que o consumo de farinha de grilo, especificamente da espécie *Gryllodes sigillatus*, pode aumentar a população de bactérias probióticas, como *Bifidobacterium animalis*, em até 5,7% em comparação a dietas controle (Stull et al., 2018). Esse efeito prebiótico é acompanhado pela fermentação das fibras no intestino grosso, resultando na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como acetato, propionato e butirato. Esses AGCC desempenham um papel crucial na saúde intestinal, inibindo o crescimento de patógenos, reduzindo o pH intestinal e favorecendo o crescimento de simbioses (Gasaly, Hermoso e Gotteland, 2021; Markowiak-Kope e Sli, 2020). Em estudos realizados com galinhas alimentadas com insetos, a quitina dos insetos foi fermentada pela microbiota,

resultando na produção de propionato e butirato, compostos essenciais para a saúde intestinal (Borrelli et al., 2017).

Além disso, estudos *in vitro* demonstram que a farinha de *Tenebrio molitor* pode aumentar a produção de AGCC e lactato, ao mesmo tempo que reduz o pH, criando um ambiente menos favorável ao crescimento de bactérias patogênicas (Carvalho et al., 2019). A quitosana, derivada da quitina de grilos da espécie *Scapsipedus icipe*, também mostrou estimular o crescimento de bactérias benéficas específicas e reduzir o pH, inibindo o crescimento de patógenos (Kipkoech et al., 2021). Embora os estudos sobre o impacto da fibra alimentar de *Gryllus assimilis* na saúde intestinal sejam limitados, a pesquisa existente sugere um potencial significativo para efeitos prebióticos.

Os ácidos graxos de cadeia curta, especialmente o butirato, são produzidos pela fermentação das fibras no intestino grosso e desempenham funções importantes, como manutenção da integridade da mucosa, regulação da barreira intestinal e modulação do sistema imunológico local e sistêmico (Liu et al., 2021). Esses ácidos fornecem energia para os colonócitos, estimulando sua proliferação e contribuindo para um ambiente luminal propício à saúde intestinal (Degruttola et al., 2016; Kelly et al., 2015; Tan, Macia e Mackay, 2023). Além disso, o butirato promove a função da barreira intestinal ao induzir a expressão de genes que codificam as *tight junctions* e estimulando a produção de peptídeos antimicrobianos e mucina, protegendo o epitélio intestinal (Parada Venegas et al., 2019; Nogal, Valdes e Menni, 2021). A regulação do sistema imunológico também está associada à inibição de histonas desacetilases (HDAC) e da ativação do fator nuclear Kappa β (NF- κ B), elementos chave na resposta imunológica e inflamatória (Parada Venegas et al., 2019).

A morfologia do intestino grosso, onde ocorre a maior parte da fermentação, também é um indicador vital da saúde intestinal. O consumo de prebióticos, como as fibras presentes nos insetos comestíveis, pode melhorar a morfologia intestinal, aumentando a produção de muco e o número de células caliciformes, essenciais para a proteção do epitélio intestinal (Silva et al., 2016; Mishima et al., 2022; Theodoro et al., 2022). Estudos em modelos animais mostram que farinhas e óleos de insetos podem modificar positivamente a profundidade das criptas intestinais, melhorando a saúde e funcionalidade do intestino (Dabbou et al., 2018; Gasco et al., 2019).

Dessa forma, a adição de insetos comestíveis à dieta pode trazer benefícios significativos para a saúde intestinal, principalmente através da ação prebiótica da quitina e da

produção de AGCC, contribuindo para a manutenção da morfologia e funcionalidade do intestino grosso.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Localização

O presente estudo foi desenvolvido no Departamento de Nutrição e Saúde (DNS), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG. As análises na farinha de soja e o ensaio biológico *in vivo* foram realizados no Laboratório de Nutrição Experimental (LABNEX), também situado no DNS/UFV, durante o ano de 2023. O processo de desenvolvimento da farinha de soja foi executado no Laboratório de Desenvolvimento de Novos Produtos (DNS/UFV).

Os demais procedimentos, tais como as análises químicas e as análises após a eutanásia foram realizadas no DNS/UFV e em parceria com diferentes laboratórios e departamentos da UFV, entre eles, o Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX), Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros (LEQ), Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde (LACDSA), Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios e Microbiota Animal (BIOTAN), bem como com a Embrapa Agroindústria de Alimentos, localizada no Rio de Janeiro, RJ, que realizou as análises do perfil de aminoácidos da farinha de soja.

5.2. Grilo preto em pó

O grilo preto (*Gryllus assimilis*) em pó utilizado no experimento foi adquirido da empresa Ecological Food, que realiza a criação de insetos para alimentação animal e humana, localizada na cidade de Limeira (SP). Esses insetos são criados sob regime de alimentação com ração padrão, composta por farelo de trigo, ração de codorna, cenoura e água.

O abate e processamento dos insetos foi realizado em sua fase adulta. Os insetos foram separados para eliminação de excrementos; para isso, foram submetidos a jejum de 24 horas para redução do conteúdo intestinal, uma vez que não é possível retirá-los manualmente. Em seguida, foram abatidos por redução de temperatura (congelamento por 24 horas a -18 °C), passando por branqueamento de 5 minutos, seguido de choque térmico. Posteriormente, foram desidratados em estufa com circulação de ar a 45°C por 48 horas, triturados em liquidificador e peneirados para a obtenção de um pó de fina granulação.

5.3. Farinha de soja

Os grãos de soja (*Glycine max L.*), do lote UFV-TN105 AP, utilizados no estudo foram adquiridos *in natura* em parceria com o Programa de Melhoramento de Soja do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Viçosa (BioAgro/UFV), localizado na Universidade Federal de Viçosa. Para a produção da farinha de soja, os grãos passaram por um processamento térmico a fim de inativar compostos bioativos que podem interferir na digestibilidade proteica (Martino et al., 2011). Com isso, os grãos foram lavados com água corrente, secos de um dia para o outro em temperatura ambiente e submetidos à temperatura de 150°C por 30 minutos em estufa de circulação de ar (Quimis® ISO 9001, São Paulo, Brasil), resfriados e armazenados em sacos de polietileno. Posteriormente, os grãos foram moídos em moinho de facas (Marconi Equipment, Brasil), com peneira com abertura de malha de 150 µm, seguindo a metodologia prevista por Martino et al. (2011). A farinha de soja foi armazenada a -12 °C e denominada como FS.

5.4. Determinação da composição centesimal

As análises de composição centesimal das amostras do grilo preto (*Gryllus assimilis*) em pó e farinha de soja seguiram a metodologia da *Association of Official Analytical Chemists* (2019). Os resultados da composição centesimal do grilo preto em pó e farinha de soja estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição química grilo preto em pó e da farinha de soja

Variáveis (g/100g)	GP	FS
Proteínas	60,99±0,66	43,90±1,63
Lipídios	20,33±0,08	22,55±0,59
Fibra alimentar total	11,24±0,90	13,35±0,48
Fibra solúvel	0,86±0,75	1,89±0,10
Fibra insolúvel	10,38±0,15	11,46±0,58
Umidade	4,02±0,24	5,92±0,23
Cinzas	3,37±0,14	5,02±0,05
Carboidratos	0,06±0,70	9,26±2,75

Dados expressos em média seguido de desvio padrão. GP: grilo preto em pó; FS: farinha de soja.

5.4.1. Determinação da umidade

A umidade foi determinada por método gravimétrico, com secagem em estufa com circulação de ar (Nova Ética®, modelo 400 / 6ND, São Paulo, Brasil), a 105 °C, até peso

constante. Foram pesados 10 g de cada amostra em placas de Petri previamente lavadas e secas, utilizando balança semi-analítica (Gehaka, AG200). A determinação da umidade foi determinada segundo a fórmula:

$$\% \text{ de umidade (m/m)} = \left(Pu - \frac{Ps}{Pu} \right) \times 100$$

Onde: Pu = peso da amostra úmida (peso inicial) e Ps = peso da amostra seca (peso final).

5.4.2. Determinação de lipídios

A determinação de lipídios foi realizada em aparelho extrator Soxhlet e balões isentos de lipídios conforme o método 920.39 (AOAC, 2019). Cartuchos em papel manteiga, tamanho de 12 x 25 cm e fundo revestido com algodão isento de lipídios foram secos em estufa (Nova Ética[®], modelo 400 / 6ND, São Paulo, Brasil) a 75 ± 1 °C, *overnight* e, em seguida, resfriados em dessecador até atingir a temperatura ambiente. Para a análise, em torno de 5g de amostra seca foram pesadas no interior dos cartuchos e, em seguida, cobertas com algodão. Os balões de 250 mL foram levados para estufa (Nova Ética[®], modelo 400 / 6ND, São Paulo, Brasil) a 105 °C, resfriados em dessecador e pesados. Logo depois, foi montado o sistema de extração, composto por balão, extrator, cartucho e duas “viragens” de éter de petróleo (aproximadamente 300 mL). A extração dos lipídios foi realizada por um período de 8 horas em temperatura de 95 ± 1 °C, em chapa elétrica. Após este período, os balões foram retirados do aparelho extrator e deixados na capela por 20 minutos para evaporação do éter de petróleo. Ao final, os balões foram secos em estufa (Nova Ética[®], modelo 400 / 6ND, São Paulo, Brasil) a 105 ± 1 °C por 24 horas, resfriados em dessecador e pesados. Para a obtenção dos resultados do % de lipídios empregou-se a equação:

$$\text{Teor de lipídios (\%)} = \frac{(\text{peso do balão} + \text{lipídio (g)}) - (\text{peso do balão seco vazio (g)})}{\text{peso da amostra (g)} \times 100}$$

5.4.3. Determinação de cinzas totais

Para determinação de cinzas, as amostras foram incineradas em forno mufla a 550 °C por 24 horas de acordo com o método 942.05 (AOAC, 2019). Cadinhos de porcelana foram secos em mufla (Quimis, modelo Q320 M, Brasil) a 550 °C por 1 hora, posteriormente a temperatura foi diminuída para 105 °C (por aproximadamente 3 ou 4h ou até esfriar), resfriados em dessecador e pesados em balança analítica (peso 1) (Gehaka, AG200). Em seguida, foram adicionados 2,5g de amostra seca e pesados cadinho mais amostra (peso 2), os quais foram

levados à mufla a 300°C por 1 hora para a realização da carbonização lenta das amostras e exalação dos vapores. Depois, a temperatura foi elevada a 600°C, permanecendo durante 6 horas até a obtenção de cinzas claras ou levemente acinzentadas. Em seguida, a temperatura da mufla (Quimis, modelo Q320 M, Brasil) foi reduzida para 105°C para resfriar as cinzas, que foram colocadas em dessecador por 30 minutos, para posterior pesagem em balança analítica (peso 3) (Gehaka, AG200) e cálculo. A determinação de cinzas foi determinada de acordo com a fórmula:

$$\text{Teor de cinzas totais (\%)} = \frac{(\text{peso 3}) - (\text{peso 1})}{(\text{peso 2}) - (\text{peso 1})} \times 100$$

Onde: peso 1 = peso do cadinho vazio (g); peso 2 = peso do cadinho + peso da amostra (g); e peso 3 = peso do cadinho com cinzas (g).

5.4.4. Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada utilizando os equipamentos de digestão, destilação e titulação de Kjeldahl. Foram pesados em triplicatas 50 mg das amostras previamente secas em papel manteiga, sendo o material transferido para tubo de digestão e acrescido de aproximadamente 1 g de mistura catalisadora (94% de sulfato de potássio, 5% de sulfato de cobre, 1% de selênio). Posteriormente, na capela de exaustão, foram adicionados 3 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado. Após vedação, os tubos foram levados ao bloco digestor.

No bloco digestor, os sistemas de digestão e exaustão foram acionados aumentando a temperatura para 300°C por 1 hora, após esse tempo, a temperatura foi ajustada para 350°C durante 30 minutos. Depois, a temperatura foi elevada a 380°C durante 30 minutos e, após este procedimento, o bloco digestor foi desligado até atingir temperatura ambiente. Na etapa de destilação, foram preparados erlenmeyers de 250 mL com 10 mL de solução de ácido bórico (H₃BO₃) 4%. Os tubos contendo as amostras foram levados ao destilador de Kjeldahl, onde foram acrescidos de aproximadamente 15 mL de NaOH 50% até a mistura apresentar coloração marrom. A destilação foi efetuada até a obtenção de 100 mL de condensado no erlenmeyer. Após a destilação, a solução obtida foi titulada com solução HCl 0,05 mol/L.

5.4.5. Fibra alimentar total

A avaliação do conteúdo de fibra alimentar total seguiu o método enzimático-gravimétrico da AOAC (2019). Inicialmente, as amostras previamente secas e desengorduradas

foram submetidas à hidrólise enzimática. Foram utilizados quatro béqueres para cada amostra e oito cadinhos, sendo quatro para fibra solúvel e quatro para insolúvel. Em um béquer de 600 mL foi pesado 1 g de amostra, com precisão de 0,0004g. Em seguida, foi adicionado ao recipiente 50 mL de tampão fosfato pH 6,0 e feito o ajuste do pH, adicionando NaOH 0,275 ou HCL 0,325 N. Foi adicionado à solução 0,1 mL de α -amilase termoestável (Total dietary fiber assay kit, Sigma®).

Depois disso, o béquer foi tampado com papel alumínio e colocado em banho maria a 95°C por 30 minutos, com agitação horizontal a cada 5 minutos. Após arrefecimento, até a temperatura ambiente, foi realizado o ajuste do valor do pH para $7,5 \pm 0,1$ pela adição da solução de NaOH 0,275 N e adicionado à solução de 0,2 mL de protease pronta. Para a digestão da proteína, o béquer foi vedado novamente e incubado em banho maria a 60°C por 30 minutos, com agitação constante. Posteriormente, o béquer foi resfriado a temperatura ambiente e o pH ajustado para $4,3 \pm 0,3$, adicionando cerca de 10 mL de HCL 0,325 N. Finalmente, foi acrescentado 0,1 mL de amiloglicosidase na solução, que foi colocada novamente em banho maria a 60°C por 30 minutos, com agitação horizontal constante a fim de se obter o hidrolisado final (Total dietary fiber assay kit, Sigma®).

Na etapa posterior, foi realizada a filtração das amostras. Para isso, cadinhos preparados com antecedência foram colocados na bomba a vácuo e lavados duas vezes com 10 mL de água destilada. Logo depois, o conteúdo do béquer foi vertido no cadinho e lavado três vezes com 10 mL de água destilada. Ao final da filtração, os cadinhos ficaram com o resíduo insolúvel e os kitassatos com a parte solúvel. Então, o filtrado do kitassato foi transferido para o mesmo béquer de 600 mL e acrescido de 320 mL de etanol 98% aquecido a 60°C. Essa fração solúvel contida no béquer ficou reservada para precipitação e posterior filtragem. Ainda na etapa de filtração da fibra insolúvel, os cadinhos foram lavados duas vezes com 20 mL de etanol a 95% e duas vezes com 20 mL de acetona. Ao final, quando já estavam secos, os cadinhos foram desconectados da bomba a vácuo e colocados em estufa a 105°C *overnight* e pesados posteriormente.

Para determinar a fração solúvel da fibra, os cadinhos foram colocados na bomba a vácuo e lavados duas vezes com 10 mL de etanol 78%. Em seguida, o conteúdo reservado no béquer foi vertido no cadinho e lavado três vezes com 20 mL de etanol a 78%, duas vezes com 20 mL de etanol a 95% e duas vezes com 20 mL de acetona. Os cadinhos foram levados para estufa a 105°C “overnight” e após secos e resfriados em dessecador, foram pesados. Por fim, para cada tipo de fibra, dois cadinhos foram separados para determinação de cinzas e dois para

análise de proteínas. As amostras para análise de cinzas foram colocadas em mufla (Quimis, modelo Q320 M, Brasil) a 490°C por 7 horas, enquanto as que serão avaliadas quanto ao teor de proteína foram ser retiradas dos cadinhos, trituradas e submetidas aos procedimentos de análise de proteína da fibra.

O cálculo da fibra alimentar insolúvel se deu por meio da fórmula:

$$\% FI = \frac{RI - P - C - BI}{M} \times 100$$

Onde: RI = média do resíduo insolúvel da amostra (mg); P = média de proteína do RI (mg); C = média de Cinzas do RI (mg); m = média de peso das amostras (mg); BI = RI_B - P_B - C_B; RI_B = média do resíduo insolúvel do branco (mg); P_B = média de proteína do RI_B (mg); e C_B = média de cinzas do RI_B (mg).

O cálculo da fibra alimentar solúvel se dará por meio da fórmula:

$$\% FS = \frac{RI - P - C - BS}{M} \times 100$$

Onde: RI = média do resíduo Solúvel da amostra (mg); P = média de proteína do RI (mg); C = média de Cinzas do RI (mg); m = média de peso das amostras (mg); BS = RS_B - P_B - C_B; RS_B = média do resíduo solúvel do branco (mg); P_B = média de proteína do RS_B do branco (mg); e C_B = média de cinzas do RS_B (mg).

$$Fibra\ alimentae\ total = FS + FI$$

5.4.6. Cálculo de carboidratos

Os carboidratos foram estimados por diferença, por meio da fórmula:

$$\% \text{ carboidratos} = 100 - \% \text{ umidade} - \% \text{ fração lipídica} - \% \text{ fração proteica} \\ - \% \text{ fração de fibra alimentar} - \% \text{ cinzas}$$

5.5. Perfil de aminoácidos

A determinação do perfil de aminoácidos foi realizada de acordo AOAC 994.12/2000 e método de Liu et al. (1995). Para a determinação dos aminoácidos foram realizadas duas hidrólises: ácida e ácida com prévia oxidação com ácido permórfico. As hidrólises foram realizadas em ampolas de vidro vedadas a vácuo e mantidas a 110 °C por 20 horas. Posteriormente, os aminoácidos sulfurados e aqueles resistentes à hidrólise ácida foram derivatizados com 6-aminoquinolil-succimidil-carbamato (AQC). As análises foram realizadas

por Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de fluorescência acoplado de coluna de separação de fase reversa. Os dados foram expressos em g de aminoácido por 100 g de amostra.

5.6. Determinação do escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS)

A determinação do escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS) foi realizada no grilo preto em pó, farinha de soja, bem como sua combinação. Para calcular o PDCAAS, o teor de nitrogênio foi determinado e o conteúdo proteico ($N \times 6,25$) foi calculado para o grilo preto em pó, grilo preto em pó associado à farinha de soja (30%/70%) e farinha de soja. Além disso, foi determinado o perfil de aminoácidos conforme descrito anteriormente, juntamente com o escore de aminoácidos para cada matriz alimentar (Carvalho et al., 2009).

O escore de aminoácidos baseia-se na análise dos aminoácidos da proteína em estudo e na comparação dos aminoácidos essenciais com os de uma proteína de referência (Costa e Peluzio, 2008; Oliveira, Santos & Wilson, 1989).

O escore de aminoácidos foi calculado com base no padrão sugerido de requisitos de aminoácidos pela FAO para crianças com idade entre 0 meses e 6 meses, conforme proposto pela FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) em 2013, e foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Escore de aminoácidos} = \frac{\text{mg de aminoácido em 1g de proteína no alimento}}{\text{mg de aminoácido em 1g de proteína de referência}}$$

Além disso, calculou-se o PDCAAS multiplicando-se o escore mais baixo de aminoácido essencial pela digestibilidade (DV) da proteína. Um escore igual ou superior a 1 indica que o alimento fornece todos os aminoácidos essenciais em quantidades adequadas e que sua proteína apresenta boa qualidade. Alimentos com escore mais baixos podem ser deficientes em um ou mais aminoácidos essenciais ou podem ter uma digestibilidade reduzida (Henley e Kuster, 1994; Rutherford et al., 2015).

5.7. Cálculo amostral

Para o cálculo amostral utilizou-se a equação abaixo (Mera et al., 1988), utilizando como critério a diferença de 7% no ganho de peso em relação aos grupos, e um poder estatístico de 95% ($\alpha \leq 0,05$).

$$n = \frac{2 \times (t\alpha \times DP)^2}{E^2}$$

Em que: α = probabilidade do erro tipo 1 em função do grau de liberdade do resíduo; DP = Desvio padrão; e E = Diferença que se deseja detectar no estudo.

Quadro 1 – Variáveis utilizadas para o cálculo amostral

	Média DP Grupo controle	Média DP Grupo teste	Média DP Grupo teste	Média DP Grupo teste	Média DP Fórmula
Peso (g)	136,2 ± 8,46	62,53 ± 3,59	99,40 ± 10,18	80,30 ± 5,70	94,61 ± 6,98
N	8	8	8	8	-

Fonte: Araújo et al., 2019

$$n = 2 \times (1,771 \times 6,98)^2 / 6,62^2$$

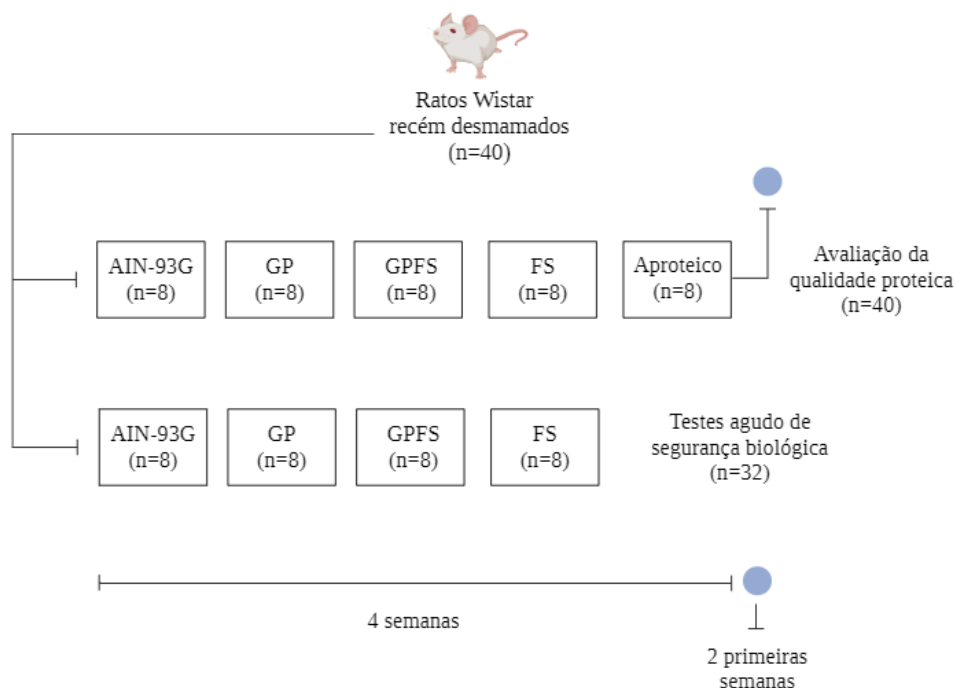
$$n = 6,97$$

$$6,97 + 15\% = 8,01 - \mathbf{8 \text{ animais}}$$

Considerando a possibilidade de perdas durante o experimento, acrescentou-se 15% ao n calculado, sendo necessários 8 animais por grupo, de acordo com estudos prévios com modelo animal e desfechos semelhantes (Araújo et al., 2019). Entretanto, os mesmos animais foram utilizados na avaliação da segurança biológica do uso agudo do grilo preto em pó citado previamente. Propondo, portanto, um total de 40 animais, valor correspondente a 8 repetições por grupo.

5.8. Ensaio biológico

Foram utilizados quarenta ratos machos recém-desmamados (*Rattus norvegicus*, *Wistar*, variação *albinus*) com 21 dias de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Os animais foram separados em 5 grupos (n=8), randomizados por peso corporal, sendo estes utilizados para dois estudos simultâneos – teste agudo de segurança biológica (n=32) e avaliação da qualidade proteica (n=40). Foram alojados individualmente em gaiolas de aço inoxidável, em ambiente com temperatura controlada (22 °C) e ciclos claro e escuro de 12 horas, ajustados automaticamente. Os animais receberam água destilada e suas respectivas dietas experimentais *ad libitum*.

Figura 1 – Delineamento experimental.

AIN – 93G: dieta padrão caseína para animais em fase de crescimento; GP: 100% da proteína advinda do grilo preto em pó; GPFS: 30% da proteína advinda do grilo preto em pó + 70% da proteína advinda da farinha de soja; FS: 100% da proteína advinda da farinha de soja; e Aproveiteico: grupo isento de proteína.

Os cinco grupos experimentais foram divididos em: Grupo AIN-93G: os animais receberam dieta padrão de acordo com a AIN-93G (Reeves et al., 1993), com 100% da recomendação de proteína diária advinda da caseína; Grupo GP: os animais receberam 100% das recomendações de proteína do grilo preto em pó; Grupo GPFS: os animais receberam 30% das recomendações de proteína do grilo preto em pó associado à 70% de proteína da farinha de soja (essa combinação foi escolhida a partir do cálculo do escore de aminoácidos que melhor suprisse os aminoácidos limitantes dos grupos isolados); Grupo FS: os animais receberam 100% das recomendações de proteína da farinha de soja; e Grupo Aproveiteico: os animais receberam dieta isenta de proteína. O grupo aprobeiteico não foi utilizado para o teste de segurança biológica de uso agudo. Os grupos foram alocados aleatoriamente de forma cega para os pesquisadores do estudo, a fim de evitar possível viés.

5.9. Dietas experimentais

A preparação das dietas foi realizada considerando as necessidades nutricionais dos animais, conforme composição da dieta AIN-93G (recomendada para animais em fase de

crescimento), segundo Reeves et al. (1993) com adaptações (Tabela 2). Para o cálculo das dietas, foram utilizados os dados da composição química do grilo preto em pó, da farinha de soja e caseína com 80,21% de proteína. Todas as dietas foram preparadas de maneira a serem isocalóricas e isoproteicas (9,5% de proteínas), com exceção do grupo aprotéico. Os ingredientes foram pesados individualmente, em balança semianalítica (Gehaka, AG200), misturados manualmente em recipientes de plástico previamente lavados com água deionizada, peneirados em peneiras plásticas e homogeneizados em batedeira industrial (Leme®) por um período de 15 minutos (com pausas a cada 5 minutos para uma mistura manual retirando das bordas da batedeira). Por fim, as dietas foram acondicionadas em sacos plásticos, devidamente rotuladas e armazenadas em freezer a $-18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

Tabela 2 – Composição das dietas experimentais

Ingredientes	Caseína	Aprotéico	GP	GPFS	FS
	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g
Caseína	11,84	-	-	-	-
Farinha de soja	-	-	-	15,15	21,64
Grilo em pó	-	-	15,58	4,67	-
Amido dextrinizado (maltodextrina)	13,20	13,20	13,20	13,20	13,20
Sacarose	10,0	10,0	10,00	10,00	10,00
Óleo de soja	7,00	7,00	3,83	2,63	2,12
Fibra (celulose)	5,00	5,00	3,25	2,43	2,11
Mix minerais	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Mix vitaminas	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
L-cistina	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido de milho	47,91	59,75	49,10	46,87	45,88
Total (g)	100	100	100	100	100
DC (kcal.g ⁻¹)	3,95	3,95	3,90	3,87	3,85

DC: densidade calórica; pureza da caseína: 80,21%

5.10. Avaliação da saúde intestinal e marcadores metabólicos

5.10.1. Animais e manutenção

A avaliação da saúde intestinal e dos marcadores metabólicos foi realizada utilizando os dados obtidos a partir de quatro grupos de animais (n=8), sendo eles: AIN-93G, GP, GPFS e FS, durante os 30 dias de experimento. Foram realizadas análises de umidade e pH das fezes, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), coloração e consistência das fezes, histomorfometria do cólon, parâmetros bioquímicos (glicose, colesterol total, colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL), colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL), atividade da aspartato aminotransferase (AST), atividade da alanina aminotransferase (ALT), triglicérides, creatinina, ureia e ácido úrico), perfil antioxidante e histologia do fígado.

5.11. Avaliação da qualidade proteica

5.11.1. Animais e manutenção

Os mesmos grupos, com um acréscimo do grupo controle aprotéico, somando, assim, quarenta animais, foram avaliados durante as duas primeiras semanas do experimento, de acordo com o peso corporal e o consumo alimentar dos animais para avaliação dos índices de qualidade proteica, sendo eles: digestibilidade verdadeira (DV), coeficiente de eficiência proteica (PER) e a razão proteica líquida (NPR).

5.12. Dados murinométricos

Para determinação do ganho de peso dos animais, foi realizado o acompanhamento por meio da pesagem semanal utilizando uma balança eletrônica digital (Marte, Brasil), e cálculo da diferença entre o peso final e o peso inicial de cada animal. Além disso, o consumo alimentar também foi avaliado semanalmente, levando em consideração a diferença entre a quantidade de dieta ofertada e a quantidade remanescente nos comedouros, somada às sobras no fundo da gaiola e jornais. O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi avaliado segundo a equação: $CEA = \text{ganho de peso (g)} / \text{ingestão alimentar (g)}$.

5.13. Eutanásia

Ao fim de 30 dias, os animais foram eutanasiados por uma equipe treinada, em ambiente tranquilo e adequado, longe da sala de experimentação. Após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com isoflurano a 3% (Isoforine[®], Cristália), utilizando circuito simples com fluxômetro, acoplado a um cilindro de oxigênio. Os animais foram acondicionados

individualmente em caixa vedada transparente para saturação do anestésico, acarretando assim, os efeitos da sedação e anestesia profunda. Foram avaliados parâmetros fisiológicos e reflexos para averiguação do grau de sensibilidade da anestesia para que os animais fossem, em seguida, eutanasiados por punção cardíaca. Todo procedimento foi feito com objetivo de favorecer uma morte humanitária dos animais (RN nº37, 2018). O sangue foi coletado por punção cardíaca e armazenado em tubos com gel separador contendo ativador de coágulo (soro), posteriormente centrifugados a 3000 rpm, a 4°C, por 10 minutos (centrífuga Thermo Scientific, Megafuge 11R, Alemanha) para separação do plasma e obtenção do soro, sendo o mesmo armazenado a -80 °C para análises posteriores. O fígado e cólon foram retirados, pesados, congelados e/ou armazenados em Formalina de Carson para posteriores análises histológicas e de marcadores oxidativos. Além disso, outros órgãos como cérebro, rins e duodeno também foram retirados e congelados e/ou armazenados em Formalina de Carson para possíveis posteriores análises. O ceco foi retirado, pesado cheio, posteriormente o seu conteúdo foi retirado e armazenado em ultra freezer a – 80 °C e o ceco, agora vazio, foi novamente pesado e descartado.

5.14. Cálculo dos índices

A avaliação da qualidade proteica foi determinada pelos índices de coeficiente de eficiência proteica (PER) (AOAC, 1975), razão proteica líquida (NPR) e digestibilidade verdadeira (DV) (Bender e Doell, 1957).

O método de cálculo do Coeficiente de Eficiência Proteica (PER) (Hegsted, 1977) mede a razão entre o ganho de peso (g) e a ingestão de proteína por meio da equação:

$$PER = \frac{GP (g)}{PI (g)}$$

Onde: GP = ganho de peso do grupo teste e PI = proteína consumida pelo grupo teste.

A Razão Proteica Líquida (NPR) foi determinada no 14º dia de experimento, considerando o ganho de peso do grupo teste mais a perda de peso do grupo controle negativo, com dieta aprotéica, quanto ao consumo de proteína dos grupos teste, seguindo o método de Bender e Doell (1957):

$$NPR = \frac{\text{ganho de peso do grupo experimental} + \text{perda de peso grupo aprotéico}}{\text{proteína consumida pelo grupo experimental}}$$

Para a determinação da digestibilidade, as dietas foram marcadas com corante carmin (100 mg.100 g⁻¹) e as fezes marcadas foram coletadas por um período de 4 dias. As fezes coletadas foram armazenadas em recipientes individuais e mantidas sob refrigeração. O teor proteico das dietas e do nitrogênio fecal foram determinados pelo método Kjeldahl (AOAC, 2019). O teor de nitrogênio das fezes obtido foi utilizado para o cálculo de digestibilidade verdadeira, de acordo com a seguinte fórmula (Bender e Doell, 1957; Yildiz, 2010):

$$DV (\%) = \frac{I - (F - FK)}{I \times 100}$$

Onde: DV = digestibilidade verdadeira; I = nitrogênio ingerido pelo grupo com dieta teste; F = nitrogênio fecal do grupo com dieta teste; e FK = nitrogênio fecal do grupo com dieta aprroteica.

5.15. Balanço oxidativo – avaliação do perfil antioxidante

O balanço oxidativo foi avaliado por meio da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona-S-transferase (GST) e por meio da quantificação dos produtos da oxidação malondialdeído (MDA), óxido nítrico (ON) e proteína carbonilada (PCN), no Laboratório de Patologia Experimental (DBA/UFV).

5.15.1. Preparação do homogenato

Para se obter um homogeneizado do fígado, 150 mg de tecido foram macerados e acrescidos de 1500 µL de tampão de fosfato (50 mM). As amostras foram centrifugadas a 12000g e 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -80°C para as análises de MDA, ON, CAT, SOD, GST e proteínas totais. O pellet formado foi utilizado para quantificação da PCN. Os dados foram normalizados de acordo com os níveis de proteína total no sobrenadante.

5.15.2. Quantificação de proteínas totais

A quantidade de proteínas presentes no tecido utilizados nas análises de TBARS, CAT, SOD e GST foi mensurada segundo metodologia de Lowry et al. (1951).

Para a análise, foi construída uma curva analítica com solução de albumina de soro bovino (BSA), sendo o primeiro ponto feito com uma solução de 3mg/mL de BSA e os outros pontos a partir de diluição seriada da solução-mãe (Lowry et al., 1951).

A análise foi realizada em uma placa de 96 poços e em um ambiente escuro, onde foram pipetadas 20 µL de cada amostra (sobrenadante) em duplicata, 20 µL de cada ponto da curva

em duplicata e 20 μL de água destilada para o branco. Em seguida, foram pipetados 200 μL da solução ABC (Solução A: Na_2CO_3 (carbonato de sódio) e NaOH (hidróxido de sódio); Solução B: CuSO_4 (sulfato de cobre); Solução C: tartarato de sódio e potássio) em todos os poços e aguardado o período de 10 minutos.

Decorrido esse tempo, foram pipetados 20 μL da solução Folin-Ciocalteu (1:2) em todos os poços e a placa foi incubada por 30 minutos (Lowry et al., 1951). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (ThermoScientific[®], modelo Multiskan GO, Finlândia) a 700 nm.

5.15.3. Atividade da enzima catalase (CAT)

A determinação da atividade da enzima catalase (CAT) baseia-se na sua capacidade de clivar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por Rocha (2020). Para determinar a atividade da CAT, preparou-se uma curva analítica a partir de diluições seriadas do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com tampão fosfato de sódio e potássio; esperou-se 3 minutos e adicionou-se solução de molibdato de amônia para parar a reação. Para o branco, foram pipetados 100 μL de tampão fosfato de sódio e potássio e 150 μL de molibdato de amônia.

Neste protocolo, foram montadas duas placas de 96 poços, sendo uma referente ao controle e a outra ao teste. Na placa controle, foram pipetados 5 μL de cada amostra, 100 μL de tampão fosfato de sódio e potássio e 150 μL de molibdato de amônia em todos os poços. Já na placa teste, foram pipetados 5 μL da amostra, 100 μL de H_2O_2 , cronometrados 3 minutos, e adicionados 150 μL de molibdato de amônia (Rocha, 2020). A absorbância foi determinada a 370 nm em espectrofotômetro (ThermoScientific[®], modelo Multiskan GO, Finlândia). A concentração da enzima foi expressa em U de catalase/mg de proteína da amostra (Rocha, 2020).

5.15.4. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD é determinada a partir de sua habilidade de eliminar o radical livre superóxido e, conseqüentemente, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol (Sigma Aldrich[®], Japão) (Dieterich et al., 2000). Para isso, foram pipetados 30 μL de cada amostra em placa de 96 poços, 45 μL de tampão 8,0 no poço destinado ao branco, e 30 μL de tampão pH 8,0 no poço destinado ao padrão. Em seguida, foram adicionados 99 μL de tampão pH 8,0 em

todos os poços, 6 µL de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2 il)-2,5-diphenyltetrazolium] (MTT), e 15 µL de pirogalol em todos os poços, exceto no branco.

Feito isso, as amostras, padrão e branco foram incubados a 40°C por 10 minutos. Após incubação, foi pipetado 150 µL de DMSO em todos os poços. A medição da absorbância e a leitura foi realizada feita em espectrofotômetro (ThermoScientific®, modelo Multiskan GO, Finlândia) a 570 nm. A porcentagem de inibição da auto-oxidação do pirogalol pela amostra é expressa em unidades de inibição por mg de proteína.

5.15.5. Atividade da glutationa-S-transferase (GST)

A atividade da glutationa-S-transferase (GST) foi determinada segundo Habig et al. (2002). O método se baseia na habilidade da GST de metabolizar o 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB), conjugado com a glutationa reduzida (GSH). Assim, após centrifugação do homogeneizado, foi acrescentado o CDNB (Sigma Aldrich®, EUA) e a glutationa reduzida (GSH) (Sigma Aldrich®, EUA). O espectrofotômetro foi zerado com tampão 7,0, e realizada a leitura do branco (980 µL de tampão 7,0 + 10 µL de CDNB + 10 µL de GSH), nos tempos 0, 30, 60 e 90, em triplicata. Para as amostras, foram adicionados na cubeta 970 µL de tampão 7,0, 10 µL de CDNB, 10 µL de amostra, e 10 µL de GSH, e lidas nos tempos 0, 30, 60 e 90, em triplicata. As absorbâncias foram determinadas a 340 nm em espectrofotômetro (ThermoScientific®, modelo Evolution 60S) e expressa em unidades de GSH por mL de amostra (Habig e Jakoby, 1981).

5.15.6. Malondialdeído (MDA)

A medição dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é baseada na capacidade do malondialdeído (MDA) de, quando aquecido com o ácido tiobarbitúrico, em condições ácidas, formar um produto de coloração rosa que pode ser quantificado por espectrofotometria. Dessa forma, após centrifugação do homogenato, foi adicionada a solução que contém ácido tricloroacético (Sigma Aldrich®, Brasil) e tiobarbitúrico (Merck®, Alemanha) (solução de TBARS) ao sobrenadante resultante.

A concentração de MDA foi determinada usando a curva analítica de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMPO). Para isso, foi feita a solução de TMPO 10 mM (16,45 µL da solução original + 10 mL de água destilada) e essa foi diluída 1/500 v/v (20 µL da solução de TMPO 10 mM + 10 mL de água destilada, concentração final: 20 µM) (Wallin et al., 1993). A curva analítica foi feita a partir das seguintes diluições, em *eppendorf*:

Quadro 2 – Diluições para construção da curva analítica

Curva (μM)	P1 (0)	P2 (1,25)	P3 (2,5)	P4 (5,0)	P5 (10,0)	P6 (15,0)	P7 (20,0)
Solução TMPO (μL)	0	12,5	25	50	100	150	200
Água (μL)	200	187,5	175	150	100	50	0

Foram identificados *ependorfs* para cada amostra, ponto da curva e branco (tampão fosfato). Nos *ependorfs* da amostra, foram adicionados 200 μL do sobrenadante de cada amostra e deixado no gelo. Em seguida, foram adicionados 400 μL solução TBARS (HCL 0,25M + TCA (ácido tricloroacético) + TBA (Ácido 2-tiobarbitúrico)) em todos os *ependorfs*, inclusive na curva, e agitado no vórtex por 10 segundos.

Feito isso, os *ependorfs* foram colocados em banho maria a 90°C por 40 minutos e, em seguida, no gelo por 5 minutos. Decorrido o tempo, foram adicionados 600 μL de álcool butílico P.A. (n-butanol), inclusive na curva, agitados em vórtex por 1-2 minutos para inversão de fase (a parte superior fica rósea), e centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm a 15°C. Foram pipetados 200 μL do sobrenadante na placa (parte rosa claro). Após nova centrifugação, o sobrenadante foi utilizado para leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO, Finlândia) a 540 nm e os dados foram expressos em unidades de MDA por mg de proteína totais (Buege, Aust, 1978).

5.15.7. Óxido nítrico (ON)

A produção de ON foi estimada pela produção de NO_2/NO_3 pela reação padrão de Griess (Tsikas, 2007). Para a quantificação, preparou-se uma curva padrão, a partir de diluições seriadas, com concentrações conhecidas de nitrito (6,9 mg para 400 mL de água destilada).

A análise foi realizada em placa de 96 poços, onde foram pipetados 50 μl de cada amostra em duplicata, 50 μl de cada ponto da curva, e 50 μl de tampão fosfato pH 7,0 para o branco. Após, foi preparada a solução AB na proporção 1/1 (Solução A (Sulfanilamida 1% em H_3PO_4 85%); Solução B (Nafitil etileno 0,1% em H_3PO_4 85%)). Foram adicionados 100 μL de solução AB em todos os poços e esperados 10 minutos em abrigo de luz para reação.

A intensidade da cor, que é proporcional à concentração de nitrito, a conversão da absorbância em concentrações micromolares de ON foi obtida a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (0–125 μM) e expressa em concentrações de ON ($\mu\text{M}/\text{L}$). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Cientific) a 570 nm.

5.15.8. Proteína carbonilada (PCN)

A análise de PCN é um método para detectar e quantificar a oxidação de proteínas. A amostra é incubada com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) em ambiente ácido, onde DNPH reage com os grupos carbonila das proteínas oxidadas, formando derivados hidrazona.

Para a análise, foram utilizadas as seguintes soluções: HCl 2M; 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM; TCA 10%; Etanol + Acetato de etila; e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 6%.

Nesta análise, foi utilizado o *pellet* de cada amostra e esse foi ressuspenso com 500 µL de TCA e homogeneizado, e adicionados mais 500 µL de TCA e passado no vórtex. Em seguida, foram separados 2 *eppendorfs* com 500 µL de amostra em cada, sendo um *eppendorf* utilizado como branco e o outro como a amostra. Estes foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos a 15 °C e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 500 µL de DNPH na amostra e 500 µL de HCl no branco, agitados em vórtex, incubados no escuro por 30 minutos, e passados no vórtex no minuto 15 e 30 (Levine et al., 1990).

Os *eppendorfs* foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos a 15 °C e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 500 µL de TCA em todos os *eppendorfs*, passado no vórtex e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 15 °C, descartando o sobrenadante no final. Em seguida, foram feitas 3 lavagens que consistiram em adicionar 1 mL de acetato + etanol, passar no vórtex, centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos a 15 °C e descartar sobrenadante. Após as lavagens, foram adicionados 1 mL da solução de SDS em todos *eppendorfs*, colocados em banho a 32°C por 30 minutos, passado em vórtex e centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos a 15°C. Por fim, foram pipetados 200 µL na placa de 96 poços (Levine et al., 1990).

A leitura foi realizada em espectrofotômetro (ThermoScientific®, modelo Multiskan GO, Finlândia) a 370 nm, utilizando um ensaio de controle para estabelecer a linha de base. Comparando a absorbância com um padrão conhecido, calculou-se a quantidade de proteínas carboniladas em termos de nmol de carbonilas por mg de proteína totais (Levine et al., 1990).

5.16. Análise de variáveis bioquímicas

As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca e colocadas em tubos para coleta de sangue e, em seguida, centrifugados (centrífuga Thermo Scientific, Megafuge 11R, Alemanha) a 3000 rpm por 10 min a 4 °C. Após a centrifugação, o soro e o plasma foram coletados e as amostras encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde (LACDSA) localizado na Universidade Federal de Viçosa, onde foram realizadas as análises.

Os tubos para separação do plasma sanguíneo continham gel separador contendo ativador de coágulo (soro). Foram realizadas as análises dos seguintes parâmetros bioquímicos: glicose, colesterol total, colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL), colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL), atividade da aspartato aminotransferase (AST), atividade da alanina aminotransferase (ALT), triglicerídeos, creatinina, ureia e ácido úrico.

5.17. Análises histomorfométricas

Após a pesagem, parte dos órgãos coletados (fígado e cólon) foi armazenada em frascos contendo Formalina de Carson, por 24 horas. A formalina foi substituída por etanol 70% (v/v) e, posteriormente, os órgãos foram preparados para a inclusão em parafina. A desidratação foi realizada em série etanólica crescente (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), com trocas a cada 60 minutos, passando por trocas de 60 minutos em xileno (I, II e III), procedendo-se ao final da série a inclusão em parafina, em três banhos de 60 minutos cada (parafina I, II e III). Ao final da inclusão do terceiro banho em parafina III, os órgãos são deixados em *overnight* e, no dia seguinte, incluídos nos blocos para posterior corte dos fragmentos histológicos.

Posteriormente, foram obtidos fragmentos histológicos semi-seriados de 5 µm de espessura utilizando-se micrótomo rotativo (Leica, RM2245, Alemanha) usando navalhas de aço inoxidável. As preparações foram coradas com Hematoxilina-Eosina (H&E) para o fígado e cólon e Picro Sirius para o fígado, as lamínulas foram fixadas com Entellan[®] (Merck, Alemanha).

A captura das imagens foi realizada utilizando um fotomicroscópio (Olympus AX 70, Japão) com sistema de captura de imagem acoplado (Zeiss, AxioCam HRc, Alemanha), utilizando objetiva de 10X, 20X e 40x.

5.18. Análise da saúde intestinal

5.18.1. Umidade fecal

O teor de umidade das fezes foi coletado ao final do experimento e determinado pelo método gravimétrico segundo (AOAC 2019). As amostras foram secas em estufa a 105°C por 24 h.

5.18.2. pH do conteúdo cecal

Para a análise do pH cecal, cerca de 400 mg do conteúdo do ceco foram homogeneizados em 4 mL de água destilada, com auxílio de vórtex para agitação. Posteriormente, foi inserido o

eletrodo de vidro do pHmetro (Bel Engineering®) para medição do pH. As medidas foram realizadas em duplicata, segundo a metodologia de Grancieri et al., (2017).

5.18.3. Conteúdo de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

A análise para determinar o conteúdo do AGCC seguiu a metodologia proposta por Siegfried e Ruckemann (1984), com modificações. As amostras de fezes do ceco foram retiradas do *ultrafreezer* a -80° e encaminhadas, no gelo, ao Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios e Microbiota Animal (BIOTAN) para posterior realização das análises.

Amostras de 100 mg de fezes de ceco foram homogeneizadas em 300 µL de água Milli-Q, seguindo um protocolo de agitação em vórtice. Em seguida, as amostras passaram por centrifugação a 12.000 rpm, por 10 min. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, receberam a adição de 300 µL hidróxido de cálcio (CHS) e 150 µL de sulfato cúprico (CRS) e posteriormente agitados vigorosamente. As amostras foram congeladas e depois descongeladas à temperatura ambiente para centrifugação. O sobrenadante foi adicionado com ácido sulfúrico concentrado e então congelado. Em seguida, as amostras passaram por descongelamento e recongelamento para serem novamente descongeladas para centrifugação a 12.000 rpm, por 10 min. O sobrenadante foi transferido para frascos para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os AGCC foram determinados em um aparelho Dionex Ultimate 3000 Dual detector HPLC (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) equipado com um detector de índice de refração Shodex RI-101, usando uma coluna Bio-Rad HPX-87H, 300 mm × 4,6 mm, mantida a 40°C. Ácido sulfúrico (H₂SO₄, 5 mM) com vazão de 0,7 mL min⁻¹ e volume de injeção 20 µL foi utilizado como fase móvel. Os ácidos acético, propiônico e butírico foram utilizados para preparar as soluções estoque dos padrões. Os AGCC foram preparados com uma concentração final de 10 mmol/L.

5.18.4. Histomorfometria do cólon

A realização das lâminas do cólon seguiu os passos citados no item 5.17. Fragmentos histológicos semi-seriados de 5 µm de espessura do cólon ascendente foram obtidos em micrótomo rotativo semi-automático (Leica, Brasil) e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (H&E). Para medir a profundidade e espessura das criptas, espessura das camadas musculares circulares e longitudinais, mucosa e submucosa e a área das células calciformes foram selecionados 10 campos aleatórios por animal. As lâminas foram examinadas em

fotomicroscópio AX70 (Olympus, Japão), utilizando objetivas de 10X e 40X. O sistema de software ImagePro-Plus®, versão 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD, EUA) foi usado para processar as imagens.

5.18.5. Coloração e consistência das fezes

A consistência e coloração das fezes foram avaliadas utilizando a Escala de Bristol, por meio de observação macroscópica, adaptando a classificação proposta por Hammer e Phillips (1993), seguindo uma escala descritiva e visual que descreve sete tipos de fezes.

Os tipos de consistências das fezes estão descritos na Figura 2. Quanto à coloração, adotou-se a seguinte classificação: tipo 1: fezes de coloração marrom-escuras; tipo 2: fezes de coloração marrom-claras; tipo 3: fezes de coloração amarelada; tipo 4: fezes descoradas; tipo 5: fezes de coloração preta; tipo 6: fezes de coloração vermelha; e tipo 7: fezes de coloração esverdeada.

A Escala de Bristol para Consistência das Fezes foi utilizada para obtenção de informações sobre o trânsito e funcionamento intestinal, sendo categorizadas em: ritmo intestinal lento (para os tipos 1 e 2), ritmo intestinal adequado (tipos 3 e 4) e ritmo intestinal rápido (tipos 5, 6 e 7) (Martínez & Azevedo, 2012).

Figura 2 – Escala de Bristol para consistência das fezes, adaptado de Martínez & Azevedo (2012)

Tipo	Imagem	Descrição
1		Grânulos duros e separados como nozes (difíceis de evacuar)
2		Em forma de salsicha, mas granuladas.
3		Semelhante a uma salsicha, mas com rachadura em sua superfície.
4		Como salsicha ou cobra, lisa e macia.
5		Gotas macias com bordas bem demarcadas (fáceis de evacuar)
6		Pedacos macios com bordas irregulares, fezes pastosas.
7		Líquidas, sem pedaços sólidos, totalmente líquidas

5.19. Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações intragrupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA *one-way*) seguida pelo teste post-hoc Newman-Keuls, sendo adotado como nível de significância estatística um $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média seguida do desvio padrão (média \pm DP). O processamento, análise estatística dos dados e construção dos gráficos foram realizados utilizando o *software* foi utilizado o *software* GraphPad Prism, versão 8 para Windows (GraphPad Prism Inc, EUA).

5.20. Aspectos éticos

O projeto foi aceito pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Viçosa (UFV) pelo processo nº 29/2021 (Anexo 1), estando em conformidade com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia estabelecidas pelo CONCEA/MCTIC. Todos os procedimentos experimentais com os animais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos da experimentação animal.

6. RESULTADOS

Ao final das primeiras duas semanas de experimento, a ingestão alimentar (IA) foi maior no grupo GP ($p < 0,05$). Entretanto, o grupo AIN-93G apresentou o maior ganho de peso, seguido pelo grupo GP ($p < 0,05$). Os grupos teste não diferiram entre si quanto aos índices de coeficiente de eficiência alimentar (CEA), coeficiente de eficiência proteica (PER) e razão proteica líquida (NPR) ($p > 0,05$), entretanto, foram inferiores ao grupo controle ($p < 0,05$).

O peso seco das fezes dos grupos que consumiram grilo preto em pó isoladamente (GP) ou associado à farinha de soja (GPFS) apresentou similaridade ao grupo controle (AIN-93G) e foi maior que o grupo FS ($p < 0,05$). Os grupos teste apresentaram maior nível de excreção fecal de nitrogênio quando comparados ao grupo AIN-93G ($p < 0,05$), sendo o grupo GP o mais alto, seguido de GPFS e FS, respectivamente.

Os grupos GP e GPFS apresentaram digestibilidade verdadeira (DV) semelhante ($p > 0,05$), e foram menores quando comparados ao grupo AIN-93G e FS ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeito do grilo preto em pó associado à farinha de soja no peso corporal, consumo alimentar, CEA, peso seco das fezes e índices de qualidade proteica em ratos Wistar, após um período de 14 dias de experimento

Variável	Grupos			
	AIN-93G	GP	GPFS	FS
IA (g)	155,74 ± 11,44 ^b	194,01 ± 18,68 ^a	157,62 ± 14,18 ^b	147,77 ± 16,13 ^b
Ganho de peso (g)	64,85 ± 7,12 ^a	49,95 ± 8,66 ^b	40,09 ± 5,14 ^c	33,22 ± 6,30 ^c
CEA (%)	41,68 ± 3,90 ^a	25,60 ± 2,49 ^b	25,41 ± 2,00 ^b	22,35 ± 2,62 ^b
PER	4,39 ± 0,41 ^a	2,69 ± 0,26 ^b	2,68 ± 0,21 ^b	2,35 ± 0,28 ^b
NPR	5,20 ± 0,42 ^a	3,35 ± 0,22 ^b	3,23 ± 0,56 ^b	3,21 ± 0,24 ^b
Peso seco fecal (g)	2,66 ± 0,96 ^{ab}	3,45 ± 0,61 ^a	2,92 ± 0,39 ^a	2,11 ± 0,46 ^b
gN total de fezes	0,04 ± 0,01 ^d	0,17 ± 0,03 ^a	0,13 ± 0,02 ^b	0,09 ± 0,02 ^c
DV (%)	98,70 ± 0,59 ^a	94,59 ± 1,26 ^c	94,84 ± 0,78 ^c	96,34 ± 0,86 ^b

Dados expressos em média seguida de desvio padrão. n = 8 animais por grupo. Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha (a – d) indicam diferença significativa pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade. AIN-93G: dieta padrão; GP: 100% proteína advinda do grilo preto em pó; GPFS: proteína advinda de 30% grilo preto em pó associada à 70% farinha de soja; FS: 100% proteína advinda da farinha de soja; IA: ingestão alimentar; CEA: coeficiente de eficiência alimentar; PER: razão de eficiência proteica; NPR: razão proteica líquida; N: nitrogênio; DV: digestibilidade verdadeira.

O grilo preto em pó apresentou como aminoácidos limitantes a lisina, treonina, valina, leucina e isoleucina, sendo a lisina o primeiro limitante, com escore químico de 0,49. A farinha de soja também obteve como primeiro aminoácido limitante a lisina (0,67), seguida da valina e leucina.

Observou-se que o grupo GP demonstrou o menor valor de escore de aminoácidos corrigidos pela digestibilidade da proteína (PDCAAS) (46,47%), seguido do grupo GPFS (58,24%) e FS (64,23%), sendo o aminoácido limitante primário para todos os grupos teste a lisina (Tabela 4).

Tabela 4 – Perfil de aminoácidos essenciais, escore químico e PDCAAS de acordo com o padrão FAO (2013) para o grilo preto em pó, associado à farinha de soja

Aminoácidos	(mg/g de proteína)			Padrão FAO (2013)	AA-score			PDCAAS		
	GP	GPFS	FS		GP	GPFS	FS	GP	GPFS	FS
<i>Indispensáveis</i>										
Triptofano	ND	ND	10,00	8,50	ND	ND	1,18	-	-	-
Lisina	28,00	35,00	38,00	57,00	0,49	0,61	0,67	46,35	58,24	64,23
Histidina	21,00	23,10	24,00	20,00	1,05	1,16	1,20	-	-	-
Treonina	28,00	32,20	34,00	31,00	0,90	1,04	1,10	-	-	-
Metionina + Cisteína	29,00	31,80	33,00	27,00	1,07	1,18	1,22	-	-	-
Valina	35,00	34,30	34,00	43,00	0,81	0,80	0,79	-	-	-
Isoleucina	24,00	29,60	32,00	32,00	0,75	0,93	1,00	-	-	-
Leucina	51,00	55,90	58,00	66,00	0,77	0,85	0,88	-	-	-
Fenilalanina + Tirosina	74,00	81,70	85,00	52,00	1,42	1,57	1,63	-	-	-

ND: Não determinado; AA-score (quociente da divisão entre mg de aa por g de proteína Caseína, GP, FS ou GPFS e mg de aa por g de proteína padrão, FAO); Padrão FAO (2013) ((Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), padrão teórico para aminoácidos essenciais para crianças de 0 a 6 meses); PDCAAS: Índice de aminoácido corrigido pela digestibilidade proteica (Primeiro aminoácido limitante (colunas de pontuação AA) × digestibilidade verdadeira do experimento com ratos). AIN-93G: dieta padrão; GP: 100% proteína advinda do grilo preto em pó; GPFS: proteína advinda de 30% grilo preto em pó associada à 70% farinha de soja; FS: 100% proteína advinda da farinha de soja. Digestibilidade Verdadeira: AIN-93G = 98,70; GP = 94,59; GPFS = 94,84; e FS = 96,34.

Não houve diferença entre os grupos quanto ao peso corporal inicial dos animais ($p > 0,05$), o que indica uma randomização eficaz. Ao final dos trinta dias de experimento, o maior ganho de peso foi no grupo AIN-93G ($p < 0,05$), seguido pelos grupos GP, GPFS, e menor ganho de peso no grupo FS (Tabela 5).

Tabela 5 – Efeito do consumo de grilo preto em pó associado à farinha de soja no peso corporal de ratos Wistar, após um período de 30 dias

Variáveis (g)	AIN-93G	GP	GSFS	FS
Peso inicial	56,90±4,39 ^a	56,93±4,41 ^a	56,79±4,0 ^a	56,84±4,06 ^a
Peso final	211,29±17,54 ^a	182,61±14,41 ^{ab}	156,21±10,44 ^{bc}	138,72±11,52 ^c
Ganho de peso	154,40±17,42 ^a	99,28±9,96 ^b	49,95±8,66 ^c	33,22±6,30 ^d

Dados expressos em média seguida de desvio padrão. n = 8 animais por grupo. Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha (a – d) indicam diferença significativa pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade. AIN-93G: dieta padrão; GP: 100% proteína advinda do grilo preto em pó; GPFS: proteína advinda de 30% grilo preto em pó associada à 70% farinha de soja; FS: 100% proteína advinda da farinha de soja.

Os pontos sobre infiltrado inflamatório não diferiram entre os grupos teste ($p > 0,05$), entretanto, o grupo GP apresentou mais pontos sobre infiltrado inflamatório quando comparado ao grupo controle (AIN-93G) ($p < 0,05$). Semelhantemente, o grupo GP também foi o que

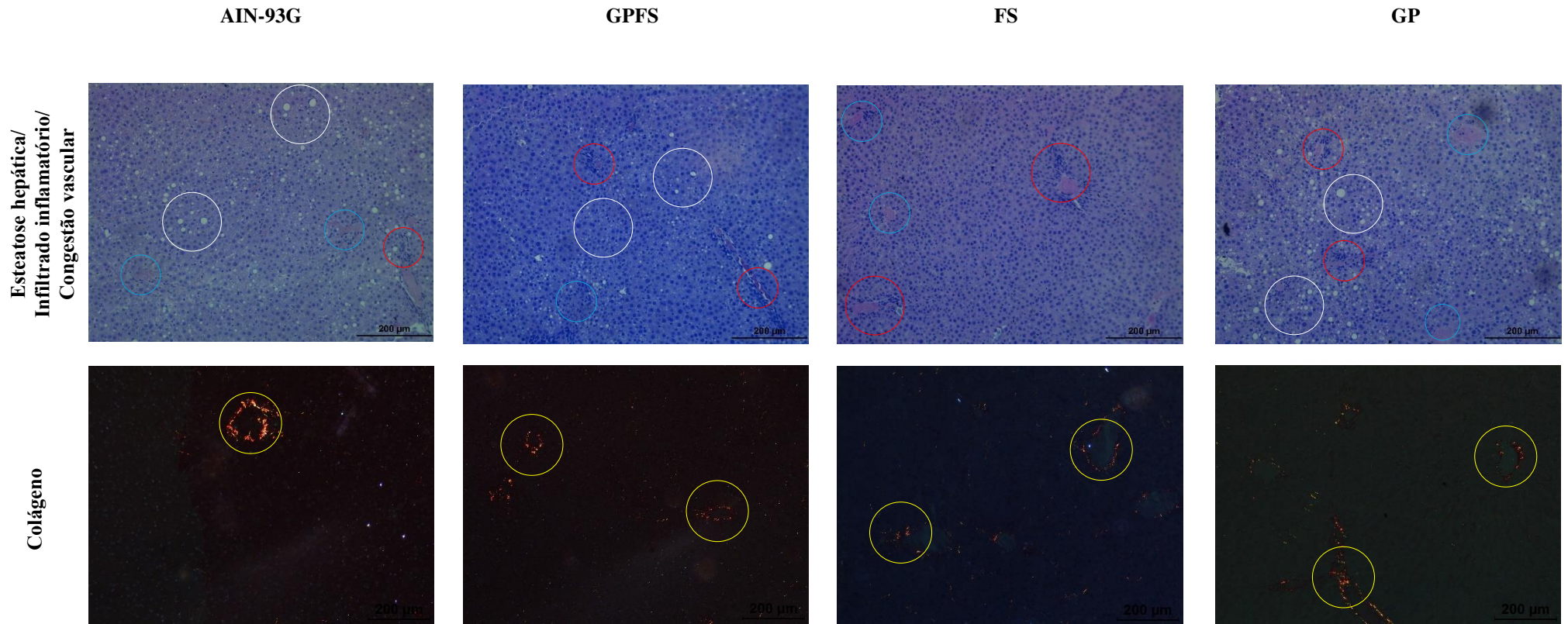
apresentou maior pontos sobre esteatose hepática ($p < 0,05$), enquanto os grupos GPFS e FS não diferiram do grupo controle ($p > 0,05$). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos experimentais quanto aos pontos sobre congestão vascular e colágeno ($p > 0,05$) (Tabela 6, Figura 3).

Tabela 6 – Histologia do fígado de ratos Wistar submetidos à dieta contendo grilo preto em pó associado à farinha de soja, após 30 dias

Variáveis	Grupos			
	AIN-93G	GP	GPFS	FS
Pontos sobre infiltrado inflamatório	2,59±1,23 ^b	5,65±2,54 ^a	3,40±1,34 ^{ab}	4,45±1,30 ^{ab}
Pontos sobre esteatose hepática	4,31±3,02 ^b	8,73±5,05 ^a	2,09±2,01 ^b	0,98±0,84 ^b
Pontos sobre congestão vascular	2,95±1,57 ^a	2,90±0,53 ^a	3,05±1,03 ^a	2,83±1,27 ^a
Pontos sobre colágeno	1,51±0,33 ^a	0,88±0,42 ^a	1,17±0,37 ^a	0,81±0,40 ^a

Dados expressos em média seguida de desvio padrão. $n = 8$ animais por grupo. Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade. AIN-93G: dieta padrão; GP: 100% proteína advinda do grilo preto em pó; GPFS: proteína advinda de 30% grilo preto em pó associada à 70% farinha de soja; FS: 100% proteína advinda da farinha de soja.

Figura 3 – Representações da morfologia do fígado de cada grupo experimental, letras de A – D, coloração com Eosina-Hematoxilina (H&E) e letras de E – H, coloração com Picro Sirius

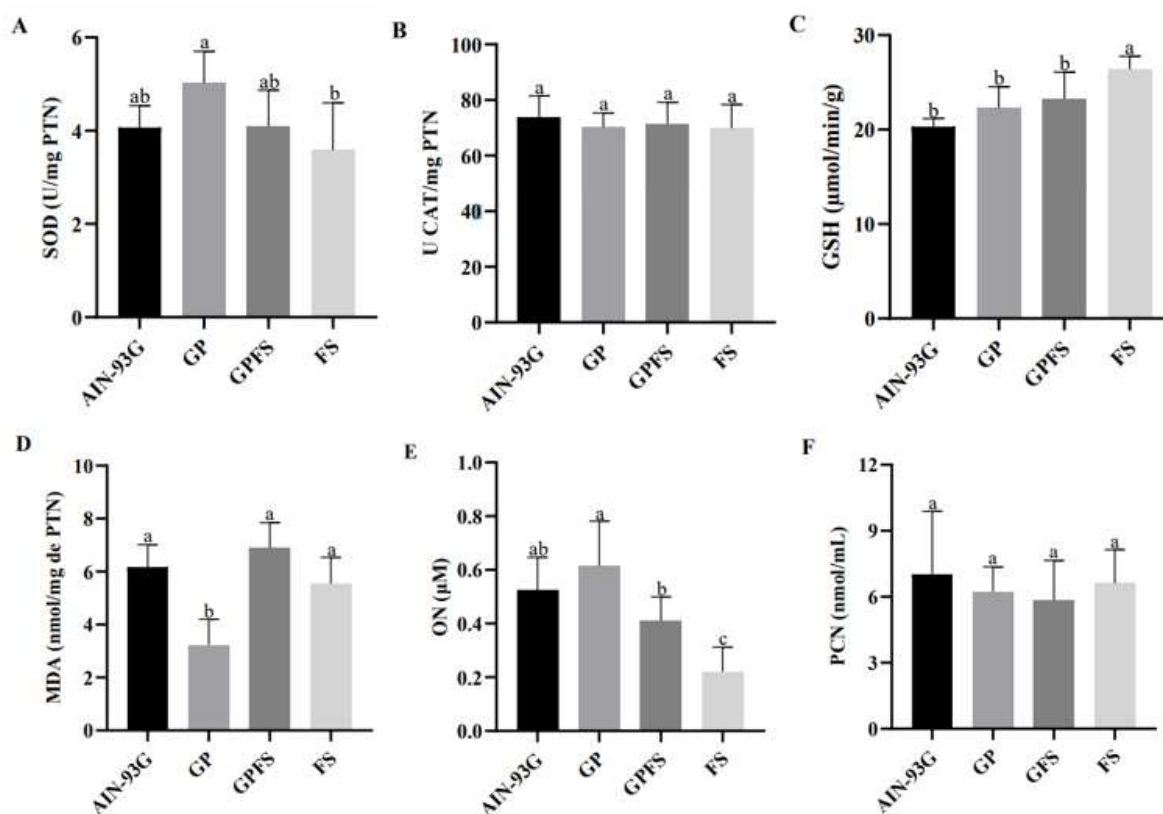


Os círculos vermelhos indicam pontos sobre infiltrado inflamatório, os círculos brancos pontos sobre esteatose hepática e os círculos azuis indicam pontos sobre congestão vascular. Os círculos amarelos indicam formação de colágeno. Barra de escala = 200 μ m. AIN-93G: grupo que recebeu dieta padrão; GP: grupo 100% proteína advinda do grilo preto em pó; GPFS: grupo mistura, proteína advinda de 30% grilo preto em pó e 70% farinha de soja; e FS: grupo 100% proteína advinda da farinha de soja.

Os grupos contendo grilo em pó (GP e GPFS) apresentaram atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutiona-S-transferase (GST) semelhantes ao grupo controle AIN-93G ($p > 0,05$) (Figura 4-A e 4-C), embora para GST, os animais do grupo FS apresentaram maior atividade quando comparados aos demais grupos ($p < 0,05$). Todos os grupos foram semelhantes quanto a enzima catalase (CAT) ($p > 0,05$) (Figura 4-B).

Embora o grupo GP tenha apresentado redução de malondialdeído (MDA) ($p < 0,05$), o mesmo grupo aumentou a produção de óxido nítrico (ON), quando comparado aos demais grupos teste ($p < 0,05$) (Figura 4-D e E). O grupo GPFS foi semelhante ao controle para os três marcadores de estresse oxidativo, MDA, ON e proteína carbonilada (PCN) ($p > 0,05$) (Figura 4-D, E e F). Além disso, o grupo FS diminuiu a produção de ON ($p < 0,05$), quando comparados aos demais (Figura 4-E). Todos os grupos foram semelhantes quanto a PCN ($p > 0,05$) (Figura 4-F).

Figura 4 – Análises do balanço oxidativo no fígado



AIN-93G: grupo que recebeu dieta padrão; GP: grupo 100% proteína advinda do grilo preto em pó; GPFS: grupo mistura, proteína advinda de 30% grilo preto em pó e 70% farinha de soja; e FS: grupo 100% proteína advinda da farinha de soja. Os gráficos mostram (A) Superóxido dismutase, (B) Catalase, (C) Glutaciona S-transferase, (D) Malondialdeído, (E) Óxido nítrico e (F) Proteína carbonilada. Letras minúsculas diferentes (a – c) indicam diferenças entre os grupos, de acordo com a ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

O grupo GP apresentou redução da glicemia e colesterol total comparado ao controle AIN-93G ($p < 0,05$). Por sua vez, o grupo GPFS também demonstrou redução das concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicerídeos quando comparado aos grupos AIN-93G e FS ($p < 0,05$). Os grupos teste (GP, GPFS e FS) apresentaram redução do colesterol LDL quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$), sem diferirem entre si ($p > 0,05$).

Os animais alimentados com a dieta FS apresentaram aumento da concentração de ureia e creatinina ($p < 0,05$). As concentrações de AST reduziram nos grupos que receberam farinha de soja em sua dieta (GPFS e FS), quando comparadas aos grupos AIN-93G e GP ($p < 0,05$). Já para as concentrações de ALT, ácido úrico, HDL e VLDL, todos os grupos apresentaram concentrações sanguíneas semelhantes ($p > 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Efeito da ingestão de grilo preto em pó associado ou não à farinha de soja sobre variáveis bioquímicas em ratos Wistar, após 30 dias

Parâmetros	Grupos			
	AIN-93G	GP	GPFS	FS
Glicose (mg/dL)	178,4±28,3 ^a	133,2±25,5 ^b	140,6±14,2 ^{ab}	137,8±24,0 ^{ab}
Ureia (mg/dL)	12,2±3,2 ^{bc}	9,5±3,0 ^c	14,8±2,2 ^b	24,0±2,7 ^a
AST (U/L)	96,8±4,5 ^a	106,3±4,0 ^a	85,3±4,9 ^b	79,5±9,2 ^b
ALT (U/L)	20,3±2,1 ^a	23,0±1,8 ^a	22,4±2,5 ^a	23,3±2,8 ^a
Ácido úrico	0,7±0,1 ^a	0,7±0,2 ^a	0,7±0,1 ^a	1,0±0,3 ^a
Creatinina (mg/dL)	0,24±0,1 ^b	0,30±0,1 ^b	0,29±0,0 ^b	0,36±0,1 ^a
Triglicerídeos (mg/dL)	49,8±1,5 ^a	45,0±4,0 ^{ab}	39,5±6,7 ^b	49,8±2,1 ^a
Colesterol total (mg/dL)	71,4±5,3 ^a	56,8±1,7 ^b	60,0±7,4 ^b	72,6±6,4 ^a
HDL (mg/dL)	32,3±2,9 ^a	31,8±2,6 ^a	32,8±4,3 ^a	36,2±1,6 ^a
LDL (mg/dL)	28,2±2,5 ^a	18,8±2,9 ^b	21,3±1,3 ^b	24,0±5,5 ^b
VLDL (mg/dL)	10,7±1,3 ^a	9,4±0,9 ^a	9,0±2,5 ^a	9,6±0,8 ^a

Dados expressos em média seguida de desvio padrão. $n = 8$ animais por grupo. Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha (a – c) indicam diferença significativa pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade. AIN-93G: dieta padrão; GP: 100% proteína advinda do grilo preto em pó; GPFS: proteína advinda de 30% grilo preto em pó associada à 70% farinha de soja; FS: 100% proteína advinda da farinha de soja; AST: aspartato amino transferase; ALT: alanina amino transferase; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade.

O grupo GPFS apresentou maior umidade das fezes quando comparado ao grupo AIN-93G ($p < 0,05$), embora não tenha diferido dos demais grupos teste. Quanto ao pH fecal, não houve diferença entre os grupos experimentais ($p > 0,05$).

Os grupos contendo grilo em pó (GP e GPFS) apresentaram produção de ácido acético e butírico similares ao grupo controle (AIN-93G) ($p > 0,05$), entretanto, o grupo FS apresentou concentrações mais baixas de ácido butírico quando comparado ao controle ($p < 0,05$). Os grupos teste foram semelhantes ($p > 0,05$) quanto à produção de ácido propiônico, porém

menores que o grupo controle ($p < 0,05$). Todos os grupos, entretanto, apresentaram valores semelhantes para as concentrações totais de AGCC ($p > 0,05$) (Tabela 8).

A consistência das fezes não diferiu entre os grupos experimentais ($p > 0,05$), sendo caracterizada na Escala de Bristol como tipo 4 (“semelhante à salsicha ou semelhante à cobra, liso e macio”); no grupo AIN-93G, a consistência das fezes foi caracterizada como tipo 3 (“semelhante a uma salsicha, mas com rachaduras na superfície”). Em relação à coloração das fezes, não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$). Os grupos AIN-93G, GP e FS ficaram entre os termos “fezes marrom-escuras” e “marrom-claras” e o GPFS entre “fezes marrom-claras” e “amareladas (Tabela 8).

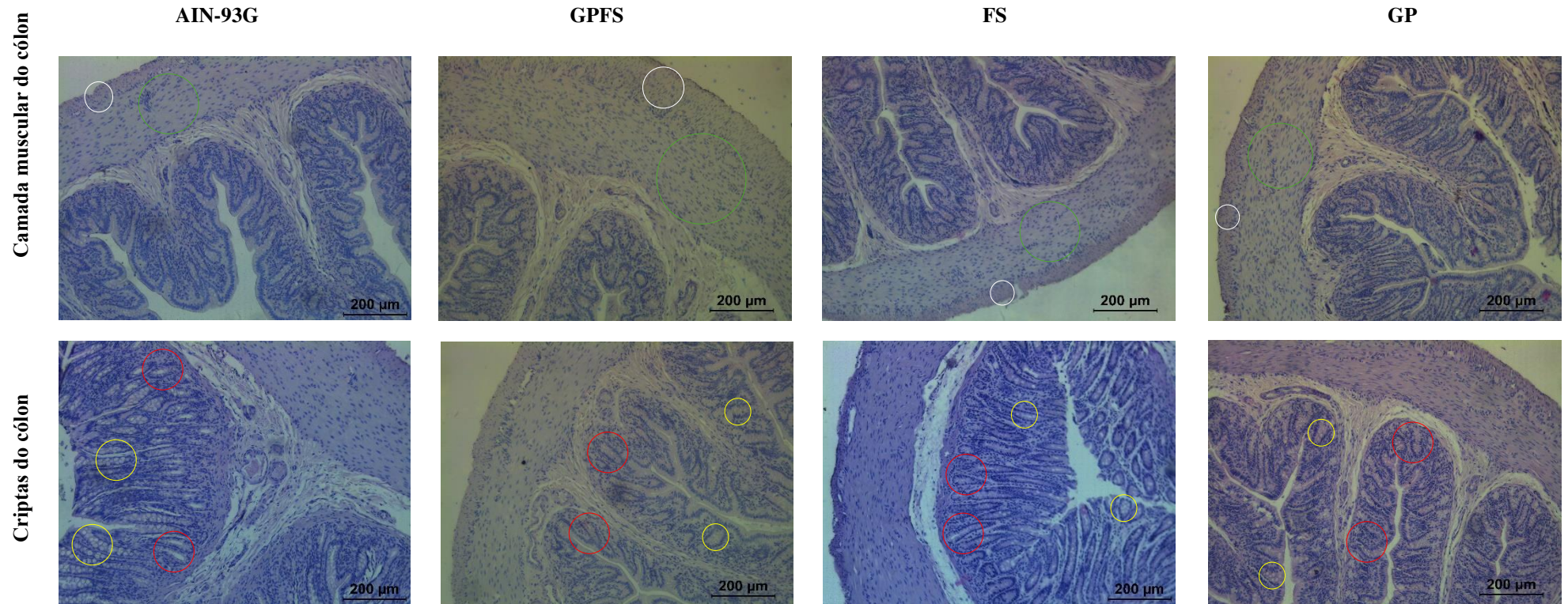
Não houve diferença entre os grupos experimentais quanto aos parâmetros histomorfométricos do cólon (espessura e profundidade das criptas colônicas, espessura da camada mucosa longitudinal e circular e espessura da camada mucosa e submucosa), nem quanto à área das células caliciformes ($p > 0,05$) (Tabela 8, Figura 5).

Tabela 8 – Efeito do grilo em pó associado à farinha de soja na saúde intestinal em ratos Wistar, após 30 dias

Variáveis	Grupos			
	AIN-93G	GP	GPFS	FS
Umidade das fezes	14,76±3,50 ^b	20,34±3,84 ^a	26,23±2,23 ^a	23,31±2,96 ^a
pH das fezes	6,77±0,19 ^a	6,61±0,45 ^a	6,64±0,27 ^a	6,80±0,29 ^a
Ácido graxo de cadeia curta – AGCC (mM):	6,71±2,50 ^a	4,85±1,78 ^a	4,71±1,53 ^a	3,92±1,32 ^a
Ácido acético	4,89±2,49 ^a	3,90±1,12 ^a	3,54±0,87 ^a	3,05±0,63 ^a
Ácido propiônico	1,40±0,47 ^a	0,63±0,10 ^b	0,83±0,23 ^b	0,64±0,05 ^b
Ácido butírico	0,42±0,20 ^a	0,32±0,06 ^a	0,33±0,09 ^a	0,23±0,04 ^a
Coloração das fezes, Escala de Bristol	1,71±0,49 ^a	1,75±0,46 ^a	2,50±2,07 ^a	1,00±0,00 ^a
Consistência das fezes, Escala de Bristol	3,00±0,00 ^a	4,00±0,00 ^a	4,00±0,00 ^a	4,00±0,00 ^a
Espessura da camada muscular circular (µm)	140,53±30,13 ^a	159,83±20,71 ^a	169,55±39,17 ^a	162,44±19,20 ^a
Espessura da camada muscular longitudinal (µm)	48,99±5,93 ^a	45,47±9,64 ^a	54,06±21,41 ^a	42,66±5,81 ^a
Espessura da camada mucosa (µm)	175,90±31,77 ^a	183,48±13,23 ^a	214,75±34,51 ^a	171,35±25,59 ^a
Espessura da camada submucosa (µm)	44,34±15,80 ^a	48,98±6,81 ^a	46,56±20,86 ^a	50,59±12,99 ^a
Profundidade das criptas (µm)	130,69±15,32 ^a	130,22±11,09 ^a	120,46±21,21 ^a	122,97±28,45 ^a
Espessura das criptas (µm)	35,36±3,81 ^a	35,44±2,03 ^a	37,71±3,99 ^a	35,08±1,85 ^a
Número de células caliciformes (por criptas)	19,19±1,83 ^a	18,97±2,48 ^a	19,08±1,36 ^a	18,28±1,52 ^a
Área de células caliciformes nas criptas (µm)	78,69±10,12 ^a	89,40±8,67 ^a	83,49±17,19 ^a	90,81±10,50 ^a

Dados expressos em média seguida de desvio padrão. n = 8 animais por grupo. Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade. AIN-93G: dieta padrão; GP: 100% proteína advinda do grilo preto em pó; GPFS: proteína advinda de 30% grilo preto em pó associada à 70% farinha de soja; FS: 100% proteína advinda da farinha de soja.

Figura 5 – Representações da morfologia do cólon de cada grupo experimental, coloração com Eosina-Hematoxilina (H&E)



Os círculos brancos indicam as camadas musculares circulares e os círculos verdes indicam as camadas musculares longitudinais. Os círculos vermelhos indicam as criptas dentro das vilosidades e os círculos amarelos indicam células caliciformes nas criptas. Barra de escala = 200 µm. Letras A – D representam camada muscular do cólon; letras E – H representam as criptas do cólon. AIN-93G: grupo que recebeu dieta padrão; GP: grupo 100% proteína advinda do grilo preto em pó; GPFS: grupo mistura, proteína advinda de 30% grilo preto em pó e 70% farinha de soja; e FS: grupo 100% proteína advinda da farinha de soja.

7. DISCUSSÃO

O grilo preto (*Gryllus assimilis*) se destaca pelo elevado conteúdo de proteínas e fibra alimentar, principalmente na forma de quitina, reconhecida por seu potencial prebiótico e benefícios para a saúde intestinal (Machado et al., 2019; Young et al., 2020). Por outro lado, a soja (*Glycine max L.*) é conhecida por ter, dentre as fontes de proteína vegetal, o maior conteúdo de proteínas, além de compostos bioativos como isoflavonoides e grande quantidade de fibras solúveis (Achouri et al., 2005; Berno, Lopes & Canniatti-Brazaca, 2008; Toledo et al., 2012). Tendo em vista estas considerações, nosso estudo teve como objetivo investigar os efeitos combinados do grilo preto em pó e da farinha de soja, além do grilo de forma isolada, na qualidade proteica, saúde intestinal e segurança de uso em ratos Wistar.

As análises revelaram que a combinação de grilo preto em pó com a farinha de soja possui uma proteína altamente absorvível e digerível, apesar de seu PER, NPR e DV mais baixos que o grupo controle caseína. Além disso, o consumo dessa combinação apresentou melhorias na resposta inflamatória e nos níveis de esteatose hepática em comparação ao consumo isolado do grilo preto. Observou-se, também, uma melhoria nos marcadores bioquímicos, como colesterol total, LDL e triglicerídeos, além de aumento na umidade das fezes, em relação ao grupo controle. Esses achados ressaltam os benefícios do uso do grilo preto em pó, especialmente quando associado à farinha de soja.

Quando se trata da avaliação da qualidade da proteína, o primeiro fator que reflete a eficiência da utilização proteica da dieta é a digestibilidade (Malla; Nørgaard; Roos, 2023; Pires et al., 2006). A menor digestibilidade verdadeira (DV) observada nos grupos alimentados com o grilo em pó (GP e GPFS) pode estar relacionada a diversos fatores, como a presença de aminoácidos limitantes e o tipo de fibra presente na matriz alimentar comparada ao grupo controle caseína (celulose microcristalina). A quitina presente no exoesqueleto dos insetos é uma substância resistente à digestão em mamíferos e pode interferir na digestão proteica, dificultando a quebra das proteínas, reduzindo, assim, sua digestibilidade (Araújo et al., 2021; Nowakowski et al., 2021).

Geralmente, as proteínas advindas de animais apresentam digestibilidade em torno de 90% a 95%, enquanto a digestibilidade das proteínas de origem vegetal varia entre 80% e 90% (Tirapegui, 2006). O fato de que todos os grupos obtiveram valores de digestibilidade acima de 90% remete a uma boa digestibilidade dos grupos experimentais.

Não houve diferença entre os grupos teste quanto aos valores de PER e NPR, mesmo tendo sido menores que o controle. Entretanto, valores de PER acima de 2,0 indicam que a proteína presente em todos os grupos experimentais é de alta qualidade (Martino, Silva, 2014),

sendo eficientes na promoção do crescimento e manutenção dos animais. Um fator que pode ter contribuído para o resultado inferior de PER nos grupos teste é a presença de aminoácidos limitantes, além de componentes como a quitina nos insetos, ácido fítico e inibidores de tripsina na soja, os quais podem interferir na absorção da proteína (Araújo et al., 2019; Esteves et al., 2017; Mandarinino, 2008; Young et al., 2020).

Apesar de o grupo GP ter registrado uma ingestão alimentar (IA) mais elevada, possivelmente devido à maior palatabilidade da dieta, isso não refletiu em maior ganho de peso em relação ao grupo controle AIN-93G. O maior ganho de peso e o coeficiente de eficiência alimentar (CEA) mais alto nos animais do grupo controle podem ser atribuídos à menor excreção de nitrogênio nas fezes e, conseqüentemente, maior eficiência do alimento consumido no crescimento e desenvolvimento do animal. Nossos resultados diferiram dos achados de Oibiokpa et al. (2018), os quais observaram ganho de peso superior nos animais que consumiram dieta com acréscimo de grilo preto comparado ao grupo caseína.

O primeiro aminoácido limitante do grilo em pó, de acordo com o escore de aminoácidos, foi a lisina, comumente encontrada em leguminosas (Friedman & Brandon, 2001; Kudelka, Kowalska, Popis, 2021; Qin, Wang e Luo, 2022). No entanto, um resultado inesperado foi observado no perfil de aminoácidos da soja UFVTN105 utilizada neste estudo, visto que esta também apresentou a lisina como aminoácido limitante. Isso foi contrário à expectativa de que a adição de farinha de soja ao grilo preto em pó resolveria essa limitação.

Entretanto, a associação do grilo preto em pó com a farinha de soja promoveu pequena melhoria no perfil de aminoácidos essenciais, quando comparado ao grilo em pó de forma isolada. Além disso, a adição de farinha de soja contribuiu para a melhoria da composição nutricional do produto, oferecendo equilíbrio entre macronutrientes e adicionando fibras alimentares que promovem a saúde intestinal, além de promover benefícios adicionais a partir da adição de compostos bioativos, como as isoflavonas, e melhorando a textura, a estrutura do produto final, o que motivou a escolha da soja como complemento (Garcia, et al., 2021; Liu, et al., 2020; Messina et al., 2019; Rodrigues, et al., 2021).

Alimentos com escore de aminoácidos abaixo de 1,0 indicam digestibilidade reduzida, o que vai de acordo com os resultados da DV dos grupos teste (Henley e Kuster, 1994; Rutherford et al., 2015). O escore de aminoácidos corrigido pela digestibilidade da proteína (PDCAAS) do grupo GPFS para a lisina ficou abaixo da recomendação de 70% do padrão de referência da OMS (Codex Alimentarius, 2017; FAO, 1991; Magalhães et al., 2023). No entanto, uma alimentação variada, que inclua quantidades adequadas de diversas fontes proteicas, animal ou vegetal, especialmente a sua combinação, favorece o fornecimento

necessário de aminoácidos essenciais, potencialmente solucionando essa questão (Mariotti e Gardner, 2019).

Apesar das análises histológicas do fígado apontarem maior inflamação e acúmulo de esteatose hepática nos animais que receberam exclusivamente o grilo preto em pó (GP), os grupos GPFS e FS mostraram semelhança com o grupo controle. Uma possível explicação para esses dados é que a inclusão da farinha de soja na dieta dos animais pode ter contribuído para atenuar os efeitos adversos observados no grupo que recebeu apenas o grilo preto.

A farinha de soja é rica em compostos bioativos, como isoflavonas, fitoesteróis, antioxidantes e fibra alimentar, além de ácidos graxos linoleico e alfa-linolênico, os quais podem contribuir para modular a resposta inflamatória e o metabolismo lipídico. Essa combinação pode ter gerado um efeito sinérgico, resultando em menor incidência de inflamação e acúmulo de gordura hepática, sugerindo efeitos mais favoráveis para a saúde hepática dos animais (Kyoko et al., 2007; Messina, 2010; Toledo et al., 2012).

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ou malondialdeído (MDA), o óxido nítrico (ON) e os níveis de proteína carbonilada (PCN) constituem produtos da oxidação de biomoléculas e são biomarcadores comumente usados para indicar estresse oxidativo. Por sua vez, enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) são utilizadas como parâmetros que refletem o estado antioxidante (Hendrix et al., 2020).

No presente estudo, os grupos que receberam grilo em pó (GP e GPFS) demonstraram atividade das enzimas SOD e GST semelhantes ao grupo controle, sugerindo capacidade antioxidante comparável entre esses grupos.

No entanto, o grupo FS apresentou atividade aumentada de GST em comparação com os demais grupos testados, o que pode ser atribuído aos compostos bioativos presentes na farinha de soja, como fitoesteróis e isoflavonas, reconhecidos por suas propriedades antioxidantes e de regulação da expressão gênica relacionadas ao estresse oxidativo (Berno, Lopes & Canniatti-Brazaca, 2008; Messina, 2010; Toledo et al., 2012).

Em relação aos produtos de oxidação, observamos menores níveis de MDA no fígado no grupo GP quando comparados aos demais grupos, indicando menor peroxidação lipídica e, conseqüentemente, menor estresse oxidativo. Entretanto, o mesmo grupo apresentou aumento na produção de ON em comparação aos outros grupos teste. Tal achado pode ser indicativo de um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante, levando a um aumento do estresse oxidativo (Halliwell et al., 2015).

No contexto hepático, níveis elevados de ON podem estar associados a danos celulares e inflamação (Laskin et al., 2001), o que é consistente com os resultados da histologia realizada no fígado dos animais, em que o grupo GP também apresentou maior quantidade de infiltrados inflamatórios quando comparado ao controle.

Por outro lado, o grupo GPFS demonstrou resultados semelhantes ao grupo controle para todos os marcadores de oxidação, sugerindo que a combinação de grilo em pó com farinha de soja pode ter efeitos compensatórios na redução do estresse oxidativo. Além disso, a diminuição significativa na produção de ON no grupo FS em comparação aos demais grupos experimentais pode também ser atribuída à composição nutricional da soja, com os seus compostos antioxidantes, ácidos graxos poli-insaturados e fitoquímicos (Achouri et al., 2005; Berno, Lopes & Canniatti-Brazaca, 2008; Esteves & Monteiro, 2001; Kyoko et al., 2007; Mandarino, 2008; Messina, 2010; Toledo et al., 2012).

Os grupos que consumiram grilo preto em pó (GP e GPFS) apresentaram redução das concentrações plasmáticas de colesterol total e LDL, além de redução de glicose no grupo GP, quando comparados ao grupo controle, devido, provavelmente, à presença do polissacarídeo glicosaminoglicano no grilo preto. Estudos demonstraram que esse polissacarídeo auxilia na redução de parâmetros bioquímicos, entre eles, glicose e colesterol total, o que vai de acordo com os achados do nosso estudo (Ahn et al., 2016). Pesquisas adicionais que investigaram a suplementação de glicosaminoglicano em camundongos diabéticos também evidenciaram diminuição nos níveis de glicose sanguínea e LDL, além de um aumento na atividade de enzimas antioxidantes (Ahn et al., 2020).

As concentrações de creatinina aumentaram no grupo FS em comparação com os demais grupos, porém, ainda se mantiveram dentro da faixa de normalidade para roedores (Spinelli et al., 2014).

Os grupos que receberam farinha de soja (FS e GPFS) apresentaram redução dos níveis de AST, possivelmente devido à presença de isoflavonas na soja. Tais achados estão de acordo com estudos que relataram diminuição dos níveis plasmáticos de AST e ALT em dieta suplementada com isoflavonas comparada a uma dieta controle caseína (Gudbrandsen et al., 2007; Gudbrandsen et al., 2009; Hakkak et al., 2018).

Além disso, o grupo GPFS apresentou redução dos níveis de triglicerídeos (TGL) quando comparados ao grupo controle e FS. Esse resultado está de acordo com os achados de Ortiz et al. (2022), que observaram a diminuição dos níveis de TGL em animais que receberam dieta *high-fat* suplementada com farinha de grilo a 8%.

A redução nos níveis plasmáticos de colesterol total no grupo GP, além de colesterol total e TGL no grupo GPFS em comparação ao controle AIN-93G, sugerem efeito hipolipidêmico do grilo em pó. Além disso, a presença de fibras na combinação do grilo preto com a farinha de soja forma um gel no lúmen intestinal, onde se ligam aos ácidos biliares. Esse processo aumenta a excreção de lipídios nas fezes, além de reduzir a absorção de colesterol e a reabsorção dos ácidos biliares pela via entero-hepática, resultando em menos colesterol disponível para incorporação nas lipoproteínas (Faludi et al., 2017; Magalhães et al., 2023; Nagao et al., 2001; Seibel & Beléia, 2008).

Os efeitos do grilo preto em pó associado à farinha de soja sobre a saúde intestinal incluíram aumento da umidade das fezes nos grupos teste, o que pode estar relacionado aos altos níveis de fibras solúveis e insolúveis presentes nas matrizes alimentares utilizadas (Assis, Silva 2003; Young et al., 2020).

As fibras solúveis influenciam diretamente o volume e a viscosidade do conteúdo gastrointestinal, retendo água no cólon e contribuindo para a formação de fezes mais macias (Mudgil, 2017). Além disso, a quitina, presente no exoesqueleto dos insetos, pode, até certo ponto, ser degradada por enzimas presentes no sistema digestivo de mamíferos, resultando em derivados como a quitosana. Adicionalmente, as bactérias benéficas que residem no cólon também são capazes de fermentar e desacetilar a quitina, transformando-a nesse mesmo composto, o qual possui alto grau de afinidade e retenção de água, explicando o resultado mais elevado de umidade das fezes do grupo GPFS (Assis, Silva 2003; Liaqat e Eltem, 2018).

Quanto à produção de ácido acético e butírico, os grupos contendo grilo em pó (GP e GPFS) se mostraram semelhantes ao grupo controle (AIN-93G), o que também pode estar relacionado à quitina presente no grilo em pó, pois sua degradação no intestino pode gerar quitooligosacarídeos, que são fermentáveis pelas bactérias da microbiota intestinal, resultando na produção de AGCC (Kipkoech et al., 2021; López-Santamarina et al., 2020; Stull et al. 2018).

De acordo com a Escala de Bristol, a consistência e coloração das fezes não diferiu entre os grupos experimentais, caracterizando um funcionamento adequado do intestino. Segundo Martínez & Azevedo (2012), fezes dos tipos 3 e 4 estão relacionadas a um ritmo intestinal adequado. O tempo de trânsito intestinal pode estar associado à absorção de nutrientes no intestino, especialmente devido ao conteúdo de fibras (Araújo et al, 2019; Costa e Peluzio, 2021; Mudgil, 2017; Lewis, Heaton, 1997; Santos, et al., 2017; Schoot et al., 2022).

Para os parâmetros histomorfométricos do cólon, como a espessura e a profundidade das criptas colônicas, espessura das camadas mucosa e submucosa, número e área das células caliciformes nas criptas, todos os grupos teste se apresentaram de forma semelhantes ao grupo

controle. Essa similaridade pode ser considerada positiva, levando em consideração que a dieta controle AIN-93G é amplamente reconhecida por atender às necessidades de crescimento e manutenção dos animais, além de promover bom funcionamento intestinal, modulando positivamente a microbiota, mantendo a integridade da mucosa e fortalecendo as barreiras imunológicas do trato gastrointestinal dos animais (Pivovar, 2022). Portanto, diante dessa similaridade, podemos inferir que as dietas teste atenderam aos requisitos para um funcionamento intestinal adequado.

8. CONCLUSÃO

O grilo preto em pó associado à farinha de soja oferece uma fonte de proteína altamente absorvível e digerível, embora sua digestibilidade seja inferior à caseína. Além disso, a combinação do grilo preto em pó com a farinha de soja demonstrou, ainda, ser capaz de reduzir a resposta inflamatória e os níveis de esteatose hepática em comparação ao grilo preto de forma isolada. Esses resultados indicam que o consumo do grilo preto associado à outra matriz alimentar (neste estudo, a farinha de soja), é nutricionalmente vantajosa e, ainda, promove benefícios adicionais, como a redução dos níveis de colesterol total, LDL e triglicérides.

Além disso, devido ao conteúdo de fibra alimentar, o grilo preto em pó associado à farinha de soja promove aumento da umidade fecal, além de preservar a morfologia intestinal e produção de ácidos acético e butírico.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora os resultados sejam promissores, é importante ressaltar a necessidade de investigações adicionais para uma compreensão mais abrangente dos efeitos do consumo de grilo preto em pó. Sugere-se que futuros estudos possam estender o período do experimento, além de realizar análises mais detalhadas para avaliação do seu efeito na segurança biológica de uso. Propõe-se ainda, a realização de análises como a expressão gênica de proteínas relacionadas à saúde intestinal e a avaliação da microbiota intestinal. Essas análises mais aprofundadas permitiriam uma compreensão mais detalhada sobre o impacto do grilo preto em pó na composição e função das bactérias intestinais e o seu reflexo na saúde intestinal e poderiam, ainda, fornecer *insights* para seu uso potencial como um ingrediente alimentar funcional.

REFERÊNCIAS

ABOGE, D. O; ORINDA, M. A; KONOYLE, S. O. Effect of partial substitution of soybean flour with cricket flour on the nutritional composition, in vitro-protein digestibility and functional properties of complementary porridge flour. **International Journal Tropical Insects Science**, v. 42, p. 1137–1145, 2022.

ACHOURI, A.; BOYE, J. I. e BELANGER, D. Soybean Isoflavones: efficacy of extraction condition and an effect of food type on extractability. **Food Research International**, v.38, p.1199-1204, maio, 2005.

AEBI, H. Catalase in vivo. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-26, 1984.

AHN, M.Y et al. Anti-inflammatory effect of glycosaminoglycan derived from *Gryllus bimaculatus* (a type of cricket, insect) on adjuvant-treated chronic arthritis rat model. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v.77, n. 22-24, p. 1332-1345. 2014.

AHN, M.Y et al. Glycosaminoglycan Derived from Field Cricket and Its Inhibition Activity of Diabetes Based on Anti-Oxidative Action. **Preprints**. 2020.

AHN, M. Y., HWANG, J. S., KIM, M. J. & PARK, K. K. Antilipidemic effects and gene expression profiling of the glycosaminoglycans from cricket in rats on a high fat diet. **Archives of Pharmacal Research**, v. 39, p. 926-936. 2016.

AHN, M. Y., KIM, B. J., KIM, H. J., JIN, J. M., YOON, H. J., HWANG, J. S. & LEE, B. M. Anti-diabetic activity of field cricket glycosaminoglycan by ameliorating oxidative stress. **BMC Complement Medicine and Therapies**, v. 20, p. 1-10. 2020.

AOAC INTERNATIONAL. Official methods of analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg, MD: AOAC International, 1975.

ARAÚJO, R. R. S. et al. Nutritional composition of insects *Gryllus assimilis* and *Zophobas morio*: Potential foods harvested in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 76, p. 22-26, 2019

ARAÚJO, R. R. S.; FAGUNDES, M. M. A.; VIANA, A. M. F.; PAULINO, A. H. S.; SILVA, M. E.; SANTOS, E. M. Protein quality evaluation in vivo of cricket flour (*Gryllus assimilis*) reared in Brazil. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 8, n. 4, p. 409–416, 2021.

ASSIS, O. B. G., SILVA, V. L. Water sorption capacity and structural characterization of chitosan thin-films processed from different concentrations. **SciELO Brasil, Polímeros**. v. 13, n. 4. 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (20th ed.). Gaithersburg: AOAC., 2016.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (19th ed.). Gaithersburg: AOAC. 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (19th ed.). Gaithersburg: AOAC. 2019.

BARBOSA, L. R. et al. Caracterização de Danos de *Gryllus sp.* em Plantas de Eucalipto, em Laboratório. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 59, p. 63-63, 2009.

BARENNE, H. et al. Insect consumption to address undernutrition, a national survey on the prevalence of insect consumption among adults and vendors in Laos. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0136458, 2015.

BATAT, W. PETER, P. The healthy and sustainable bugs appetite: factors affecting entomophagy acceptance and adoption in Western food cultures. **Journal of Consumer Marketing**, 2020.

BENDER, A.; DOELL, B. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. **British Journal of Nutrition**, v. 11, n. 2, p. 138–139, 1957.

BERNO, LOPES & CANNIATTI-BRAZACA. Avaliação da composição centesimal, digestibilidade e atividade inibitória de tripsina em produtos derivados de soja (*Glycine max*). **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.18, n.3, p. 277-282, jul./set. 2007.

BESSA, L. W. et al. Insects as human food; from farm to fork. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 14, p. 5017-5022, 2020.

BHAT, et al. In vitro meat production: Challenges and benefits over conventional meat production. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 2, p. 241-248, 2015.

BISCONSIN-JUNIOR, A et al. Examining the role of regional culture and geographical 36 distances on the representation of unfamiliar foods in a continental-size country. **Food Quality and Preference**, v. 79, 2020.

BISCONSIN-JUNIOR, A. Composição de Insetos Comestíveis. **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de alimentos**. Pará. 2018.

BISCONSIN-JUNIOR, A; RODRIGUES, H; BEHRENS, J. H; SILVA, M. A. A. P; MARIUTTI, R. L. B. “Food made with edible insects”: exploring the social representation of entomophagy where it is unfamiliar. **Appetite**, v. 173, p. 106001, 2022.

BORRELLI, L.; CORETTI, L.; DIPINETO, L.; BOVERA, F.; MENNA, F.; CHIARIOTTI, L.; NIZZA, A.; LEMBO, F.; FIORETTI, A. Insect-based diet, a promising nutritional source, modulates gut microbiota composition and SCFAs production in laying hens. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

BRASIL. FAO: Se o atual ritmo de consumo continuar, em 2050 mundo precisará de 60% mais alimentos e 40% mais água. Disponível em: < <https://brasil.un.org/pt-br/68525-fao-se-o-atual-ritmo-de-consumo-continuar-em-2050-mundo-precisar%C3%A1-de-60-mais-alimentos-e-40>>. ONU, Organização das Nações Unidas, 2015.

BRASIL. Lei 11.346, de 15 de setembro de 2006. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – SISAN com vistas em assegurar o direito humano à alimentação

adequada e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 15 set. 2006.

BUEGE, JA.; AUST, SD. In *MethodsofEnzymology*. **New York: Academic Press**, 1978.

BUKKENS, S. G. F. Insects in the human diet. In *Ecological Implications of Minilivestock: Potential of Insects, Rodents, Frogs and Snails*, ed. MG Paoletti, pp. 545–77. Enfield, NH: **Science Publ. Provides an overview of human entomophagy, with an emphasis on nutritional aspects**. 2005.

BULCÃO, R., GARCIA, S. C., LIMBERGER, R. P., BAIERLE, M., ARBO, M. D., CHASIN, A. A. DA M., THIESEN, F. V., TAVARES, R. Designer drugs: analytical and biological aspects. *Química Nova*, v. 35, n. 1, p. 149–158. 2002.

CARVALHO, A. W. Biodisponibilidade de ferro e qualidade proteica do cultivar de soja UFVTN 105AP com elevado teor proteico. Orientador: Hércia Stampini Duarte Martino. 2009. 82f. Dissertação (Mestrado) - Ciência da Nutrição, Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

CARVALHO, N. M. DE; TEIXEIRA, F.; SILVA, S.; MADUREIRA, A. R.; PINTADO, M. E. Potential prebiotic activity of *Tenebrio molitor* insect flour using an optimized in vitro gut microbiota model. **Food and Function**, v. 10, n. 7, p. 3909–3922, 1 jul. 2019.

CASTEDO, C. C. B. Especies de Orthoptera que atacan plantaciones de Eucalyptus recién implantadas en el Distrito de Areguá, Departamento Central, Paraguay. **Boletín del Museo Nacional de Historia Natural del Paraguay**, v .2, p. 67-72, 2018.

CARVALHO, Ariela Werneck de. Iron bioavailability and protein quality to soybean cultivar UFVTN 105AP with high protein content. 2009. 100 f. **Dissertação** (Mestrado em Valor nutricional de alimentos e de dietas; Nutrição nas enfermidades agudas e crônicas não transmissíveis) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

CHAKRAVORTY, J. et al. Nutritional composition of *Chondacris rosea* and *Brachytrupes orientalis*: two common insects used as food by tribes of Arunachal Pradesh, India. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.17, p. 407–415, 2014.

CHEN, X., FENG, Y., & CHEN, Z. Common edible insects and their utilization in China. **Entomological Research**, v. 39, n. 5, p. 299-303, 2009.

CODEX ALIMENTARIUS, **Guidelines on formulated complementary foods for older infants and young children**. FAO, p. 1–10. 1991.

COSTA, N. M. B.; PELUZIO, M. C. G. **Nutrição Básica e Metabolismo**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2008.

COSTA, N. M. B.; PELUZIO, M. DO C. G. **Nutrição e Metabolismo Humano**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio Ltda, 2021.

COSTA-NETO, E. M., & DUNKEL, F. V. Insects as Food: History, Culture, and Modern Use Around the World. **Insects as Sustainable Food Ingredients**, p. 29-60. 2016.

COSTA-NETO, E. M.; PACHECO, J. M. "Head of snake, wings of butterfly, and body of cicada": impressions on the lantern fly (Hemiptera: Fulgoridae) in the village of Pedra Branca, Bahia State, Brazil. **Journal of Ethnobiology**, v.23, n. 1, p. 23-46. 2003.

DABBOU, S.; GAI, F.; BIASATO, I.; CAPUCCHIO, M. T.; BIASIBETTI, E.; DEZZUTTO, D.; MENEGUZ, M.; PLACHÀ, I.; GASCO, L.; SCHIAVONE, A. Black soldier fly defatted meal as a dietary protein source for broiler chickens: Effects on growth performance, blood traits, gut morphology and histological features. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 9, n. 1, 9 jul. 2018.

DE CASTRO, R. J. S. et al. Nutritional, functional and biological properties of insect proteins: Processes for obtaining, consumption and future challenges. **Trends in Food Science & Technology**, v. 76, p. 82-89, 2018.

DEGRUTTOLA, A. K.; LOW, D.; MIZOGUCHI, A.; MIZOGUCHI, E. Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. **Inflammatory bowel diseases**, v. 22, n. 5, p. 1137–1150, 1 maio 2016.

DI MATTIA, C. et al. Antioxidant activities in vitro of water and liposoluble extracts obtained by different species of edible insects and invertebrates. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, seção Nutrition and Sustainable Diets, p. 106, 15 jul. 2019.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K. et al. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. **Circulation**, v. 101, p. 33-39, 2000.

EATON & KLAASSEN, 1996, LOOMIS, 1996; LU, 1996 apud CHASIN A. A. M., AZEVEDO, F. A. Intoxicação e avaliação da toxicidade. In.: **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. Cap. 5. Ed.: Rima

EFSA. Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. **European Food Safety Authority Journal**, v. 13, n. 10, p. 4257. 2015.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Características da Soja. Rio Grande do Sul, RS: **Documentos Online**, 2021.

ESTEVES, E. A. e MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.14, p.43-52, 2001.

ESTEVES, T. C. F. Influência do processo de obtenção de extrato fermentado e não fermentado de soja preta sobre compostos bioativos e capacidade antioxidante. **Doutorado** (Tese de doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2017.

ESWARAN, S.; MUIR, J.; CHEY, W. D. Fiber and functional gastrointestinal disorders. **American Journal of Gastroenterology**, v. 108, n. 5, p. 718–727, maio 2013.

FALUDI, A. A.; OLIVEIRA, M. C.; IZAR, J. F. K.; SARAIVA, A. P. M.; CHACRA, H. T.; BIANCO, A. A.; NETO, A.; BERTOLAMI, A. C.; PEREIRA, A. M.; LOTTENBERG, A. C.; SPOSITO, A. C. P.; CHAGAS, A. C.; FILHO, A. F.; SIMÃO, A. C.; DE ALENCAR FILHO, B.; CAMELLI, C. C.; MAGALHÃES, C. E.; NEGRÃO, C. E.; FERREIRA, C.; SCHERR, C. M. A.; FEIO, C.; KOVACS, D. B.; DE ARAÚJO, D.; MAGNONI, D.;

CALDERARO, D. M.; GUALANDRO, E. P.; DE MELLO JUNIOR, E. R. G.; ALEXANDRE, E. I.; SATO, E. H.; MORIGUCHI, F. H.; RACHED, F. C.; DOS SANTOS, F. H. Y.; CESENA, F. A. H.; FONSECA, H. A. R.; DA FONSECA, H. T.; XAVIER, I. C. P.; MOTA, I. C. B.; GIULIANO, J. S.; ISSA, J.; DIAMENT, J. B.; PESQUERO, J. E.; DOS SANTOS, J. R. F.; NETO, J. X.; MELO FILHO, J. T.; KATO, K. P.; TORRES, M. C.; BERTOLAMI, M. H. V.; ASSAD, M. H.; MINAME, M.; SCARTEZINI, N. A.; FORTI, O. R.; COELHO, R. C.; MARANHÃO, R. D.; DOS SANTOS FILHO, R. J.; ALVES, R. L.; CASSANI, R. T. B.; BETTI, T.; DE CARVALHO, T. L. R.; MARTINEZ, V. Z. R.; GIRALDEZ W. S.; FILHO. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017, **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 109, p. 1–76. 2017.

FAO. How to feed the world in 2050. Paper presented at the High Level Expert Forum, Rome, Italy, 12–13 October. Disponível em www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf. 2009

FAO/WUR. Insects to feed the world: summary report. In P. Vantomme, C. Münke, A. Van Huis, J. van Itterbeek, & A. Hakman (Eds.), *Insects to Feed the World*. Ede, Netherlands. 2014.

FELIX, M.A. e CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Disponibilidade de ferro in vitro de grãos de soja tostados por diferentes tratamentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.78-83, 2008.

FENG, S. *Tenebrio molitor L.*, entomophagy and processing into ready to use therapeutic ingredients: a review. **Journal of Nutritional Health & Food Engineering**, v. 8, p. 280-285, 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Edible insects: Future prospects for food and feed security**. Rome: FAO, 2013

FRIEDMAN, M., & BRANDON, D. L. Nutritional and Health Benefits of Soy Proteins†. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1069–1086, 2001.

GARBER S. *The Urban Naturalist*. Family Gryllidae. Toronto, ON: **General publishing Company Ltd**, p. 61, 2013.

GASALY, N.; HERMOSO, M. A.; GOTTELAND, M. **Butyrate and the fine-tuning of colonic homeostasis: Implication for inflammatory bowel diseases***International Journal of Molecular Sciences*MDPI AG, 2 mar. 2021.

GASCO, L.; DABBOU, S.; TROCINO, A.; XICCATO, G.; CAPUCCHIO, M. T.; BIASATO, I.; DEZZUTTO, D.; BIROLO, M.; MENEGUZ, M.; SCHIAVONE, A.; GAI, F. Effect of dietary supplementation with insect fats on growth performance, digestive efficiency and health of rabbits. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 10, n. 1, 17 jan. 2019.

GERBER PJ, et al. Tackling climate change through livestock - a global assessment of emissions and mitigation opportunities. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)**, Rome. 2013.

- GILL, S. K.; ROSSI, M.; BAJKA, B.; WHELAN, K. **Dietary fibre in gastrointestinal health and disease** *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* Nature Research, 1 fev. 2021.
- GÓMEZ, B. et al. Challenges and Opportunities Regarding the Use of Alternative Protein Sources: Aquaculture and Insects. **Advances in Food and Nutrition Research**, 89, 259–295, 2019.
- GRANCIERI, M. et al. Yacon flour (*Smallanthus sonchifolius*) attenuates intestinal morbidity in rats with colon cancer. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 666–675, 2017.
- GREENWOOD-VAN MEERVELD, B.; JOHNSON, A. C.; GRUNDY, D. Gastrointestinal physiology and function. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 239, p. 1–16, 1 jan. 2017.
- GUDBRANDSEN O. A., WERGEDAHL H., MØRK S., LIASET B., ESPE M., BERGE R. K. Dietary soya protein concentrate enriched with isoflavones reduced fatty liver, increased hepatic fatty acid oxidation and decreased the hepatic mRNA level of VLDL receptor in obese Zucker rats. **British Journal of Nutrition | Cambridge Core**, v. 96, p. 249–257. 2007.
- GUDBRANDSEN O. A., WERGEDAHL H., BERGE R. K. A casein diet added isoflavone-enriched soy protein favorably affects biomarkers of steatohepatitis in obese Zucker rats. **Nutrition**.v. 25, p. 574–580. 2009.
- HABER, M.; MISHYNA, M.; MARTINEZ, I. J. J.; BENJAMIN, O. The influence of grasshopper (*Schistocerca gregaria*) powder enrichment on bread nutritional and sensorial properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 110, p. 61-67, 2020.
- HABIG, WH.; JAKOBY, WB. Glutathione S-Transferase (rat and human). **Methods in Enzymology**, 77(27), 218-239, 1981.
- HAKKAK, R., GAUSS, C. H., BELL, A. KOURORIAN, S. Short-Term Soy Protein Isolate Feeding Prevents Liver Steatosis and Reduces Serum ALT and AST Levels in Obese Female Zucker Rats. **Biomedicines, MDPI**. v. 6, n. 2, p. 55. 2018
- HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.
- HAMMER, J., PHILLIPS, S, F. Fluid loading of the human colon: Effects on segmental transit and stool composition, **Gastroenterology**, v. 105, p. 988–998. 1993.
- HANBOONSONG, Y. et al. Six-legged livestock: edible insect farming, collecting and marketing in Thailand. Bangkok: **Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific**. 2013.
- HEGSTED, D. M. Protein quality and its determination. **Food Proteins**: 347– 362. 1977.
- HENDRIX, J., NIJS, J., ICKMANS, K., GODDERIS, L., GHOSH, M., & POLLI, A. The Interplay between Oxidative Stress, Exercise, and Pain in Health and Disease: Potential Role of Autonomic Regulation and Epigenetic Mechanisms. **Antioxidants**, v. 9, n. 11, p. 1166, 2020.
- HENLEY, E. C. e KUSTER, J. M. Protein quality evaluation by protein digestibility corrected amino acid scoring. **Food Technology**, v. 48, n. 4, p.74-77, 1994.

HERRERO M. et al. Pecuária e meio ambiente: o que aprendemos na última década? **Annual Review of Environment and Resources**, v.40, p. 177–202. 2015.

HERRERO, M. et al. Greenhouse gas mitigation potentials in the livestock sector. **Nature Climate Change**, v. 6, p. 452–461, 2016.

HU, QiaoRu et al. Análise e avaliação dos componentes nutricionais em *Holotrichia paralela* Motschulsky. **Doenças e Pragas de Plantas**, v. 1, n. 5, pág. 7-9, 2010.

HWANG, D.; KOH, J. H.; LEE, J.; KIM, Y.; LIM, Y. H. Cherry tomato supplementation increases the area of the intestinal mucosa and the number of muscle layers in rats. **Food Research International**, v. 64, p. 298–304, 2014.

JANSSEN R.H., et al. Nitrogen-to-protein conversion factors for three edible insects: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 2275–2278. 2017.

JENSEN, K. et al. Breeding and maintaining high-quality insects. **Insects as Food and Feed: From Production to Consumption**; Van Huis, A., Tomberlin, JT, Eds, p. 174-198, 2017.

JONGEMA, Y. Worldwide list of recorded edible insects. **The Netherlands: Department of Entomology**, Wageningen University & Research. 2017

KELLY, C. J. et al. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. **Cell Host and Microbe**, v. 17, n. 5, p. 662–671, 13 maio 2015.

KIELA, P. R.; GHISHAN, F. K. **Physiology of intestinal absorption and secretion** **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology** Bailliere Tindall Ltd. 1 abr. 2016.

KIPKOECH, C.; KINYURU, J. N.; IMATHIU, S.; MEYER-ROCHOW, V. B.; ROOS, N. In vitro study of cricket chitosan's potential as a prebiotic and a promoter of probiotic microorganisms to control pathogenic bacteria in the human gut. **Foods**, v. 10, n. 10, 1 out. 2021.

KIRBY, M.; DANNER, E. Nutritional deficiencies in children on restricted diets. **Pediatric clinics of North America**, v. 56, n. 5, p. 1085–103, 2009.

KUDELKA, W.; KOWALSKA, M.; POPIS, M. Quality of Soybean Products in Terms of Essential Amino Acids Composition. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 5071. 2021.

LANGE, K. W., NAKAMURA, Y. Edible insects as future food: chances and challenges. **Journal of Future Foods**, v. 1, n. 1, p. 38-46. September, 2021.

LASKIN, J. D., HECK, D. E., GARDNER, C. R., LASKIN, D. L. Prooxidant and Antioxidant Functions of Nitric Oxide in Liver Toxicity. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 3, n. 2, p. 261–271. 2001.

LATUNDE-DADA, G. O.; YANG, W.; VERA AVILES, M. In vitro iron availability from insects and sirloin beef. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 44, p. 8420-8424, 2016.

- LEVINE, R. L. et al. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, n. C, p. 464–478, 1 jan. 1990.
- LEWIS, S. J.; HEATON, K. W. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 32, n. 9, p. 920-924, 1997.
- LIAQAT, F., ELTEM. R. Chitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review. **Carbohydrate Polymers** v. 184, p. 243–259. 2018.
- LIU H. J. et al. Determination of Amino Acids in Food and Feed by Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate and Reversed-Phase Liquid Chromatographic Separation, **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v.78, 3, 1995.
- LIU, P.; WANG, Y.; YANG, G.; ZHANG, Q.; MENG, L.; XIN, Y.; JIANG, X. The role of short-chain fatty acids in intestinal barrier function, inflammation, oxidative stress, and colonic carcinogenesis. **Pharmacological Research Academic Press**. 1 mar. 2021.
- LOCKWOOD, J.Á. Locust: The Devastating Rise and Mysterious Disappearance of the Insect That Shaped the American Frontier, **Basic Books**, New York, NY. 2014.
- LÓPEZ-SANTAMARINA, A., MONDRAGON, A. DEL C., LAMAS, A., MIRANDA, J. M., FRANCO, C. M., & CEPEDA, A. Animal-Origin Prebiotics Based on Chitin: An Alternative for the Future? A Critical Review. **Foods**, v. 9, n. 6, p. 782. 2020.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.
- LUCAS, A.J. et al. Edible insects: An alternative of nutritional, functional and bioactive compounds. **Food chemistry**, v. 311, p. 126022, 2020.
- MACHADO, C. R; THYS, R. C. S. Cricket Powder (*Gryllus assimilis*) as a new alternative protein source for gluten-free breads. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.56, 2019.
- MAGALHÃES, T. L. S., SILVA, B. P., GRANCIERI, M. LÚCIO, H. G., TOLEDO, R. C. L., BARRA, R. R. S., CARVALHO, C. W. P., MARTINO, H. S. D. Germinated and non-germinated cooked Whole millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) flours show a promising effect on protein quality, biochemical profile and intestinal health in vivo. **Food & Function**, v. 14, p. 5678–5689. 2023.
- MALLA, N. NØRGAARD, J. V.; ROOS, N. Protein quality of edible insects in the view of current assessment methods. **Animal Frontiers**, v. 13, n. 4, p. 50–63. 2023.
- MANDARINO, J. M. G. Composto antinutricionais da soja: caracterização e propriedades funcionais. In: COSTA, N.M.B. e PELUZIO, M.C. **Alimentos Funcionais: benefícios para a saúde**. Viçosa: UFV, 2008, p. 55-80.
- MARIOTTI F., GARDNER, C. D. Dietary Protein and Amino Acids in Vegetarian Diets — A Review. **Nutrients**, v. 11, p. 2661. 2019.
- MARKOWIAK-KOPE, P.; SLI, K. The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. **Nutrients**, p. 1–23, 16 abr. 2020.

- MARTINEZ, A. P. C. Efeito dos processos de irradiação e germinação nos aspectos nutricionais, sensoriais e microbiológicos em grãos de soja (*Glycine max* Merrill) cultivar BRS216. 219f. Dissertação (Mestrado) - Ciência e Tecnologia de Alimentos - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2011.
- MARTINEZ, A. P., & AZEVEDO, G. R. The Bristol Stool Form Scale: its translation to Portuguese, cultural adaptation and validation. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 20, n. 3, p.583–589. 2012.
- MARTINO, H. D. S. ARIELA, W. C., DA SILVA, C. O., DANTAS, S., INÊS, M., NATAL, G., ISABEL, D., RIBEIRO, S. M. R., COSTA, B., MARIA, N. Heat-treated hull flour does not affect iron bioavailability in rats. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 61, n. 2, p. 135-142, 2011.
- MARTINO, H. S. D., MARTIN, B. R., WEAVER, C. M., BRESSAN, J., ESTEVES, E. A., & COSTA, N. M. B. Zinc and iron bioavailability of genetically modified soybeans in rats. *Journal of Food Science*, v. 72, n. 9, p. 689-695. 2007.
- MARTINO, H. S. D., SILVA, C. O. Avaliação da Qualidade Proteica. In COSTA, N.M.B. et al. **Nutrição Experimental–Teoria e Prática**. Editora Rubio, 2014.
- MAATSCH, J. M; GRAS, C. C. The “Carmin Problem” and Potential Alternatives. **Food Science, Technology and Nutrition**, p. 385-428. 2016.
- MCRORIE, J. W.; MCKEOWN, N. M. Understanding the Physics of Functional Fibers in the Gastrointestinal Tract: An Evidence-Based Approach to Resolving Enduring Misconceptions about Insoluble and Soluble Fiber. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 117, n. 2, p. 251–264, 1 fev. 2017.
- MENDES, A. P. A.; PEREIRA, R. C.; ANGELIS-PEREIRA, M. C. Estresse oxidativo e sistemas antioxidantes: conceitos fundamentais sob os aspectos da nutrição e da ciência dos alimentos. In: CORDEIRO, C. A. M. **Tecnologia de alimentos: tópicos físicos, químicos e biológicos**. Edição 1, v. 2: Editora científica digital, 2020. 614 p. 296-312.
- MENDES, F. Q. et al. Digestibilidade proteica e caracterização bromatológica de linhagens de soja com ausência ou presença do inibidor de tripsina Kunitz e das isozimas lipoxigenases. **Journal of Biosciences**, v.23, p.14-21, 2007.
- MENDES, F. Q. et al. Qualidade proteica de diversos alimentos, incluindo variedades de soja. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 1, p. 77-86, 2009.
- MENON, V. P.; SUDHEER, A. R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. In: **The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease**. Springer, Boston, MA, p. 105-125. 2007.
- MERA R, et. al. How to Calculate Sample Size for an Experiment: A Case-Based Description. **Nutritional Neuroscience**, v.1, n.1, p. 87-91. 1988.
- MESSINA, M., & MESSINA, V. The role of soy in vegetarian diets. **Nutrients**, v. 2, n. 8, p. 855-888. 2010.

MISHIMA, M. D. V.; SILVA, B. P. DA; GOMES, M. J. C.; TOLEDO, R. C. L.; MANTOVANI, H. C.; JOSÉ, V. P. B. DE S.; COSTA, N. M. B.; TAKO, E.; MARTINO, H. S. D. Effect of Chia (*Salvia hispanica L.*) Associated with High-Fat Diet on the Intestinal Health of *Wistar* Rats. **Nutrients**, v. 14, n. 22, 1 nov. 2022.

MITSUHASHI J, The future use of insects as human food, in *Forest Insects as Food: Humans Bite Back*, ed. by Durst PB, Johnson DV, Leslie RN and Shono K. FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, pp. 115–122. 2010.

MITSUHASHI, J. *Edible insects of the world*. 1st ed. **CRC Press**, p. 291, 2019.

MOFFETT, J. R.; PUTHILLATHU, N.; VENGILOTE, R.; JAWORSKI, D. M.; NAMBOODIRI, A. M. Acetate Revisited: A Key Biomolecule at the Nexus of Metabolism, Epigenetics and Oncogenesis—Part 1: Acetyl-CoA, Acetogenesis and Acyl-CoA Short-Chain Synthetases. **Frontiers in Physiology**, v. 11, 12 nov. 2020.

MOFFETT, J. R.; PUTHILLATHU, N.; VENGILOTE, R.; JAWORSKI, D. M.; NAMBOODIRI, A. M. Acetate Revisited: A Key Biomolecule at the Nexus of Metabolism, Epigenetics and Oncogenesis—Part 1: Acetyl-CoA, Acetogenesis and Acyl-CoA Short-Chain Synthetases. **Frontiers in Physiology**, v. 11, 12 nov. 2020.

MONTEIRO, M. R. P. et al. Qualidade proteica de linhagens de soja com ausência do Inibidor de Tripsina Kunitz e das isoenzimas Lipoxigenases. **Revista de Nutrição**, v.17, n.2, p.195-205, 2004.

MONTEVECCHI, G. et al. Fortification of wheat flour with black soldier fly prepupae. Evaluation of technological and nutritional parameters of the intermediate doughs and final baked products. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 69, p. 102642, 2021.

MONTOWSKA, M. et al. Nutritional value, protein and peptide composition of edible cricket powders. **Food Chemistry**, v. 289, p. 130-138, 2019.

MUDGIL, D. **The Interaction Between Insoluble and Soluble Fiber**. Em: *Dietary Fiber for the Prevention of Cardiovascular Disease: Fiber's Interaction between Gut Microflora, Sugar Metabolism, Weight Control and Cardiovascular Health*. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 35–59.

MÜLLER-MAATSCH, J. & GRAS, C. The “Carmine Problem” and Potential Alternatives. **Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages**, 343-366. 2016.

NAGAO, K., SATO, M. TAKENAKA, M. ANDO, M. IWAMOTO, IMAIZUMI, K. Feeding Unsaponifiable Compounds from Rice Bran Oil Does Not Alter Hepatic mRNA Abundance for Cholesterol Metabolism-related Proteins in Hypercholesterolemic Rats, **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, p. 371–377. 2001.

NOGAL, A.; VALDES, A. M.; MENNI, C. The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health. **Gut Microbes Bellwether Publishing**, Ltd. 2021.

NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. Unlocking the biological potential of proteins from edible insects through enzymatic hydrolysis: A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 43, p. 239-252, 2017.

NOWAKOWSKI, A. C.; MILLER, A. C.; MILLER, M. E.; XIAO, H.; WU, X. Potential health benefits of edible insects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Taylor and Francis Ltd. 2022.

OIBIOKPA, F. I.; AKANYA, H. O.; JIGAM, A. A.; SAIDU, A. N.; EGWIN, E. C. Protein quality of four indigenous edible insects species in Nigéria. **Food Science and Human Wellness**, n. 2, v. 7, p. 175-183, 2018.

OLIVEIRA, J. E. D.; SANTOS, A. C.; WILSON, E. D. **Nutrição Básica**. São Paulo: Sarvier, cap. 4, p. 29-65, 1989.

OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, S. M. S.; DIAS, K. A.; PAES, S. S.; GRANCIERI, M. JIMENEZ, L. G. S.; CARVALHO, C. W. P.; OLIVEIRA, E. E.; MARTINO, H. S. D.; LUCIA, C. M. D. Nutritional content, amino acid profile, and protein properties of edible insects (*Tenebrio molitor* and *Gryllus assimilis*) powders at different stages of development. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 125, 2024.

OLIVEIRA, M. I. P. et al. Protein, oil, and isoflavone contents in lipoxygenase- and Kunitz trypsin inhibitor-deficient soybean seeds. **Chromatographia**, v.66, p.521-527, 2007.

ONWEZEN, M. C; BOUWMAN, E. P; REINDERS, M. J; DAGEVOS, H. A systematic review on consumer acceptance of alternative proteins: Pulses, algae, insects, plant-based meat alternatives, and cultured meat. **Appetite**, v. 159, 2021.

OONINCX, D. G. A. B. et al. An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. **PloS one**, v. 5, n. 12, p. e14445, 2010.

ORTIZ, A. E., SAAVEDRA, D. H., MENDOZA, J. L., RAMÍREZ, I. F. P., IZAGUIRRE, O. F., GÓMEZ, M. R., CAMACHO, R. R. Consumption of cricket (*Acheta domestica*) flour decreases insulin resistance and fat accumulation in rats fed with high-fat and -fructose diet. **Journal of Food Biochemistry**, v. 46, n. 9. 2022.

PARADA VENEGAS, D.; LA FUENTE, M. K. DE; LANDSKRON, G.; GONZÁLEZ, M. J.; QUERA, R.; DIJKSTRA, G.; HARMSSEN, H. J. M.; FABER, K. N.; HERMOSO, M. A. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAR, 11 mar. 2019.

PAYNE, C. et al., Insects as food in the global north – the evolution of the entomophagy movement. **Edible Insects in the Food Sector: Methods, Current Applications and Perspectives**, ed. G. Sogari, C. Mora, and D. Menozzi, (Cham: Springer), p. 11–26, 2019.

PIRES, C. V. et al. Nutritional quality and chemical score of amino acids from different protein sources. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 1, p. 179-184, Jan./Mar. 2006.

PIVOVAR, G. A. **Dietas padrão e de cafeteria para ratos e camundongos utilizados em experimentação: uma revisão da literatura.** Trabalho de conclusão de curso. Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2022.

POELAERT, C., FRANCIS, F., ALABI, T., MEGIDO, R. C., CRAHAY, B., BINDELLE, J. & BECKERS, Y. Protein value of two insects, subjected to various heat treatments, using growing rats and the protein digestibility-corrected amino acid score. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 4, n. 2, p. 77–87. 2018.

QIN, P.; WANG, T.; LUO, Y. A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 7. March, 2022.

RAHEEM, D. et al. Entomophagy: Nutritional, ecological, safety and legislation aspects. **Food Research International**, v. 126, p. 108672, 2019.

RAHMAN, S.; O’CONNOR, A. L.; BECKER, S. L.; PATEL, R. K.; MARTINDALE, R. G.; TSIKITIS, V. L. Gut microbial metabolites and its impact on human health. **Annals of Gastroenterology**, v. 36, n. 4, p. 360, 29 maio 2023.

RAHMAN, S.; O’CONNOR, A. L.; BECKER, S. L.; PATEL, R. K.; MARTINDALE, R. G.; TSIKITIS, V. L. Gut microbial metabolites and its impact on human health. **Annals of Gastroenterology**, v. 36, n. 4, p. 360, 29 maio 2023.

RAHMAN, S.; TRONE, K.; KELLY, C.; STROUD, A.; MARTINDALE, R. NUTRITION AND OBESITY (S MCCLAVE AND E OMER, SECTION EDITORS). **Current Gastroenterology Reports**, v. 25, p. 1–12, 2023.

RAMOS-ELORDUY, J. et al. Contenido de vitaminas de algunos insectos comestibles de México. **Revista de la Sociedad Química de México** v. 45, p. 66-76, 2002.

RAUBENHEIMER, D, ROTHMAN, J. M. Nutritional ecology of entomophagy in humans and other primates. **Annual review of entomology**, v. 58, p. 141-160, 2013.

RAZA, M., SHABANAH, O. A., HADIYAH, T. M., MAJED, A. A. Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Scientia Pharmaceutica**, v. 70, n. 2, p. 135–145, 2002.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. 1993.

REHMAN, A. et al. Towards environmental Sustainability: Devolving the influence of carbon dioxide emission to population growth, climate change, Forestry, livestock and crops production in Pakistan. **Ecological Indicators**, v. 125, p. 107460, 2021.

ROSTOM, H.; SHINE, B. Basic metabolism: proteins. **Surgery (Oxford)**, v. 36, n. 4, p. 153-158, 2018.

RUMPOLD, B. A.; SCHLÜTER, O. K. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n. 5, p. 802-823, 2013.

- RUTHERFURD, S. M., FANNING, A. C., MILLER, B. J., & MOUGHAN, P. J. Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores and Digestible Indispensable Amino Acid Scores Differentially Describe Protein Quality in Growing Male Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 145, n. 2, p. 372–379. 2015.
- SANTOS, L. A., LEMAIRE, D. C., LIMA, C. R. O. C., RIOS, D. L. S., CONCEIÇÃO, G. C., BRANDÃO, N. A., ARAÚJO, E. M. Q. Tempo de trânsito intestinal de indivíduos portadores de síndrome metabólica pela escala de Bristol – Intestinal transit time of individuals with metabolic syndrome by the bristol scale. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 16, n. 3, p. 338-343, 2017.
- SARWAR, G. The protein digestibility-corrected amino acid score method overestimates quality of proteins containing antinutritional factors and of poorly digestible proteins supplemented with limiting amino acids in rats. **Journal of Nutrition**, v. 127, p. 758-764, 1997.
- SAYYAD, M. TIANG, N., KUMARI, Y., GOH, B. H., JAISWAL, Y., ROSLI, R., WILLIAMS, L. SHAIKH, M. F. Acute toxicity profiling of the ethyl acetate fraction of *Swietenia macrophylla* seeds and in-vitro neuroprotection studies. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 2, p. 196–205, 2017.
- SCHABEL, H. G. **Forest Insects as Food: A Global Review**. Proceedings of a Workshop on Asia-Pacific Resources and Their Potential for Development, Bangkok, 37-64. 2010.
- SCHMIDT, A. et al. Determination of vitamin B12 in four edible insect species by immunoaffinity and ultra-high performance liquid chromatography. **Food chemistry**, v. 281, p. 124-129, 2019.
- SCHOOT, A. VAN DER; DRYSDALE, C.; WHELAN, K.; DIMIDI, E. The Effect of Fiber Supplementation on Chronic Constipation in Adults: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 116, n. 4, p. 953–969, 1 out. 2022.
- SCIENTIFIC ADVISORY COMMITTEE ON NUTRITION. **Carbohydrates and health**. [s.l: s.n.]. 2015.
- SEIBEL, N. F., BELÉIA, A. D. P. Carbohydrates from cotyledon fibers and proteins of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) derivatives. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. v. 28, n. 3, p. 607-613. 2008.
- SIEGFRIED, R., RUCKEMANN, H., STUMPF, G. Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography, **Landwirtsch. Forsch.**, v. 37, p. 298–304.1984.
- SILVA, B. P. DA; MATYELKA, J. C. D. S.; MOREIRA, M. E. D. C.; TOLEDO, R. C. L.; LUCIA, C. M. DELLA; PINHEIRO-SANT’ANA, H. M.; MARTINO, H. S. D. A high fat diet does not affect the iron bioavailability in *Wistar* rats fed with chia and increases gene expression of iron metabolism proteins. **Food & function**, v. 7, n. 12, p. 4861–4868, 1 dez. 2016.

SIMPLÍCIO, V. S. Avaliação em laboratório de iscas tóxicas no controle de *Gryllus (Gryllus) Assimilis* (Fabricius, 1775) (Orthoptera: Gryllidae) Dissertação (Mestrado) - Ciências - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

SINGSON L et al. Edible insects of Nagaland and its nutritional benefit. **Periodic Research**, v. 5, p. 1-7, 2016.

SKERRETT, A. Milestone for Wairarapa cricket farm. **Newshub**. 2019.

SMETANA S et al. Sustainability of insect use for feed and food: life cycle assessment perspective. **Journal of Cleaner Production**, v.137, p. 741–751. 2016.

SMETANA S. et al. Meat alternatives: life cycle assessment of most known meat substitutes. **The International Journal of Life Cycle Assessment** , v.20, p. 1254–1267. 2015.

SMIL, V. Worldwide transformation of diets, burdens of meat production and opportunities for novel food proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 3, p. 305-311, 2002.

SO, D.; WHELAN, K.; ROSSI, M.; MORRISON, M.; HOLTMANN, G.; KELLY, J. T.; SHANAHAN, E. R.; STAUDACHER, H. M.; CAMPBELL, K. L. Dietary fiber intervention on gut microbiota composition in healthy adults: A systematic review and meta-analysis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 107, n. 6, p. 965–983, 1 jun. 2018.

SOGARI, G. Entomophagy and Italian consumers: an exploratory analysis. **Progress in Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 311-316, 2015.

SOUSA-SILVA, J. P.; COSTA-NETO, E. M. Worldwide list of recorded edible insects. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2017.

SPINELLI, M. O., CRUZ, R. J., GODOY, C. M. S. C., MOTTA, M. C., DAMY, S. B. Estudo da variação sazonal dos parâmetros bioquímicos de roedores e lagomorfos do Biotério da Faculdade de Medicina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 36, p. 219–25, 2014.

STEINFELD H. et al. Livestock’s long shadow. Environmental issues and options. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, Rome)**. 2006.

STULL, V. J.; FINER, E.; BERGMANS, R. S.; FEBVRE, H. P.; LONGHURST, C.; MANTER, D. K.; PATZ, J. A.; WEIR, T. L. Impact of Edible Cricket Consumption on Gut Microbiota in Healthy Adults, a Double-blind, Randomized Crossover Trial. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

TAN, J. K.; MACIA, L.; MACKAY, C. R. **Dietary fiber and SCFAs in the regulation of mucosal immunity** **Journal of Allergy and Clinical Immunology** Elsevier Inc., 1 fev. 2023.

TAO, J; LI, Y. O. Edible insects as a means to address global malnutrition and food insecurity issues. **Food Quality and Safety**, v. 2, n. 1, p. 17-26, 2018.

TIRAPÉGUI, J. Nutrição: fundamentos e aspectos atuais. **Atheneu**, Rio de Janeiro, Brasil, 342 pp. 2006.

THEODORO, J. M. V.; GRANCIERI, M.; GOMES, M. J. C.; TOLEDO, R. C. L.; SÃO JOSÉ, V. P. B. DE; MANTOVANI, H. C.; CARVALHO, C. W. P.; SILVA, B. P. DA;

MARTINO, H. S. D. Germinated Millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) Flour Improved the Gut Function and Its Microbiota Composition in Rats Fed with High-Fat High-Fructose Diet. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 22, 1 nov. 2022.

TOLEDO, M. Z., CAVARIANI, C., FRANÇA-NETO, J. B. Qualidade fisiológica de sementes de soja colhidas em duas épocas após dessecação com glyphosate. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 1. 2012.

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of Chromatography B**, v. 851, n. 1-2, p. 51-70, 2007.

United Nations (UN), World population projected to reach 9.6 billion by 2050 – UN report [Online]. Disponível em:
<http://www.un.org/apps/news/story.asp?NewsID=45165#.V6or25h97b0>

USUDA, H.; OKAMOTO, T.; WADA, K. Leaky gut: Effect of dietary fiber and fats on microbiome and intestinal barrier. **International Journal of Molecular Sciences**, MDPI. 2 jul. 2021.

VAN HUIS, A. OONINCX, D. G.A.B. The environmental sustainability of insects as food and feed. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 37, n. 5, p. 1-14, 2017.

VAN HUIS, A. Potential of insects as food and feed in assuring food security. **Annual review of entomology**, v. 58, p. 563-583, 2013.

VAN HUIS, A; RUMPOLD, B.; MAYA, C.; ROOS, N. Nutritional Qualities and Enhancement of Edible Insects Annual Review of Nutrition. **Annual Reviews Inc.**, 2021.

Yen, A. L. Edible Insects and Other Invertebrates in Australia: Future Prospects. **Edible Forest Insect: Human Bite Back**. Proceedings of a Workshop on Asia-Pacific Resources and Their Potential for Development, Bangkok, p. 65-84, 2010.

YILDIZ, FATI H. Amino Acids, oligopeptides, polypeptides, and proteins. In: Yildiz, Fatih. **Advances in Food Biochemistry**. CRC Press Taylor & Francis Group. New York. p. 51-100, 2010.

YOUNG, W.; AROJJU, S. K.; MCNEILL, M. R.; RETTEDAL, E.; GATHERCOLE, J.; BELL, N.; PAYNE, P. Feeding Bugs to Bugs: Edible Insects Modify the Human Gut Microbiome in an in vitro Fermentation Model. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 23 jul. 2020.

ZUGRAVU, C. et al. Knowledge: A Factor for Acceptance of Insects as Food. **Sustainability**, v.15, n.6, p.4820, 2023.

ANEXO A – Aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 29/2021, intitulado “**Investigação do valor nutricional, qualidade proteica e segurança de uso agudo e subcrônico de farinhas de insetos com potencial de utilização na alimentação humana**”, coordenado pela professora Ceres Mattos Della Lucia do Departamento de Nutrição e Saúde, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTIC, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 02/06/2021, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 29/2021, named “**Investigation of the nutritional value, protein quality and safety of acute and subchronic use of insect flours with potential for use in human nutrition**”, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008, Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTIC, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTIC therefore being approved by the Committee on June 02, 2021 valid for 12months.



Profa. Mariella Bontempo Duca de Freitas
Coordenadora
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV