

MICHELE LILIAN DA FONSECA BARNABÉ

EFEITO DO CONSUMO DE GRILO PRETO EM PÓ ASSOCIADO À FARINHA DE SOJA NA BIODISPONIBILIDADE DE FERRO, SAÚDE INTESTINAL E BALANÇO OXIDATIVO DE RATOS WISTAR

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 S. Duarte Martino
Bárbara Pereira da Silva
Izabela Maria Montezano de Carvalho
Reggiani Gonçalves Vilela

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2024

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

T

B259e
2024

Barnabé, Michele Lílian da Fonseca, 1995-
Efeito do consumo de grilo preto em pó associado à farinha de soja na biodisponibilidade de ferro, saúde intestinal e balanço oxidativo de ratos Wistar / Michele Lílian da Fonseca Barnabé. – Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (83 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Ceres Mattos Della Lucia.

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

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.402>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Entomofagia. 2. Insetos comestíveis. 3. Anemia ferropriva. 4. Farinha de soja. 5. Ácidos graxos voláteis. 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. 641.696


MICHELE LILIAN DA FONSECA BARNABÉ

EFEITO DO CONSUMO DE GRILO PRETO EM PÓ ASSOCIADO À FARINHA DE SOJA NA BIODISPONIBILIDADE DE FERRO, SAÚDE INTESTINAL E BALANÇO OXIDATIVO DE RATOS WISTAR


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: 24 de abril de 2024

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 MICHELE LILIAN DA FONSECA BARNABE
Data: 30/07/2024 10:33:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Michele Lílian da Fonseca Barnabé
Autora

Documento assinado digitalmente
 CERES MATTOS DELLA LUCIA
Data: 30/07/2024 11:55:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ceres Mattos Della Lucia
Orientadora

Dedico este trabalho a Deus, a todos que me apoiaram e me ajudaram, a todos que tiveram que interromper ou não conseguiram realizar seus sonhos e a todas as almas boas que pude encontrar durante este ciclo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, à Nossa Senhora Aparecida, a todos os santos e orixás por sempre me iluminarem, guiarem os meus passos, e derramarem muitas bênçãos em meu caminho!

Agradeço a toda minha família pelo apoio e incentivo sempre. Agradeço, em especial, ao meu sobrinho, Pedro Lucas, por ser luz em minha vida. Aos familiares não explicitados, digo que amo todos vocês!

Agradeço aos amigos Paula Candidenses, por todo incentivo e por sempre se fazerem presentes em minha vida apesar da distância, e por compreenderem minha ausência. Aos amigos Viçosenses, agradeço por todo incentivo, pelos rolês, por escutarem minhas histórias acadêmicas e minhas lamentações. Todos vocês foram essenciais para a conclusão deste ciclo.

Agradeço, em especial, a minha amiga e colega de profissão, Viviane Oliveira, que compartilha comigo a UFV desde 2015 e foi peça fundamental para a conclusão do mestrado. Acho que sem você eu não teria conseguido, obrigada por tornar essa jornada mais leve. Qualquer palavra que eu diga aqui não seria capaz de expressar a gratidão que eu sinto por você. Agradeço a Francilene Azevedo, por ter se solidarizar com a minha situação inicial e me indicar para trabalhos. Fran, você foi um anjo que Deus enviou no momento que eu mais precisei. Agradeço também meu amigo Daniel pelo mesmo motivo. Obrigada pela sensibilidade com o momento em que eu estava e por ter me ajudado. Sem vocês a realização deste sonho não seria possível.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Prof.^a Ceres Mattos Della Lucia, primeiramente por ter aceitado embarcar comigo nessa jornada, por toda orientação e pela paciência. Certamente fui um desafio para você. Tão avoada e tão ingênua! Mas aprendi muito e sou grata a você por tudo que partilhamos neste ciclo. Agradeço à minhas coorientadoras, Prof.^a Hércia Stampini Duarte Martino, Prof.^a Bárbara Pereira, Prof.^a Izabela Montezano e Prof.^a Reggiani Vilela, por também terem aceitado embarcar conosco nessa jornada, pela brilhante coorientação e por toda troca que tivemos. Vocês são mulheres e pesquisadoras incríveis.

Agradeço ao Laboratório de Análise de Vitaminas e a todas (os) vitaminadas (os), por toda troca durante estes dois anos. Por toda oportunidade de crescimento, ensinamentos e contribuições. Agradeço à equipe do Laboratório de Nutrição Experimental (em especial, Vinicius Brilhante e Renata Celi), por ceder o espaço para a realização do experimento, bem como por toda ajuda e suporte durante a realização do mesmo e por todo acolhimento. Agradeço também à equipe do Laboratório de Morfologia Animal (em especial, Donizete Silva, José

Geraldo e Prof.^a Sirlene Sartori), à equipe do Laboratório de Patologia Experimental (especialmente, Manoela Maciel e Rosinéia de Paula), por todo acolhimento e por cederem espaço para a realização das análises e ao Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros (principalmente à Prof.^a Mariella Bontempo e ao Pedro Henrique Neves), também por ceder espaço para realização de análises. Certamente sentirei falta do cafezinho e das conversas com Lúcia sobre pautas que só mulheres negras e retintas entenderiam!

Agradeço ao Fast Salad, Parthenon e instituto de pesquisa VIPPAZI, por terem sido minhas “agências de fomento” à pesquisa durante meu primeiro ano de mestrado. Ao trabalhar com vocês, pude aprimorar e desenvolver habilidades que já nem me lembrava que tinha. Agradeço a cada um pelo voto de confiança no meu trabalho. Ainda nos agradecimentos ao Fast Salad, agradeço a Paloma Silva, por toda confiança e por ser uma chefe maravilhosa. Agradeço também a Rayane Melo e Adriana Maria, por todo acolhimento e conhecimento compartilhado comigo.

Gratidão às psicólogas Dayanne Duarte e Eduarda Martins, por terem cuidado da minha saúde mental e não terem me permitido surtar.

Agradeço a mim mesma. Sem querer parecer prepotente ou soberba. Mas por tudo que aguentei e por tudo que passei para chegar até aqui, é preciso agradecer a mim mesma por não ter desistido.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, à FAPEMIG, pelo financiamento do projeto, e a CAPES, pela concessão da bolsa.

Agradeço à banca examinadora, por suas sugestões e contribuições para a melhoria deste trabalho.

A todos que estiveram comigo me apoiando e incentivando, minha eterna e profunda gratidão!

RESUMO

BARNABÉ, Michele Lílian da Fonseca, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Abril de 2024. **Efeito do consumo de grilo preto em pó associado à farinha de soja na biodisponibilidade de ferro, saúde intestinal e balanço oxidativo de ratos Wistar.** Orientadora: Ceres Mattos Della Lucia. Coorientadoras: Hércia Stampini Duarte Martino, Reggiani Vilela Gonçalves, Barbara Pereira da Silva, Izabella Maria Montezano de Carvalho.

O ferro é um dos minerais mais abundantes na natureza. Ainda assim, sua deficiência se caracteriza como a carência nutricional mais prevalente no mundo e atinge milhões de pessoas. Neste cenário, o consumo de insetos comestíveis surge como uma alternativa sustentável para lidar com questões relacionadas à melhora do *status* nutricional de ferro em países em que prevalece sua carência, tendo em vista seu excelente perfil nutricional. Além de macro e micronutrientes, os insetos aptos para o consumo humano são fontes de fibras e compostos bioativos, que podem impactar positivamente na saúde intestinal e no estresse oxidativo, respectivamente. Apesar disso, o consumo de insetos ainda apresenta resistência quanto a sua aceitação em uma sociedade ocidental. Uma alternativa para esse problema é a transformação desse ingrediente alimentar em um pó, bem como sua inserção em outras farinhas consumidas habitualmente. Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo investigar a biodisponibilidade de ferro presente em dietas experimentais contendo grilo preto (*Gryllus assimilis*) em pó, isolado ou em associação à farinha de soja (UFVTN 105AP), bem como seu efeito na saúde intestinal e balanço oxidativo em ratos Wistar. O conteúdo de ferro da albumina e das dietas foi determinado por espectrometria de absorção atômica. O método utilizado para a avaliação da biodisponibilidade foi o de depleção/repleção de hemoglobina, segundo a técnica da AOAC (1998), com modificações. Para este ensaio biológico, foram utilizados 32 ratos machos jovens (*Rattus norvegicus*, variedade albinus) da linhagem Wistar, distribuídos em quatro grupos (n=8/grupo), a saber: Grupo A: dieta padrão com sulfato ferroso (SF), Grupo B: dieta padrão contendo *Gryllus assimilis* em pó e farinha de soja (GP + FS) , Grupo C: dieta padrão contendo *Gryllus assimilis* em pó (GP); D: dieta padrão contendo farinha de soja (FS). Durante o período experimental, foram monitorados o peso corporal e o consumo alimentar para determinação do coeficiente de eficiência alimentar (CEA). Após a eutanásia dos animais, órgãos como fígado e intestino (duodeno) foram coletados. O conteúdo cecal foi utilizado para a realização de análises de ácidos graxos de cadeia curta, umidade fecal, pH fecal, consistência e coloração das fezes. Foram realizadas análises de produtos de peroxidação (malondialdeído, proteína carbonilada e óxido nítrico) e atividade de enzimas antioxidantes (catalase, supeóxido

dismutase e glutathione S-transferase) no fígado e realizadas análises histomorfométricas do duodeno (espessuras de mucosa e submucosa e diâmetro de células caliciformes). Durante a eutanásia, o sangue foi coletado por punção cardíaca para análises séricas de ferritina, transferrina e hemoglobina. O teste estatístico ANOVA seguido de post-hoc de Tukey foi realizado por meio do *software GraphPad Prism* (GraphPad software, San Diego, CA), versão 9.0. Foi estabelecido o nível de significância de 5% para todos os testes. O consumo de grilo em pó, associado à farinha de soja, mostrou-se mais eficaz na biodisponibilidade de ferro (HRE% = $41,13 \pm 10,86$ e RBV-HRE = $1,15 \pm 0,18$). Os animais que consumiram GP + FS apresentaram, ainda, maior umidade fecal ($21,29 \pm 3,80\%$), maior concentração de ácido acético ($10,02 \pm 0,76$ mmol/L) e maior atividade da superóxido dismutase ($1,27 \pm 0,27$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) e redução de malondialdeído ($1,95 \pm 0,37$ nmol/mg PTN), e manutenção da espessura de mucosa e submucosa e diâmetro de células caliciformes.

Palavras-chaves: Entomofagia; insetos comestíveis; anemia ferropriva; farinha de soja, morfologia intestinal, ácidos graxos de cadeia curta.

ABSTRACT

BARNABÉ, Michele Lílian da Fonseca, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April 2024.

Effect of consumption of black cricket powder associated with soy flour on iron bioavailability, intestinal health and oxidative balance in Wistar rats. Adviser: Ceres Mattos Della Lucia. Co-advisers: Hércia Stampini Duarte Martino, Reggiani Vilela Gonçalves, Barbara Pereira da Silva, Izabella Maria Montezano de Carvalho

Iron is one of the most abundant minerals in nature. Nevertheless, its deficiency is characterized as the most prevalent nutritional deficiency in the world, affecting millions of people. In this scenario, the consumption of edible insects emerges as a sustainable alternative to address issues related to improving iron nutritional status in countries where its deficiency prevails, considering their excellent nutritional profile. In addition to macro and micronutrients, insects suitable for human consumption are sources of fibers and bioactive compounds; such as glycosaminoglycans. Fibers have strong potential in improving intestinal health, and bioactive compounds have antifungal, antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory properties; capable of preventing inflammation and oxidative stress. However, the consumption of insects still faces resistance regarding its acceptance in Western society. An alternative to this problem is the transformation of this food ingredient in a powder, as well as their incorporation into blending with other commonly consumed flours. In light of the above, this study aims to investigate the bioavailability of iron present in experimental diets containing black cricket (*Gryllus assimilis*) powder, isolated or in combination with soybean flour (UFVTN 105AP), as well as its effect on intestinal health and oxidative balance in Wistar rats. This study also aims to systematically review the potential use of edible insects in enhancing nutritional value and altering sensory characteristics in food products. The iron content of albumin and diets was determined by atomic absorption spectrometry. The method used for assessing bioavailability was the hemoglobin depletion/repletion method, following the AOAC technique (1998), with modifications. For this biological assay, 32 young male rats (*Rattus norvegicus*, Wistar strain) were used, divided into four groups (n=8/group), namely: Group A: standard diet with ferrous sulfate (FS), Group B: standard diet containing *Gryllus assimilis* powder and soybean flour (GP + SF), Group C: standard diet containing *Gryllus assimilis* powder (GP), and Group D: standard diet with soybean flour (SF). During the experimental period, body weight and food consumption were monitored to determine the feed efficiency ratio (FER). After euthanasia of the animals, organs such as liver, intestine (duodenum), were collected. Cecal content were used to evaluate intestinal health through analyses of short-chain fatty acids, fecal moisture, fecal pH, consistency, and color of feces. Analysis of peroxidation products (malondialdehyde, carbonylated protein, and nitric oxide) and antioxidant enzyme activity (catalase, superoxide

dismutase, and glutathione S-transferase) was conducted in liver, as well as histomorphometric analysis of the duodenum (mucosal and submucosal thicknesses, and diameter of goblet cells). Blood was collected after euthanasia via cardiac puncture for serum analyses of ferritin, transferrin, and hemoglobin. Statistical tests ANOVA followed by Tukey's post-hoc test were conducted using GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA) version 9.0. A significance level of 5% was established for all tests. The consumption of cricket powder, in combination with soy flour, proved to be effective in iron bioavailability (HRE% = 41.13 ± 10.86 and RBV-HRE = 1.15 ± 0.18). The animals that consumed GP + FS also showed improvements in fecal moisture ($21.29 \pm 3.80\%$), acetic acid (10.02 ± 0.76 mmol/L), higher superoxide dismutase activity (1.27 ± 0.27 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$), and reduction of malondialdehyde (1.95 ± 0.37 nmol/mg PTN), as well as maintenance of mucosal and submucosal thickness and goblet cell diameter.

Keywords: Entomophagy, edible insects, iron-deficiency anemia, soy flour, intestinal morphology, short-chain fatty acids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Material e métodos:

Figura 1. Desenho experimental.

Figura 2. Tipo e característica das fezes de acordo com a escala de Bristol.

Figura 3. Corte histológico do duodeno de ratos *Wistar*.

Artigo 1:

Figura 1. Corte histológico duodenal para análise de mucosa e submucosa.

Figura 2. Corte histológico duodenal para análise de células caliciformes.

Figura 3. Efeito do consumo de *Gryllus assimilis* em pó isolado ou associado à farinha de soja no balanço oxidativo *in vivo*.

LISTA DE TABELAS

Material e métodos:

Tabela 1. Composição das dietas experimentais para a fase de depleção

Tabela 2. Composição das dietas experimentais para a fase de repleção

Artigo 1:

Tabela 1. Composição nutricional das dietas experimentais (g/kg)

Tabela 2. Composição química da farinha de soja e *Gryllus assimilis* em pó em base seca

Tabela 3. Consumo total, ganho de peso corporal, ingestão de ferro, utilização de ferro, índices para avaliação da biodisponibilidade de ferro

Tabela 4. Valores de hemoglobina, ganho de hemoglobina e níveis séricos de ferritina e transferrina na fase de repleção

Tabela 5. Análises de ácidos graxos de cadeia curta, umidade e pH fecal

Tabela 6. Efeito das dietas experimentais na histomorfometria duodenal de ratos Wistar

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AGCC: Ácidos Graxos de Cadeia Curta

CAT: Catalase

CEA: Coeficiente de Eficiência Alimentar

DMT-1: *Divalent Metal (Iron) Transporter 1* (Transportador de Metal Divalente 1)

DcytB: *Cytochrome b* (Citocromo b duodenal)

DP: Dieta Padrão

EBCF: Escala de Bristol para Consistência das Fezes

FAO: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FS: Farinha de Soja

GSH: Glutathione

GST: Glutathione-S-transferase

Hb: Hemoglobina

HCP1: *Haem Carrier Protein 1* (Proteína Transportadora Heme 1)

HCL: Ácido Clorídrico

HNO₃: Ácido Nítrico

HRE: Eficiência de Regeneração da Hemoglobina

MDA: Malondialdeído

mg: miligrama

mL: mililitros

NaOH: Hidróxido de sódio

ON: Óxido Nítrico

PCN: Proteína Carbonilada

GP: Grilo em pó

GP + FS: Grilo em pó + Farinha de soja

RBV: Relative Biological Value (Valor Biológico Relativo)

SF: Sulfato Ferroso

TCA: Ácido Tricloroacético

FTP: Ferroportina

Tf: Transferrina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	JUSTIFICATIVA.....	17
3.	HIPÓTESE.....	18
4.	OBJETIVOS	18
5.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
5.1.	Histórico da entomofagia.....	18
5.2.	Entomofagia e a segurança alimentar e nutricional	20
5.3.	Aspectos nutricionais da entomofagia	21
5.4.	Entomofagia: vantagens, desafios e perspectivas	22
5.5.	Gryllus assimilis	24
5.6.	Soja	24
5.7.	Ferro.....	26
5.8.	Insetos comestíveis e saúde intestinal.....	30
5.9.	Insetos comestíveis e balanço oxidativo	31
6.	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
6.1.	Farinha de soja	33
6.2.	Obtenção do Gryllus assimilis em pó	33
6.3.	Composição centesimal das farinhas	33
6.3.1	Desmineralização das vidrarias.....	33
6.3.2	Análise de ferro nas farinhas.....	33
6.3.3	Determinação de lipídios	34
6.3.4	Determinação de proteínas.....	34
6.3.5	Determinação de fibras	35
6.3.6	Determinação de cinzas	36
6.3.7	Determinação de umidade.....	37
6.3.8	Cálculo de carboidratos.....	37
6.4.	Biodisponibilidade de ferro nas farinhas	37
6.4.1	Ensaio biológico.....	37
6.4.2	Cálculo amostral	38
6.4.3	Dietas experimentais	38
6.4.4	Método de depleção/repleção.....	40
6.5.	Eutanásia.....	42

6.6. Testes hematológicos (Hemoglobina, ferritina e transferrina)	42
6.7. Determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).....	43
6.8. Análise dos níveis de estresse oxidativo - Perfil antioxidante.....	43
6.8.1. Atividade enzimática da superóxido dismutase	44
6.8.2. Atividade enzimática da catalase	44
6.8.3. Atividade da glutathiona-S-transferase.....	44
6.8.4. Quantificação de proteínas totais	45
6.8.5. Malondialdeído (MDA)	45
6.8.6. Óxido nítrico	45
6.8.7 Quantificação de proteína carbonilada.....	46
6.9. Determinação do pH cecal.....	46
6.10. Coloração e formato das fezes	46
6.11. Análise histomorfométrica do duodeno	47
6.12. Aspectos éticos	48
6.13. Análise estatística dos dados.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
7. RESULTADOS.....	56
7.1 ARTIGO: <i>Gryllus assimilis</i> EM PÓ ASSOCIADO À FARINHA DE SOJA (<i>Glycine max</i> (L) Merrill) AUMENTA A BIODISPONIBILIDADE DE FERRO E MELHORA SAÚDE INTESTINAL E BALANÇO OXIDATIVO <i>IN VIVO</i>	56
8. CONCLUSÃO GERAL	81
ANEXOS	82

1. INTRODUÇÃO

O termo entomofagia deriva do grego *éntomon*, “inseto” e *phagein*, “comer”; sendo assim definido como o ato de consumir insetos (Evans et al., 2015). Esta é uma prática antiga, tendo início com os primeiros hominídeos. Atualmente, cerca de 113 países são adeptos à entomofagia, e são conhecidas mais de 2.000 espécies de insetos comestíveis em todo o mundo (Araújo et al., 2022; Jongema, 2017; Silva Lucas et al., 2020;).

O consumo de insetos é extremamente comum em regiões da África, Ásia, Colômbia, México, China, Tailândia, Indonésia, Japão e Austrália (Defoliart, 2002; Jongema, 2017). Atualmente, os besouros lideram o *ranking* dos insetos mais consumidos, seguidos por lagartas, abelhas, vespas e formigas. Em seguida, citam-se os gafanhotos, grilos, cigarras, percevejos, cupins, libélulas e moscas (Jongema, 2017).

Estima-se que, nas próximas décadas, ocorra um grande crescimento populacional e a indústria alimentícia necessitará se reinventar para atender à demanda global de alimentos, por meio do desenvolvimento de produtos nutritivos de forma sustentável. Sob essa perspectiva, os insetos destacam-se como uma alternativa, tendo em vista suas qualidades nutricionais e seu sistema de produção, menos oneroso e mais sustentável quando comparado à produção de bovinos, peixes e aves (Araújo et al., 2022; Rupold e Schluter; 2013) .

Uma das estratégias para melhorar a aceitação dos insetos seria seu uso na forma de pó (Bisconsin-Junior et al., 2022). Portanto, a mistura de insetos em pó com farinhas mais habituais na alimentação humana como forma de complementação nutricional surge como alternativa, bem como sua inserção em produtos alimentícios (Aboge et al., 2022; Haber et al., 2020; Montevecchi et al., 2021). Farinhas de leguminosas, como a soja, por exemplo, se beneficiariam da adição de pós de insetos, tendo em vista a complementação de seus aminoácidos limitantes (Oibiokpa et al., 2018).

Proteínas, gorduras, fibras, vitaminas e minerais, especialmente ferro, zinco e cálcio, são nutrientes encontrados em insetos comestíveis (Mwangi et al., 2018; Ojha et al., 2021; Rupold e Schluter; 2013; Van-Huis et al., 2013). Sua composição nutricional, entretanto, pode variar de acordo com a espécie, o estágio de desenvolvimento e a dieta do inseto (Bessa et al., 2020; Toti et al., 2020). Dentre os insetos com potencial de utilização na alimentação humana, o *Gryllus assimilis* tem gerado interesse no meio científico, devido ao seu valor nutricional. Com relação ao perfil de minerais, este inseto apresenta em sua composição cobre (0,68 mg/100g), manganês (1,42 mg/100g), zinco (5,22 mg/100g) e ferro (2,78 mg/ 100g) sendo o conteúdo deste muitas vezes próximo ou superior ao encontrado em fontes animais (Araújo et al., 2019).

Insetos comestíveis apresentam alto conteúdo de fibra alimentar, uma vez que possuem índices elevados de quitina, que é o componente principal do exoesqueleto artrópode (Raheem et al., 2019). Gafanhotos migratórios apresentam cerca de 27% de fibra alimentar em seu peso seco, enquanto grilos apresentam 6,3%. Incluir fibra na alimentação está relacionado com a melhora da saúde intestinal e com a redução de doenças cardiovasculares (Bagchi, Ohia, 2021).

Nos insetos comestíveis são encontrados, ainda, compostos bioativos que possuem funções antifúngica, antimicrobiana, antiviral, antioxidante, antiinflamatória e efeitos imunomodulatórios (Seabrooks e Hu, 2017). Foram observados no *Gryllus assimilis* em pó compostos bioativos com propriedades antioxidantes e antimicrobianas, tais como os glicosaminoglicanos (Nowakowski et al., 2021; Rupold e Schluter; 2013).

Embora se observe o progressivo interesse nos insetos para a alimentação humana, bem como para a indústria no desenvolvimento de novos produtos, a biodisponibilidade do ferro no *Gryllus assimilis* em pó ainda é pouco explorada, bem como sua associação com a saúde intestinal e balanço oxidativo *in vivo*. Neste sentido o presente estudo visa preencher esta lacuna do conhecimento.

2. JUSTIFICATIVA

Estudos acerca do ferro são clássicos na literatura, tendo em vista que marcadores específicos para realização dos estudos experimentais já estão bem delimitados. Porém, ainda não há relato na literatura sobre investigações que tenham avaliado a biodisponibilidade de ferro presente em insetos com potencial para alimentação humana, bem como a relação destes insetos em pó, isolados ou associados à farinha de soja, na saúde intestinal e balanço oxidativo *in vivo*. Sendo assim, o presente estudo visa a obter resultados para contribuir com o preenchimento desta lacuna. Avaliar a biodisponibilidade de ferro em insetos em pó e sua correlação com a saúde intestinal e balanço oxidativo torna-se importante para embasar e encorajar o seu consumo pela população, auxiliar no desenvolvimento de novos produtos alimentícios, bem como encontrar fontes alternativas para melhoria do perfil nutricional de populações em países em desenvolvimento.

3. HIPÓTESE

Hipotetiza-se que o *Gryllus assimilis* em pó irá apresentar elevada biodisponibilidade de ferro e que, associado ou não à farinha de soja, influenciará positivamente nos parâmetros de saúde intestinal e balanço oxidativo *in vivo*.

4. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo geral*

Investigar a biodisponibilidade de ferro do *Gryllus assimilis* em pó, associado ou não à farinha de soja, e seu efeito na saúde intestinal e balanço oxidativo *in vivo*.

4.2. *Objetivos específicos*

- Determinar a concentração de ferro no *Gryllus assimilis* em pó e na farinha de soja;
- Investigar o efeito do *Gryllus assimilis* em pó, isolado ou em associação à farinha de soja, sobre o consumo alimentar e ganho de peso em ratos *Wistar*;
- Analisar a biodisponibilidade do ferro presente no *Gryllus assimilis* em pó, isolado ou em associação à farinha de soja, em ratos *Wistar*;
- Avaliar o efeito do *Gryllus assimilis* em pó, isolado ou em associação à farinha de soja, na atividade antioxidante e balanço oxidativo em ratos *Wistar*;
- Investigar o efeito do *Gryllus assimilis* em pó, isolado ou em associação à farinha de soja, na saúde intestinal de ratos *Wistar*.

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1. *Histórico da entomofagia*

A palavra entomofagia deriva do grego, e é definida como o ato de consumir insetos (Evans et al., 2015). Em tempos que remontam o período pré-histórico, não existiam ferramentas para a caça, o que fez com que o homem mantivesse uma dieta onívora e se alimentasse extensivamente de plantas e insetos, como ovos, larvas, pupas e insetos adultos como ingredientes alimentares (Kourimská, 2016).

Data-se que o consumo de insetos na China deu-se há 3.200 anos (Yi et al., 2010). Nos

banquetes que aconteciam no palácio real, os gafanhotos eram servidos em varas (Van-Huis et al., 2013), sendo comum também o consumo de larvas e pupas de vespas (Ying et al., 2010). De maneira geral, o ato de consumir insetos não era cotidiano, visto que eram considerados iguarias (Raheem et al, 2019).

De maneira oposta à crença popular, os insetos não são somente consumidos quando se há escassez ou impossibilidade de aquisição de alimentos “convencionais”. Em muitas regiões do mundo, o consumo de insetos acontece devido a sua palatabilidade e pelo hábito alimentar presente naquela região (Deroy et al., 2015; Van-Huis et al, 2013).

O consumo de insetos destaca-se nas regiões da África, Ásia, Colômbia, México, China, Tailândia, Indonésia, Japão e Austrália (Defoliart, 2002; Jongema, 2017). Porém, nos países que adotam os padrões dietéticos ocidentais, o ato de consumir insetos por parte da população humana é raro ou até mesmo culturalmente visto como inapropriado (Van-Huis, 2013). Contudo, a Organização das Nações Unidas para Alimentação Agricultura (FAO) coloca a produção de insetos como um meio de pensar a alimentação humana e a segurança alimentar (FAO, 2013).

A Organização das Nações Unidas para Alimentação Agricultura (FAO) vem, desde 2003, se dedicando a pontos relacionados à entomofagia em múltiplos países do mundo. A organização coloca a produção de insetos como um meio de pensar a alimentação humana e a segurança alimentar, tendo como foco gerar e compartilhar conhecimentos sobre o tema, bem como expandir o número de pesquisas e fomentar políticas e legislações sobre o uso de insetos (FAO, 2013).

Com o objetivo de explorar discussões acerca da utilização de insetos como alimentos e rações, foi realizada a Conferência Mundial sobre Insetos para Alimentar o Mundo, em 2014, onde estavam presentes representantes de 42 países. Nessa conferência, foram apontados os principais desafios para a inserção de insetos como alimentos: maior conscientização do público em geral para promover os insetos como alimento saudável para humanos e animais; influenciar os formuladores de políticas a aprovar legislações de alimentos e rações que incluam insetos; e promover maiores esforços de pesquisa para fornecer e propagar, com dados validados e evidências científicas, os benefícios do uso de insetos nas cadeias de alimentos (FAO, 2014).

Apesar de seus benefícios, é comum o questionamento acerca da segurança do consumo de insetos. Existem riscos microbianos, químicos, tóxicos e alergênicos; porém, os riscos tornam-se extremamente baixos desde que os insetos sejam criados em um ambiente higiênico e livre de substâncias tóxicas (Van-Huis et al., 2021).

No Brasil, a maior parte dos habitantes vive em centros urbanos e possui um padrão

alimentar ocidental, sendo a entomofagia uma prática mais comum em comunidades nativas e tradicionais nas regiões Norte e Nordeste (Costa-Neto, 2015; Macedo et al., 2017). É relativamente comum o consumo de insetos como içá ou tanajura (*Atta spp.*), bastante consumida em Minas Gerais, Amazonas e Nordeste brasileiro como um ingrediente das farofas; a larva do bicho-da-taquara (*Morpheis smerintha*, *Lepidoptera*); e a saúva (*Atta cephalotes*); formigas muito consumidas na região norte (Terramerica, 2013). Existem, no país, empresas que produzem insetos para consumo animal e humano, sendo os principais insetos produzidos o grilo-preto (*Gryllus assimilis*) e o tenébrio gigante (*Zophobas morio*) (Araújo et al., 2019).

5.2. Entomofagia e a segurança alimentar e nutricional

De acordo com a Lei Orgânica de Segurança Alimentar e Nutricional (LOSAN), de 15 julho de 2006 (Lei nº 11.346), entende-se como Segurança Alimentar e Nutricional (SAN) a realização do direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como base práticas alimentares que promovam a saúde e que respeitem a diversidade cultural e que sejam social, econômica e ambientalmente sustentáveis (BRASIL, 2006).

A insegurança alimentar tem se transformado em um problema para os seres humanos devido ao crescimento populacional, a elevação da demanda por alimentos e um declínio na disponibilidade (Gahukar, 2009). Ao redor do mundo, a entomofagia desempenha papel importante na segurança alimentar humana; sendo considerada uma estratégia prática e viável para amenizar este impasse (Gahukar, 2011). Em diversos grupos étnicos ao redor do mundo, a presença de um número notável de insetos nativos têm exercido um papel como fonte alimentar alternativa para lidar com a questão da insegurança alimentar (Puzari, 2020). Devido ao efeito positivo da ingestão de insetos na saúde humana e nos meios de subsistência, a FAO rotulou os insetos como uma fonte alternativa de alimento no combate da questão relacionada à insegurança alimentar (FAO, 2010).

Os insetos são uma fonte saudável e sustentável de proteínas, minerais, vitaminas e energia utilizados para lidar com a desnutrição e subnutrição em países em desenvolvimento e desenvolvidos (Govorushko, 2019; Tao e Li, 2018). O conteúdo de nutrientes dos insetos tende a variar de acordo com a espécie e, também, de acordo com o estágio do desenvolvimento em que o inseto se encontra. Entretanto, de maneira geral, insetos aptos para o consumo humano apresentam em seu perfil nutricional elevado conteúdo de zinco e ferro (Mwangi et al., 2018), os quais são essenciais em diversos processos bioquímicos (Wieser et al., 2013). Sendo assim,

o consumo de insetos comestíveis pode ser considerado uma maneira de auxiliar na melhora do *status* de micronutrientes (Mwangi et al., 2018).

5.3. Aspectos nutricionais da entomofagia

Devido à relevante gama de insetos comestíveis, seu perfil nutricional torna-se altamente diverso, podendo até variar entre a mesma espécie conforme sua dieta, seu estágio de desenvolvimento, sexo, bem como ambiente de crescimento e método de aferição dos nutrientes (Castro et al., 2018; Van-Huis e Oonincx, 2017).

Para o consumo humano, os insetos, sejam colhidos na natureza ou criados em *habitat* controlado, necessitam passar por processamento. Na literatura, foram observadas três formas principais de se ingerir insetos: inteiros, processados em formas granulares e pastosas ou, ainda, por meio da extração de um componente alimentar advindo do inseto (Govorushko, 2019). Quanto aos métodos de processamento convencionais, citam-se o vapor, a fervura, o cozimento, a fritura, a secagem ao sol e a defumação (Van-Huis e Oonincx, 2017). Em países que praticam a entomofagia, o consumo de insetos inteiros é mais comum, sendo o processamento em suas formas granulada e pastosa é comum em locais onde os habitantes não estão adaptados com o consumo de insetos inteiros como, por exemplo, a Europa. Já a extração de um componente alimentar é uma prática melhor aceita onde a entomofagia não é convencional (Van-Huis e Oonincx, 2017).

Os insetos são amplamente vistos como fonte alternativa de proteína, porém outros nutrientes também se destacam, como as gorduras, fibra alimentar, vitaminas e minerais também são encontrados em insetos comestíveis (Bisconsin-Junior et al., 2022; Van-Huis et al., 2013). Uma porção de 100 g de lagartas (larvas de mariposa ou borboleta) contribui com 76% da quantidade diária de proteínas e quase 100% da quantidade diária recomendada de vitaminas como riboflavina, ácido pantotênico e biotina; os besouros, gafanhotos e grilos, por sua vez, são ricos em folato (Rumpold e Schluter, 2013).

Grilos, gafanhotos, farinha de larvas e cupins possuem boas concentrações de ferro, zinco, cálcio, cobre, fósforo, magnésio e manganês (Ojha et al., 2021). O estudo sobre a análise do conteúdo de ferro se torna interessante tendo em vista que a deficiência deste mineral é frequente em países em desenvolvimento (Raheem et al., 2019). Os insetos aptos para o consumo humano apresentam concentrações de ferro diversificadas e que variam de acordo com as diferentes espécies, com seu estágio de desenvolvimento, bem como a sua dieta. A concentração de ferro varia entre 4 e 62 mg/100 g, sendo que o menor valor foi encontrado no

grilo tropical doméstico (*Grylloides sigillatus*) e o maior valor no cupim (*Macrotermes subhyalinus*) (Mwangi et al., 2018). Em contrapartida, carnes de frango e bovina fornecem 1,2 mg e 3 mg de ferro, respectivamente (Tao e Li, 2018). O conteúdo de ferro dos insetos comestíveis mostra-se, em alguns casos, superior ao da carne, porém a biodisponibilidade e a bioacessibilidade do ferro nos insetos como fonte alimentar ainda é pouco explorada (Castro et al., 2018; Ojha et al., 2021; Toti et al., 2020).

5.4. Entomofagia: vantagens, desafios e perspectivas

Estima-se que, em 2050, a população mundial seja de 9,5 a 10 bilhões de pessoas. Assim, emerge na sociedade a busca por novas fontes alimentares seguras, limpas, nutritivas e mais sustentáveis (Chantawhannakul, 2020; Raheem et al., 2019). Neste cenário, surge o interesse na utilização de insetos para a alimentação humana, tendo em vista a conscientização de que os mesmos são altamente nutritivos. Além disso, seu cultivo não necessita de grandes áreas, a manutenção possui baixo custo e os insetos podem ser de grande valia para indústrias químicas e farmacêuticas, servindo como insumos para a obtenção de compostos bioativos utilizados na fabricação de nutracêuticos (Matos, Castro, 2021; Traksele et al., 2021; Xia et al., 2011).

A criação de insetos requer menos recursos hídricos e térreos, tem melhor conversão alimentar, e gera menos gases de amônia e efeito estufa quando comparados ao gado convencional (Van-Huis e Oonincx, 2017). Entretanto, as vantagens nutricionais e ambientais não se demonstram suficientes para persuadir os ocidentais a inserir os insetos em sua dieta, sendo necessário então a criação de estratégias que incentivem o consumo deste alimento (Bisconsin-Junior et al., 2022).

Para a população ocidental, os insetos não são culturalmente vistos como um alimento padrão de seu consumo dietético. Tal fato dificulta a sua aceitação por parte da população e, conseqüentemente, a incorporação da entomofagia como um comportamento alimentar habitual (Bisconsin-Junior et al., 2022). Diante do exposto, observa-se uma aversão natural aos insetos como fonte alimentar, justificando a resposta neofóbica dos consumidores diante da entomofagia (Onwezen et al., 2021).

Alguns estudos apontam a repulsa como a barreira primordial para o consumo de insetos (Bisconsin-Junior et al., 2022; Lammers et al., 2019; Woolf et al., 2019). A repulsa é uma emoção humana universal, no entanto, é possível observar uma bagagem cultural influenciando a percepção cultural sobre o que seria repugnante ou não (Bisconsin-Junior et al., 2022). Tal fato se torna evidente quando observamos que o ato de consumir insetos é extremamente

comum em regiões da África e Ásia, e completamente repugnante em países ocidentais (Van-Huis et al., 2013).

A maneira como a entomofagia é vista difere entre as partes do mundo. Dessa forma, os métodos de comunicação utilizados para encorajar o consumo de insetos não devem ser os mesmos. Em regiões onde a segurança alimentar é instável, os insetos comestíveis devem ser promovidos visando aspectos econômicos e nutricionais. Nas regiões onde o consumo de insetos já é habitual, deve-se estimular a preservação e promoção deste hábito como forma de combater a influência das dietas ocidentais. Já nas regiões de alta renda, estratégias que promovam o consumo de insetos e de produtos derivados precisam livrar-se de preconceitos e do fator desgosto (Lange, Nakamura, 2021).

Uma das opções debatidas acerca da melhora da aceitabilidade da entomofagia são exposições educativas em zoológicos e museus, bem como palestras educativas que versem sobre a experiência de consumir insetos e atividades gastronômicas que apresentem opções de lanches, cardápios de restaurantes e bares e livros de receitas com insetos comestíveis (Lange, Nakamura, 2021).

Diversas estratégias têm sido propostas para melhorar a aceitabilidade dos insetos comestíveis. A mais fomentada está relacionada com a alteração da visibilidade dos insetos, convertendo-os, por exemplo, em pó. Tal estratégia se justifica porque o grau de processamento e, conseqüentemente, o nível de visibilidade do inseto é capaz de influenciar as expectativas emocionais com relação a um produto adicionado com insetos (Binconsin-Junior et al., 2022). Desta forma, os insetos sob a forma de pó, acrescentados em preparações prontas para o consumo ou em pasta, podem melhorar sua aceitação e expressar uma fase de transição para sua inserção na cultura alimentar de regiões que não praticam a entomofagia (Khatun et al., 2021; Megido et al., 2016).

A estratégia de usar os insetos na forma de pó abriu margem para estudos que analisassem seu potencial no enriquecimento nutricional de outras farinhas mais comuns na alimentação humana, bem como seus produtos (Aboqe et al., 2022; Haber et al., 2020; Montevecchi et al., 2021). Neste cenário, surge o interesse na mistura dos pós de insetos e soja, tendo em vista a complementação de ambas. A soja apresenta concentração elevada de proteínas vegetais (42 g/100 g), conta com oito aminoácidos essenciais, com destaque para o mineral potássio, mas é também fonte de fatores antinutricionais (Deepika et al., 2013). Já os insetos são ricos em proteína animal (60 a 70 g/100 g), são pobres em fatores antinutricionais e possuem diversos aminoácidos essenciais, principalmente metionina e cistina; que são aminoácidos limitantes na soja (Oibiokpa et al., 2018).

5.5. *Gryllus assimilis*

Os grilos são insetos noturnos e possuem como *habitat* ambientes com vegetação rasteira, campos nativos ou lavouras com baixa cobertura vegetal; bem como pedras, troncos ou galerias subterrâneas. Sua alimentação tem como base as folhas, ramos e raízes de plantas. Durante o dia, permanecem encobertos sob detritos e galerias subterrâneas, em ambientes úmidos e escuros (Barbosa et al., 2009; Moreira e Aragão 2009).

As espécies mais encontradas em nosso meio são o grilo-preto ou grilo-comum (*Gryllus assimilis*) e o grilo-marrom (*Anurogryllus muticus*). A primeira espécie é conhecida por ter também ambientes antrópicos, hortas e gramados como *habitat* natural. A segunda, adquiriu notoriedade mais recentemente devido a sua ocorrência em lavouras (EMBRAPA, 2007).

O *Gryllus assimilis* é uma espécie nativa das Índias Ocidentais, países da América do Sul e Central, estando presente também na América do Norte, como no Estado Unidos, no estado da Flórida, podendo ser criado com êxito e em grandes colônias em ambiente controlado (Starcevic et al., 2017). Seu perfil nutricional tem gerado interesse no meio científico, especialmente quanto a sua concentração de proteínas, que corresponde a cerca de 65% de sua composição (Araújo et al., 2019; Machado et al., 2019); seguidos por lipídios (21%), carboidratos (8%) e cinzas (4%) (Araújo et al., 2019). Com relação ao perfil de minerais, o *Gryllus assimilis* apresenta em sua composição cobre (0,68 mg/100g), manganês (1,42 mg/100g), ferro (2,78 mg/ 100g) e zinco (5,22 mg/100g); sendo que o ferro encontrado em insetos por muitas vezes é muito próximo ou até mesmo superior ao ferro encontrado em fontes animais de proteína (Araújo et al., 2019).

Apresentam, ainda, percentual significativo de fibra na forma de quitina (Ojha et al., 2021). A quitina não é solúvel em água, e pode ser parcialmente degradada por enzimas digestivas no trato gastrointestinal humano; prevenindo o crescimento de microorganismos patogênicos acarretando em melhora da saúde intestinal (Bagchi, Ohia 2021; Rinninella et al., 2019).

O *Gryllus assimilis* possui um perfil nutricional que o torna um alimento alternativo interessante para humanos e animais ou, ainda, para uso como matéria-prima na formulação de suplementos alimentares para dietas especiais (Araújo et al., 2019).

5.6. Soja

A soja (*Glycine max* (L) Merrill) cultivada no Brasil é uma planta herbácea, do gênero *Glycine* L. As principais variedades comerciais apresentam caule híspido, pouco ramificado e raiz com eixo principal e muitas ramificações. Desenvolvem vagens levemente arqueadas que, quando amadurecem, vão da cor verde para amarelo-pálido, marrom-claro, marrom ou cinza, podendo conter de uma a cinco sementes lisas, elípticas ou globosas, de tegumento amarelo pálido, com hilo preto, marrom, ou amarelo-palha (EMBRAPA, 2021).

Na composição química desta leguminosa estão presentes vitaminas (tocoferol, filoquinona, tiamina, riboflavina e folatos), fosfolipídios e minerais (potássio, fósforo, magnésio, enxofre, cálcio, cloreto, sódio, silício, ferro, zinco, molibdênio, manganês e cobre), além de outros componentes, como ácido fítico, inibidores de tripsina, oligossacarídeos que são biologicamente ativos (Esteves e Monteiro 2001; Mandarino, 2008).

Dentre as fontes de proteína vegetal, como os cereais e as leguminosas, a soja possui o maior conteúdo de proteínas (40%) e o segundo maior conteúdo de lipídios (20%). Seus compostos bioativos, como por exemplo os isoflavonoides, atuam no controle e diminuição do risco de doenças crônicas não transmissíveis (Achouri et al., 2005).

A soja é uma leguminosa de relevância na economia mundial e na alimentação humana, devido às suas propriedades nutricionais e funcionais. Por meio do melhoramento genético, surgem novos cultivares com sabor aperfeiçoado e com composição química modificada (Oliveira et al., 2007). O cultivar UFVTN 105 AP, utilizado no estudo, foi desenvolvido pelo Programa de Melhoramento de Soja do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO/UFV). Este é um cultivar produzido por meio de um método de retrocruzamento, apresentando em sua composição conteúdos de proteínas mais elevados e ausência de lipoxigenases (LOX1, LOX2 e LOX3). Tal ausência resulta em grãos com concentrações reduzidas em inibidores de tripsina, melhorando também o sabor e aceitação deste cultivar (Carvalho et al., 2009; Duarte Martino et al., 2011).

Além de proteínas e minerais, a soja possui também compostos com características antinutricionais como, por exemplo, o ácido fítico, inibidores de tripsina e oligossacarídeos que podem interferir negativamente na biodisponibilidade de minerais (Esteves e Monteiro, 2001; Mandarino, 2008). Porém, Carvalho et al. (2009) realizaram um estudo que avaliou a biodisponibilidade do ferro presente no cultivar UFVTN 105 AP. Este cultivar possui conteúdo de proteína elevado (43,1%) e oferece sabor superior às variedades convencionais (Duarte Martino et al., 2011). Os autores analisaram a biodisponibilidade do mineral mencionado na soja com casca e soja sem casca, tendo sido observado que a biodisponibilidade de ferro foi de 68,5% e 67,1%, respectivamente, quando comparados ao padrão sulfato ferroso (100% de

biodisponibilidade). Tais resultados mostram que o conteúdo de ferro presente na farinha de soja do cultivar UFVTN 105 AP é altamente biodisponível.

A soja é uma leguminosa que apresenta proteína de alto valor biológico (EMBRAPA, 2021). Os insetos em pó, apesar de apresentarem elevado teor proteico, são limitantes em alguns aminoácidos como por exemplo lisina e triptofano (Raheem et al., 2019). Desta forma, a mistura destas farinhas se torna benéfica tendo em vista a complementação de seus aminoácidos limitantes (Oibiokpa et al., 2018).

5.7. Ferro

5.7.1. Deficiência de ferro

O ferro é considerado o 4º elemento mais presente na natureza, sendo encontrado no organismo em dois estados denominados férrico (Fe^{3+}) e ferroso (Fe^{2+}) (Grotto, 2008; Margarita et al., 2018). O ferro é um mineral crucial para o bom funcionamento do organismo, possuindo papel de extrema importância em diversas funções biológicas, incluindo respiração, geração de energia, síntese de DNA e proliferação celular; sendo também um importante cofator de proteínas ligadas ao transporte de oxigênio (Camaschella, 2015; Margarita et al., 2018).

Apesar de serem tidas como sinônimos, deficiência de ferro e anemia ferropriva possuem definições distintas. A deficiência de ferro é entendida como a depleção das reservas de ferro corporal total; já a anemia ferropriva é conhecida como o terceiro estágio e a forma mais evidente de manifestação da deficiência de ferro (Camaschella, 2019). A maneira mais grave da depleção das reservas de ferro se manifesta na forma de anemia ferropriva, sendo esta enfermidade mais comum em crianças, mulheres jovens e mulheres grávidas; tendo em vista que são fases da vida onde a necessidade metabólica deste mineral se encontra elevada. Embora a deficiência de ferro seja o principal distúrbio nutricional presente globalmente, os projetos governamentais de suplementação têm contribuído para a redução desses índices (Camaschella, 2015; Pasricha et al, 2020).

Os sinais e sintomas da deficiência de ferro muitas vezes são ignorados. O sintoma de maior relevância é a fadiga, sendo que a longo prazo alterações como boca seca, queilite, glossite atrófica, teias faríngeas de Plummer-Vinson e perda de cabelo, também são sinais que podem predizer uma anemia por deficiência de ferro (Camaschella, 2019).

O diagnóstico correto da deficiência de ferro se dá por meio de exames laboratoriais. Níveis baixos de ferritina sérica são considerados o padrão ouro para a identificação da

deficiência de ferro, uma vez que avalia a depleção dos estoques deste mineral. No contexto de uma inflamação, o diagnóstico da anemia pode precisar de mais de um tipo de teste laboratorial e adota-se um teor mais alto de ferritina (100 μ l) como um preditor, já nos casos de insuficiência renal e doenças cardíacas o diagnóstico de deficiência de ferro também adota maiores teores (300 μ l) (Grotto, 2010).

As principais fontes dietéticas de ferro são as vísceras, como, por exemplo, o fígado, seguido pelos mariscos, ostras, rim, coração, carnes magras, aves e peixes. Dentre as fontes vegetais, se destacam os feijões, os grãos integrais e as frutas secas, porém sua biodisponibilidade é menor do que nas carnes (Costa e Peluzio, 2021).

Diversos fatores podem interferir na absorção e consequente biodisponibilidade do ferro. Dentre os fatores que interferem positivamente na absorção do mineral mencionado, citam-se fatores fisiológicos como, por exemplo, a deficiência de ferro, a hemocromatose, a gravidez e a eritropoiese aumentada; e os dietéticos e intraluminais como ácido ascórbico, ácido cítrico, aminoácidos sulfurados e produtos da digestão de carnes (Costa e Martino, 2016). Os fatores que interferem negativamente na absorção de ferro também podem ser fisiológicos ou dietéticos e intraluminais. Com relação aos fatores dietéticos ou intraluminais, têm-se a precipitação por alcalinização, fitatos, ingestão de compostos alcalinos ou de antiácidos, proteína do leite, albumina, gema de ovo e proteína da soja, café e chá. Já com relação aos fatores fisiológicos, cita-se saturação de ferro, trânsito intestinal acelerado, síndrome de má absorção, aquilia ou acloridria, doenças que causam anomalias na mucosa intestinal; como por exemplo a doença celíaca (Costa e Martino, 2016).

5.7.2. *Absorção do ferro*

A absorção de ferro acontece através dos enterócitos e envolve seu transporte por meio de diferentes barreiras, como, a membrana apical, a translocação através do citosol e a liberação do ferro na membrana basolateral na corrente sanguínea. O conteúdo de ferro da dieta pode ser absorvido por duas vias, sendo elas a via paracelular ou transcelular, sendo a última dependente de energia (Grotto, 2010). A fração de ferro que é absorvida da quantidade ingerida é relativamente baixa, podendo variar de 5% a 35%, dependendo das condições e do tipo de ferro (Abbaspour et al., 2014).

A absorção intestinal do ferro é responsável por regular seu balanço. A absorção pode acontecer em qualquer parte do intestino delgado, porém, é no duodeno que se tem a maior eficiência. Antes de ser captado pela borda em escova das células da mucosa, os átomos de ferro

devem primeiro atravessar a camada de muco. O próprio muco tem a propriedade de se ligar ao ferro, sendo este mineral mais solúvel no estado ferroso (Fe^{2+}) do que na sua forma férrica (Fe^{3+}). Portanto, o Fe^{2+} atravessa a camada de muco mais rapidamente para alcançar a borda em escova, onde é ligado a proteínas ligantes de ferro, como por exemplo, a mucina (glicoproteína do muco). As proteínas ligantes de ferro vão transferir o mineral para dentro da célula. O ferro também pode ser carregado através do enterócito por outras duas proteínas ligantes, como a integrina e mobilferrina, que são semelhantes à transferrina. A integrina, localizada nas vilosidades intestinais, facilita o transporte do mineral para dentro da célula, enquanto que a mobilferrina recebe o ferro da integrina, que atua como uma proteína protetora de ferro no citosol até a membrana basolateral (Grotto, 2010).

O ferro não heme também pode ser transportado do lúmen intestinal para o interior do enterócito através da proteína transportadora de metal divalente (DMT-1), porém, a DMT-1 transporta apenas o ferro em seu estado mais solúvel. Assim, como a maior parte do ferro presente no lúmen está na forma férrica e menos solúvel, ocorre então, a redução da forma férrica em ferrosa. Esse processo de redução acontece na borda em escova por meio de redutase férrica, citocromo duodenal B (DCYTB) ou através de agentes redutores como o ácido ascórbico. O influxo de ferro através da membrana basolateral para a circulação é mediada pela proteína transportadora, ferroportina 1 e a oxidase férrica, hefaestina. Além disso, a ferroportina 1 também favorece a liberação de ferro de outras células, incluindo macrófagos (Scheers, 2013).

No momento em que o ferro alcança o plasma, ele é oxidado a Fe^{3+} pela ceruloplasmina e, sequentemente captado pela transferrina. A porção de ferro no citosol que ultrapassa a capacidade de ligação com a transferrina liga-se à ferritina, onde é liberada na circulação sanguínea. Porém a maioria permanece nas células da mucosa, sendo posteriormente eliminado do organismo dentro de dois a três dias, através da descamação das células no lúmen intestinal. Assim, o ferro ligado à transferrina é, então, liberado para os estoques no fígado, no baço e na medula óssea, bem como para os tecidos, que precisam de ferro. Para que o ferro seja captado pelos tecidos é preciso uma ligação da transferrina aos receptores celulares. O complexo formado por essa ligação penetra na célula por endocitose e forma uma vesícula no seu interior. As enzimas lisossomais liberam o Fe^{3+} e a apotransferrina, sendo esta levada de volta à superfície da célula e segue para o plasma. A maioria do ferro encontrado no organismo está ligado a uma proteína, e não na forma livre. Essa ligação atua protegendo o ferro da filtração glomerular servindo como um mecanismo de defesa, visto que o Fe^{2+} reage prontamente com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerando radicais livres, que são extremamente reativos e causam danos à célula (Costa e Martino, 2016).

Em geral, o ferro atravessa a célula sendo liberado no plasma na forma de Fe^{3+} , entretanto, apenas uma pequena porção do ferro heme que entra na célula chega até a veia porta como ferro heme. Este, ao ser captado por HCP1 (transportador de ferro heme) sofre endocitose e o ferro ferroso é liberado dentro do endossomo ou lisossomo no citossol do enterócito, seguindo o mesmo percurso do ferro não heme (Costa e Martino, 2016).

5.7.3. Armazenamento e excreção

Após a absorção, o ferro possui dois caminhos: pode ser exportado diretamente para o plasma através da superfície basolateral da célula ou então ser armazenado por alguns dias (Mackenzie e Garrick, 2005). Grande parte do ferro circulante no plasma advém da destruição das hemoglobinas (macrófagos do sistema reticuloendotelial) e pode ser armazenado no fígado na forma de ferritina ou hemossiderina (Abbaspour et al., 2014).

Juntas, a concentração de ferritina e hemossiderina refletem os estoques de ferro do corpo. Ambas armazenam ferro em uma forma insolúvel e estão presentes principalmente em órgãos como fígado, baço e medula óssea (Abbaspour et al., 2014). Na eritropoese, acontece a reutilização do ferro presente na hemoglobina. Um adulto normal libera cerca de 20 a 25 mg de ferro por dia do catabolismo das hemoglobinas. A porção heme da molécula é catabolizada pela heme oxigenase a biliverdina e, subsequentemente, a bilirrubina, que é, então, secretada na bile e excretada do organismo. O ferro degradado retorna à circulação ligado à transferrina. A transferrina se liga a receptores de transferrina (TfR) específicos nos precursores de eritrócitos na medula óssea e o ciclo se completa quando um novo eritrócito entra na circulação, sendo que mais de 90% do ferro da hemoglobina é reutilizado. Na deficiência de ferro a transferência deste mineral no ciclo eleva-se pelo aumento da expressão de ferroportina nos macrófagos, bem como pela síntese hepática de transferrina e expressão de TfR1 na medula óssea e outros tecidos (Costa e Martino, 2016).

5.7.4. Biodisponibilidade de ferro

Entende-se por biodisponibilidade a parcela de um nutriente ingerido que se torna disponível para ser usada e armazenada no corpo (Melse-Boonstra, 2020). Desta forma, a biodisponibilidade do ferro se refere à fração do mineral passível de ser absorvida pelo trato gastrointestinal, sendo sequentemente armazenada (Schafer, 2011). O ferro pode ter sua biodisponibilidade afetada negativa ou positivamente por fatores fisiológicos e dietéticos (Costa e Martino, 2016). Dentre os fatores dietéticos que inibem a absorção de ferro, podemos citar o

ácido fítico, os polifenóis, o cálcio e as proteínas. Já com relação ao aumento da absorção do ferro, podemos citar o ácido ascórbico (Fairweather-Tait e Sharp, 2021). Sobre os fatores fisiológicos, sabe-se que a anemia e a deficiência de ferro atuam aumentando a sua absorção; já situações onde há trânsito intestinal acelerado, saturação de ferro, distúrbios absorptivos e doenças que afetam a mucosa intestinal (como, por exemplo, a doença celíaca), a absorção do ferro será prejudicada (Costa e Martino, 2016).

Diversos fatores podem interferir diretamente na biodisponibilidade de nutrientes dos insetos comestíveis, desde a forma em que esses insetos foram criados (qualidade do substrato alimentar, condições ambientais, estado de desenvolvimento) e processamento de alimentos (alterações físicas, químicas e/ou biológicas), bem como o consumo de alimentos à base de insetos e subsequente digestão, absorção e metabolismo (Ojha et al., 2021). A biodisponibilidade de minerais, de maneira geral, necessita de diversos processos como a liberação do nutriente da matriz físico-química alimentar; efeitos da digestão enzimática no intestino; ligação e absorção através da mucosa intestinal; transferência através da parede intestinal para a circulação sanguínea ou linfática; distribuição e deposição sistêmica; uso metabólico e funcional; bem como excreção via urina ou fezes (Mwangi et al., 2018).

Em animais vertebrados, o ferro se encontra concentrado nos músculos na forma de mioglobina e hemoglobina; já nos insetos, o ferro na sua forma primária (ferro heme) é encontrado nos citocromos. Suspeita-se que a biodisponibilidade do citocromo ferro heme, mioglobina e hemoglobina sejam parecidas (Mwangi et al., 2018). Em insetos, o ferro não heme se faz presente como: ferritina e holoferritina. Cada molécula de ferritina pode abrigar milhares de átomos de ferro, uma vez que esta proteína tem como função o armazenamento deste mineral, geralmente em seu estado ferroso, o que eleva sua biodisponibilidade (Latunde-Dada et al., 2016).

Assim como outros insetos comestíveis, os grilos são considerados fontes ricas de minerais nutricionais (Araújo et al., 2019). Entretanto, muitas vezes o conteúdo de minerais pode ser alto e a biodisponibilidade pode não ser eficiente, uma vez que a biodisponibilidade de um alimento depende de sua matriz alimentar, bem como do seu processo de digestão e absorção (Ojha et al., 2021). Por isso se faz importante analisar a biodisponibilidade de ferro presente no *Gryllus assimilis* em pó, para saber o quanto do ferro presente realmente é aproveitado pelo organismo.

5.8. Insetos comestíveis e saúde intestinal

Os insetos aptos para o consumo humano são nutritivos e econômicos do ponto de vista ecológico. Existem relatos do uso de insetos comestíveis como forma de tratamento de diversas doenças, e acredita-se que eles possuem potencial para atuar na melhora da saúde (Van-Huis, 2018).

Proteínas, gorduras, fibras alimentares, minerais e vitaminas são nutrientes encontrados em insetos comestíveis (Bisconsin-Junior et al., 2022; Van-Huis et al., 2013). Os micronutrientes presentes na composição nutricional dos grilos apresentam potencial na prevenção de anemia, melhora na função do sistema imunológico, melhora na função cognitiva e saúde gastrointestinal em humanos (Abril et al., 2022).

Os efeitos benéficos da fibra na saúde intestinal têm sido amplamente estudados. Insetos comestíveis apresentam alto teor de fibra alimentar, uma vez que possuem índices elevados de quitina, que é o componente principal do exoesqueleto artrópode (Raheem et al., 2019). Sendo 65,6 mg/kg a quantidade média de quitina observada na matéria seca em insetos comestíveis (Bagchi e Ohia, 2021). Quitina não é solúvel em água, e pode sofrer degradação parcial de enzimas digestivas no trato gastrointestinal humano. Este polímero e seus derivados evidenciam uma prevenção no crescimento de microorganismos patogênicos como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* e *Vibrio Cholera* (Bagchi e Ohia, 2021; Rinninella et al., 2019).

A fibra alimentar presente no pó de insetos comestíveis, por vezes, é muito próxima à fibra encontrada em farinha de trigo integral e farinha de soja (Nowakowski et al., 2021). Gafanhotos migratórios apresentam cerca de 27% de fibra alimentar em seu peso seco, besouros e larvas amarelas apresentam 18% e grilos apresentam 6,3%. Incluir fibra na alimentação está relacionado com a melhora da saúde intestinal e melhora na eficiência contra doenças cardiovasculares (Bagchi e Ohia, 2021).

5.9. Insetos comestíveis e balanço oxidativo

Mudanças no padrão alimentar global mostram crescente aumento da ingestão de alimentos com alta densidade energética e com baixos conteúdos de minerais, vitaminas e fibras (Martins et al., 2021). Uma dieta na qual predominam alimentos gordurosos e com baixo conteúdo de fibras torna-se fator de risco para o desenvolvimentos de distúrbios metabólicos e inflamatórios crônicos que atingem diversos órgãos (Wali et al., 2020).

Patologias como aterosclerose, doença pulmonar obstrutiva crônica, *Alzheimer* e câncer são ocasionadas devido a um estresse oxidativo (Forman e Zhang, 2021). Entende-se por estresse oxidativo o desequilíbrio entre radicais oxidantes livres e as defesas antioxidantes. Ou

seja, é um estado cujo radicais livres estão em excesso e as defesas antioxidantes estarão trabalhando de maneira insuficiente no combate aos radicais; ocasionando danos aos sistemas biológicos (Sies et al., 2017).

Funções antifúngica, antimicrobiana, antiviral, antioxidante e antiinflamatória são comuns dos compostos bioativos encontrados em insetos comestíveis (Seabrooks e Hu, 2017). Foram observados no *Gryllus assimilis* em pó compostos bioativos como os glicosaminoglicanos e peptídeos com propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Nowakowski et al., 2021). Além disso, este inseto apresenta quantidade satisfatória de zinco, que é um mineral conhecido por suas propriedades antioxidantes (Rumpold e Schluter, 2013).

A característica antioxidante de hidrolisados de insetos e frações peptídicas faz com que esses compostos contribuam para a redução da inflamação e estresse oxidativo, por meio da diminuição dos radicais livres presentes no organismo (Messina et al., 2019; Nowakowski et al., 2021). Desta forma, observa-se que o inseto em pó, bem como seu hidrolisado e frações de peptídeos, apresentam potencial para prevenir enfermidades cuja origem esteja associada à inflamação crônica e ao estresse oxidativo (Nowakowski et al., 2021).

Ainda são insuficientes na literatura estudos acerca das propriedades funcionais de insetos comestíveis. Entretanto, Stull e colaboradores (2018) observaram em seu estudo que o consumo de 25 g de *Gryllus assimilis* em pó por dia apresentou propriedade de redução dos níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α circulante no plasma de humanos. Outro estudo realizado com hidrolisado de *Tenebrio molitor* (10 g de tenébrio em 100 mL de água destilada) mostrou atividade de erradicação dos radicais livres (Tang et al., 2018). Ainda assim, são necessários maiores estudos que elucidem os compostos bioativos presentes nos insetos comestíveis, e sua função antioxidante.

6. MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio biológico e as análises de composição centesimal no *Gryllus assimilis* em pó e na farinha de soja foram realizados no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde, da Universidade Federal de Viçosa (DNS/UFV), e as análises de composição mineral foram conduzidas com o Laboratório de Análise de Solos (Departamento de Solos/UFV). As análises de balanço oxidativo foram realizadas no Laboratório de Patologia Experimental (BDA/UFV) e Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros (BDA/UFV). Já as análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Morfologia Animal (BDA/UFV).

6.1. Farinha de soja

A soja (UFVTN 105 AP) utilizada no estudo foi cedida pelo Programa de Melhoramento de Soja do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO/UFV), sendo desenvolvida por meio de um método de retrocruzamento.

Para a obtenção das farinhas, os grãos foram moídos utilizando um moinho de facas (peneira de 600 μm , tamanho 30 *mesh*; moedor vertical rotor MA 090 CFT, Marconi, Brasil) com granulometria de 850 μm . Posteriormente, a farinha de soja foi acondicionada em sacos de polietileno e armazenada em freezer (-20°C) até o momento de ser usada na elaboração das dietas.

6.2. Obtenção do *Gryllus assimilis* em pó

O *Gryllus assimilis* em pó foi obtido da empresa Ecological Food, que realiza a criação de insetos para alimentação animal localizada na cidade de Limeira (SP). Esses insetos foram criados sob um regime de alimentação que consistia em: farelo de trigo, ração de codornas (sem carne ou restos de animais), cenoura e água. Os insetos foram mantidos em criadouro específico cuja temperatura girava em torno de 28° C a 30° C, e quando atingiram a vida adulta foram abatidos por congelamento. Após separação para a remoção de excrementos, foram submetidos a um jejum de 24 horas para reduzir o conteúdo intestinal, que não pode ser removido manualmente. Em seguida, foram abatidos por redução de temperatura (congelamento a -18 °C por 24 horas), passaram por branqueamento durante 5 minutos e sofreram choque térmico. Após, foram desidratados em estufa com circulação de ar a 45°C por 48 horas, triturados em liquidificador e peneirados para obtenção de um pó de fina granulação.

6.3. Composição centesimal das farinhas

6.3.1 Desmineralização das vidrarias

As vidrarias e utensílios utilizados tanto na determinação do teor de ferro quanto nos ensaios biológicos foram desmineralizados, utilizando-se uma solução de ácido nítrico (HNO₃) 10%, na qual permaneceram por 24 h, sendo, posteriormente, enxaguados com água deionizada.

6.3.2 Análise de ferro nas farinhas

A digestão e a análise de ferro foram realizadas de acordo com o postulado por Gomes *et al.* (2003). Foram pesados separadamente 2 g de cada farinha (pó de *Gryllus assimilis* e farinha de soja) em papel manteiga, em balança analítica (Gehaka, BG2000, Brasil), e transferidos para tubos de digestão. Em seguida, 10 mL de ácido nítrico à temperatura ambiente

foram adicionados aos tubos e mantidos em bloco digestor, a 150°C, por 16 horas. Quando necessário, 5 mL de ácido nítrico eram adicionados aos tubos. Após a digestão, os tubos foram resfriados em temperatura ambiente e as amostras transferidas para balões volumétricos de 50 mL, sendo os tubos lavados com água deionizada e agitados em vórtex, por 3 vezes. Para análise, os extratos foram diluídos apropriadamente utilizando água deionizada. O conteúdo de ferro foi determinado no Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa, por espectrometria de emissão atômica (SpectrAA, Modelo 220 FS), e com as seguintes condições: potência de 1300 W, fluxo de ar refrigerante de 15 L/minuto, fluxo de ar auxiliar de 0,7 L/minuto, fluxo de ar carregador de 0,5 L/minuto, velocidade de introdução de amostra de 1,5 mL/minuto e uso de nebulizador Perkin Elmer.

6.3.3 Determinação de lipídios

Para a determinação de lipídios, utilizou-se o método de Soxhlet, no qual 5 g de amostra seca foram pesados em um cartucho e cobertos com algodão. O peso das amostras (Peso A) foi anotado e os cartuchos identificados a lápis. Balões de 250 mL (1 para cada amostra) foram lavados e colocados na estufa a 105°C por 12 horas (*overnight*) e, em seguida, resfriados em dessecador. Foi pesado o balão seco vazio (Peso 1) e o peso anotado. Posteriormente foi montado o sistema de extração (balão + extrator + cartucho + 2 “viragens” de éter etílico), que permaneceu por 8 horas sob aquecimento. Após as 8 horas, o cartucho foi retirado e o éter etílico guardado para posterior recuperação. Os balões foram deixados na capela por 20 minutos e posteriormente secos em estufa a 105°C por 24 horas (com a porta ligeiramente aberta nos primeiros 30 minutos). Seguidamente foram resfriados em dessecador e pesados (Peso 2). O teor de lipídios foi dado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Teor de lipídios (\%)} = \frac{\text{Peso 2} - \text{Peso 1}}{A} \times 100$$

6.3.4 Determinação de proteínas

A determinação proteica foi realizada por meio da digestão, destilação e titulação pelo método de Kjeldahl. Em triplicata, 0,05 g de amostra foram pesadas em papel manteiga. Cuidadosamente os papéis foram dobrados e colocados em tubos de digestão. Para os brancos, os papéis foram colocados vazios. Em seguida foram acrescentadas nos tubos 1 ponta de espátula de mistura digestora (aproximadamente 1 g) e, posteriormente, 3 mL de ácido sulfúrico.

Os tubos foram, então, colocados para digerir em bloco digestor, onde permaneceram

por 1 hora a 300°C. Após este tempo, a temperatura foi aumentada para 350°C por 30 minutos e, posteriormente, para 380°C por mais 30 minutos. Em seguida, o bloco foi desligado e as amostras foram colocadas para esfriar em temperatura ambiente.

Foram preparados erlenmeyers de 250 mL (1 para cada tubo digestor) com 10 mL de ácido bórico. As amostras foram colocadas no destilador de Kjeldahl, onde foram acrescentados 15 mL de NaOH 50% até a mudança de coloração das amostras para o marrom. Em seguida, 100 mL de condensado foram recolhidos no erlenmeyer e titulados com HCL 0,05N.

O fator 6,25 foi utilizado no cálculo da conversão de nitrogênio em proteínas, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrogênio} \times 6,25$$

6.3.5 Determinação de fibras

A análise total de fibra alimentar foi realizada de acordo com o método enzimático gravimétrico (AOAC, 2012). Os cadinhos utilizados nesta análise foram deixados em imersão durante a noite em detergente neutro (concentração de 20%) e, em seguida, lavados com água destilada até a remoção de todo o sabão. Em seguida, os cadinhos foram secos em estufa colocados na mufla a 525°C por 5 horas.

Em seguida, os cadinhos foram lavados 5 vezes com 20 mL de HCl 0,5N na direção normal, neutralizando 2 vezes com 10 mL de água destilada na mesma direção e 3 vezes com 20 mL de água destilada na direção oposta. Os cadinhos foram secos em estufa a 105°C por 12 horas, resfriados e pesados para obtenção da tara zero. Em seguida, em cada cadinho, foi pesado 1 g de celite, sendo estes colocados em uma estufa a 105°C durante a noite para obtenção da tara 1. Posteriormente, foi realizada a hidrólise enzimática das amostras: 4 béqueres (600 mL) foram preparados para cada amostra, e nelas foram pesados 0,5 g de amostra. Foram adicionados 50 mL de tampão fosfato (pH 6,0) e o pH das amostras foi ajustado para 6,0. Em seguida, foi adicionado 0,1 mL de alfa-amilase termo resistente e os béqueres foram colocados em banho-maria (97°C) por 30 minutos. Após esse período, os béqueres foram resfriados, ajustado o pH para 7,5 e adicionado 0,2 mL de protease, incubando-os a 60°C em banho-maria por 30 minutos com agitação constante. Após esse processo, os béqueres foram novamente resfriados, o pH ajustado para 4,3 e adicionado 0,1 mL de amiloglicosidase, colocando-os em banho-maria a 60°C por 30 minutos.

A fibra alimentar insolúvel foi determinada da seguinte forma: os cadinhos preparados foram acoplados à bomba de vácuo e o conteúdo dos béqueres foi vertido neles, sendo lavados com 30 mL de água destilada. O conteúdo foi transferido de volta para o béquer e adicionados

320 mL de etanol 98% aquecido a 60°C. Essa fração corresponde à fibra solúvel no cadinho e o resíduo à fibra insolúvel. Os cadinhos foram lavados duas vezes com 20 mL de etanol 95% e duas vezes com 20 mL de acetona, sendo colocados em uma estufa a 105°C durante a noite para posterior pesagem.

O resíduo no cadinho foi lavado 2 vezes com 20 mL de etanol 78% (v/v), 1 vez com 10 mL de etanol 95% e 1 vez com 10 mL de acetona, sendo colocado em uma estufa a 105°C durante a noite, e resfriado por 2 horas em uma dessecadora. Posteriormente, os dados foram analisados para a determinação total de fibra dietética usando a seguinte equação:

$$\text{Fibra dietética (\%)} = \frac{(R1 + R2 \div 2) - p - A - B}{m1 - m2 \div 2} \times 100$$

Onde:

m1 = peso da amostra 1

m2 = peso da amostra 2

R1 = peso de resíduo 1 de m1

R2 = peso de resíduo 2 de m2

A = peso da cinza de R1

p = peso de proteína de R2

B = branco

B = $\frac{BR1 + BR2}{2} - BP - BA$

2

6.3.6 Determinação de cinzas

A determinação da concentração de cinzas foi realizada à temperatura de 550°C. Cadinhos de porcelana foram pesados em balança analítica. Então, 5 g da amostra foram pesados e adicionados aos cadinhos. Aconteceu uma lenta carbonização da amostra em mufla, até a exalação do vapor, aumentando a temperatura em 50° C a cada 5 min até atingir 300°C, sendo mantida nesta temperatura por 30 min. As amostras foram levadas à estufa a 550° C até a obtenção de peso constante e coloração clara ou levemente acinzentada.

As amostras foram resfriadas em dessecador contendo sílica gel em temperatura ambiente por 30 min para posterior pesagem em balança analítica. A concentração de cinzas foi obtida pela seguinte fórmula:

$$\text{Concentração de cinzas (\%)} = \frac{(\text{peso do cadinho} + \text{cinzas}) - \text{peso do cadinho}}{(\text{peso do cadinho} + \text{amostra}) - \text{peso do cadinho}} \times 100$$

6.3.7 Determinação de umidade

Para determinar a umidade, placas de petri (3 placas para cada amostra) foram lavadas e, posteriormente, secas em estufa a 105°C por 4 horas. Em seguida, as placas ficaram no dessecador por 30 minutos para resfriar. Após, pesou-se a placa vazia (Peso 1), e a placa adicionada de 10g de amostra (Peso 2). As placas contendo as amostras foram levadas para secar em estufa a 105°C por 24 horas. Sendo depois resfriadas em dessecador, e tendo novamente o seu peso mensurado (Peso 3).

A concentração de umidade foi obtida através das seguintes fórmulas:

$$\text{Teor de sólidos (\%)} = \frac{\text{Peso 3} - \text{Peso 1}}{\text{Peso 2} - \text{Peso 1}} \times 100$$

$$\text{Teor de umidade (\%)} = 100 - \text{Teor de sólidos}$$

6.3.8 Cálculo de carboidratos

Os carboidratos foram calculados por diferença de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{Carboidratos} = 100 - (\% \text{ proteína} + \% \text{ lipídios} + \% \text{ fibras} + \% \text{ cinzas} + \% \text{ umidade})$$

6.4. Biodisponibilidade de ferro nas farinhas

6.4.1 Ensaio biológico

Foram utilizados 32 ratos machos jovens (*Rattus norvegicus*, variedade albinus) da linhagem *Wistar*, com 21 dias de idade, recém-desmamados, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa, com peso inicial médio de 50 a 70 g. No transporte dos animais até o biotério setorial do LNE/DNS/UFV, foram utilizados contêineres seguros, confortáveis e à prova de fuga. Esse processo se deu em um curto espaço de tempo, para evitar estresse aos animais. Estes permaneceram em ambiente com temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), em gaiolas individuais de aço inox (18 cm de altura x 20 cm de largura x 31 cm de comprimento) e em ciclo claro-escuro de 12 horas, controlado automaticamente.

O método utilizado para a avaliação da biodisponibilidade foi o de depleção/repleção de hemoglobina, segundo a técnica da AOAC (1998), com modificações. O método será descrito posteriormente.

6.4.2 Cálculo amostral

Para cálculo da amostra utilizou-se a fórmula do “n” amostral para estudos descritivos conforme detalhado por Fontelles et al. (2010), por meio da seguinte equação:

$$n = \frac{s^2}{(\underline{x} - \mu)^2} X(z_{\frac{\alpha}{2}})^2$$

Em que:

n : número de animais por grupo

s^2 : variância dos dados de referência

$\underline{x} - \mu$: diferença máxima razoável, admitida entre a média obtida da amostra e a verdadeira média da população.

$z_{\frac{\alpha}{2}}$: Erro alfa do tipo I - Determinado por meio da tabela de valores críticos da distribuição normal gaussiana.

Como não foi realizado experimento prévio para cálculo do número de repetições ideal, utilizaram-se dados de um estudo prévio que avaliou a biodisponibilidade de ferro em ratos alimentados com chia (Da Silva et al., 2016) como fonte de dados para referência, e o cálculo foi realizado a fim de confirmar o número de animais utilizando valores de DP dos níveis de hemoglobina dos animais. Desta maneira, adotando um nível de significância igual a 5%, o número de repetições calculado foi 8,40, portanto foram utilizados 8 animais por grupo. Como trabalhamos com 4 grupos, foram necessários 32 animais.

6.4.3 Dietas experimentais

As dietas foram preparadas de acordo com as necessidades nutricionais dos animais, conforme composição da dieta AIN93-G, segundo Reeves et al. (1993). A albumina foi utilizada como fonte proteica em substituição à caseína, devido a sua menor concentração de ferro contaminante. A albumina utilizada teve sua concentração de proteínas avaliada pelo método de Kjeldahl, sendo encontrado o valor de 75,73% de conteúdo de proteína. A dieta do grupo contendo inseto foi preparada utilizando como base a dieta AIN-93G, sendo que o conteúdo de ferro foi 100% advindo do grilo preto em pó, e o conteúdo dos demais nutrientes foi adaptado devido à farinha de inseto adicionada. O mesmo ocorreu com a dieta do grupo soja. Já a dieta do grupo que recebeu soja associada a inseto também foi preparada com base na dieta AIN-93G; no entanto o conteúdo de ferro foi 85% advindo da farinha de soja e 15% do grilo preto em pó (Tabela 1).

Tabela 1. Composição nutricional das dietas experimentais (g/kg)

Ingredientes	Fase de depleção				
	AIN-93G	SF	GP	FS	GP + FS
Albumina (g)	225,0	225,0	192,4	137,5	145,6
Amido dextrinizado (g)	132,0	132,0	132,0	132,0	132,0
Sacarose (g)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Celulose (g)	70,0	70,0	46,6	29,8	32,4
Óleo de soja (mL)	50,0	50,0	63,0	35,9	40,0
Mix mineral s/ Fe (g)	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0
Mix vitamínico (g)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
L-cistina (g)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Bitartarato de colina (g)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Amido de milho (g)	372,5	375,5	377,3	363,2	365,4
FeSO ₄ (mg)	-	0,038	-	-	-
<i>Gryllus assimilis</i> em pó (g)	-	-	50,6	-	7,6
Farinha de soja (g)	-	-	-	151,1	128,4
Densidade calórica (Kcal/g)	39,6	39,5	39,3	38,8	38,9

SF: Sulfato Ferroso; GP + FS: *Gryllus assimilis* em pó + Farinha de Soja (85:15); GP: *Gryllus assimilis* em pó; FS: Farinha de Soja; AIN-93G: dieta padrão para fase de crescimento. Dietas preparadas no Laboratório de Nutrição Experimental.

Para o preparo das dietas todos os ingredientes foram pesados individualmente em balança semi-analítica (GEHACA[®]), modelo BG2000, misturados manualmente em vasilhames plásticos e peneirados em peneiras de plástico, ambos previamente lavados, desmineralizados e enxaguados com água deionizada. Os ingredientes foram homogeneizados em batedeira industrial (Leme[®]) por 15 minutos, sendo misturados manualmente a cada cinco minutos. As dietas foram acondicionadas em sacos de polietileno, devidamente rotulados e armazenados em freezer (-20 °C). Para o preparo das dietas de repleção, os ingredientes como o mix mineral sem ferro, mix vitamínico, L-cistina, bitartarato de colina, sulfato ferroso, *Gryllus assimilis* em pó e farinha de soja; antes de serem homogeneizados em batedeira industrial com os demais ingredientes, foram homogeneizados em um thermomix (Vorwerk[®]) por 15 minutos, como forma de garantir uma maior homogeneização das dietas.

6.4.4 Método de depleção/repleção

O método utilizado para avaliação da biodisponibilidade foi o de depleção/repleção de hemoglobina, segundo a técnica da AOAC (1997), com modificações (Figura 1).

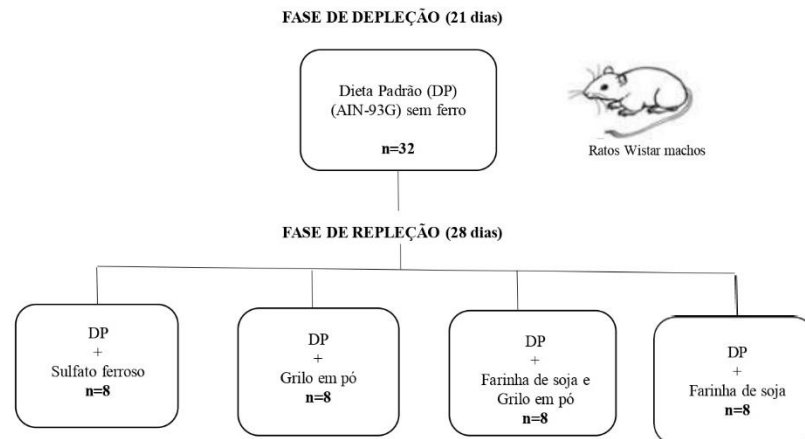


Figura 1. Desenho experimental do estudo

No período de depleção (21 dias), os animais foram alimentados com dieta AIN-93G (Reeves et al. 1993) sem adição de ferro à mistura de minerais, com o intuito de induzir a deficiência deste mineral. Os animais receberam água deionizada e dieta *ad libitum* durante esta fase.

Ao final do período de depleção, amostras de sangue foram coletadas por incisão da cauda dos animais para determinação da concentração de hemoglobina de todos os animais por kits colorimétricos comerciais (Bioclin[®]). Posteriormente, os animais foram realocados de modo que os níveis médios de hemoglobina e de peso fiquem homogêneos entre os grupos.

No período de repleção (28 dias), foram constituídos 4 grupos de 8 animais cada, distribuídos de forma que as médias da concentração de hemoglobina fossem as mais próximas possíveis entre os grupos. Na dieta, foram fornecidos aos animais 21 ppm de ferro provenientes de *Gryllus assimilis* em pó (dieta teste), da farinha de soja (dieta teste) ou de sulfato ferroso (dieta controle). Os 4 grupos experimentais foram: dieta padrão com sulfato ferroso (n=8) (FS), dieta padrão com *Gryllus assimilis* (85%) em pó e farinha de soja (15%) (n=8) (GP + FS), dieta padrão com *Gryllus assimilis* em pó (100%) (n=8) (GP) e dieta padrão com farinha de soja

(100%) (n = 8) (FS).

Nessa fase, cada animal recebeu uma quantidade controlada de dieta (*pair fed*) e água deionizada *ad libitum*. No início da fase de repleção, os animais de todos os grupos receberam 11 g/dia de dieta, sendo este valor estipulado com base no consumo médio dos animais na fase de depleção. Quando todos os animais consumiam toda a dieta ofertada, esse valor era aumentado de 1g em 1g chegando-se, assim, no final da repleção, com todos os animais recebendo 15 g/dia de dieta. Ao final da fase de repleção, amostras de sangue foram coletadas por incisão da cauda dos animais para nova determinação da concentração de hemoglobina.

Para cálculo das concentrações de hemoglobina das amostras de sangue, foi utilizado como referência o valor de leitura da absorbância de uma solução padrão de hemoglobina de concentração correspondente a 11,4 g/dL (Química Básica, Belo Horizonte, MG).

A Eficiência na Regeneração de Hemoglobina (HRE) será calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{HRE (\%)} = \frac{[100 \times (\text{mgFe da Hb final} - \text{mgFe Hb inicial})]}{\text{Fe Consumido}}$$

Sendo:

$$\text{mg Fe da Hb inicial} = [\text{peso inicial (g)} \times \text{Hb inicial (g/dL)} \times 6,7 \times 0,335] / 1000$$

$$\text{mg Fe da Hb final} = [\text{peso final (g)} \times \text{Hb final (g/dL)} \times 6,7 \times 0,335] / 1000$$

Nesta equação, considera-se que o volume do sangue corresponde a 6,7% do peso corporal do animal; e o conteúdo de ferro da hemoglobina é 0,335 (Haro-Vicente et al., 2008). O consumo de ferro (Fe) foi calculado considerando-se a quantidade total de dieta consumida e o conteúdo de ferro desta dieta, sendo calculado para cada animal, segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Consumo de Fe} = \frac{[\text{Consumo de dieta total na fase 2} \times \text{Ferro da dieta (mg/1000g)}]}{1000}$$

Durante o período experimental, foram monitorados o peso corporal e o consumo alimentar para determinação do coeficiente de eficiência alimentar (CEA), calculado pela razão entre o ganho de peso do animal (g) e o consumo alimentar (g).

O Valor Relativo de Biodisponibilidade (RBV) do *Gryllus assimilis* em pó foi calculado

considerando o padrão (dieta controle com sulfato ferroso) com biodisponibilidade igual a 100%.

6.5. Eutanásia

Ao fim de 49 dias, os animais foram eutanasiados por uma equipe treinada, em ambiente adequado.

Após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com isoflurano a 3 % (Isoforine, Cristália[®] Brasil), utilizando circuito simples com fluxômetro, acoplado a um cilindro de oxigênio. Os animais foram acondicionados individualmente em caixas vedadas transparentes para saturação do anestésico, ampliando assim os efeitos aguardados da sedação e anestesia profunda. Foram avaliados parâmetros fisiológicos e reflexos para averiguação do grau de sensibilidade da anestesia para que os animais possam ser submetidos à exsanguinação total. Todo procedimento foi feito com objetivo de favorecer uma morte humanitária dos animais (RN nº 37, 2018). O sangue foi coletado por punção cardíaca e posteriormente centrifugado a 1.006x g por 10 minutos (FANEM[®], São Paulo, Brasil) para obtenção do soro, sendo o mesmo armazenado a -80 °C para análises posteriores.

Após a eutanásia dos animais, órgãos como fígado e duodeno, bem como o conteúdo cecal foram coletados para avaliação da saúde intestinal, bem como expressão de marcadores envolvidos no estresse oxidativo.

6.6. Testes hematológicos (Hemoglobina, ferritina e transferrina)

A hemoglobina sérica foi dosada pelo método do cianeto de metahemoglobina, proposto pela AOAC (1998) utilizando *kit* para diagnóstico colorimétrico *in vitro*. O volume de 20 µL de sangue foi pipetado e misturado a 5 mL do reagente de cor solução de Drabkin (contendo cianeto de potássio e ácido cianídrico). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Multiskan UV-Visible (Thermo Scientific), em comprimento de onda de 540 nm. Para cálculo da concentração de hemoglobina das amostras de sangue, foi utilizado como referência o valor de leitura da absorbância de uma solução padrão de hemoglobina. As análises de ferritina e transferrina no soro foram realizadas em kit específico, conforme recomendações do fabricante (Bioclin[®], Brasil).

6.7. Determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Com finalidade exploratória e para análise de saúde intestinal, foram determinados os AGCC (ácido acético, propiônico e butírico). As fezes do conteúdo cecal foram analisadas conforme metodologia descrita por Siegfried et al (1984), no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios e Microbiota Animal (DMB/UFV).

As amostras de conteúdo cecal (aproximadamente 100 mg) foram suspensas em 300 µL de água ultrapura em microtubos e centrifugados a 12.000 x g por 10 min. Foram transferidos 300 µL do sobrenadante para novos tubos e adicionados 300 µL de hidróxido de cálcio e 150 µL de solução de sulfato cúprico. Em seguida, os tubos foram agitados por 10 segundos e congelados. Após descongelados, foram novamente centrifugados a 12.000 x g por 10 min. Quinhentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para novos microtubos, e foram adicionados 14 µL de H₂SO₄ concentrado e os tubos foram congelados. Após descongelados e centrifugados, 500 µL de sobrenadante foram utilizados para a quantificação de AGCC.

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). As amostras foram analisadas em coluna Phenomenex (Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) Ion Exclusion) mantida a 45°C utilizando um cromatógrafo marca Dionex Ultimate 3000 acoplado a um detector de índice de refração (RI) (Shodex). Utilizou-se como fase móvel ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5,0 mM com fluxo de 0,7 mL/min. O ácido crotônico foi utilizado como padrão interno nas amostras e curva de calibração.

6.8. Análise dos níveis de estresse oxidativo - Perfil antioxidante

Para a obtenção do homogeneizado, foram inicialmente pesados aproximadamente 150 mg de fígado em microtubos de 2 mL. Foram adicionados 1500 µL de tampão fosfato 50 mM com 1 mM EDTA (pH 7,4) e a amostra foi macerada com o auxílio de um mixer e posteriormente centrifugada a 12.000 nm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e armazenado em ultracongelador para análise de malondialdeído (MDA), óxido nítrico (ON), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST) e proteínas totais. O pellet formado foi utilizado para quantificação da proteína carbonilada (PCN). Os dados foram normalizados de acordo com os níveis de proteína total no sobrenadante.

6.8.1. Atividade enzimática da superóxido dismutase

A quantificação da enzima superóxido dismutase (SOD) foi realizada por meio da homogeneização das amostras, conforme descrito acima. Para as amostras alíquotadas nos microtubos (30 μ L) foram adicionados 129 μ L de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, contendo 1 mM de EDTA; 6 μ L MTT (1,25 mM) e 15 μ L de pirogalol (10 mM). Para o padrão, foram adicionados 6 μ L de MTT; 15 μ L de pirogalol (10 mM) e 99 μ L de tampão e para obter o branco, 6 μ L de MTT e 144 μ L de tampão foram aplicados aos poços. As amostras, padrão e branco foram incubadas a 37°C por 5 minutos e a leitura foi realizada em um Multiskan GO (Thermo Scientific) espectrofotômetro a 570 nm. Os resultados foram expressos como unidades de SOD/mg de proteína. Os cálculos foram realizados em relação ao valor de absorvância do padrão, considerando que possui um U de SOD, ou seja, 100% de oxidação do pirogalol (Marklund, 1995).

6.8.2. Atividade enzimática da catalase

A determinação da atividade da enzima catalase foi baseada em sua capacidade de clivar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por Aebi (1984). Em um tubo, foi adicionado sobrenadante homogeneizado (1:10 diluído em água), tampão fosfato (pH 7,4) + H_2O_2 (em cada 25 mL de tampão, 40 μ L de H_2O_2 30%). A absorvância foi determinada a 0, 30 e 60 segundos a 240 nm em um espectrofotômetro o (ThermoScientific®, modelo Multiskan GO, Finlândia). O equipamento foi limpo antes de cada análise com 100 mM tampão fosfato pH 7,2 e a respectiva amostra. A atividade da catalase foi calculada de acordo com a lei de Lambert Beer. A absorvância utilizada para o cálculo foi o delta obtido de a absorvância lida nos tempos 0 e 60 (absorvância final - absorvância inicial). A concentração da enzima foi expressa em U de catalase/mg de proteína da amostra.

6.8.3. Atividade da glutathione-S-transferase

A atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi determinada segundo Habig et al. (2002). Para a realização desta análise foram preparadas duas soluções: CDNB (0,0406 mg + 2 ml de álcool 80%) e GSH reduzida (0,0614 mg + 2mL de tampão 7). Para o padrão, 10 μ L de homogenato foram acrescentados a 970 μ L de tampão e 10 μ L de CDNB e 10 μ L de GSH em uma cubeta. Para o branco, 980 μ L de tampão foram acrescentados a 10 μ L de CDNB e 10 μ L de GSH. A leitura foi feita em um Multiskan GO (Thermo Scientific) espectrofotômetro a 340 nm e foram realizadas em 0s, 30s, 60s e 90s em triplicata.

6.8.4. Quantificação de proteínas totais

A quantidade de proteínas presentes no tecido hepático utilizado nas análises foi mensurada segundo metodologia de Lowry et al. (1951) e Bradford (B6916-Sigma). O tampão utilizado nesta análise foi composto por três soluções: solução A (6 g de Na₂CO₃, 0,8 g de NaOH e 200 mL de água Milli-Q), solução B (0,2 g CuSO₄ em 10 mL de água Milli-Q) e solução C (0,4 g de bitartarato de sódio e potássio e 10 mL de água Milli-Q). Para o preparo da amostra foram adicionados na placa de ELISA 10 µL de amostra e 150 µL de reagente de Bradford. Para o preparo do branco foram adicionados 80 µL de água e 20 µL de reagente de Bradford. Para o preparo da curva foi feita uma diluição seriada de albumina de soro bovino e água. O tampão ABS foi adicionado (200 µL) em todos os poços da placa, deixado de repouso e no escuro por 5 minutos. A leitura foi realizada em um Multiskan GO (Thermo Scientific) espectrofotômetro a 595 nm.

6.8.5. Malondialdeído (MDA)

Duzentos microlitros de homogeneizado e 400 µL de solução de TBARs (15% (p/v) de ácido tricloroacético, 0,375% (p/v) de ácido tiobarbitúrico e 0,25 M de HCl) foram aliqüotados em microtubos de 2 mL. Em seguida, as amostras foram vigorosamente agitadas em vórtex por 10 segundos e aquecidas em banho-maria a 90°C por 40 minutos e depois resfriadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Após este procedimento, foram adicionados 600 µL de n-butanol e a mistura foi agitada no vortex e centrifugada a 3500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e pipetado em triplicata em placa Elisa para leitura em espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Scientific) a 535 nm (Kohn, Liversedge, 1944; Pyles et al., 1993). A concentração do MDA foi calculada usando o coeficiente de absorvidade molar $E_{0} = 1,56 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Buege; Aust, 1978), e os resultados expressos em nmol de MDA por miligramas de proteína (MDA/PTN). A proteína total do homogeneizado de fígado foi quantificada de acordo com o Método de Bradford (1976).

6.8.6. Óxido nítrico

Esta análise foi realizada em tecido hepático. Cinquenta microlitros de fígado homogeneizado foram misturados com as soluções A (1% sulfanilamida em 2,5% H₃PO₄) e B (0,1% dicloridrato de naftil l etileno diamida em 2,5% H₃PO₄) na proporção (1:1) e a placa de microtitulação foi incubada no escuro por 10 minutos. A absorbância foi lida em um espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Scientific) a 570 nm e os resultados foram calculados usando a curva padrão, expressos em µmol NO/mg de proteína no tecido hepático

e em μM no plasma (Green et al., 1982).

6.8.7 Quantificação de proteína carbonilada

A concentração de proteína carbonilada foi medida utilizando o procedimento 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com base nos grupos carbonila que reagem com DNPH (Levine et al., 1990). Foram colocados 500 μL de ácido tricloroacético 10% (TCA) nas amostras (pellet que foi separado do primeiro homogenato) e, em seguida, foram homogeneizados até a dissolução do pellet e acrescentados mais 500 μL de TCA. Após vortexar, 500 μL foram transferidos para um segundo *eppendorf* (branco). Ambos *eppendorfs* (amostra e branco) foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos a 15°C e em seguida o sobrenadante foi descartado. Em seguida foram acrescentados 500 μL de DNPH na amostra e 500 μL de HCL no branco. Ambos foram incubados no escuro durante 30 minutos, tendo sido passados no vórtex no minuto 15 e no minuto 30. Posteriormente, todos os *eppendorfs* foram centrifugados novamente e os sobrenadantes foram descartados. Foram adicionados 500 μL de TCA em todos os *eppendorfs*, que foram mais uma vez centrifugados e tiveram o sobrenadante descartado. Em seguida, foram realizadas três lavagens consecutivas da amostra e branco com 1 mL da mistura de acetato de etila com etanol. Após adição de 1 mL de SDS e passagem na centrífuga por 10 min a 15°C, 200 μL da amostra e branco foram pipetados na placa de ELISA. A leitura foi realizada em um Multiskan GO (Thermo Scientific) espectrofotômetro a 370 nm.

6.9. Determinação do pH cecal

Para a análise do pH fecal, cerca de 0,4 g do conteúdo do ceco foi homogeneizado em 4 mL de água destilada, com auxílio de vortex. Posteriormente, o eletrodo de vidro do pHmetro (Bel Engineering®) foi inserido para medir o pH (Grancieri et al., 2017).

6.10. Coloração e formato das fezes

A análise de coloração das fezes foi realizada por meio de observação macroscópica, adaptando a classificação proposta por Silveira Júnior (1988), seguindo escala numérica, em que:

- 1- Fezes de coloração castanho escuro
- 2- Fezes de coloração castanho claro
- 3- Fezes de coloração Amarelada
- 4- Fezes descoradas

- 5- Fezes de coloração preta
- 6- Fezes de coloração vermelha
- 7- Fezes de coloração esverdeada

A consistência das fezes foi avaliada por um sistema de pontuação proposto previamente por Canani et al. (2007), em que as fezes foram classificadas e receberam a seguinte pontuação:

- 1- NORMAL
- 2- MOLES
- 3- SEMI-LÍQUIDAS
- 4- LÍQUIDAS

A Escala de Bristol para Consistência das Fezes (EBCF) (Figura 2) foi utilizada para obtenção de informações sobre o trânsito intestinal e o funcionamento do intestino. A Escala foi categorizada em: ritmo intestinal lento (Tipos 1 e 2), ritmo intestinal adequado (Tipos 3 e 4) e ritmo intestinal rápido (Tipos 5, 6 e 7).

Tipo	Imagem	Descrição
1		Grânulos duros e separados como nozes (difíceis de evacuar)
2		Em forma de salsicha, mas granulosa.
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		Pedaços macios com bordas irregulares, fezes pastosas.
7		Líquidas, sem pedaços sólidos, totalmente líquidas

Figura 2. Tipos de fezes e características de acordo com a Escala de Bristol.

Fonte: Adaptado de Martínez e Azevedo (2012)

6.11. Análise histomorfométrica do duodeno

Fragmentos histológicos de duodeno fixados em formalina 10% foram desidratados em séries crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 95%, absoluto), clarificados em xileno e embebidos em parafina. Cortes de 3 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo

(Reichert-Jung[®], Genossen, Alemanha). Os mesmos foram esticados em água morna, coletados em lâminas histológicas e posteriormente corados pela técnica de hematoxilina e eosina. As lâminas histológicas foram montadas com Entellan[®] (Merck, Frankfurt, Alemanha). As lâminas foram examinadas em microscópio de luz Olympus BX43, com objetiva de 20x e 40x. Para medir o diâmetro de células caliciformes e espessura das camadas da mucosa e submucosa, foram selecionados dez campos aleatórios por animal. Foram utilizadas apenas criptas com epitélio conjuntivo definido e visível (Cavaliere e Carlos, 2013). As imagens foram processadas com o software ImagePro-Plus[®] versão 4.5 (Media Cybernetics, Rockville USA).

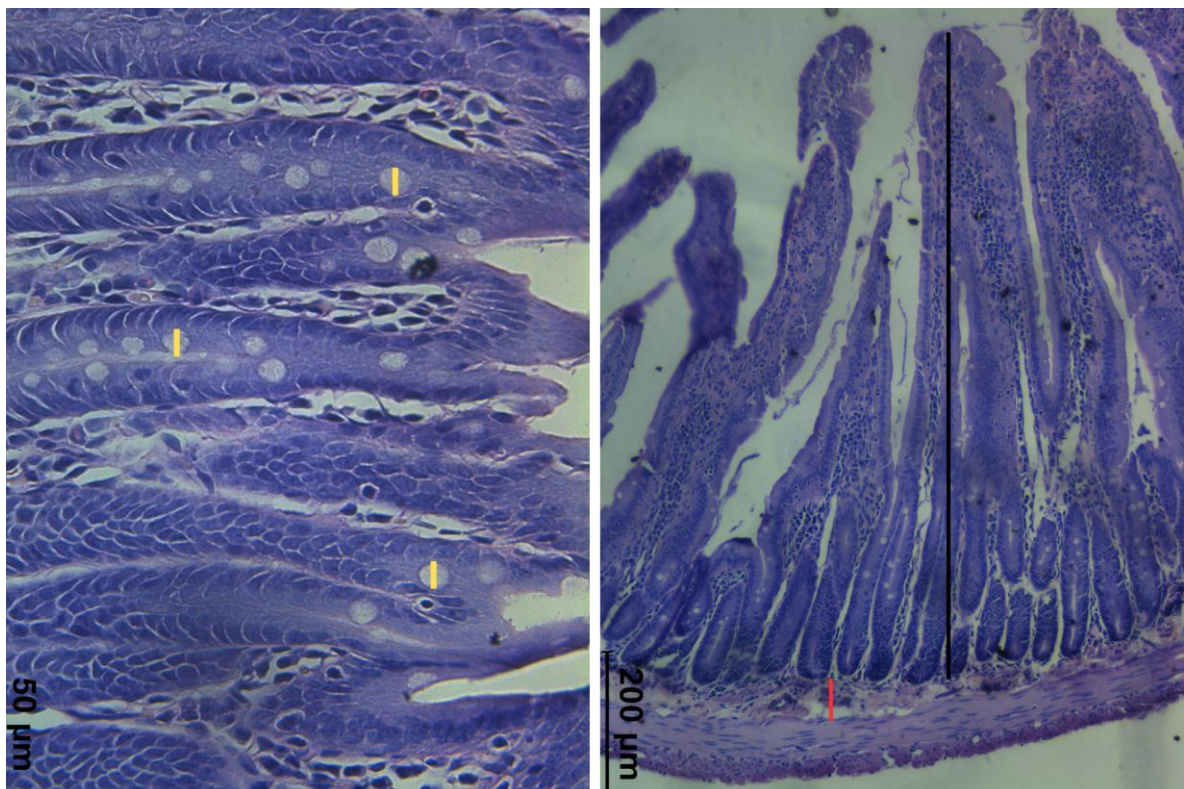


Figura 3. Corte histológico do duodeno de ratos *Wistar*.

Fotomicrografia do parênquima intestinal de ratos *Wistar*, mostrando como foram mensuradas as medidas histomorfométricas. O traçado preto representa a medida da camada da mucosa, o traçado vermelho a medida da submucosa e o traçado laranja o diâmetro das células caliciformes.

6.12. Aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos segundo as Normas Brasileiras de Experimentação Animal, e o estudo foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Viçosa e recebeu o aceite por meio do processo número 38/2022 (Anexo 1).

6.13. Análise estatística dos dados

O banco de dados foi elaborado com auxílio do software Excel (Microsoft Excel, 2013). Os testes estatísticos e os gráficos foram realizados por meio do programa *Graphpad Prism for Windows versão 9.0.2* (GraphPad Prism Inc, EUA), utilizando procedimentos paramétricos e não paramétricos, de acordo com a natureza da variável em estudo e sua variabilidade na amostra estudada. Todos os dados foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Foi aplicada a análise de variância one-way ANOVA, seguida pelo teste Tukey. O nível de significância estabelecido para todos os testes foi de 5%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASPOUR, N.; HURRELL, R.; KELISHADI, R. Review on iron and its importance for human health. **Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 19, n. 2, p. 164, 2014.

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.

ABRIL, S *et al.* Edible insects in Latin América: A Sustainable Alternative for Our Food Security. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 2022.

ACHOURI, A.; BOYE, J. I.; 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.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International - 20th Edition, 2016** 20th ed. **Gaithersburg: AOAC.**, 2016. Disponível em: <https://www.techstreet.com/standards/official-methods-of-analysis-of-aoac-international-20th-edition-2016?product_id=1937367>. Acesso em: 04 set. 2022.

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 *et al.* 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, 2022.

BAGCHI, D.; OHIA, S. E. Nutritional and Functional Foods in Boosting Digestion, Metabolism and Immune Health. Academic Press (Elsevier), 2021.

BARBOSA, L. R.; LEDE, E. T.; SANTOS, F. Caracterização de danos de *Gryllus sp.* em plantas de eucalipto, em laboratório. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n.59, p.63-68, 2009.

BERGMANS, R. S *et al.* Comparison of cricket diet with peanut-based and milk-based diets in the recovery from protein malnutrition in mice and the impact on growth, metabolism and immune function. **Plos One**, v.15, n. 6, 2020.

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

BISCONSIN-JUNIOR, A *et al.* “Food made with edible insects”: Exploring the social representation of entomophagy where it is unfamiliar. **Appetite**, v. 173, 2022.

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

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.

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.

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.

CAMASCHELLA, C. Iron deficiency - anemia. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 19, p. 1832-1843, 2015.

CAMASCHELLA, C. Iron metabolism and its disorders: iron deficiency. **Blood Review Series**, v. 133, n. 1, p. 30-39, 2019.

CHANTAWANNAKUL, P. From entomophagy to entomotherapy. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 25, 2020.

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

COSTA, B. M. N.; MARTINO, D. S. H. Biodisponibilidade de Minerais. In: Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia. Editora Payá, p. 107-135, 2016.

COSTA-NETO, E. M. Anthro-entomophagy in Latin America: an overview of the importance of edible insects to local communities. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 1, n. 1, p. 17-23, 2015.

DEEPIKA, S.; GUPTA, R.; JOSHI, I. Nutrient Analysis of Raw and Processed Soybean and Development of Value Added Soybean Noodles. **Inventi Rapid: Life Style**, v. 2014, p. 1-5, 2013.

DEFOLIART, G. R. The human use of insects as food resource: a bibliographic account in progress. Wisconsin, USA: Department of Entomology, University of Wisconsin-Madison, 2002.

DEROY, O.; READE, B.; SPENCE, C. The insectivore's dilemma, and how to take the West out of it. **Journal food quality and preference**, v. 44, p. 44-55, 2015.

DUARTE-MARTINO, H. S. *et al.* Heat-treated hull flour does not affect iron bioavailability in rats. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 61, n. 2, p. 135-142, 2011.

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

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

EVANS, J. *et al.* Entomophagy: an evolving terminology in need of review. **Journal of Insects as Food and Feed**, v. 1, n. 4, p. 293-305, 2015.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Edible insects: future prospects for

food and feed security. **Rome: FAO Forestry Paper**, 2013.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Insects to feed the world: summary report. In P. Vantomme, C. Münke, A. van Huis, J. van Itterbeeck, & A. Hakman (Eds.), *Insects to Feed the World*. Ede, Netherlands, 2014.

FAIRWEATHER-TAIT, S.; SHARP, P. Iron. *In: ESKIN, N. A. M. The Latest Research and Development of Minerals in Human Nutrition. Advances in Food and Nutrition Research*, v. 96, 2021.

FONTELLES, M. J., *et al.* Metodologia Da Pesquisa: Diretrizes Para O Cálculo Do Tamanho Da Amostra. **Revista Paraense de Medicina**, v. 24, n. 2, p. 57–64, 2010.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature reviews, Drug discovery**, v. 20, n.9, p. 689-709.

GAHUKAR, R. T. Entomophagy and Human Food Security. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 31, n. 3, p. 129-144, 2011.

GAHUKAR, R. T. Food Security: The challenges of climate change and bioenergy. **Current Science**, v. 96, n. 1, p. 26-28, 2009.

GOVORUSHKO, S. Global Status of Insects as Food and Feed source: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 91, p. 436-445, 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, 1 out. 2017.

GROTTO H. Z. W. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** [Internet]. v. 32, p. 08-17, 2010.

GROTTO H. Z. W. Diagnóstico laboratorial da deficiência de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** [Internet]. v. 32, p. 22-28, 2010.

HABER, M. *et al.* The influence of grasshopper (*Schistocerca gregaria*) powder enrichment on bread nutritional and sensorial properties. **LWT**, v. 15, 2019.

JONGEMA, Y. List of edible insects of the world. Wageningen, The Netherlands: Wageningen University, 2017.

KHATUN, H. *et al.* Characterization of freeze-dried, oven-dried and blanched house crickets (*Acheta domesticus*) and Jamaican field crickets (*Gryllus assimilis*) by means of their physicochemical properties and volatile compounds. **European Food Research and Technology**, v. 247, p. 1291-1305, 2021.

KOURIMSKÁ, L.; ADAMKOVÁ, A. Nutritional and sensory quality of edible insects. **NFS Journal**, v. 4, p. 22-26, 2016.

LAMMERS, P.; ULLMAN, L. M.; FIEBELKORN, F. Acceptance of insects as food in Germany: Is it about sensation seeking, sustainability consciousness, or food disgust? **Food Quality and Preference**, v. 77, 2019.

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

LATUNDE-DADA, G. O.; YANG, W.; AVILES, M. V. *In vitro* iron availability from insects and sirloin beef. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 64, p. 8420–8424, 2016.

MACEDO, I. M. E. *et al.* Entomophagy in different food cultures. **Revista Geama**, v. 3, n. 2, 2017.

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.

MANDISTERA, F. A. *et al.* Effect of domestic cooking methods on protein digestibility and mineral bioaccessibility of wild harvested adult edible insects. **Food Research International**, v. 121, p. 404-411, 2019.

MACKENZIE, B.; GARRICK, M. D. Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 289, n. 6, p. G981-G986, 2005.

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.

MATOS, F. M.; CASTRO, R. J. S. Edible insects as potential sources of proteins for obtaining bioactive peptides. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, p. 1-13, 2021.

MEGIDO, R. C *et al.* Consumer acceptance of insect-based alternative meat products in Western countries. **Food Quality and Preference**, v. 52, p. 237-43, 2016.

MELSE-BOONSTRA, A. Bioavailability of Micronutrients From Nutrient-Dense Whole Foods: Zooming in on Dairy, Vegetables, and Fruits. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, p. 101, 2020.

MOREIRA, H. J. C.; ARAGÃO, F. D. Manual de Pragas da Soja. Campinas - SP, 2009.

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, 2021.

MWANGI, M. N. *et al.* Insects as sources of iron and zinc in human nutrition. **Nutritional Research Review**, n. 2, v. 31, p. 248-255, 2018.

MESSINA, C. M. *et al.* Microbiological Profile and Bioactive Properties of Insect Powders Used in Food and Feed Formulations. **Foods**, n. 8, v. 9, p.400, 2019.

NOWAKOWSKI, A. C. *et al.* Potential health benefits of edible insects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 13, 2021.

OIBIOKPA, F. I. *et al.* Protein quality of four indigenous edible insects species in Nigéria. **Food Science and Human Wellness**, n. 2, v. 7, p. 175-183, 2018.

OJHA, S. *et al.* Bioavailability of nutrients from edible insects. **Current Opinion in Food Science**, v. 41, p. 240-248, 2021.

ONWEZEN, M. C. *et al.* A systematic review on consumer acceptance of alternative proteins: Pulses, algae, insects, plant-based meat alternatives, and cultured meat. **Appetite**, v. 159, 2021.

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

PASRICHA, S. R. *et al.* Iron Deficiency. **The Lancet**, v. 16, n. 396, p. 233-248.

PUZARI, M. Prospects of entomophagy. *International Journal of Tropical Insect Science*, v. 41, p. 1989-1992, 2021.

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

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, 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. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1 nov. 1993.

RINNINELLA, E. *et al.* What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 14, 2019.

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.

SCHAFER, A. A. Biodisponibilidade de ferro na alimentação de pré-escolares: Comparação entre métodos de avaliação. 2011. Número de folhas: 47. Dissertação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – Rio Grande do Sul, 2011.

SCHEERS, N. Regulatory effects of Cu, Zn, and Ca on Fe absorption: The intricate play between nutrient transporters. **Nutrients**, v. 5, n. 3, p. 957-970, 2013.

SEABROOKS, L.; HU, L. Insects: an underrepresented resource for the discovery of biologically active natural products. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 4, p. 409-426, 2017.

SIERS, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 715-748.

SILVA, B. P. *et al.* A high fat diet does not affect the iron bioavailability in Wistar rats fed with chia and increases gene expression of iron metabolism protein. **Food & Function**, v. 7, p. 4861-4868, 2016.

STARCEVIC, K. *et al.* Influence of substitution of sunflower oil by different oils on the growth, survival rate and fatty acid composition of Jamaican field cricket (*Gryllus assimilis*). **Animal Feed Science and Technology**, v. 228, p. 66-71, 2017.

STULL, V. J. *et al.* Impact of edible cricket consumption on gut microbiota in healthy adults, a double-blind, randomized crossover trial. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-13, 2018.

SMIRICKY-TJARDES, M. R. *et al.* Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. **Journal Animal Science**, v. 81, p. 2535-2545, 2003.

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.

- TANG, Y. *et al.* Changes in the amino acid profiles and free radical scavenging activities of *Tenebrio molitor* larvae following enzymatic hydrolysis. **Plos One**, v. 13, n. 5, 2018.
- TERRAMERICA. 2013. Meio Ambiente e Cidadania. Barreiras ao Mercado de Insetos. Edição 669 de 01 jul. 2013.
- TOTI, E. *et al.* Entomophagy: A Narrative Review on Nutritional Value, Safety, Cultural Acceptance and A Focus on the Role of Food Neophobia in Italy. **European Journal of Investigation in Health, Psychology and Education**, v. 10, n. 2, p. 628-643, 2020.
- TRAKSELE, L. *et al.* Investigation of in vitro and in vivo digestibility of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae protein. **Journal of Functional Foods**, v. 79, 2021.
- 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. *et al.* Edible Insects: Future Prospects for Food and Feed Security. FAO Forestry Paper, Roma, 2013.
- 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. 43, 2017.
- VAN HUIS, A. Insects as human food. In: Ethnozoology. Academic Press, p. 195-213, 2018.
- VAN HUIS, A. *et al.* Nutritional Qualities and Enhancement of Edible Insects. **Annual Review of Nutrition**, v. 41, p. 551-576, 2021.
- WALI, J. A. *et al.* Cardio-metabolic effects of high-fat diets and their underlying mechanisms — a narrative review. **Nutrients**, v. 12, p. 1-18, 2020.
- WIESER, S. *et al.* Burden of micronutrient deficiencies by socio-economic strata in children aged 6 months to 5 years in the Philippines. **BMC Public Health**, v. 13, 2013.
- WOOLF, E. *et al.* Willingness to consume insect-containing foods: A survey in the United States. **LWT**, v. 109, p. 100-105, 2019.
- XIA, Z. *et al.* Nutritional evaluation of protein from *Clanis bilineata* (Lepdoptera), an edible insect. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 1479-1482, 2011.
- YI, C. *et al.* The Utilization of Insect-resources in Chinese Rural Area. **Journal of Agricultural Science**, v. 2, n. 3, p. 146-154, 2010.
- YING, F. *et al.* Common edible wasps in Yunnan Province, China and their nutritional value. **FAO**, Bangkok, p. 93-98, 2010.

7. RESULTADOS

7.1 ARTIGO: *Gryllus assimilis* EM PÓ ASSOCIADO À FARINHA DE SOJA (*Glycine max* (L) Merrill) AUMENTA A BIODISPONIBILIDADE DE FERRO E MELHORA SAÚDE INTESTINAL E BALANÇO OXIDATIVO *IN VIVO*

RESUMO

Os insetos aptos para o consumo humano apresentam excelente perfil nutricional, sendo ricos em diversos nutrientes, entre eles, o ferro. A biodisponibilidade de ferro nessa matriz, entretanto, é desconhecida, bem como seus efeitos sobre a saúde intestinal e o balanço oxidativo. Visto que o consumo de insetos ainda enfrenta barreiras em algumas regiões, uma das formas de melhorar sua aceitação seria utilizá-los na forma de pó, e associá-lo a uma farinha comum na alimentação cotidiana. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar o efeito do consumo de *Gryllus assimilis* em pó, isolado ou associado à farinha de soja, na biodisponibilidade de ferro, saúde intestinal e balanço oxidativo de roedores. O método utilizado para a avaliação da biodisponibilidade foi o de depleção/repleção de hemoglobina. Para este ensaio biológico, foram utilizados 32 ratos machos jovens (*Rattus norvegicus*, variedade albinus) da linhagem Wistar, distribuídos em quatro grupos (n=8/grupo), a saber: Grupo A: dieta padrão (AIN-93G) com sulfato ferroso (SF), Grupo B: dieta padrão com *Gryllus assimilis* em pó e farinha de soja (GP + FS), Grupo C: dieta padrão com *Gryllus assimilis* em pó (GP) e Grupo D: dieta padrão com farinha de soja (FS). O ganho de hemoglobina, a eficiência de regeneração da hemoglobina (HRE%), o valor biológico relativo (RBV-HRE), hemoglobina, ferritina e transferrina séricas foram avaliadas, assim como parâmetros de saúde intestinal e balanço oxidativo. Não foram observadas diferenças entre o consumo alimentar, o ganho de peso dos animais, a HRE% e o RBV-HRE das dietas experimentais. No entanto, o grupo GP + FS demonstrou maior eficácia na manutenção dos níveis semanais e no ganho final de hemoglobina, quando comparado a GP isoladamente. Além disso, a ingestão do *Gryllus assimilis* associado à soja resultou em melhora na concentração de ácido acético e maior umidade das fezes quando comparado ao SF. A combinação de *Gryllus assimilis* e soja também conduziu a resultados positivos no balanço oxidativo, visto que este grupo apresentou aumento na atividade da superóxido dismutase em comparação com GP isoladamente, que apresentou, por sua vez, maiores concentrações de produtos de peroxidação.

Palavras chave: Minerais; disponibilidade biológica; entomofagia; insetos comestíveis.

1. Introdução

O ferro possui funções essenciais no organismo, e níveis baixos deste mineral podem acontecer quando sua ingestão na dieta é insuficiente ou quando existe um desequilíbrio entre a ingestão e sua absorção, o que pode acarretar em anemia (Borba et al., 2022; Margarita et al., 2018; Parischa et al., 2021). Estima-se que a prevalência de anemia ferropriva se faz presente em mais de 160.000 pré-escolares e crianças em idade escolar, pertencentes a 21 países da América Latina e Caribe (Vazquez et al., 2019).

Biodisponibilidade pode ser definida como a parcela de um nutriente ingerido que se torna disponível para ser usada e armazenada no corpo (Melse-Boonstra, 2020). O ferro pode ter sua biodisponibilidade afetada negativa ou positivamente por fatores fisiológicos e dietéticos (Costa e Martino, 2016). No que tange os insetos comestíveis, diversos fatores podem interferir diretamente na biodisponibilidade de seus nutrientes; como por exemplo, a forma com que esses insetos foram criados (qualidade do substrato alimentar, condições ambientais, estado de desenvolvimento), o processamento que foi utilizado para transformá-los em alimento (alterações físicas, químicas e/ou biológicas), bem como o processo de digestão, absorção e metabolismo após o consumo de alimentos à base de insetos (Ojha et al., 2021).

O *Gryllus assimilis* é uma espécie nativa das Índias Ocidentais, países da América do Sul e Central, estando presente também nos Estados Unidos, especialmente no estado da Flórida, podendo ser criado com êxito em grandes colônias em ambiente controlado (Starcevic et al., 2017). Assim como outros insetos comestíveis, os grilos são considerados fontes ricas de minerais, apresentando em sua composição cobre (0,68 mg/100 g), manganês (1,42 mg/100 g), zinco (5,22 mg/100 g) e ferro (2,78 mg/ 100 g) (Araújo et al., 2019). Por ser também fonte de fibras, o *Gryllus assimilis* pode promover melhoras na saúde gastrointestinal (Abril et al., 2022). Além disso, devido ao seu conteúdo de vitaminas e minerais, pode, ainda, apresentar funções antioxidante e antiinflamatória (Messina et al., 2019; Nowakowski et al., 2021; Oliveira et al., 2024; Seabrooks e Hu 2017).

A soja (*Glycine max* (L) Merrill) cultivada no Brasil, por sua vez, é uma planta herbácea, do gênero *Glycine* L, cujas principais variedades comerciais apresentam caule híspido, pouco ramificado e raiz com eixo principal e muitas ramificações. A soja constitui-se uma leguminosa fonte de proteínas de alto valor biológico (Embrapa, 2021). Já os insetos em pó, apesar de apresentarem elevado conteúdo proteico, são limitantes em alguns aminoácidos, como a lisina e o triptofano, os quais estão presentes em boas quantidades na soja (Raheem et al., 2019). Desta forma, a mistura destas farinhas se torna benéfica, tendo em vista a

complementação de seus aminoácidos limitantes (Inje et al., 2018).

O estresse oxidativo ocorre por meio de um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ROS) e o sistema de defesa antioxidante (Barbosa et al., 2010; Barbosa et al., 2017; Bogliolo, 2013). A exposição prolongada a ROS pode comprometer a integridade da barreira intestinal, aumentando sua permeabilidade, e desencadeando diversas doenças intestinais. Desta forma, o estresse oxidativo funciona como gatilho para disfunção da barreira intestinal, desencadeando, assim, o desequilíbrio imunológico e a inflamação. A inflamação, por sua vez, interfere na regulação de proteínas transportadoras de ferro, podendo reduzir a absorção intestinal deste mineral (Yang et al., 2019; Wang et al., 2020).

Ainda são inexistentes na literatura estudos que tenham investigado a biodisponibilidade de ferro presente em *Gryllus assimilis* em pó, bem como o efeito do consumo deste inseto, de forma isolada ou associada à farinha de soja, na saúde intestinal e no balanço oxidativo *in vivo*. Sendo assim, o presente estudo visa a obter resultados para contribuir com o preenchimento desta lacuna do conhecimento. Avaliar a biodisponibilidade do ferro presente em insetos em pó, bem como sua correlação com a saúde intestinal e balanço oxidativo, torna-se importante para embasar e encorajar o seu consumo pela população, auxiliar no desenvolvimento de novos produtos alimentícios, bem como encontrar fontes alternativas para melhoria do perfil nutricional de populações em países em desenvolvimento.

2. Material e métodos

2.1 Obtenção e preparação das farinhas

O grilo preto (*Gryllus assimilis*) em pó foi obtido da empresa Ecological Food, localizada na cidade de Limeira (SP), que realiza a criação de insetos para alimentação animal. Esses insetos foram criados sob um regime de alimentação que consistia em: farelo de trigo, ração de codornas (sem carne ou restos de animais), cenoura e água. Os insetos foram mantidos em criadouro específico cuja temperatura gira em torno de 28° C a 30° C e, quando atingiram a vida adulta, foram abatidos por congelamento, sendo posteriormente desidratados e transformados em farinha.

Já a soja (UFVTN 105 AP) utilizada no estudo foi cedida pelo Programa de Melhoramento de Soja do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO/UFV), sendo desenvolvida por meio de um método de retrocruzamento. Para a obtenção das farinhas, os grãos foram moídos utilizando um moinho de facas (peneira de 600 µm, tamanho 30 *mesh*; moedor vertical rotor MA 090 CFT, Equipamentos Marconi, Brasil)

com granulometria de 850 μm . Posteriormente, a farinha de soja foi acondicionada em sacos de polietileno e armazenada em freezer ($-18\pm^{\circ}\text{C}$) até o momento da análise.

2.2 Composição química da farinha de soja e do grilo em pó

A análise da composição centesimal das farinhas foi determinada de acordo com as técnicas descritas pela AOAC (2019). A umidade foi determinada por gravimetria e as fibras foram determinadas segundo técnica enzimática gravimétrica, lipídios foram determinados por Soxhlet, cinzas por incineração em mufla, proteínas foram determinadas pelo método de Kjeldahl e os carboidratos determinados por diferença. O ferro foi determinado por espectrometria de absorção atômica. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os valores encontrados na composição química foram levados em consideração para o cálculo das dietas experimentais, para que elas fossem isocalóricas e apresentassem os mesmos conteúdos de macronutrientes por 100 g.

2.3 Determinação de ferro

A análise do conteúdo de ferro presente na farinha de *Gryllus assimilis* e soja, bem como o conteúdo de ferro das dietas experimentais e da albumina foram determinados por espectrometria de absorção atômica (SpectrAA, Modelo 220 FS). As análises foram realizadas nas condições com potência de 1300 W, vazão de plasma de argônio de 15 L min^{-1} , taxa de fluxo de argônio auxiliar de 0,7 L min^{-1} , vazão de argônio do nebulizador de 0,5 L min^{-1} e taxa de introdução da amostra de 1,5 mL min^{-1} . Foram pesados separadamente 2 g de cada amostra (*Gryllus assimilis* em pó e farinha de soja) em papel manteiga, em balança analítica (Gehaka, BG2000, Brasil), e transferidos para tubos de digestão. Em seguida, 10 mL de ácido nítrico à temperatura ambiente foram adicionados aos tubos e mantidos em bloco digestor, a 150 $^{\circ}\text{C}$, por 16 horas. Quando necessário, 5 mL de ácido nítrico foram adicionados aos tubos. Após a digestão, os tubos foram resfriados em temperatura ambiente e as amostras transferidas para balões volumétricos de 50 mL, sendo os tubos lavados com água deionizada e agitados em vórtex, por 3 vezes. Para análise, os extratos foram diluídos apropriadamente utilizando água deionizada. As análises foram realizadas em triplicata.

2.4 Animais e dietas experimentais

O método utilizado para análise da biodisponibilidade de ferro foi o de depleção/repleção de hemoglobina. Foram utilizados 32 ratos machos (*Rattus norvegicus*,

variedade albinus) da linhagem *Wistar*, com 21 dias de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa. Os mesmos foram distribuídos em gaiolas individuais e permaneceram em um fotoperíodo de 12 horas.

As dietas experimentais foram elaboradas de acordo com o padrão AIN-93G. Na fase de depleção, os animais receberam uma dieta contendo mix mineral isento de ferro, com o intuito de reduzir as concentrações de hemoglobina, e receberam água deionizada *ad libitum* por 21 dias. Posteriormente os animais foram divididos em quatro grupos (n=8) de forma que os níveis de hemoglobina fossem homogêneos em cada grupo: (1) dieta padrão + sulfato ferroso (DP + SF), (2) dieta padrão + grilo em pó (15%) + farinha de soja (85%) (DP + GP + FS), (3) dieta padrão + grilo em pó (100%) (DP + GP), (4) dieta padrão + farinha de soja (100%) (DP + FS) (Tabela 1).

Durante a fase de repleção, tanto o *Gryllus assimilis* em pó quanto a farinha de soja foram usados como fonte de ferro, tendo sido o sulfato ferroso utilizado como controle positivo. Foram fornecidos 12 mg de ferro por quilo de dieta para cada grupo experimental. Durante a fase de repleção, amostras de sangue foram colhidas semanalmente por punção caudal para determinar a concentração de hemoglobina. Após 48 dias de experimento e um jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com isoflurano (isoforine Cristália[®]) e eutanasiados por punção cardíaca.

O sangue foi armazenado em tubos de ensaio e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos (FANEM[®], São Paulo, Brasil) para separar o soro. Órgãos como fígado e intestino também foram coletados. Todos os materiais biológicos foram armazenados a - 80°C para análises posteriores.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), sob o registro 38/2022.

Tabela 1. Composição nutricional das dietas experimentais (g/kg)

Ingredientes	Fase de depleção		Fase de repleção		
	AIN-93G	SF	GP	FS	GP + FS
Albumina (g)	225,0	225,0	192,4	137,5	145,6
Amido dextrinizado (g)	132,0	132,0	132,0	132,0	132,0
Sacarose (g)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Celulose (g)	70,0	70,0	46,6	29,8	32,4
Óleo de soja (mL)	50,0	50,0	63,0	35,9	40,0
Mix mineral s/ Fe (g)	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0
Mix vitamínico (g)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
L-cistina (g)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Bitartarato de colina (g)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Amido de milho (g)	372,5	375,5	377,3	363,2	365,4
FeSO ₄ (mg)	-	0,038	-	-	-
<i>Gryllus assimilis</i> em pó (g)	-	-	50,6	-	7,6
Farinha de soja (g)	-	-	-	151,1	128,4
Densidade calórica (Kcal/g)	39,6	39,5	39,3	38,8	38,9

SF: Sulfato Ferroso; GP + FS: *Gryllus assimilis* em pó + Farinha de Soja (85:15); GP: *Gryllus assimilis* em pó; FS: Farinha de Soja; AIN-93G: dieta padrão para fase de crescimento.

2.5 Dosagem de hemoglobina e exames séricos de ferritina e transferrina

A hemoglobina sérica foi dosada por meio do método do cianeto de metahemoglobina, proposto pela AOAC (1998), utilizando um kit para diagnóstico colorimétrico *in vitro*. Foi pipetado o volume de 20 µL de sangue e misturado a 5 mL do reagente de cor solução de Drabkin (que continha cianeto de potássio e ácido cianídrico). A leitura da absorbância foi realizada utilizando um espectrofotômetro Multiskan UV-Visible (Thermo Scientific), em comprimento de onda de 540 nm. Para cálculo da concentração de hemoglobina das amostras de sangue, foi utilizado como referência o valor de leitura da absorvância de uma solução padrão de hemoglobina.

2.6 Biodisponibilidade de ferro

A biodisponibilidade do ferro foi determinada de acordo com o postulado por Hernández et al (2003). Para cálculo da eficiência de regeneração da hemoglobina (HRE%) foi usada a expressão: $HRE\% = [(Fe\text{ mg final Hb} - Fe\text{ mg inicial Hb}) / 100] / mg\text{ Fe consumido}$. O conteúdo de ferro presente na hemoglobina foi estimado por: $[peso\text{ corporal (g)} \times Hb\text{ (g L}^{-1}) \times 0,335 \times 6,7] / 1000$. Esta variável foi calculada assumindo que o volume total de sangue é

igual a 6,7% do peso corporal, e o conteúdo de ferro do corpo na hemoglobina sendo 0,335. O uso de ferro foi calculado como: $[\text{HRE}\% \times \% \text{ ferro dietético}] / 100$. O valor biológico relativo foi calculado através da razão entre: $[(\text{HRE}\% \text{ do grupo teste}) / (\text{HRE}\% \text{ do grupo controle})]$.

2.7 Estresse oxidativo e atividade antioxidante

2.7.1 Atividade enzimática

A quantificação da superóxido dismutase (SOD) foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Marklund (1985). As amostras, padrão e branco, foram incubadas a 37°C por 5 minutos e a leitura foi realizada em um espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Scientific) a 570 nm. Os resultados foram expressos como unidades de SOD/mg de proteína. Os cálculos foram realizados em relação ao valor de absorbância do padrão, considerando que possui um U de SOD, ou seja, 100% de oxidação do pirogalol.

A determinação da atividade da enzima catalase (CAT) foi baseada em sua capacidade de clivar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por Aebi (1984). A absorbância foi determinada a 0, 30 e 60 segundos a 240 nm em um espectrofotômetro (T70 + Espectrômetro UV/VIS). A absorbância utilizada para o cálculo foi o delta obtido de a absorbância lida nos tempos 0 e 60 (absorbância final - absorbância inicial).

A atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi determinada segundo Habig et al. (2002). Após a centrifugação do homogeneizado, foi acrescentado o CDNB (Sigma Aldrich[®], EUA) e a glutathione reduzida (GSH) (Sigma Aldrich[®], EUA). As absorbâncias foram determinadas nos tempos 0, 30, 60 e 90 segundos a 340 nm em espectrofotômetro (ThermoScientific[®], modelo Multiskan GO, Finlândia).

2.7.2 Malondialdeído

A concentração de malondialdeído (MDA) foi realizada de acordo com Buege e Aust (1978). Foi adicionada solução de TBARs (15% de ácido tricloroacético, 0,375% de ácido tiobarbitúrico e 0,25 M de HCl) ao homogeneizado de fígado. Em seguida, as amostras foram agitadas em vórtex e aquecidas em banho-maria a 95°C por 30 minutos. Após este procedimento, foi adicionado n-butanol e a nova agitação e centrifugação. O sobrenadante foi removido e pipetado em triplicata em placa Elisa para leitura em espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Scientific) a 535 nm e os resultados expressos em nmol de MDA por miligramas de proteína (MDA/PTN).

2.7.3 Óxido nítrico

A concentração de óxido nítrico (ON) foi determinada de acordo com o postulado por Green et al (1982). O homogeneizado foi misturado com duas soluções: Solução A (1% sulfanilamida em 2,5% H₃PO₄) e solução B (0,1% dicloridrato de naftil 1 etileno diamida em 2,5% H₃PO₄) na proporção (1:1) e a placa de microtitulação foi incubada no escuro durante 10 minutos. A leitura da absorbância aconteceu em um espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Scientific) a 570 nm e os resultados foram calculados usando a curva padrão e expressos em $\mu\text{mol NO/mg}$ de proteína.

2.7.4 Proteína carbonilada

A concentração de proteína carbonilada foi mensurada utilizando o procedimento 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com base nos grupos carbonil que reagem com DNPH de acordo com Levine et al. (1990). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (ThermoScientific[®], modelo Multiskan GO, Finlândia) a 370 nm.

2.8 Análise do conteúdo fecal e da morfologia do duodeno

2.8.1 Umidade fecal

O teor de umidade nas fezes foi determinado pelo método gravimétrico de acordo com a AOAC (2016). As amostras coletadas no final do experimento, foram secas em estufa a 105° C por 24 horas.

2.8.2 Coloração e consistência das fezes (*Escala de Bristol*)

Para obtenção de informações acerca do trânsito intestinal e o funcionamento do intestino, foi utilizada a Escala de Bristol para Consistência das Fezes (EBCF). A análise de coloração das fezes foi realizada através da observação macroscópica, adaptando a classificação proposta por Silveira Júnior (1988); e a consistência das fezes foi avaliada por um sistema de pontuação proposto previamente por Canani et al. (2007).

2.8.3 Análise do pH das fezes do ceco

Para análise de pH, cerca de 0,4 g do conteúdo do ceco foi homogeneizado em 4 mL de água destilada, utilizando um vórtex. Em seguida, o eletrodo de vidro do medidor de pH (Bel Engineering[®]) foi inserido para aferir o pH fecal (Grancieri et al., 2017).

2.8.4 Quantificação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Para a quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta, seguiu-se o postulado por Siegfried et al (1984). Fezes do conteúdo cecal foram misturadas em tubo tipo *ependorf* a 300 µL de água ultrapura em microtubos e centrifugados a 12.000 x g por 10 min. Foram transferidos 300 µL do sobrenadante para novos tubos e adicionados 300 µL de hidróxido de cálcio e 150 µL de solução de sulfato cúprico. Em seguida, os tubos foram agitados por 10 segundos e congelados. Após descongelados, foram novamente centrifugados a 12.000 x g por 10 minutos. Quinhentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para novos microtubos, foram adicionados 14 µL de H₂SO₄ concentrado e os tubos foram congelados. Após descongelados e centrifugados, 500 µL de sobrenadante foram utilizados para a quantificação de AGCC.

2.8.5 Análise histológica do duodeno

Fragmentos histológicos semi-seriados de cólon e duodeno de 3 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo automatizado (Reichert-Jung[®], Genossen, Alemanha) e corados pela técnica de hematoxilina e eosina. As lâminas foram examinadas em microscópio de luz Olympus BX43, com objetiva de 20x e 40x. Para medir a espessura das camadas da mucosa e submucosa e diâmetro das células caliciformes foram selecionados 10 campos aleatórios por animal. Foram utilizadas apenas criptas com epitélio conjuntivo definido e visível (CAVALIERE; CARLOS, 2013). As imagens foram processadas com o software ImagePro-Plus[®] versão 4.5 (Media Cybernetics, Rockville USA).

2.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e Kolmogorov Smirnov. Foi aplicada análise de variância (ANOVA) one-way, seguida pelo teste post-hoc de Tukey para as variáveis paramétricas. O nível de significância estabelecido para todos os testes foi de 5%. Todas as análises foram realizadas no *software GraphPad Prism* (GraphPad software, San Diego, CA) versão 9.0. Foi estabelecido o nível de significância de 5% para todos os testes.

3. Resultados

A análise da composição centesimal revelou que o *Gryllus assimilis* em pó continha 23,72 mg de ferro/100 g, enquanto a farinha de soja apresentou 7,94 mg de ferro/100 g. O grilo

apresentou maiores conteúdos de proteínas e menores conteúdos de lipídios, carboidratos e fibras quando comparado à soja (Tabela 2).

Tabela 2. Composição química da farinha de soja e pó de *Gryllus assimilis* em base seca

Compostos	<i>Gryllus assimilis</i>	Soja
Umidade (g/100 g)	3,68±0,01	5,92 ±0,23
Cinzas (g/100 g)	4,04±0,16	5,02±0,05
Lipídios (g/100 g)	18,28±1,01	22,55±0,59
Proteínas (g/100 g)	64,75±0,79	43,90±1,63
Fibra alimentar total (g/100 g)	9,04±0,01	13,35±0,48
Carboidratos (g/100 g)	0,21±0,01	9,26±2,75
Ferro (mg/100 g)	23,72±1,31	7,94±0,69

Dados apresentados em média ± desvio padrão.

Não foram observadas diferenças no consumo alimentar nem no ganho de peso dos animais, entre os diferentes grupos ($p < 0,05$) (Tabela 3). Entretanto, os animais que consumiram *Gryllus assimilis* em pó associado à farinha de soja (GP + FS) apresentaram maior ingestão de ferro quando comparados ao grupo que consumiu apenas farinha de soja (FS) ($p < 0,05$) (Tabela 3). A taxa de utilização do ferro diferiu entre o grupo GP + FS e o grupo que consumiu *Gryllus assimilis* em pó de forma isolada ($p < 0,05$) (Tabela 3). Não foram encontradas diferenças na Eficiência de Regeneração da Hemoglobina (HRE%), Valor Relativo de Biodisponibilidade (RBV-HRE) e Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) entre os grupos ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Consumo total, ganho de peso corporal, ingestão de ferro, utilização de ferro, índices para avaliação da biodisponibilidade de ferro

Variáveis	SF	GP + FS	GP	FS
Consumo total (g)	338,41±15,98 ^a	348,82±17,91 ^a	343,61±32,30 ^a	342,28±18,17 ^a
Ganho peso (g)	30,42±18,85 ^a	32,81±20,41 ^a	30,04±19,13 ^a	20,33±16,89 ^a
CEA	0,09±0,05 ^a	0,10±0,05 ^a	0,10±0,04 ^a	0,8±0,04 ^a
Ingestão de ferro (g)	7,39±0,35 ^{ab}	8,02±0,41 ^a	7,90±0,74 ^{ab}	7,29±0,39 ^b
HRE %	41,37±10,86 ^a	41,13±10,86 ^a	36,40±6,26 ^a	40,82±8,03 ^a
RBV-HRE	1,00±0,15 ^a	0,99±0,18 ^a	0,88±0,12 ^a	0,98±0,11 ^a
Utilização do ferro	0,90±0,14 ^{ab}	0,94±0,15 ^a	0,83±0,11 ^b	0,86±0,10 ^{ab}

Dados apresentados em média ± desvio padrão. N = 8 animais/grupo. SF: Sulfato Ferroso; GP + FS: *Gryllus assimilis* em pó associado à farinha de soja (15:85); GP: *Gryllus assimilis* em pó; FS: Farinha de Soja. Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No início da fase de repleção, os níveis de hemoglobina não diferiram entre os grupos

teste e controle ($p > 0,05$) (Tabela 4). No entanto, na última semana, o grupo GP demonstrou menor valor de hemoglobina quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$), apresentando menor ganho final de hemoglobina em relação aos grupos controle (SF) e GP + FS ($p < 0,05$) (Tabela 4). Os grupos que consumiram *Gryllus assimilis* em pó isoladamente (GP) ou associado à farinha de soja (GP + FS) apresentaram maiores valores de transferrina ao final do estudo ($p < 0,05$). Os valores de ferritina, por sua vez, foram maiores no grupo GP ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de hemoglobina, ganho de hemoglobina e níveis séricos de ferritina e transferrina na fase de repleção

Variáveis	SF	GP + FS	GP	FS
Hemoglobina inicial (g/dL)	7,52±1,51 ^a	7,51±1,47 ^a	7,57±1,47 ^a	7,67±1,38 ^a
Hemoglobina final (g/dL)	14,46±1,99 ^a	14,49±1,25 ^a	12,05±1,82 ^b	14,37±1,01 ^a
Ganho de hemoglobina (g/dL)	7,53±2,00 ^a	6,98±1,08 ^a	4,49±2,00 ^b	6,70±1,38 ^{ab}
Transferrina (mg/dL)	163,40±8,26 ^b	178,03±4,90 ^a	185,91±8,19 ^a	160,22±7,44 ^b
Ferritina (ng/dL)	5,18±1,01 ^{ab}	4,56±0,97 ^b	6,41±1,10 ^a	4,64±0,84 ^{ab}

Dados apresentados em média \pm desvio padrão. N = 8 animais/grupo. SF: Sulfato Ferroso; GP + FS: *Gryllus assimilis* em pó associado à farinha de soja (15:85); GP: *Gryllus assimilis* em pó; FS: Farinha de Soja. Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O grupo que recebeu farinha de soja de maneira isolada apresentou maior concentração de ácido acético no conteúdo cecal ($p < 0,05$). As concentrações de ácido propiônico também foram maiores no grupo FS ($p < 0,05$) e as concentrações de ácido butírico não diferiram entre os grupos ($p > 0,05$) (Tabela 5). A ingestão de farinha de soja isoladamente (FS) ou em associação ao *Gryllus assimilis* em pó (GP + FS) aumentou a umidade das fezes ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre o pH e a coloração das fezes do ceco entre os grupos ($p > 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5. Análises de ácidos graxos de cadeia curta, umidade e pH das fezes do ceco

Variáveis	SF	GP + FS	GP	FS
Ácido acético (mmol/L)	7,58±0,92 ^d	10,02±0,76 ^c	11,59±0,97 ^b	13,95±1,80 ^a
Ácido propiônico (mmol/L)	3,60±0,53 ^b	3,86±0,64 ^b	4,27±0,47 ^{ab}	4,78±0,21 ^a
Ácido butírico (mmol/L)	0,99±0,12 ^a	1,17±0,32 ^a	1,31±0,29 ^a	1,15±0,27 ^a
Total de AGCC	12,56±1,84	15,87±0,86	17,24±1,74	19,33±1,63
Umidade fecal (%)	12,32±1,37 ^b	21,29±3,80 ^a	16,08±2,53 ^b	18,72±1,30 ^{ab}
pH fezes do ceco	8,25±0,69 ^a	7,96±0,31 ^a	7,74±0,36 ^a	8,03±0,55 ^a
Coloração fezes	3,00±0,00 ^a	2,00±0,00 ^a	2,00±0,00 ^a	1,00±0,00 ^a
Consistência fezes	2,00±0,00 ^a	1,00±0,00 ^a	2,00±0,00 ^a	1,00±0,00 ^a

Dados apresentados em média ± desvio padrão. N = 8 animais/grupo. SF: Sulfato Ferroso; GP + FS: *Gryllus assimilis* em pó associado à farinha de soja (15:85); GP: *Gryllus assimilis* em pó; FS: Farinha de Soja. Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise histomorfométrica do duodeno mostrou que os grupos teste apresentaram maior espessura da mucosa quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$) (Tabela 6, Figuras 1 e 2). A espessura da submucosa, entretanto, não diferiu entre os grupos ($p > 0,05$). O consumo de *Gryllus assimilis* em pó na forma isolada promoveu maior diâmetro de células caliciformes ($p < 0,05$) (Tabela 6, Figuras 1 e 2).

Tabela 6. Efeito das dietas experimentais na histomorfometria duodenal de ratos Wistar

Variáveis	SF	GP + FS	GP	FS
Espessura mucosa (µm)	600,64±78,48 ^b	725,26±79,41 ^{ab}	798,81±78,53 ^a	796,78±46,29 ^a
Espessura submucosa (µm)	47,14±7,68 ^a	46,24±3,88 ^a	48,84±3,20 ^a	45,23±10,31 ^a
Diâmetro células caliciformes (µm)	16,86±0,94 ^b	17,95±0,97 ^b	19,21±0,92 ^a	16,78±0,96 ^b

Dados apresentados em média ± desvio padrão. N = 8 animais/grupo. SF: Sulfato Ferroso; GP + FS: *Gryllus assimilis* em pó associado à farinha de soja (15:85); GP: *Gryllus assimilis* em pó; FS: Farinha de Soja. Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

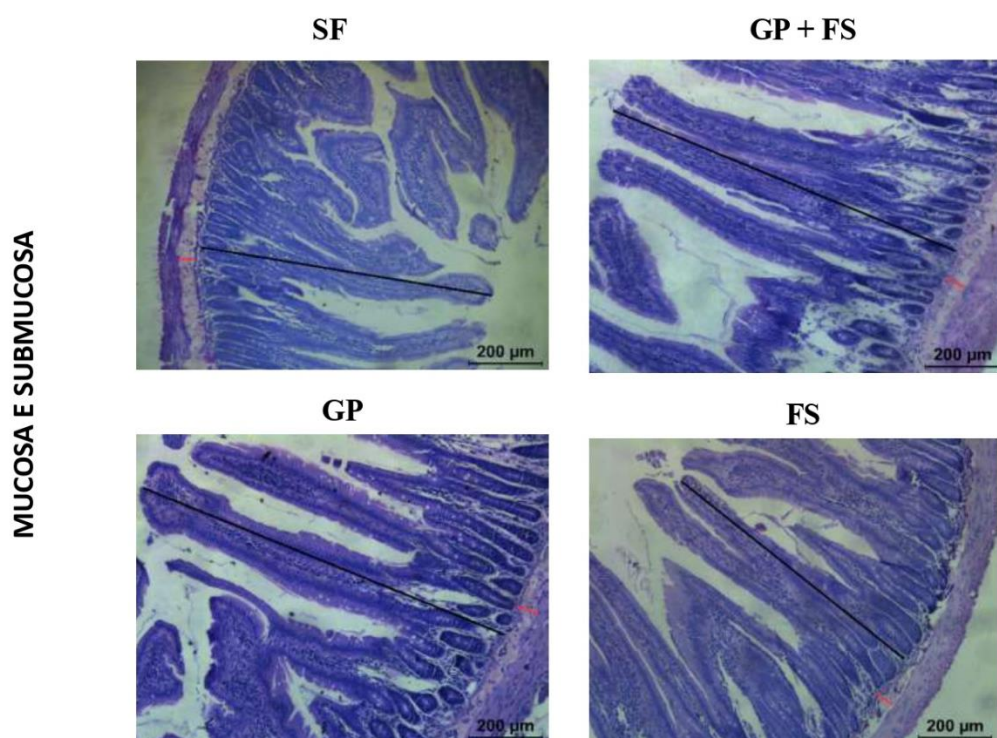


Figura 1. Corte histológico duodenal para análise de mucosa e submucosa.

Seção transversal de duodeno de ratos Wistar submetidos à análise de biodisponibilidade de ferro pelo método de depleção/repleção. SF: Sulfato Ferroso; GP + FS: *Gryllus assimilis* em pó associado à farinha de soja (15:85); GP: *Gryllus assimilis* em pó; FS: Farinha de Soja. Linhas pretas: sinalizam como foram feitas as medidas das espessuras das mucosas. Linhas vermelhas: sinalizam como foram feitas as medidas das espessuras das submucosas.

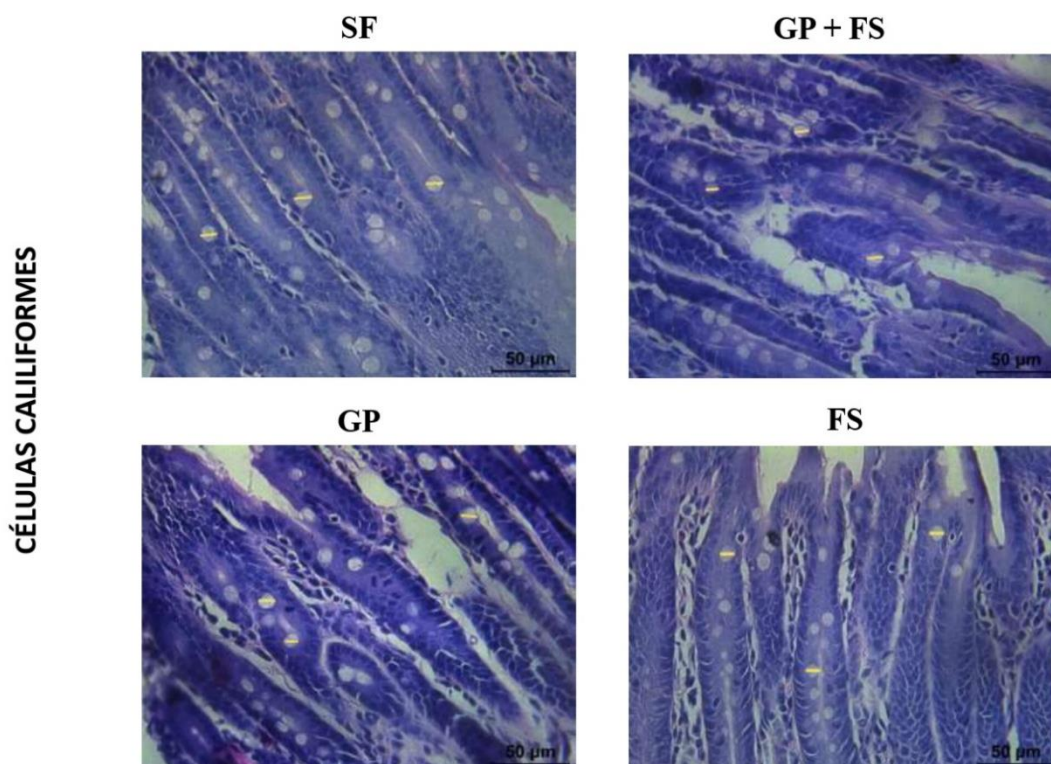


Figura 2. Corte histológico duodenal para análise de células caliciformes.

Seção transversal de duodeno de ratos Wistar submetidos à análise de biodisponibilidade de ferro pelo método de depleção/repleção. SF: Sulfato Ferroso; GP + FS: *Gryllus assimilis* em pó associado à farinha de soja (15:85); GP: *Gryllus assimilis* em pó; FS: Farinha de Soja. Linhas amarelas: sinalizam como foram feitas as medidas dos diâmetros das células caliciformes.

A atividade antioxidante e o estresse oxidativo também foram analisados, no fígado. Os valores de catalase (CAT) não apresentaram diferenças entre os grupos ($p > 0,05$). No entanto, as concentrações de superóxido dismutase (SOD) foram maiores no grupo GP + FS ($p < 0,5$), enquanto as concentrações de glutathiona peroxidase (GSH) foram superiores no grupo GP ($p < 0,05$) (Figura 3). No entanto, a produção de óxido nítrico (ON), malondialdeído (MDA) e proteína carbonilada (PCN) foi superior no grupo que recebeu *Gryllus assimilis* em pó isoladamente (GP) ($p < 0,05$) (Figura 3).

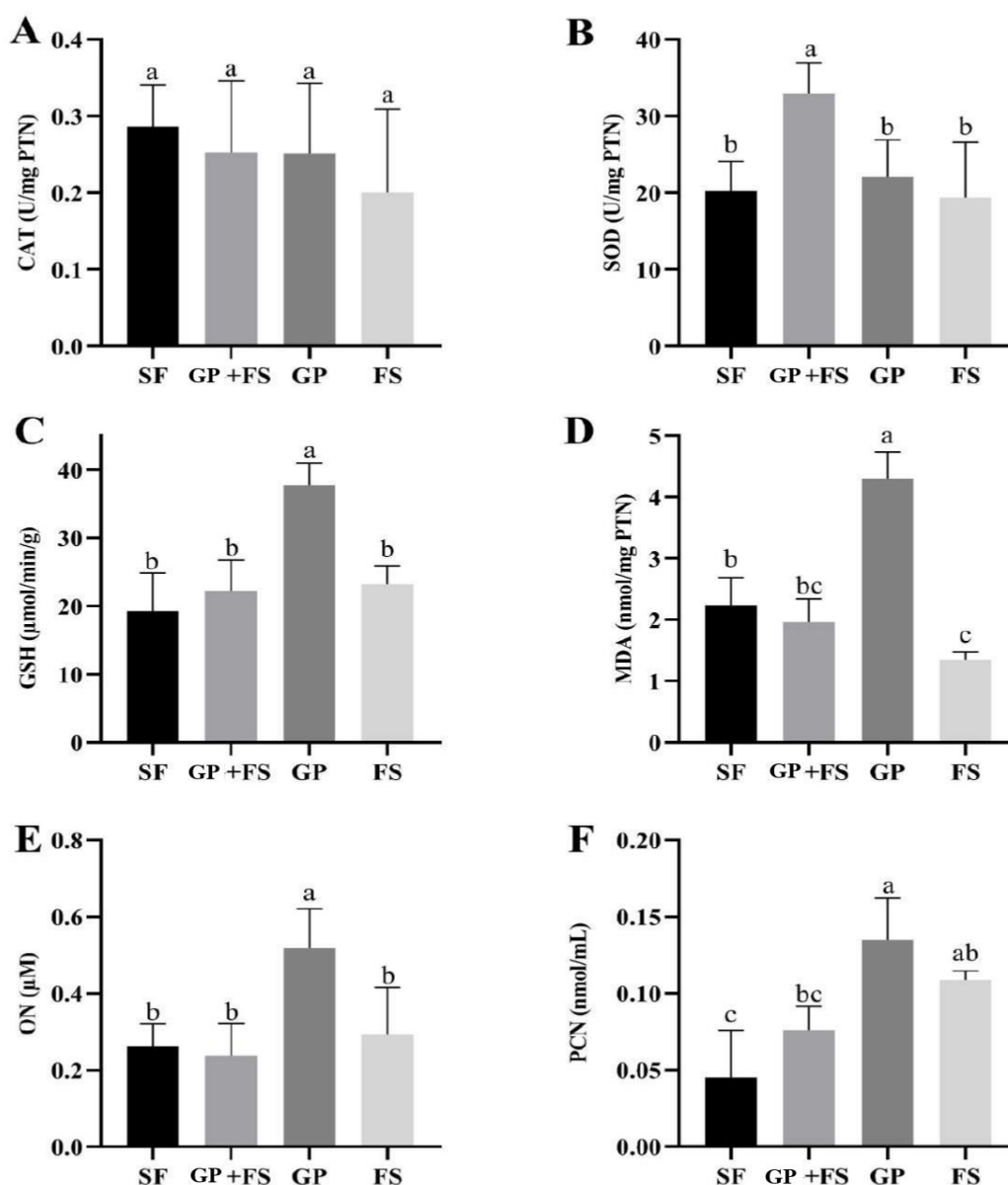


Figura 3. Efeito do consumo de *Gryllus assimilis* em pó isolado ou associado à farinha de soja no balanço oxidativo *in vivo*.

SF: Sulfato Ferroso; GP + FS: *Gryllus assimilis* em pó associado à farinha de soja (15:85); GP: *Gryllus assimilis* em pó; FS: Farinha de Soja. (A) Catalase, (B) Superóxido Dismutase, (C) Glutathiona S-Transferase, (D) Malondialdeído, (E) Óxido Nítrico, (F) Proteína Carbonilada. Letras minúsculas diferentes (a-c) indicam diferenças intra grupos, de acordo com a ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

4. Discussão

Ainda não foram relatados estudos que avaliaram a biodisponibilidade de ferro *in vivo* de *Gryllus assimilis* em pó isoladamente ou associado a uma farinha de leguminosa comumente consumida, como a soja. Portanto, este estudo constitui-se como pioneiro nesta temática.

Como esperado, não foram observadas diferenças entre o consumo alimentar e o ganho de peso nos animais. Tal fato evidencia a boa aceitação das dietas ofertadas. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos realizados com *Gryllus assimilis* em pó (Araújo et al., 2022; Bergmans, 2020; Inje et al., 2018).

Os resultados aqui apresentados demonstraram que o inseto, em associação à farinha de soja, apresentou biodisponibilidade de ferro comparável ao sulfato ferroso, visto que os valores de HRE% e RBV-HRE não diferiram entre os grupos. No entanto, as menores concentrações de hemoglobina na semana final da repleção, o menor ganho final de hemoglobina e a menor taxa de utilização do ferro no grupo GP demonstram que, apesar de ser eficaz na regeneração de hemoglobina, o *Gryllus assimilis* em pó isolado apresenta menor capacidade de manter os níveis de hemoglobina a longo prazo. Além disso, os resultados dos exames bioquímicos mostram que os grupos que receberam grilo em pó de maneira isolada ou associada à soja apresentaram maiores concentrações séricas de transferrina quando comparados ao grupo controle.

Estudos apontam que insetos comestíveis possuem ferro altamente biodisponível, no entanto, os resultados anteriormente observados demonstram que eles possuem compostos que podem afetar a absorção do ferro, como por exemplo, a quitina. A quitina é um polímero presente no exoesqueleto de insetos, e os grilos apresentam porcentagem significativa de fibras em forma de quitina (Ojha et al., 2021; Raheem et al., 2019). Estudos prévios mostraram que o consumo prolongado de quitina e quitosana estão relacionados com um balanço negativo de ferro e baixa concentração de hemoglobina (Deuchi et al., 1995; Mwangi et al., 2022; Oonincx; Fingue, 2020). Desta forma, as fibras podem apresentar efeito quelante, e interferir negativamente na absorção intestinal de alguns minerais e vitaminas; como por exemplo ferro, cálcio, magnésio, cobre e zinco (Ojha et al., 2021).

Uma possível explicação para os resultados aqui observados na concentração de transferrina no grupo GP se deve ao processo de metabolismo e absorção do ferro. A maior parte do ferro presente no plasma sanguíneo origina-se da degradação da hemoglobina, bem como das reservas de ferro armazenadas no organismo, como a ferritina e a hemossiderina (Costa & Martino, 2016; Grotto, 2008). O ferro liberado durante esse processo de degradação

é reincorporado à circulação sanguínea, onde se liga à transferrina, a principal proteína de transporte de ferro no plasma. A degradação da hemoglobina resulta em aumento na demanda por transporte de ferro, o que leva a níveis elevados de transferrina na circulação sanguínea (Frazer & Anderson, 2013; Waldvogel-Abramovski et al., 2014). Abdel-Monien e colaboradores (2022) analisaram ratos com anemia ferropriva e o efeito da suplementação de ferro e também observaram aumento de transferrina e diminuição de hemoglobina nos animais dos grupos intervenção.

As concentrações de ferritina dos grupos intervenção não diferiram do controle. No entanto, foram observadas diferenças entre os grupos que receberam grilo em pó isoladamente e associado à farinha de soja, tendo o primeiro apresentado maior concentração de ferritina. A ferritina se liga ao ferro formando um complexo férrico, facilitando com que o mineral flua para dentro e para fora da célula e funcionando também como local de armazenamento deste mineral (Ueda; Nakasawa, 2018). A interpretação dos marcadores bioquímicos de ferro sofre interferência da inflamação. Em situação de inflamação acontece o estímulo a agentes da eritropoiese, conseqüentemente os níveis de ferritina aumentam e a disponibilidade de ferro reduz (Sciacqua et al., 2020; Ueda; Nakasawa, 2018). Hipotetiza-se, assim, que o consumo de grilo preto em pó, de maneira isolada, tenha causado algum nível de inflamação nos animais.

Foi possível observar melhora em parâmetros intestinais nos grupos teste, especialmente quando receberam farinha de soja. Embora não tenham sido encontradas diferenças nas concentrações de ácido butírico entre os grupos, o grupo FS apresentou maiores concentrações de ácido acético e propiônico, seguido do grupo GP. As concentrações de ácido propiônico foram aumentadas nos grupos GP e FS. A soja é uma leguminosa que contém em sua composição fitoquímicos como isoflavonas, fitoesteróis e saponinas; que são conhecidos por oferecer benefícios à saúde (Basson et al., 2021). As isoflavonas apresentam potencial terapêutico na saúde gastrointestinal; melhorando a capacidade secretora, a integridade da barreira epitelial intestinal e minimizando danos histomorfológicos (Al-Nakkash & Kubinski, 2020). De acordo com estudos anteriores, a soja é capaz de aumentar a concentração de ácidos graxos de cadeia curta em ratos, uma vez que a isoflavona, presente nessa leguminosa, possui a capacidade de ser metabolizada pela microbiota intestinal, produzindo AGCC (Huang et al., 2022; Li et al., 2021; Luo et al., 2019). Os AGCC também são produzidos a partir da fermentação de fibras alimentares (Koh et al., 2016; Yan et al., 2022). Ácidos acético, propiônico e butírico são os AGCC mais abundantes e exercem vários efeitos benéficos no organismo como, por exemplo, melhor função na barreira e redução da inflamação intestinal,

uma vez que favorecem a produção de proteínas de junção e muco (Blaak et al., 2020; Dalile et al., 2019; Tan et al., 2014). Além disso, AGCC podem desempenhar um papel na fisiopatologia da obesidade e *diabetes mellitus* tipo 2, interferindo no controle de peso corporal e na sensibilidade insulínica (Caetano & Castelucci, 2022).

A presença de soja nas dietas também aumentou a umidade das fezes; e os grupos teste apresentaram a mesma coloração e consistência das fezes que o grupo controle. A maior umidade das fezes nos grupos contendo farinha de soja e grilo em pó também se deve, provavelmente, ao conteúdo de fibras insolúveis dessas matrizes. As fibras insolúveis possuem a capacidade de adsorver água no lúmen intestinal, aumentando massa e volume fecal, e consequentemente, acelerando o trânsito intestinal (Vries et al., 2019). Fibras alimentares possuem diversas funções fisiológicas no trato gastrointestinal, como por exemplo: aumentam a saciedade, regulam doenças cardiovasculares e diminuem o risco do desenvolvimento de doenças, como o diabetes mellitus tipo 2 (Brandl et al., 2020; Remes-Troche et al., 2020).

Os resultados observados na análise histomorfométrica corroboram com os resultados discutidos anteriormente. Os grupos teste apresentaram maior espessura da mucosa quando comparados ao controle. Os animais que receberam grilo em pó de maneira isolada apresentaram, ainda, maior diâmetro de células caliciformes. Tais parâmetros histomorfométricos estão diretamente relacionados à eficiência das funções digestivas e de absorção da membrana na borda em escova (Kwon et al., 2020). Mudanças macroscópicas, microscópicas e funcionais no intestino são respostas adaptativas normais a uma série de fatores, sendo a dieta a mais comum entre eles. Mudanças morfológicas induzidas pela dieta foram observadas por alguns autores (Najman et al., 2022; Seyyedini & Nazem, 2017; Segu et al., 2022). A quitina presente no exoesqueleto de insetos comestíveis, quando degradada, gera quitooligossacarídeos (COS); que são oligômeros de D-glucosamina, com diversas funções biológicas, tais como imunomodulação, redução de processos inflamatórios e impactos positivos na saúde intestinal (Ojha et al., 2021; Selenius et al., 2018; Van-Huis et al., 2013; Zhai et al., 2021). COS podem ser facilmente fermentados por bactérias intestinais, acarretando em produção de AGCC, que estimulam o crescimento da mucosa intestinal e a proliferação de células epiteliais em ratos (Adam et al., 2015; Knapp et al., 2013; Liu et al., 2022). Hipotetiza-se que o aumento na espessura da mucosa aconteceu como uma forma adaptativa do órgão para melhorar processos digestivos e absorptivos.

Células caliciformes estão envolvidas na produção de muco e alterações estruturais nessas organelas acarretam em alterações na produção deste subproduto (Gustafsson &

Johansson, 2022; Naama et al., 2023; Rogers, 2003). O muco possui a propriedade de se ligar ao ferro, facilitando sua captação pela camada da borda em escova para se ligar a proteínas e ser transferido para dentro da célula (Costa & Martino, 2016). Além disso, a camada de muco funciona como a primeira camada de defesa intestinal contra lesões químicas e físicas causadas por alimentos ingeridos, micróbios e produtos microbianos (Kim & Ho, 2010). Desta forma, aumentar o diâmetro das células caliciformes e, conseqüentemente, a produção de muco, sugere um aumento da absorção de ferro e da defesa intestinal.

No presente estudo, os animais que receberam *Gryllus assimilis* em pó de maneira isolada apresentaram maior expressão de biomarcadores do estresse oxidativo; e maior atividade da glutathione S-transferase (GST). Sabe-se que a GST é a enzima central na reação de ligação com a glutathione (GSH), um antioxidante não enzimático que atua como um dos principais agentes desintoxicantes, expulsando materiais estranhos acumulados no corpo e desempenhando um papel crucial na proteção das células contra os danos provocados pelos radicais livres (Chauhan e Choudhury 2020; Yuan et al., 2022). Dessa forma, hipotetiza-se que o *Gryllus assimilis* em pó, isoladamente, causou efeito oxidante nos animais, e a maior expressão de GST aconteceu de maneira adaptativa para minimizar os danos oxidativos gerados por esse estresse.

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que possui a capacidade de converter radicais superóxidos (O_2^-) nocivos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (He et al., 2019). Ao complementar o *Gryllus assimilis* em pó com a farinha de soja, observaram-se níveis de produtos de peroxidação lipídica similares ao controle e aumento da atividade da SOD. A capacidade antioxidante de dietas contendo insetos comestíveis também foi analisada por Xie e colaboradores (2020). Os autores verificaram que a larva de *Chrysomya megacephala* em pó também aumentou a expressão de SOD em camundongos. O aumento da atividade desta enzima antioxidante no grupo GP + FS, no presente estudo, pode estar associada à potencialização dos compostos bioativos presentes no grilo (Oliveira et al., 2024). A soja possui isoflavonas e saponinas; já os grilos possuem glicosaminoglicanos e frações peptídicas. Juntas, essas matrizes alimentares possuem compostos bioativos com propriedades antioxidantes e antimicrobianas que são capazes de reduzir a inflamação e o estresse oxidativo (Chatterjee et al., 2018; Kusumah e Mejia, 2022; Messina et al., 2019; Nowakowski et al., 2021).

Existem relatos que o consumo de grilo em pó acarretou em atividade antiinflamatória e antioxidante em roedores (Ahn et al., 2016; Hwang et al., 2019). Contraditoriamente, no

presente estudo, observou-se maior atividade oxidativa nos animais que consumiram esta matriz alimentar de forma isolada, demonstrada por meio do aumento da expressão de produtos de peroxidação. A maior expressão de MDA e PCN está envolvida com o aumento do estresse oxidativo, e esta condição desencadeia aumento na expressão de ON (Cui et al., 2018; Halliwell e Gutteridge, 2015). Espécies reativas de oxigênio aumentadas e defesas antioxidantes diminuídas podem influenciar na fisiopatologia da inflamação, fibrose, lesão de reperfusão, aterosclerose, doença de Alzheimer e doença pulmonar obstrutiva crônica (Forman & Zhang, 2021; Hybertson et al., 2011). Desta forma, sugere-se que o consumo do grilo preto de maneira isolada, no presente estudo, esteve associado a danos oxidativos no fígado dos animais, mas sua associação com a farinha de soja mostrou-se benéfica.

5. Conclusão

De maneira geral, nossos resultados mostram que o *Gryllus assimilis* em pó, associado à farinha de soja, é uma boa fonte de ferro biodisponível, mostrando-se também eficaz na manutenção dos níveis semanais e no ganho final de hemoglobina. O consumo do inseto associado à soja implicou também em melhorias de parâmetros de saúde intestinal como, por exemplo, aumento de ácido acético e umidade das fezes quando comparado ao controle. A associação do *Gryllus assimilis* à soja também gerou resultados positivos no balanço oxidativo, uma vez que o grupo que recebeu esse mix apresentou um aumento da atividade da superóxido dismutase, quando comparado ao consumo do pó isolado, que apresentou maiores concentrações de produtos de peroxidação.

6. Referências

- ABDEL-MONIEM, M. M. *et al.* Iron supplementation ameliorates aloin-induced iron deficiency anemia in rats. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 124, 2022.
- ABRIL, S. *et al.* Edible insects in Latin América: A Sustainable Alternative for Our Food Security. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 2022.
- ADAM, C. L. *et al.* Dose-dependent effects of a soluble dietary fiber (pectin) on food intake, adiposity, gut hypertrophy and gut satiety hormone secretion in rats. **Journal PlosOne**, 2015.
- AHN, M. Y. *et al.* Gene expression profiling and inhibition of adipose tissue accumulation of *G. bimaculatus* extract in rats on high fat diet. **Lipids Health Disease**, v. 116, n.14, 2015.
- AL-NAKKSH, L.; KUBINSKI, A. Soy isoflavones and gastrointestinal health. **Current Nutrition Reports**, v. 9, p. 193-201, 2020.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International - 20th Edition, 201620th ed. Gaithersburg: AOAC., 2016. Disponível em: <https://www.techstreet.com/standards/official-methods-of-analysis-of-aoac-international-20th-edition-2016?product_id=1937367>. Acesso em: 04 set. 2022.

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. *et al.* 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, 2022.

BARBOSA, G. D. *et al.* Oxidative stress, antioxidants and intestinal calcium absorption. **World Journal Gastroenterology**, v. 23, n. 16, 2017. 2017; 23(16): 2841-2853 [PMID: 28522903 DOI: 10.3748/wjg.v23.i16.2841]

BARBOSA, K. B. F. *et al.* Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, 2010.

BASSON, A. R. *et al.* Regulation of intestinal inflammation by soybean and soy-derived compounds. **Foods**, v. 10, n. 4, p. 774, 2021.

BERGMANS, R. S. *et al.* Comparison of cricket diet with peanut-based and milk-based diets in the recovery from protein malnutrition in mice and the impact on growth, metabolism and immune function. **Plos One**, v.15, n. 6, 2020.

BLAACK E. E. *et al.* Short chain fatty acids in human and gut and metabolic health. **Beneficial Microbes**, v. 11, n. 5, p. 411-455, 2020.

BOGLIOLO, L. Patologia Geral [editado por] Geraldo Brasileiro Filho. - 5. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

BORBA, L. S. *et al.* Importance of iron in the human body: an integrative literature review. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 17, p. e151111738965, 2022.

BRANDL, B. *et al.* Effects of Extrinsic Wheat Fiber Supplementation on Fecal Weight; A Randomized Controlled Trial. **Nutrients**, v.12, n. 2, 2020.

CAETANO, M. A. F.; CASTELUCCI, P. Role of short chain fatty acids in gut health and possible therapeutic approaches in inflammatory bowel disease. **World Journal of Clinical Cases**, v. 10, n. 28, p. 9985-10003, 2022.

CHATTERJEE, C.; GLEDIE, S.; XIAO, C. W. Soybean Bioactive Peptides and Their Functional Properties. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1211, 2018.

CHAUHAN, A. K.; CHOUDHURY, B. Suitability of organic solvent and cholinium based ionic liquid activated novel lignolytic enzymes of *H. aswanensis* for enhanced Kalson lignin degradation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 107-117, 2020.

COSTA, B. M. N.; MARTINO, D, S. H. Biodisponibilidade de Minerais. In: Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia. Editora Payá, p. 107-135, 2016.

CUI, X. *et al.* Relationship between free and total malondialdehyde, a well-established marker of oxidative stress, in various types of human biospecimens. **Journal of Thoracic Disease**, v. 10, n. 5, p. 3088–3097, 2018.

DALILE, B. *et al.* The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. **Nature reviews gastroenterology & hepatology**, v. 16, p. 461–478, 2019.

DEUCHI, K. *et al.* Continuous and massive intake of chitosan affects mineral and fat-soluble vitamin status in rats fed on a high-fat diet. **Bioscience, Technology and Biochemistry**, v. 59, n. 7, p. 1211-1216, 1995.

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

FORMAN, H. J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 9, p. 689-709, 2021.

FRAZER, D. M.; ANDERSON, G. J. The regulation of iron transport. **BioFatores**, v. 40, n. 2, p. 206-214, 2013.

GROTTO, H.Z.W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** [Internet]. v. 30, p. 390-397, 2008.

GUSTAFSSON, J. K.; JOHANSSON, M. E. V. The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 19, n. 12, p. 785-803, 2022.

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Radicais Livres em Biologia e Medicina , 5ª ed. (Oxford, 2015; edn online, Oxford Academic , 22 de outubro de 2015)

HE, Y. *et al.* Housefly (*Musca domestica*) larvae powder, preventing oxidative stress injury via regulation of UCP4 and CyclinD1 and modulation of JNK and P38 signaling in APP/PS1 mice. **Food & Function**, 2019.

HUANG, L. *et al.* Soybean isoflavones modulate gut microbiota to benefit the health weight and metabolism. **Frontiers in Cellular and Infectioin Microbiology**, v. 12, 2022.

HWANG, B. B. *et al.* The edible insect *Gryllus bimaculatus* protects against gut-derived inflammatory responses and liver damage in mice after acute alcohol exposure. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p.857, 2019.

HYBERTSON, B. M. *et al.* Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. **Molecular Aspects of Medicine**, v.32, n. 4, p.234-246, 2011.

INJE, O. F. *et al.* Protein quality of four indigenous edible insect species in Nigeria. **Food Science and Human Wellness**, v. 7, n. 2, p, 175-183, 2018.

KIM, J. S.; HO, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. **Current Gastroenterology Reports**, v. 12, p. 319-330, 2010.

KNAPP, B. K. *et al.* Supplementation with soluble fiber dextrin and soluble corn fiber modifies health indices in the cecum and color of Sprague-Dawley rats. **Nutrientes**, v. 5, p. 396–410, 2013.

KOH, A. *et al.* From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. **Cell Press**, v. 165, n. 6, p. 1332-1345, 2016.

KUSUMA, J.; MEJIA, E. G. Impact of soybean bioactive compounds as response to diet-induced chronic inflammation: A systematic review. **Food Research International**, v. 162, 2022.

KWON, O.; HAN, T. S.; SON, M. Y. Intestinal Morphogenesis in Development, Regeneration, and Disease: The Potential Utility of Intestinal Organoids for Studying Compartmentalization of the Crypt-Villus Structure. **In Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 2020.

LI, W. *et al.* Differences in the gut microbiota composition of rats fed with soybean protein and their derived peptides. **Journal of Food Science**, v.86, n. 12, p. 5452-5465, 2021.

LIU, Z. *et al.* Bacillus coagulans in Combination with Chitooligosaccharides Regulates Gut Microbiota and Ameliorates the DSS-Induced Colitis in Mice. **Microbiology Spectrum**, v.10, n.4, 2022.

LUO Q. H. *et al.* Improvement of colonic immune function with soy isoflavones in high-fat diet-induced obese rats. **Molecules**, v. 24, n. 6, 2019.

MARGARITA, G.; SKALNAYA, A.; SKALNY, V. Essential Trace Elements in Human Health: A Physician's View. Publishing House of Tomsk State University, Tomsk, P. 612-615, 2008.

MELSE-BOONSTRA, A. Bioavailability of Micronutrients From Nutrient-Dense Whole Foods: Zooming in on Dairy, Vegetables, and Fruits. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, p. 101, 2020.

MESSINA, C. M. *et al.* Microbiological Profile and Bioactive Properties of Insect Powders Used in Food and Feed Formulations. **Foods**, n. 8, v. 9, p.400, 2019.

MWANGI, M. N. *et al.* Insects as sources of iron and zinc in human nutrition. **Nutritional Research Review**, n. 2, v. 31, p. 248-255, 2018.

NAAMA, M. *et al.* Autophagy controls mucus secretion from intestinal goblet cells by alleviating ER stress. **Cell Host & Microbe**, v. 31, n. 3, p. 433-446, 2023.

NAJMAN, K. *et al.* Effect of heat-treated garlic (*Allium sativum L.*) on growth parameters, plasma lipid profile and histological changes in the ileum of atherogenic rats. **Nutrients**, v. 14, n. 2, p. 336, 2022.

NOWAKOWSKI, A. C. *et al.* Potential health benefits of edible insects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 13, 2021.

OJHA, S. *et al.* Bioavailability of nutrients from edible insects. **Current Opinion in Food Science**, v. 41, p. 240-248, 2021.

OLIVEIRA, L. A. *et al.* 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.

OONINCX, D. G. A. B.; FINKE, M. D. Nutritional value of insects and ways to manipulate their composition. **Journal Insects as a Food and Feed**, v. 7, n. 5, p. 495-948, 2021.

- PASRICHA, S. R. *et al.* Iron Deficiency. *The Lancet*, v. 16, n. 396, p. 233-248, 2021.
- RAHEEM, D. *et al.* Entomophagy: nutritional, ecological, safety and legislation aspects. **Food Research International**, v. 126, 2019.
- REMES-TROCHE, J. M. *et al.* Nopal fiber (*Opuntia ficus-indica*) improves symptoms in irritable bowel syndrome in the short term: a randomized controlled trial. *Neurogastroenterology & Motility*, v. 33, n. 2, 2020)
- ROGERS, D. F. The airway goblet cell. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, n. 1, p. 1-6, 2003.
- SCIACQUA, A. *et al.* Ferritin modifies the relationship between inflammation and arterial stiffness in hypertensive patients with different glucose tolerance. *Cardiovascular Diabetology*, v. 19, p.123, 2020.
- SEGU, H. *et al.* Intestinal morphometrical changes induced by a Western-Style Diet in Wistar rats and GSPE counter regulatory effect. **Nutrients**, v. 14, n. 13, p. 2608, 2022.
- SELENIUS, O. *et al.* Effect of chitin and chitooligosaccharide on in vitro growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Escherichia coli* TG. **Applied Food Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 163-172, 2018.
- SEYYEDIN, S.; NAZEM, M. N. Histomorphometric study of the effect of methionine on small intestine parameters in rat: an applied histologic study. **Journal Via Medica**, v. 76, n. 4, p. 620-629, 2017.
- STARCEVIC, K. *et al.* Influence of substitution of sunflower oil by different oils on the growth, survival rate and fatty acid composition of Jamaican field cricket (*Gryllus assimilis*). **Animal Feed Science and Technology**, v. 228, p. 66-71, 2017.
- TAN, J. *et al.* Chapter three – The role of short-chain fatty acids in health and disease. **Advances in Immunology**, v. 121, p. 91-119, 2014.
- UEDA, N.; TAKASAWA, K. Impact of Inflammation on Ferritin, Hepcidin and the Management of Iron Deficiency Anemia in Chronic Kidney Disease. *Nutrients*, v. 10, n. 9, p. 1173, 2018.
- VAN HUIS, A. Potential of insects as food and feed in assuring food security. **Annual review of entomology**, v. 58, p. 563-583, 2013.
- VÁZQUEZ, L. I. *et al.* Prevalence of anemia in children from latin america and the caribbean and effectiveness of nutritional interventions: systematic review and meta-analysis. *Nutrients*, v. 11, n. 1, p. 183, 2019.
- VRIES, J. *et al.* Effects of β -Fructans Fiber on Bowel Function: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, v. 11, n. 1, 2019.
- WALDVOGEL-ABRAMOWSKI, S. *et al.* Physiology of iron metabolism. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 41, n. 3, p. 213-221, 2014.
- WANG, Y. *et al.* New insights in intestinal oxidative stress damage and the health intervention effects of nutrients: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 75, 2020.

XIE, D. *et al.* Antioxidant activity of selenium-enriched *Chrysomya megacephala* (Fabricius) larvae powder and its impact on intestinal microflora in D-galactose induced aging mice. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, p. 264, 2020.

YAN, J. *et al.* Beneficial effect of the short-chain fatty acid propionate on vascular calcification through intestinal microbiota remodelling. **Microbiome**, n. 195, v. 10, 2022.

YANG, Y. *et al.* Evaluation of the protective effects of *Ganoderma atrum* polysaccharide on acrylamide-induced injury in small intestine tissue of rats. **Food & function**, v. 10, n. 9, p. 5863-5872, 2019.

YUAN, H. *et al.* Oxidative stress and inflammation caused by 1-tetradecyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate in rat livers. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, p. 86680-86691, 2022.

ZHAI, X. *et al.* The impact of chitooligosaccharides and their derivatives on the *in vitro* and *in vivo* antitumor activity: A comprehensive review. **Carbohydrate Polymers**, v. 266, 2021.

8. CONCLUSÃO GERAL

O *Gryllus assimilis* em pó associado à farinha de soja apresentou biodisponibilidade comparável com o padrão sulfato ferroso. Essa associação mostrou-se ser a opção mais viável, uma vez que também apresentou melhoras significativas na saúde intestinal dos animais; aumentando a umidade das fezes e a concentração de ácidos graxos de cadeia curta. O consumo do grilo em pó associado à farinha de soja ainda resultou em menores expressões de produtos de peroxidação lipídica, maior expressão da superóxido dismutase e ganho final e semanal de hemoglobina próximos ao controle.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou efeitos benéficos e promissores da associação entre *Gryllus assimilis* em pó e farinha de soja. Juntas, essas matrizes alimentares apresentaram biodisponibilidade de ferro semelhante ao controle. Fontes alternativas de ferro biodisponível podem funcionar como estratégia nutricional para melhorar o status deste micronutriente em regiões onde prevalece a sua carência.

Esforços futuros são necessários para investigar a associação entre o consumo de *Gryllus assimilis* em pó de maneira isolada e inflamação, por meio de análises específicas de Proteína C - Reativa (PCR), bem como de marcadores de função hepática e renal. A inflamação é uma resposta imunológica a infecções, lesões ou estresse; sendo assim, um preditor do estado geral de saúde. Portanto, torna-se importante analisar se o consumo de *Gryllus assimilis* estaria associado ao desenvolvimento de um possível quadro inflamatório.

ANEXOS

Anexo 1 - Certificado de aceite do projeto pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa

UFV MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Campus Universitário – Viçosa, MG, Brasil, 36570-900 – Telefone: (31) 3612-2315

Viçosa, 16 de novembro de 2022

Prof.
Ceres Mattos Della Lucia
Coordenadora do projeto
DNS/UFV

Sr. Coordenador,

Após avaliação da Metodologia utilizada no Projeto de Pesquisa intitulado “Biodisponibilidade de ferro em farinha de *Gryllus assimilis*”, aqui nomeado Processo 38/2022, a CEUA/UFV emite parecer favorável ao protocolo de utilização de animais proposto, tendo como base para análise a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTIC, bem como 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.

Acresce a esse Parecer a exigência de Relatório Final de Atividades conforme itens a seguir:

RESUMO DOS RESULTADOS FINAIS OBTIDOS A PARTIR DOS EXPERIMENTOS ENVOLVENDO A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS NO PROJETO DE PESQUISA

- 1 Número do protocolo de submissão do projeto de pesquisa à CEUA/UFV:
- 2 Metodologia completa obrigatoriamente com:
 - Local (is) Geral (is) e específico (s) oficial (is) onde ocorreu a experimentação;
 - O nome científico do animal em questão;
 - Número total de animais utilizados na pesquisa.
- 3 Resultados:
- 4 Nome do Coordenador do Projeto:
Assinatura:
- 5 Nome do Responsável Técnico:
Assinatura:
Inscrição em CRMV:


Prof. Fabricio Luciani Valente
Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV



Universidade Federal de Viçosa

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Campus Universitário – Viçosa, MG, Brasil, 36570-900 – Telefone: (31) 3612-2315

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Biodisponibilidade de ferro em farinha de *Gryllus assimilis*”, registrada com o nº 38/2022, sob a responsabilidade da Professora Ceres Mattos Della Lucia do Departamento de Nutrição e Saúde, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08/10/2008, do Decreto nº 6.899, de 15/07/2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa, em 16/11/2022. Após a conclusão do projeto, o relatório final deverá ser submetido à CEUA para emissão de certificado definitivo.

Finalidade	Pesquisa
Vigência de autorização	12 meses
Especie/linhagem/raça	Rato – <i>Rattus norvegicus</i>
Nº de animais/sexo	32 machos
Peso/Idade	65g/ 21 dias
Origem	Biotério

CERTIFICATE

We certify that the proposition entitled “Effect of a new milk-based product fermented with probiotic and curcumin on parameters associated with an obese animal model”, registered with the number 38/2022, under the responsibility of Professora Ceres Mattos Della Lucia from the Department of Nutrition and Health is in accordance with the precepts of Law 11,7794, of 10/08/2008, Decree 6.899, of 07/15/2009, and the rules issued by Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, and was approved by the Ethics Committee in the Use of Animals (CEUA) of Universidade Federal de Viçosa, on 11/16/2022. Upon completion of the project, the final report must be submitted to CEUA for the issuance of the definitive certificate.

Purpose	Research
Validity of authorization	12 months
Specie/Lineage/Breed	Mouse – <i>Rattus norvegicus</i>
Number of animals/Sex	32 male
Weight/Age	25g/ 21 day
Origin	Biotarium


Fabricio Luciani Valente

Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV