

Inês Nunes Cabanas Paes Vieira

**Análise dos efeitos da substituição parcial e total de bagaço e
óleo de soja por farinha de larva da mosca soldado negro
(*Hermetia illucens*) na alimentação de suínos**

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Orientador: Doutor Pedro Faísca

Co-Orientador: Doutor Daniel Murta

Lisboa

2021

Inês Nunes Cabanas Paes Vieira

**Análise dos efeitos da substituição parcial e total de bagaço e
óleo de soja por farinha de larva da mosca soldado negro
(*Hermetia illucens*) na alimentação de suínos**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 15 de Julho de 2021, com o Despacho Reitoral nº 222/2021, mediante a seguinte composição de júri:

Presidente: Professora Doutora Margarida Alves

Arguente: Professora. Doutora Ana Resendes

Orientador: Doutor Pedro Faísca

Co-Orientador: Doutor Daniel Murta

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2021

Agradecimentos

A realização desta dissertação não teria sido possível sem o apoio e colaboração de várias pessoas e entidades a quem quero deixar os meus agradecimentos.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos meus orientadores, Doutor Pedro Faísca e Doutor Daniel Murta, por toda a disponibilidade, ajuda e orientação durante a realização do estágio e da escrita da dissertação.

À EntoGreen por toda a confiança, transmissão de conhecimento e disponibilidade que sem a qual não teria sido possível a realização do estudo que serviu de base a esta dissertação.

A todos os que ajudaram na preparação e concretização do ensaio *in vivo* nas instalações no polo do INIAV de Santarém. Com um especial agradecimento à Dra. Olga Moreira, ao Sr. José Batista e ao João Costa.

Quero também agradecer ao Dr. José Catarino e à Dra. Antonieta Muñoz, pela ajuda e paciência com o processamento das amostras e todo o trabalho desenvolvido no Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia da FMV-ULHT.

À minha família e amigos, que foram essenciais para a conclusão desta etapa.

Por último, mas não menos importante, quero deixar o meu agradecimento às minhas companheiras de estágio, Ana Pestana e Rebeca Antunes, que mesmo quando confrontadas com dificuldades as conseguimos superar, tornando este projeto mais emocionante.

Financiamento

Este trabalho foi realizado no âmbito de um projeto de investigação financiado pela Ingredient Odyssey SA (EntoGreen) em estreita colaboração com a Estação Zootécnica Nacional (INIAV).



ENTOGREEN



Instituto Nacional de
Investigação Agrária e
Veterinária, I.P.

Resumo

O aumento da população mundial vai implicar um aumento da necessidade de produção alimentar. A FAO prevê que entre 2012 e 2050 a indústria da pecuária cresça 35% a 50%. A suinicultura é um dos setores com maior relevância da agropecuária e consequentemente responsável por um importante impacto ambiental. A alimentação dos animais é responsável por grande parte desse impacto e coloca uma forte pressão sobre recursos já limitados, especialmente a componente proteica das rações, sendo urgente a procura de fontes nutricionais alternativas. A utilização de insetos no setor alimentar pode ser uma das alternativas promissoras para tornar o setor da pecuária mais competitivo e sustentável. Sendo a BSF uma das principais apostas torna-se, assim essencial, avaliar se a introdução desta nova fonte nutricional impacta negativamente na saúde e no bem-estar dos animais e dos consumidores.

Com esta dissertação pretendeu-se avaliar de que forma a incorporação parcial e total de farinha de larva de mosca soldado negro (*Hermetia illucens*) em substituição de bagaço e óleo de soja na alimentação de suínos em fase de acabamento, afeta as características histológicas dos órgãos e tecidos. Foi realizado um estudo com 12 suínos Landrace*Large White*Duroc machos não castrados de peso vivo médio inicial de 62 ± 3.6 kg. Foram estudadas três rações com crescente incorporação de farinha de larva da mosca soldado negro em substituição de bagaço e óleo de soja: BSF0 (controlo); BSF50 (50% de substituição) e BSF100 (100% de substituição) formuladas para serem isoenergéticas e isoproteicas (15% PB). O ensaio teve uma duração de 35 dias. Os animais foram insensibilizados com uma descarga elétrica, na cabeça e tórax e de seguida sangrados, com um peso vivo final de 100 ± 6.6 kg.

Após fixação, os diferentes tecidos foram corados com a coloração de rotina HE, avaliaram-se histologicamente e através de um sistema de pontuações classificaram-se as alterações e grau de inflamação. Realizou-se ainda o estudo morfométrico das gorduras retroperitoneal, mesentérica e pericárdica.

Não foram encontradas alterações significativas nos parâmetros avaliados concluindo-se que os diferentes níveis de inclusão de farinha de larva BSF utilizados neste estudo não apresentam um impacto negativo na saúde dos suínos, podendo o recurso a esta nova fonte proteica ser uma opção do ponto de vista de saúde dos animais.

Palavras chave: *Hermetia illucens*, Histopatologia, Morfometria, Suínos de engorda

Abstract

The increasing world population will lead to an increase in the need for food production. FAO predicts that between 2012 and 2050 the livestock industry will grow 35% to 50%. Pig farming is one of the most relevant sectors of agriculture and consequently responsible for an important environmental impact. The feeding of animals is responsible for a large part of this impact and puts a strong pressure on already limited resources, especially the protein component of the feed and the search for alternative nutritional sources is urgent. The use of insects in the food sector can be one of the promising alternatives to make the livestock sector more competitive and sustainable. As BSF is one of the main bets, it is therefore essential to assess whether the introduction of this new nutritional source has a negative impact on the health and well-being of animals and consumers.

With this dissertation it was intended to evaluate how the partial and total incorporation of black soldier fly meal (BSF) (*Hermetia illucens*) in substitution of soybean meal and soybean oil in the feeding of pigs in the finishing phase, affects the histological characteristics of the organs and tissues. A study was carried out with 12 Landrace * Large White * Duroc male pigs with an initial mean live weight of 62 ± 3.6 kg. Three diets were studied with increasing incorporation of BSF meal to replace soybean meal and soybean oil: BSF0 (control); BSF50 (50% replacement) and BSF100 (100% replacement) formulated to be isoenergetic and isoprotein (15% CP). The trial lasted 35 days. The animals were stunned with an electric shock, on the head and chest and then bled, with a final live weight of 100 ± 6.6 kg.

After fixation, the different tissues were processed for routine HE staining, evaluated histologically and through a scoring system, the changes and degree of inflammation were classified. Morphometric study of retroperitoneal, mesenteric and pericardial fats was also performed.

No statistically significant differences were observed in the parameters studied, concluding that the different levels of inclusion of BSF meal used in this study do not have a negative impact on the health of pigs, therefore the use of this new protein source may be a valid option from the point of view of animal health.

Keywords: *Hermetia illucens*, Histopathology, Morphometry, Growing pigs

Abreviaturas

ADF – Fibra em detergente ácido, do inglês “Acid detergent fiber”

ADL - Lenhina em detergente ácido, do inglês “Acid detergent lignin”

ARRIVE – Pesquisa Animal: Relatório de experimentação *In Vivo*, do inglês “Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments”

BALT - Tecido linfoide associado à mucosa brônquica, do inglês “Bronchus-associated lymphoid tissue”

BSF – Mosca soldado negro, do inglês “Black Soldier Fly”

BSF0 – Ração controlo

BSF50 – Ração com 50% substituição

BSF100 – Ração com 100% substituição

CAR – Consumo alimentar residual

cm – Centímetros

dp – Desvio padrão

Dr. – Doutor

Dra. – Doutora

Et al. – E outros, da locução latina “*et alli*”

EZN - Estação Zootécnica Nacional

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, do inglês “Food and Agriculture Organization”

FAWC – Conselho de Bem-estar dos Animais de Produção, do inglês “Farm Animal Welfare Council”

FB – Fibra bruta

FMV-ULHT – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

g – Grama

GALT – Tecido linfoide associado ao intestino, do inglês “Gut-associated lymphoid tissue”

GEE – Gases com efeito estufa

GMD – Ganho de peso médio diário

HCl – Ácido clorídrico

HE – Hematoxilina e Eosina

IC – Índice de conversão alimentar

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

IPIFF – Plataforma Internacional de Insetos para Alimentação Humana e Animal, do inglês “International Platform of Insects for Food and Feed”

Kg – Quilograma

m – Metro

mm - Milímetro

MS – Matéria Seca

N - Norte

NGF - Fibra em detergente neutro, do inglês “Neutral detergent fiber”

PB - Proteína Bruta

S - Sul

SNA – Sistema nervoso autónomo

TIFF – Formato de arquivo de imagem marcada, do inglês “Tagged Image File Format”

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa, do inglês “Tumor Necrosis Factor”

% - Percentagem

°C – Graus Celsius

μm - Micrómetro

Índice

Índice de Tabelas	9
Índice de Figuras	10
Casuística de Estágio	12
1. Estação Zootécnica Nacional (EZN) – INIAV, Vale de Santarém e Ingredient Odyssey SA (EntoGreen)	12
1.1 Atividades desenvolvidas	12
2. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.....	13
2.1 Atividades desenvolvidas	13
2. Revisão bibliográfica.....	15
2.1 Introdução.....	15
2.2 Utilização de insetos como fonte nutricional na alimentação humana e animal ..	16
2.3 Importância ambiental e economia circular.....	19
2.4 Mosca soldado negro (<i>Hermetia illucens</i>).....	22
2.4.1 Ciclo de vida.....	22
2.4.2 Valor nutricional.....	23
2.4.3. BSF na alimentação de suínos	24
2.5 Métodos para avaliação do valor de uma dieta.....	25
2.6 Experimentação animal em ensaios de nutrição.....	26
2.7 Modelos animais em estudos nutricionais	28
2.7.1 O suíno como modelo animal	28
2.8 Estudos histopatológicos: métodos para aferir as lesões.	30
3. Material e Métodos	34
3.1 Produção de BSF	34
3.1.1 Reprodução e recolha de ovos	34
3.1.2 Eclosão das larvas e bioconversão.....	34
3.1.3 Separação das larvas do substrato	35
3.2 Ensaio <i>in vivo</i>	35
3.2.1 Alojamento e disposição dos animais e condicionamento ambiental.....	35

3.2.2	Caracterização e fabrico da ração	36
3.2.3	Secagem das larvas	37
3.2.4	Registos diários e semanais	38
3.3	Abate e recolha de amostras	38
3.4	Recolha e fixação das amostras histológicas	38
3.5	Desidratação das amostras	39
3.6	Inclusão das amostras em parafina e corte no micrótomo rotativo	39
3.7	Coloração das amostras: Hematoxilina-Eosina	40
3.8	Análise histológica	41
4.	Análise estatística	43
5.	Resultados.....	44
5.1	Peso dos órgãos	44
5.2	Concordância entre observadores	44
5.3	Análise histopatológicas dos tecidos	46
5.3.1	Estômago	46
5.3.2	Segmentos intestinais	46
5.3.3	Fígado	47
5.3.4	Linfonodos mesentéricos	48
5.3.5	Rim	48
5.3.6	Pulmão	48
5.4	Classificação da inflamação dos tecidos	49
5.5	Estudo morfométrico dos adipócitos	51
6.	Discussão	53
7.	Conclusão	56
8.	Referências bibliográficas	57
	Apêndices	I
	Apêndice I - Protocolo de processamento histológico	I
	Apêndice II - Protocolo de coloração de rotina: Hematoxilina-Eosina.....	I

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição das dietas em estudo.	37
Tabela 2 – Macro para medição da área de perfil dos adipócitos.....	41
Tabela 3: Médias dos pesos (kg) dos órgãos, para amostra total e por grupo	44
Tabela 4: Concordância inter-observador na análise da inflamação	45
Tabela 5: Distribuição da análise da inflamação, total e por grupo	50
Tabela 6: Distribuição dos três tipos de gordura, para amostra total e por grupos	51

Índice de Figuras

Figura 1: Postura de ovos da BSF	34
Figura 2: Ovos de BSF no vidro de relógio	34
Figura 3: Alojamento dos animais durante o ensaio.....	36
Figura 4: Suínos nos parques	36
Figura 5: Caixa metabólica.....	36
Figura 6 – Estômago 100x HE. Dieta BSF0. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário	46
Figura 7 – Estômago 100x HE. Dieta BSF50. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário	46
Figura 8 – Estômago 200x HE. Dieta BSF100. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário.....	46
Figura 9 – Intestino delgado 100x HE. Dieta BSF0. Infiltrados inflamatório linfoplasmocitário a nível da mucosa e presença de eosinófilos	46
Figura 10 – Intestino delgado (duodeno) 100x HE. Dieta BSF50. Infiltrados inflamatório linfoplasmocitário a nível da mucosa e presença de eosinófilos	46
Figura 11 – Intestino delgado (íleo) 50x HE. Dieta BSF100. Infiltrados inflamatório linfoplasmocitário a nível da mucosa com reatividade do GALT e presença de eosinófilos.....	46
Figura 12 - Ceco 100x HE. Dieta BSF0. Erosão da mucosa com infiltrados neutrofílicos secundários. Infiltrados inflamatório linfoplasmocitário a nível da mucosa.....	47
Figura 13 – Ceco 100x HE. Dieta BSF50. Infiltrados inflamatório linfoplasmocitário a nível da mucosa e submucosa.....	47
Figura 14 – Ceco 100x HE. Dieta BSF100. Infiltrados inflamatório linfoplasmocitário a nível da mucosa e submucosa.....	47
Figura 15 – Cólon 100x HE. Dieta BSF0. Infiltrados inflamatório linfoplasmocitário a nível da mucosa.	47

Figura 16 – Cólon 100x HE. Dieta BSF50. Infiltrados inflamatório linfoplasmocitário a nível da mucosa	47
Figura 17 – Cólon 100x H.E. Dieta BSF100. Infiltrados inflamatório linfoplasmocitário a nível da mucosa e submucosa.....	47
Figura 18 – Fígado 100x HE. Dieta BSF100. Infiltrado inflamatório linfoplasmócitário periportal discreto.	47
Figura 19 – Linfonodo mesentérico 100x HE. Dieta BSF0. Reatividade do linfonodo com hiperplasia do folículo linfóide com centro germinativo.....	48
Figura 20 – Linfonodo mesentérico 200x HE. Dieta BSF50. Reatividade do linfonodo com presença de eosinófilos	48
Figura 21 – Linfonodo mesentérico 100x HE. Dieta BSF100. Reatividade do linfonodo com hiperplasia do folículo linfóide com centro germinativo.....	48
Figura 22 – Rim 100x HE. Dieta BSF0. Discretos infiltrados inflamatórios linfoplasmocitários intersticiais.....	48
Figura 23 – Pulmão 100x HE. Dieta BSF0. Hiperplasia do BALT e infiltrados inflamatórios perivascular e intersticiais ricos em linfócitos, plasmócitos e alguns macrófagos.....	49
Figura 24 – Pulmão 100x HE. Dieta BSF50. Infiltrados inflamatórios perivascular e intersticiais ricos em linfócitos, plasmócitos e alguns macrófagos.	49
Figura 25 – Pulmão 100x HE. Dieta BSF50. Infiltrados inflamatórios perivascular e intersticiais ricos em linfócitos, plasmócitos e alguns macrófagos.	49

Casuística de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

1. Estação Zootécnica Nacional (EZN) – INIAV, Vale de Santarém e Ingredient Odyssey SA (EntoGreen)

O estágio na EZN e na EntoGreen teve início no dia 23 de Setembro de 2019 e terminou dia 6 de Março de 2020.

1.1 Atividades desenvolvidas

O primeiro período do estágio foi realizado no laboratório de nutrição da EZN para determinar as características físico-químicas básicas dos alimentos para animais, seguindo os protocolos, segundo a Norma Portuguesa, para avaliação do teor em: celulose bruta, com filtração intermédia; azoto e proteína bruta - pelo método de Kjeldahl; gordura; humidade; e cinza bruta.

Na EntoGreen, durante todo o período de estágio, a autora esteve envolvida no processo de produção/criação da mosca soldado negro (BSF), que serviu como fonte proteica para duas das rações do estudo *in vivo*. Este processo de produção incluiu desde a recolha e pesagem dos ovos de mosca, produção de larvas juvenis, inoculação de substrato com larvas e produção de larvas e pupas, tendo sido possível passar por vários pontos produtivos do processo.

Ainda no âmbito do estágio na EntoGreen, a autora colaborou na organização de dois eventos, O Dia Mundial do Inseto Comestível, que decorreu na Universidade Nova de Lisboa, em Carcavelos, no dia 26 de Outubro de 2019 e a apresentação do projeto EntoValor, que teve lugar na EZN, no dia 22 Novembro de 2019.

No decorrer do estágio, foi ainda possível assistir ao seminário de apresentação dos resultados do projeto ValRuMeat - Valorização da Carne de Ruminantes em Sistemas Intensivos de Produção, no dia 13 de Novembro.

Foram também desenvolvidos outros projetos para a empresa tais como folhetos para divulgação do “BSF workshop” e postais de Natal, para divulgação no site da empresa e nas redes sociais.

Os dois últimos meses foram realizados nas instalações da EZN, onde executamos o ensaio *in vivo* com doze suínos. Os animais foram pesados à chegada e divididos por peso, em dois grupos. O primeiro, com os seis animais mais pesados e o segundo, com os restantes com menor peso.

Antes da chegada dos animais, participámos no fabrico e embalamento da ração, que posteriormente foi usada no estudo.

Os suínos chegaram dia 16 de Janeiro e ficaram em período de habituação durante seis dias tendo o ensaio começado no dia 22 de Janeiro. Diariamente os animais foram alimentados de modo a terem sempre comida à disposição e procedeu-se à recolha da urina, das fezes e das sobras de alimento para serem contabilizadas individualmente e posteriormente processadas e analisadas. Todas as quartas feiras, os animais eram pesados e trocados dos parques para as caixas metabólicas e vice-versa, que eram devidamente higienizados antes da colocação do outro grupo de animais. Os resultados metabólicos recolhidos foram utilizados pela colega Rebeca Antunes na sua dissertação.

O ensaio acabou com o abate do primeiro grupo de animais no dia 27 Fevereiro e o segundo grupo no dia 5 de Março. No dia do abate, antes do tratamento da carcaça, foram retiradas as seguintes estruturas: o duodeno, jejuno, íleo ceco, cólon, fígado, estômago, rins, pâncreas, testículos, baço, linfonodo mesentérico, pulmões, coração, gordura retroperitoneal, gordura mesentérica e gordura coronária e foram pesados o fígado, baço, pulmão, coração e posteriormente cortados para serem rapidamente colocados em formol a 10% e transportados para a FMV-ULHT. A carcaça foi pesada e refrigerada para posterior análise da qualidade da carne, realizada pela colega Ana Pestana para a sua dissertação.

Esta fase do estágio foi partilhada com duas colegas, a Rebeca Antunes e a Ana Pestana, o que permitiu desenvolver competência de trabalho de equipa e de colaboração, tendo os resultados obtidos sido divididos por área e estudo de cada uma das alunas, permitindo assim obter-se no final um trabalho científico mais completo em três dissertações.

2. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

A segunda parte do estágio curricular teve início no dia 9 de Março e terminou no dia 31 de Julho, com uma pausa das atividades letivas, de 11 de Março a 6 de Julho de 2020 devido à pandemia da COVID-19.

2.1 Atividades desenvolvidas

Na primeira semana as amostras que, estavam em formol a 10%, foram cortadas com dimensões mais reduzidas de modo a serem incluídas em cassetes de histologia, e novamente colocadas em formol a 10%.

Devido à pandemia da COVID-19, no dia 11 de Março as atividades letivas foram suspensas, impossibilitando assim a continuação do estágio. No dia 6 de Julho foi de novo possível regressar à atividade.

Após as amostras terem sido processadas e colocadas em lâminas, realizou-se a coloração das amostras nas lâminas (HE) e de seguida a sua observação ao microscópio ótico. Ao mesmo tempo foram anotadas as alterações observadas em cada tecido de cada animal, para posterior tratamento dos dados.

Foi também possível ajudar na análise macroscópica, corte e colocação das amostras em cassetes histológicas, de amostras de pacientes provenientes do hospital veterinário da FMV-ULHT.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Introdução

Um aumento da população mundial, com cerca de 9.7 mil milhões de pessoas em 2050, bem como da capacidade económica, irá implicar um aumento da necessidade de produção alimentar em cerca de 70 %. A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) prevê que entre 2012 e 2050 a indústria da pecuária crescerá 35% a 50% (Food and Agriculture Organization [FAO], 2009; FAO, 2019).

A utilização de insetos no setor alimentar pode ser uma das alternativas promissoras para tornar o setor da pecuária mais competitivo e sustentável. Os insetos podem ser utilizados diretamente na alimentação humana, como alimento para animais domésticos ou exóticos e também na indústria da cosmética, combustíveis e materiais de base biológica, como por exemplo bioplásticos, esta nova indústria apresenta-se bastante promissora (International Platform of Insects for Food and Feed [IPIFF], 2020).

Em 2019 foram produzidas cerca de 500 toneladas de alimento à base de insetos, e estima-se que até 2030 o setor produza cerca de 3 milhões de toneladas, das quais 10% com aplicação na área alimentar (IPIFF, 2020).

Tendo em conta, que o setor da agropecuária exerce um grande peso do ponto de vista ambiental e do consumo de recursos (FAO, 2019), a produção de insetos é bastante aliciante pois apresenta uma emissão de gases com efeito de estufa (GEE) reduzida e é necessária uma área pequena tanto para a sua produção, como para a produção do alimento utilizado pelos insetos. Vários insetos foram estudados para consumo, sendo atualmente as espécies mais promissoras a *Hermetia illucens*, o *Tenebrio molitor* e a *Musca domestica* (Sogari *et al.*, 2019).

Os insetos podem ser alimentados com subprodutos das indústrias agroalimentares e assim aproveitar recursos que estão a ser eliminados da cadeia de consumo humano, transformando materiais de baixo valor e aproveitando nutrientes desperdiçados, em matérias com elevado valor nutricional, como por exemplo proteína. Oferecendo assim uma alternativa de escoamento para estes recursos subexplorados ou inexplorados (IPIFF, 2019).

Uma das várias utilidades dos insetos é o reaproveitamento dos desperdícios alimentares e a sua reintrodução na cadeia de valor. Segundo dados da FAO, a nível global, cerca de 14% do alimento perde-se desde a colheita até à colocação no mercado para venda, o que para a alimentação humana corresponde, em toneladas de alimento, a 1.3 mil milhões por ano (FAO, 2019).

Ao reduzir o desperdício alimentar, reduzem-se os custos associados à produção e aumenta-se a eficiência do sistema alimentar, melhorando a segurança alimentar e contribuindo para a sustentabilidade ambiental pois, tanto as emissões dos GEE são reduzidas (pegada de carbono), como a pressão sobre a terra (pegada terrestre) e sobre recursos hídricos (pegada hídrica), que afetam direta e indiretamente a biodiversidade (FAO, 2019).

Esta dissertação está inserida num estudo que pretende avaliar o efeito da substituição parcial e total de bagaço e óleo de soja, por farinha de larva BSF (*Hermetia illucens*) na alimentação de suínos. Foi realizado um ensaio *in vivo* com 12 suínos Landrace*Large White*Duroc, para análise de parâmetros metabólicos e de crescimento, de qualidade da carne e alterações histopatológicas associadas. A presente dissertação tem como objetivo analisar apenas as alterações histopatológicas.

A principal motivação para a realização deste estudo assenta na necessidade urgente de encontrar alternativas mais sustentáveis no campo da agropecuária e garantir que sejam exequíveis do ponto de vista da produção.

2.2 Utilização de insetos como fonte nutricional na alimentação humana e animal

A prática de comer insetos é denominada de entomofagia e existem mais de 1900 espécies reportadas como comestíveis para os humanos, estimando-se que os insetos façam parte da dieta tradicional de pelo menos 2 mil milhões de pessoas (Van Huis *et al.*, 2013). No entanto, acredita-se que um dos grandes entraves para a aceitação dos insetos como alimento é um problema cultural, principalmente nos países ocidentais. Para tentar ultrapassar este obstáculo e para contornar a repulsa visual, por parte do consumidor, várias apostas têm sido feitas, como por exemplo, a tentativa de incorporação em alimentos comuns (Van Huis, 2020).

O consumo de carne e peixe tem vindo a aumentar e a tendência é para continuar esse aumento, tornando cada vez mais difícil dar resposta à crescente procura e necessidade de proteína. Se essa crescente procura não for devidamente planeada e controlada em termos socioeconómicos e ambientais, nomeadamente nos recursos do planeta, vai originar graves alterações e desequilíbrios difíceis de reverter após instalados. À luz destes factos, torna-se imperativo a procura de novas fontes proteicas mais sustentáveis e com valores nutricionais semelhantes às fontes proteicas convencionais, para o consumo humano direto e indireto (Sogari *et al.*, 2019).

A utilização dos insetos no setor alimentar apresenta numerosas vantagens, pois a nível nutricional os insetos apresentam um elevado conteúdo proteico, nutrientes essenciais como vitaminas e minerais, ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados, péptidos antimicrobianos (que podem ajudar na problemática das resistências aos antibióticos através da redução da utilização de antibióticos sintéticos) e também fibras prébióticas, como por exemplo a quitina que melhoram a saúde intestinal, proporcionando o equilíbrio da microbiota (IPIFF, 2020).

Os insetos têm também, potencialidade para serem utilizados em programas de fortificação alimentar, como por exemplo no combate à anemia por deficiência de ferro, devido à elevada concentração de ferro presente, mas não só, pois também apresentam valores elevados em cálcio e zinco. Contudo, existe uma grande necessidade de um maior número de estudos científicos nesta área para se conseguirem desenvolver programas melhores e mais completos, com uma base científica mais sólida (Van Huis, 2020).

Lacroix *et al.* (2018) demonstraram que péptidos da larva de *Alphitobius diaperinus* possuem atividade inibitória contra a enzima dipeptidil peptidase IV, que desempenha um papel fundamental no metabolismo da glucose, logo com grande importância no tratamento da diabetes tipo 2.

Outro estudo desenvolvido por Stull *et al.* (2018), concluiu que a ingestão do grilo comestível apresenta efeitos benéficos na microbiota intestinal, potencialmente devido ao seu conteúdo em quitina e outras fibras presentes na composição do grilo. Os resultados demonstraram que o consumo foi bem tolerado pelos humanos e não foi descrito nenhum efeito tóxico nos voluntários durante o período do ensaio. O seu consumo potenciou o desenvolvimento da bactéria probiótica *Bifidobacterium animalis* estimulando a saúde intestinal e reduziu o nível plasmático do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) marcador inflamatório associado à inflamação sistémica.

Nekrasov *et al.* (2018), estudaram os efeitos da melanina, composto fenólico presente na cutícula dos insetos e responsável pela coloração escura de alguns insetos, no tratamento e prevenção de doenças hepáticas, stress e tumores (Van Huis, 2020).

Também em animais, foram alvo de estudo, os efeitos da utilização de insetos na procura de alternativa aos antibióticos. Estudou-se o efeito probiótico das larvas de *Tenebrio molitor* e de *Zophobas morio*, em frangos, e conclui-se que a suplementação das dietas apresentou benefícios para os animais, reduzindo a mortalidade e as contagens cecais de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. e aumentando os níveis de imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina A (IgA) no sangue (Islam & Yang, 2017).

Apesar destes resultados promissores, a introdução dos insetos no setor alimentar continua altamente condicionada devido a barreiras financeiras, legais e técnicas (Sogari *et al.*, 2019). Contudo, nos últimos anos, houve um aumento exponencial tanto no número de estudos científicos sobre a utilização dos insetos como constituinte de alimentos para humanos e para animais, como no envolvimento e investimento de empresas privadas no setor, o que representa um grande incentivo e motivação para dar continuidade ao processo de legalização (Van Huis, 2020).

A segurança alimentar é um requisito essencial e obrigatório para qualquer empresa que trabalhe na área alimentar. Logicamente, em Portugal, o setor dos insetos também deverá reger-se pelos princípios estabelecidos na legislação da União Europeia.

Para colmatar a falta de legislação europeia na utilização de insetos como fonte nutricional para consumo, a Plataforma Internacional de Insetos para Alimentação Humana e Animal (IPIFF) desenvolveu um plano com três objetivos a atingir. O primeiro, já alcançado em Julho de 2017, foi a inclusão de insetos na alimentação em aquacultura; o segundo é a possibilidade de inclusão da proteína de insetos na ração de aves e suínos; e por último o uso de larvas para possibilitar o aproveitamento dos subprodutos da alimentação, nomeadamente os que contenham carne e peixe ou restos de embalagens inevitáveis (IPIFF, 2019).

As mais valias destes animais não se reduzem à indústria alimentar, para além de serem uma boa fonte de alimento, os insetos são também produtores de outros produtos utilizados no dia a dia dos humanos. Entre muitos produtos valiosos produzidos estão: o mel; seda; carmim; têxteis; fármacos; e também resilina, uma proteína elástica, que tem aplicação na medicina para regeneração de tecidos. Também, em medicina, são utilizados o mel, a geleia real, própolis entre outros com diversas aplicações (Van Huis *et al.*, 2013). Contudo, para este setor se tornar competitivo, tem que melhorar a eficiência, bem como reduzir o custo de produção, que quando comparados com as rações ou alimentos para animais (em que a composição proteica é constituída na sua maioria soja e farinha de peixe) é bastante superior (Van Huis, 2020).

Os substratos que servem de alimento para os insetos, são também um custo importante, sendo fundamental tornar esta etapa do processo mais rentável, através do melhoramento da conversão do alimento por parte das larvas, por exemplo recorrendo a bactérias, que auxiliam através de modificações estruturais e químicas nas fibras do substrato, que serão mais favoráveis para o crescimento da larva (Rehman *et al.*, 2019). Pode também ser rentabilizada esta etapa se forem encontradas alternativas para

escoamento do substrato depois de convertido pelas larvas, como por exemplo fertilizantes para adubar os terrenos agrícolas. Para se alcançar esta otimização de produção, não só as técnicas, métodos e substratos utilizados, mas também os organismos, incidindo no melhoramento genético que é uma área ainda muito pouco estudada e com grande potencial, apresentam-se como pontos fundamentais. No entanto o setor dos insetos apenas vai progredir, se a área científica e académica, as organizações governamentais e políticas, não esquecendo a sociedade, cooperarem numa frente unida (Van Huis, 2020).

Por último, um tema pouco abordado, mas importante de ser referido, é o bem-estar dos insetos na unidade de produção e no momento do abate. Ainda é escassa a informação científica em relação à perceção da dor por parte dos insetos, mas em caso de dúvida têm que ser tomadas medidas que aspirem ser semelhantes às tomadas noutros sistemas de produção animal, tais como ausência de fome e sede, de desconforto, de ferimentos e doença, medo e liberdade para expressar o seu comportamento natural. Os métodos de abate devem reduzir ao máximo a possibilidade de dor ou sofrimento, e atualmente já são utilizados congelamento, cozimento ou trituração (Van Huis *et al.*, 2013).

2.3 Importância ambiental e economia circular

A produção de insetos pode proporcionar diversas oportunidades, aproveitando os subprodutos das indústrias agroalimentares para originar soluções inovadoras altamente nutritivas e sustentáveis. Seguindo os princípios da economia circular, a produção de insetos pode revigorar áreas rurais de produção de alimentos, ao ligar cadeias de abastecimento agroalimentar, selecionando parceiros locais para adquirir os substratos para alimentar os insetos. Também o desperdício alimentar pode ser combatido, por exemplo, através da capacidade de reutilizar resíduos alimentares que contenham vestígios contaminantes de materiais ou embalagens, como por exemplo plástico ou metal, que não são possíveis introduzir na alimentação humana nem animal (IPIFF, 2020).

Estudos recentes demonstram a capacidade de alguns insetos em degradar estes materiais, com possíveis químicos presentes em alguns destes, sem apresentarem bioacumulação. Mais estudos são necessários neste campo para melhor calcular as consequências ambientais e melhor perceber o destino final desses contaminantes

nomeadamente, os microplásticos e os diferentes aditivos químicos presentes nos diferentes resíduos alimentares (Brandon *et al.*, 2019).

Também no caso de antigos géneros alimentícios de origem animal, por exemplo que contenham carne (exceto de ruminantes) e peixe, não aproveitados para consumo humano, é atualmente proibida a sua reintrodução na cadeia para alimentação animal, e as larvas poderiam ser uma solução viável para reaproveitamento dos mesmos, reduzindo assim o desperdício. No entanto, estudos para avaliar o risco de contaminantes microbiológicos, doenças associadas entre outros fatores importantes, a fim de não comprometer a segurança na cadeia alimentar, têm ainda de ser aprofundados, incidindo nas formas para eliminar, se presentes, os possíveis riscos (IPIFF, 2020).

A utilização dos subprodutos da indústria alimentar, como alimento para os insetos constitui um novo mercado que complementa a indústria alimentar sem competir com esta (IPIFF, 2019).

O impacto ambiental provocado pela produção de insetos é bastante reduzido comparativamente com as restantes espécies utilizadas na produção animal (Van Huis, 2020).

Segundo a previsão da IPIFF para 2030, com 3 milhões de toneladas de proteína de inseto produzidas na Europa, serão necessárias menos importações de fontes proteicas e estima-se uma poupança de área agrícola semelhante ao tamanho da Bélgica (IPIFF, 2019).

O aquecimento global é, em grande parte, provocado pela produção pecuária (72% a 78% do total das emissões agrícolas) e esta é considerada uma das atividades antrópicas mais prejudiciais, devido à baixa eficiência alimentar, fermentação entérica dos ruminantes e emissões derivadas do estrume. O estrume é ainda responsável pela contaminação de águas superficiais e subterrâneas (nutrientes, toxinas e organismos patogénicos) e envolve a emissão de grandes quantidades de amónia, responsável por acidificação dos ecossistemas (Van Huis *et al.*, 2013).

Outro aspeto negativo é o facto da produção de gado competir a nível dos recursos com a alimentação humana. Por exemplo, muitos dos alimentos utilizados para alimentação animal poderiam ser destinados ao consumo humano como é o caso da produção de cereais, onde cerca de um terço da produção mundial é destinada à alimentação animal.

É também de notar que a carne representa apenas 15% da energia total na dieta humana e, no entanto para a produção da mesma é utilizada cerca de 80% da área agrícola a nível mundial (em pastagens e plantações de alimento) (Van Huis & Oonincx, 2017).

Por exemplo, quando se compara a produção de 1g de proteína proveniente do frango, com a proveniente da farinha de larvas de *Tenebrio molitor*, a primeira requer duas a três vezes mais terra e uma vez e meia de água. Esta desproporção aumenta quando se compara a produção de proteína de origem bovina, que requer oito a catorze vezes mais terra e cinco vezes mais água. Relativamente às emissões de GEE, quando comparados com a produção de *Tenebrio molitor*, os frangos apresentam entre 0,3 e 1,7 vezes mais emissões e os bovinos entre 6 e 10 vezes mais (Van Huis & Oonincx, 2017).

É por estes motivos que tem aumentado a procura de novas fontes proteicas como plantas, carne produzida *in vitro*, insetos, micro e macroalgas (Loveday, 2019).

A energia para a produção de insetos é considerável e deve-se à necessidade de criar ambientes quentes e húmidos pois os insetos são animais poiquilotérmicos (Van Huis & Oonincx, 2017). O facto de dependerem da temperatura exterior para manter a temperatura corporal, significa que não utilizam energia dos alimentos para tal, logo apresentam um índice de conversão superior (Van Huis *et al.*, 2013).

Comparativamente com aves alimentadas com dietas otimizadas que convertem 33% da proteína dietética em massa corporal comestível, o *Tenebrio molitor* converte 22% a 45%, a BSF converte 43% a 55 % e a *Blaptica dubia* converte cerca de 51% a 88%.

A evolução da ciência vai no sentido de aumentar estes valores quer pelo melhoramento genético quer pela otimização das dietas (Van Huis & Oonincx, 2017).

O conceito *One Health* tem que ser aplicado na entomofagia, pois tem como base a colaboração de várias disciplinas que trabalham para atingir a otimização da saúde tanto para os humanos como para os animais e meio ambiente. Contudo, mais pesquisas nas várias áreas integrantes do conceito para garantir todos os critérios necessários, têm que ser desenvolvidas (Van Huis *et al.*, 2013).

As alterações climáticas juntamente com produção intensiva, onde se verifica uma alta densidade de animais, apresentam um elevado risco para o aparecimento e propagação de doenças zoonóticas. Já em 2013, a FAO alertou para o surgimento nos últimos anos de várias zoonoses com potencial pandémico, nomeadamente a síndrome respiratória aguda grave onde o agente etiológico foi um coronavírus (2002) e o vírus da

influenza tipo A (2009), e um exemplo bem presente como o que vivemos atualmente, da pandemia causada por um coronavírus síndrome respiratória aguda grave 2.

Como os insetos são taxonomicamente mais distantes dos humanos do que os restantes animais utilizados na pecuária, o risco associado a transmissão de zoonoses parece ser inferior, não descurando que são vetores de outras doenças o que requer mais pesquisa para garantir a segurança da sua utilização (Van Huis *et al.*, 2013).

2.4 Mosca soldado negro (*Hermetia illucens*)

A mosca *Hermetia illucens* pertence à família Stratiomyidae da ordem Diptera (Linnaeus, 1758), e o seu ciclo de vida é composto por 5 fases: ovo; larva; pré-pupa; pupa; e mosca. Apresentando uma metamorfose completa (Ushakova *et al.*, 2017).

Encontra-se distribuída um pouco por todo o mundo nas regiões tropicais e subtropicais, entre as latitudes de 40°S e 45°N (Dortmans *et al.*, 2017).

Não é considerada como praga e não morde nem pica, pois na fase adulta (de mosca) não apresenta peça bucal nem sistema digestivo funcional, apenas se alimenta na fase de larva (Hawkinson, 2005).

Esta espécie mostrou ser uma mais valia na redução da população de *Musca doméstica*, na conversão de estrume e resíduos orgânicos (produzidos por outras indústrias) em biomassa mais valiosa, bem como na redução de contaminantes com risco microbiológico e como alimento para animais (Bradley & Sheppard, 1984; Van Huis *et al.*, 2013).

2.4.1 Ciclo de vida

Um adulto saudável mede 22 mm e tem um tempo de vida útil de 7 dias, durante o qual tem que encontrar um par para copular e a fêmea depositar os seus ovos. Esta espécie acasala em voo e a fêmea deposita os cerca de 500 ovos num local seco, perto de matéria orgânica em decomposição. Os ovos demoram em média quatro dias para eclodir originando uma larva com cerca de 1.78 mm (Hawkinson, 2005; Dortmans *et al.*, 2017). Para aumentar as hipóteses de reprodução tem que se garantir um ambiente húmido (50% a 70% de humidade do ar) com abundante luz natural e temperaturas entre os 29°C e 31°C (Makkar *et al.*, 2014).

A larva pode ficar completamente desenvolvida em duas semanas e atingir os 2,5 cm de comprimento e 0,5 cm de largura, se forem fornecidas as condições ideais de comida em quantidades e qualidade. Contudo a BSF apresenta grande resiliência e em

condições desfavoráveis tem a capacidade de estender a fase larvar até 4 meses (Furman *et al.*, 1959; Dortmans *et al.*, 2017).

Na fase seguinte, a de pré-pupa, esta não se alimenta, esvazia o seu aparelho digestivo e inicia a fase migratória. Nesta fase, a pré-pupa apresenta o seu tamanho máximo e uma grande reserva de energia para sustentar a migração e iniciar a última etapa, antes de se tornar adulta. A fase de pupa, durante a qual ocorre a metamorfose (transformação em mosca), acontece num local seco, quente e escuro, apresenta uma durabilidade de duas a três semanas, em condições favoráveis, contudo pode estender-se até 5 meses se estas não se verificarem (Furman *et al.*, 1959; Newton *et al.*, 2005a).

2.4.2 Valor nutricional

A larva da BSF contém níveis elevados de proteína, entre 37% a 63% na matéria seca (MS) variando consoante a alimentação e diminuindo com o aumento da idade.

O teor de MS varia entre 20% a 44% e está dependente não só da dieta, mas também do estadio de desenvolvimento da larva, aumentando com a idade (Barragan-Fonseca *et al.*, 2017).

O teor em cinza é relativamente elevado e aumenta também com a idade, entre 9% a 28 % (MS). O teor de cálcio presente nas larvas BSF é elevado, cerca de 5% a 8% (MS) podendo ser associado à matriz do exosqueleto rica em carbonato de cálcio. Relativamente ao teor de fósforo este varia entre 0,6% a 1,5% (MS) (Makkar *et al.*, 2014; Barragan-Fonseca *et al.*, 2017).

O perfil de aminoácidos mostra que a proteína larvar é particularmente rica em lisina, 6% a 8% do conteúdo total de proteína, valores que são semelhantes aos recomendados para alimentação animal, por exemplo quando produzida em estrume de suíno, os níveis de lisina, leucina, fenilalanina e treonina são semelhantes aos valores do bagaço de soja (Newton *et al.*, 2005b). Alanina, metionina, histidina e triptofano são superiores aos presentes no bagaço de soja, contudo o teor de arginina é menor (Barragan-Fonseca *et al.*, 2017).

A teor de gordura é elevado, 7% a 39% (MS), e aumenta com a idade, contudo extremamente variável, dependendo do tipo de dieta das larvas, variando de valores de 15% a 25% (MS) (estrume de aves); 42% a 49% (MS) (resíduos de alimentos ricos em óleo). O teor em ácidos gordos está dependente do teor de ácidos gordo do alimento. Contém 58% a 72% de ácidos gordos saturados, 19% a 40% monosaturados e polinsaturados do teor de gordura total. Contém essencialmente níveis elevados de ácido

palmítico, ácido oleico (Barragan-Fonseca *et al.*, 2017) e ácido laurico (C12:0) conhecido pelos seus efeitos antimicrobianos nas bactérias Gram positivo e antivirais (Spranghers *et al.*, 2018; Gasco *et al.*, 2018).

2.4.3. BSF na alimentação de suínos

A carne de suínos é a segunda mais consumida a nível global e a suinicultura é um dos setores da pecuária que apresenta um crescimento mais acentuado em todo o mundo com tendência para continuar a aumentar (OECD/FAO, 2019).

As principais razões para este crescimento são um aumento na procura dos produtos, um ciclo de vida curto e ainda taxas de conversão mais eficientes quando comparados com outros setores concorrentes (FAO, 2012). Contudo os custos associados à alimentação representam 50% a 70% dos custos totais da produção animal (Spring, 2013), que se deve ao elevado custo da componente proteica, maioritariamente farinha de peixe e bagaço de soja, o que atrasa o lucro e a expansão do setor (FAO, 2012). É então necessário encontrar ingredientes proteicos alternativos que sejam competitivos em termos económicos com os ingredientes convencionais, sem comprometer o desempenho dos suínos, a qualidade do produto e sem efeitos adversos na saúde dos animais e dos consumidores finais (Spring, 2013).

A farinha de larva BSF que contém um elevado valor em aminoácidos, lípidos e cálcio, já demonstrou ser um bom substituto proteico quando incorporada nas rações para suínos (Newton *et al.*, 1977; Makkar *et al.*, 2014).

Estudos realizados demonstram que diferentes níveis de inclusão de farinha de larva BSF pode ser incorporada no alimento para leitões desmamados ou suínos em fase de engorda sem que se verifiquem efeitos negativos, ao nível da performance de crescimento, do perfil sanguíneo (Biasato *et al.*, 2019; Chia *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2020), da digestibilidade de nutrientes (Spranghers *et al.*, 2018; Biasato *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2020), das características físico-químicas e sensoriais da carne (Altmann *et al.*, 2019), da análise morfométrica do intestino (Spranghers *et al.*, 2018; Biasato *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2020) ou das características histológicas (Biasato *et al.*, 2019).

Relativamente à composição de aminoácidos, os estudos indicam que para obter uma dieta equilibrada esta deve ser suplementada, nomeadamente em metionina, cistina e treonina, de acordo com o rácio de aminoácidos ideal. Novos estudos devem ser realizados para tentar colmatar estes aspetos menos favoráveis, de maneira a tornar mais adequado o perfil de aminoácidos (Newton *et al.*, 1977; Neumann *et al.*, 2018). Por

exemplo Newton *et al.* (2005b) sugeriu o processamento adicional para remoção da cutícula de quitina num ensaio realizado com leitões.

Outro resultado importante foi o de Van Huis (2013) que concluiu que a quitina, o principal componente do exosqueleto da larva, não só apresenta efeito estimulante no sistema imunitário dos animais, como promove o crescimento de bactérias benéficas e inibe o crescimento e desenvolvimento de microrganismos patogênicos. Esta apresenta também um efeito hipolipêmico e hipocolesterêmicos (Liu *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2018; Gasco *et al.*, 2018).

Para além do seu interesse para a alimentação, a quitina tem numerosas aplicações na área da cosmética, farmacêutica, indústria têxtil entre outras (Caligiani *et al.*, 2018). Testes de palatabilidade, fator importante para garantir a ingestão adequada de alimento, demonstram que os suínos têm preferência pela dieta com larva BSF comparativamente à dieta com soja (Newton *et al.*, 2005b).

2.5 Métodos para avaliação do valor de uma dieta

Para responder ao aumento do interesse da utilização de insetos na alimentação animal, é necessário avaliar, através de estudos científicos o valor nutricional das diferentes rações formuladas, antes de serem introduzidas na indústria. É essencial perceber a digestibilidade dos diferentes insetos, quais as espécies animais que melhor se adaptam à introdução desta nova fonte nutricional e qual o nível de incorporação ideal, de maneira a não alterar ou diminuir as características do produto final nas diferentes áreas da produção pecuária (Schiavone *et al.*, 2017). Segue-se uma breve descrição dos diferentes métodos utilizados para analisar o valor de uma nova dieta / nutriente.

Em 1865, Henneberg e Stohmann, desenvolveram um método para análise do valor nutricional dos alimentos, frequentemente referido como método de Weende, no entanto apresenta algumas falhas, nomeadamente no valor da fibra. Para tentar colmatar essa falha tem sido proposto o método de Van Soest (1967). As análises químicas de rotina realizadas para determinar o valor nutricional de determinada dieta são: obtenção do valor da matéria seca ou humidade (que contém quase todos os nutrientes do alimento), proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), fibra em detergente neutro (NGF), fibra em detergente ácido (ADF), lenhina em detergente ácido (ADL), gordura bruta/extrato etéreo, cinza ou matéria mineral (Galyean, 1980). Adicionalmente pode realizar-se a determinação de minerais e oligoelementos, vitaminas e aminoácidos, ácidos gordos, amido, açúcares totais, fração insolúvel em HCl (Tran & Sauvant, 2004).

O desempenho de crescimento é um dos elementos mais importantes na indústria dos suínos, pois está diretamente relacionado com a receita de uma exploração (Lee *et al.*, 2019) e quando estudada uma nova dieta ou nutriente é importante garantir que este não altera ou afeta negativamente este parâmetro. Para obter o desempenho de crescimento dos animais os parâmetros mais utilizadas são o índice de conversão alimentar (IC) e o consumo alimentar residual (CAR), utilizados para calcular a eficiência alimentar. O IC é calculado através do cálculo da ingestão de alimento e do ganho de peso médio diário (GMD). O CAR é a diferença entre a ingestão de alimento real e a ingestão de alimento esperada (Yi *et al.*, 2018).

É também importante analisar a digestibilidade dos nutrientes, pois esta representa a fração do alimento que foi absorvida no intestino, sendo a determinação do consumo total de ração e da produção de excreções (fezes e urina) o método mais utilizado (Sales & Janssens, 2003).

Deve ser realizada uma análise dos parâmetros sanguíneos e séricos, pois estes são afetados por diversos fatores incluindo a dieta e no caso de deficiências nutricionais, o perfil sanguíneo pode dar informações sobre o estado clínico e do impacto desse *deficit* nutricional no estado fisiológico do animal (Chia *et al.*, 2019).

Os parâmetros físico-químicos e sensoriais da carne devem ser monitorizados para determinar se novas dietas, nutrientes ou neste caso fontes alternativas de proteína comprometem a qualidade do produto (Altmann *et al.*, 2019).

Num estudo de experimentação animal uma análise histopatológica é fundamental. Através da análise de diferentes tecidos, é possível detetar e descrever as alterações observadas recorrendo a protocolos e nomenclatura adequada com o objetivo de chegar a um diagnóstico provável ou definitivo, de modo a aumentar a credibilidade e reprodutibilidade do estudo (Ward *et al.*, 2017).

2.6 Experimentação animal em ensaios de nutrição

Há já mais de meio século que a utilização de animais em estudos e pesquisas científicas tem acompanhado o desenvolvimento científico na área biomédica e comportamental. Esta atividade mostrou ser fundamental no desenvolvimento e conhecimento da anatomia, fisiologia, patologia, farmacologia e de outras áreas com benefícios, tanto para a medicina animal como humana, nomeadamente no melhoramento e desenvolvimento de novas vacinas, técnicas cirúrgicas, entre outros. Contudo, é

necessário ter conhecimento das limitações e precaução quando extrapolados os conhecimentos obtidos em modelos animais para o homem (Andersern & Winter, 2017).

No momento da aprovação dum estudo em que são utilizados modelos *in vivo*, levantam-se questões éticas na utilização de animais que têm, cada vez mais e maior pertinência e estão lado a lado com o interesse científico (Andersern & Winter, 2017).

Atualmente, para poderem utilizar-se os animais para fins científicos é necessário cumprir os requisitos da diretiva europeia (Diretiva 2010/63/EU) que tem como objetivo assegurar a proteção e o bem-estar dos animais utilizados. O parlamento europeu e o conselho da união europeia defendem a substituição da utilização de animais vivos, por métodos alternativos (Substituição); a redução do número de animais ou uma maior informação obtida a partir do mesmo número de animais sem comprometer os objetivos do projeto (Redução); e a utilização de métodos que minimizem a dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro em todas as etapas, nomeadamente criação animal, alojamento, cuidados a prestar e métodos utilizados nos procedimentos (Refinamento) (Europeia, 2019).

Já em 1959, no Reino Unido, Russell e Burch definiram e descreveram pela primeira vez os princípios dos três Rs. A partir desse relatório tornou-se possível aplicar este princípio (Replacing; Reducing; Refining, em inglês) em todos os estudos científicos que recorram à utilização de animais vivos e desde então, tem vindo a ser atualizado (European Medicines Agency, 2016).

No início de 2020, Tom L. Beauchamp e David DeGrazia elaboraram um documento com os seis princípios gerais de ética para aprovação científica de um estudo de experimentação animal, sendo eles os seguintes: 1º. O princípio de nenhum método alternativo; 2º. O princípio do benefício líquido esperado; 3º. O princípio do valor suficiente para justificar o dano; 4º. O princípio de nenhum dano necessário; 5º. O princípio das necessidades básicas; 6º. O princípio dos limites superiores para o dano. Os três primeiros estão centrados nos benefícios sociais e a sua relação com o custo/dano implicado e os restantes três centram-se no bem-estar animal.

Outro requisito essencial quando se desenvolve um estudo científico de experimentação animal é a transparência e idoneidade do mesmo, para que quando este for realizado nas mesmas circunstâncias, permita a reprodutibilidade e a confirmação dos resultados (Knoblaugh *et al.*, 2019).

O Centro Nacional de Substituição, Refinamento e Redução do uso de Animais em Pesquisa, desenvolveu as diretrizes de Pesquisa Animal: Relatórios de

Experimentação *In Vivo* (ARRIVE), com a finalidade de melhorar os relatórios de publicações, para que estes sejam reproduzíveis e transparentes perante a comunidade científica (Sert *et al.*, 2020).

2.7 Modelos animais em estudos nutricionais

Os modelos animais são amplamente utilizados em ensaios de nutrição e muito do que se conhece sobre nutrição e desenvolvimento de trato gastrointestinal foi baseado em estudos utilizando ratos, coelhos, porcos, ovelhas, murganhos, cães, vacas, galinhas e gatos (Guilloteau *et al.*, 2010)

Tradicionalmente o rato tem sido o modelo animal mais utilizado, no entanto este apresenta algumas limitações (Salter, 2015).

O modelo suíno é o melhor quando comparado com outros modelos animais não primatas, devido à fisiologia da digestão e processos metabólicos associados, serem análogos entre humanos e esta espécie, embora as diferenças anatómicas existam. Excluindo os primatas, tem-se que os suínos são os mais semelhantes aos humanos de entre os restantes modelos animais (Patterson *et al.*, 2008).

2.7.1 O suíno como modelo animal

Neste estudo foi utilizado o suíno pois em termos de indústria a produção de suínos é um dos setores pecuários que apresenta um maior crescimento a nível mundial. Esse crescimento e lucratividade do setor tem sido travado pelos elevados custos da componente proteica convencional mais utilizada em alimentação animal, sendo essencial encontrar alternativas mais económicas e com um menor impacto ambiental. Torna-se essencial o desenvolvimento de estudos nessa área de modo a conseguir uma substituição com uma base científica sólida e o mais melhorada possível, quer a nível de produção como a nível de impacto ambiental e rentabilidade económica (Chia *et al.*, 2019).

Por outro lado, também utilizado em estudos nutricionais entre outros, perspetivando que tais ensaios possam servir de base na medicina humana. Como animal monogástrico e omnívoro torna-o o modelo ideal para estudos de imunologia intestinal nomeadamente no estudo de aditivos alimentares prebióticos e probióticos e o seu efeito na microbiota intestinal. A semelhança anatómica e funcional com o homem, em termos de sistema imunológico é superior a 80%, enquanto que o rato/murganho apenas apresenta 10% de semelhança (Pabst, 2020).

Tanto o ser humano como os suínos são dependentes da qualidade da dieta, nomeadamente, aminoácidos e carboidratos digestíveis, principalmente devido ao facto dos microrganismos simbióticos do intestino desempenharem um papel relativamente pequeno na modificação dos nutrientes ingeridos na dieta, comparativamente com os ruminantes e equinos, mesmo sendo o comprimento do intestino e o processo fermentativo diferentes entre os dois (Guilloteau *et al.*, 2010).

Apresentam também requisitos nutricionais surpreendentemente semelhantes. Microscopicamente, tanto a estrutura das vilosidades intestinais como os tipos celulares epiteliais são muito parecidos o que torna o porco um modelo ideal para estudos nutricionais humanos (Patterson *et al.*, 2008).

O facto de os suínos apresentarem uma elevada fertilidade, durante todo o ano com numerosas ninhadas, e de existirem menos problemas éticos e emocionais associados, quando comparados com o cães e primatas, fazem com que este se apresente preferencialmente nestes estudos (Pabst, 2020).

A engenharia genética, área em crescimento que pretende resolver a escassez de órgãos para transplantes no homem, coloca o porco no pódio dos potenciais dadores de órgãos para xenotransplantes (Pabst, 2020).

Contudo esta espécie apresenta algumas desvantagens comparativamente com outras, entre elas: manuseio complexo e com maior necessidade de recursos; conflitos entre animais; necessidade de áreas superiores; manutenção mais dispendiosa. Uma das maiores desvantagens dos suínos quando utilizados em ensaios, são os níveis constantes de stress a que estes estão sujeitos (manuseamento, operações de limpeza, mudança de caixas) que influenciam os resultados e originam conclusões muitas vezes erradas. Ao percecionar os agentes causadores de stress como uma ameaça à sua homeostase, os organismos desencadeiam um conjunto de respostas biológicas quer a nível do sistema nervoso autónomo (SNA), comportamental, neuroendócrino e imunológico (Moberg, 2000; Pabst, 2020).

São cada vez mais os estudos que sustentam que o estado de stress prolongado influencia a integridade da barreira intestinal, aumentando a permeabilidade e provocando alterações na microbiota devido à perda de equilíbrio no eixo de comunicação bidirecional entre o cérebro e o intestino (Mayer, 2011).

Disfunções da microbiota intestinal (disbiose) provocam a quebra das ligações *tight-junctions* da barreira intestinal, que resulta num aumento da permeabilidade intestinal tornando o organismo suscetível a toxinas, alergénios alimentares e

microrganismos que assim conseguem passar para a corrente sanguínea, interagindo com células imunitárias e ativando uma resposta imunológica com a consequente produção de citocinas pro-inflamatórias proporcionando um estado inflamatório prejudicial ao animal e o desenvolvimento de diversas patologias como alergias, doenças inflamatórias intestinais, hepáticas e renais (Welcome, 2018; Plaza-Díaz *et al.*, 2020).

Embora escassas, existem evidências sugestivas de que doenças intestinais estão associadas a disfunções pulmonares (Welcome, 2018), provavelmente devido à migração preferencial dos linfócitos da parede intestinal (Pabst, 2020) bem como da migração dos linfócitos dos linfonodos mesentéricos, para o pulmão (Bimczok & Rothkötter, 2006).

Uma das estratégias para tentar reduzir os níveis de stress é através do enriquecimento ambiental, por exemplo a introdução de materiais que estimulem os comportamentos naturais. Em 2016 foi publicada a Recomendação da Comissão Europeia 2016/3336, onde classifica os materiais de enriquecimento consoante determinadas características como: ótimos; bons; medíocres. Os materiais devem ser comestíveis, mastigáveis, investigáveis e manipuláveis; suscitar um interesse sustentável, ou seja, incentivar um comportamento exploratório dos suínos e serem regularmente substituídos e renovados; poderem ser manipulados oralmente; serem suficientes; serem limpos e higiénicos (Recomendação (EU) 2016/336 da comissão).

São exemplos desses materiais: palha, madeira, cordas, papel, correntes, bolas, brinquedos de plástico entre outros. Para obter o maior interesse e aproveitamento por parte do animal pode ser interessante a combinação entre diferentes tipos de materiais. Foi também sugerida a utilização de música e diferentes formas de fornecer o alimento de maneira a estimular o animal, por exemplo escondida num substrato ou como recompensa no contexto de enriquecimento cognitivo (Godyn *et al.*, 2019).

Torna-se ainda essencial, para diminuir também os níveis de stress, assegurar o bem-estar dos animais. Sugerido pelo Professor John Webster e divulgados pelo Farm Animal Welfare Council (FAWC) foram definidos cinco parâmetros a respeitar, as cinco liberdades e são elas: ausência de fome e sede; ausência de desconforto; ausência de dor, ferimentos ou doença; liberdade para expressar os seus comportamentos normais; ausência de medo e angústia (FAWC, 2009).

2.8 Estudos histopatológicos: métodos para aferir as lesões.

No decorrer de uma investigação de experimentação animal é frequente submeter tecidos para análise histopatológica, pois esta desempenha um papel essencial em estudos

que utilizam animais como modelos, pois fornece dados morfológicos, moleculares e bioquímicos dos animais em estudo. A histopatologia, estuda as características microscópicas de tecidos e células, sendo uma ferramenta fundamental na detecção de células apresentadoras de alterações, diferenciando as de origem induzida pela experimentação das alterações de origem patológica (Slaoui & Fiette, 2011).

Todos os detalhes são importantes para uma correta análise histopatológica. As condições térmicas em que ocorrem as diferentes etapas não devem ser descuradas uma vez que este fator influencia o resultado e pode comprometer o sucesso das mesmas. Assim como, a descrição em detalhe de quais os tecidos analisados, quais os protocolos dos testes e quais as análises realizadas (Scudamore *et al.*, 2015).

Os patologistas, têm que estar familiarizados com os modelos animais utilizados e conhecer as particularidades que possam ser relevantes para a interpretação dos resultados, de modo a realizar uma avaliação rigorosa, descrever e comunicar as alterações observadas que apresentem a relativa importância dos achados de acordo com os objetivos do estudo (Gibson-Corley *et al.*, 2013).

O rigor, precisão e consistência são os três pilares fundamentais para a elaboração de um relatório com qualidade e credibilidade científica (Shackelford *et al.*, 2002).

Para ir ao encontro do objetivo de um estudo, que este apresente reprodutibilidade dos resultados e que estes apresentem valor científico, torna-se essencial que as lesões sejam avaliadas através de métodos corretos e adaptados ao tipo de estudo e amostras e que sejam cada vez menos sujeitos a variabilidade inter-observador. A gravidade relativa das lesões não neoplásicas pode ser, por exemplo, registada de forma semi-quantitativa ou quantitativamente (Shackelford *et al.*, 2002).

Consoante a natureza dos achados variam os sistemas de pontuações das lesões. Nos casos de lesões proliferativas e não proliferativas (não neoplásicas), as pontuações semi-quantitativas têm vindo a ser sugeridas, como forma de avaliação da gravidade das lesões observadas. Em alguns casos, essas pontuações, estão disponíveis na literatura, por exemplo nos casos de colite, encefalite autoimune experimental, nefrite lúpica e artrite por colagénio, e no caso da experimentação animal algumas destas pontuações, quando possível, tendem a ser adaptadas, de forma a se assemelharem ao máximo às orientações utilizadas para a medicina humana, de modo a permitir uma comparação entre outros estudos animais e humanos. Na falta de um esquema publicado devem ser fornecidas descrições textuais e/ou ilustrações dos critérios usados para cada pontuação no sistema (Scudamore *et al.*, 2015).

A análise semi-quantitativa envolve a aplicação de graus ou intervalos de gravidade definidos para lesões específicas. Esses graus são determinados pela extensão ou estimativa da percentagem de envolvimento do tecido, bem como pela dimensão dos vários componentes presentes. O número de níveis utilizados pelos patologistas é variável e afeta a sensibilidade e reprodutibilidade da análise. Poucos níveis de categorização resultam numa perda de sensibilidade enquanto um número elevado de níveis torna difícil para o patologista discernir entre os diferentes graus (Shackelford *et al.*, 2002).

A análise quantitativa (contagens e medições) pode ser realizada manualmente ou de forma semi ou totalmente automática, utilizando programas de análise de imagem e técnicas estereológicas para fornecer valores numéricos (Shackelford *et al.*, 2002). A utilização de programas e de processamento de imagem pode facilmente separar classes de tecidos e quantificar várias características morfológicas em tecidos, gerando variáveis contínuas que podem ser usadas para comparações estatísticas (Di Ieva *et al.*, 2012).

Em ensaios anteriores, com o objetivo de comparar as diferentes dietas e para avaliar os efeitos da incorporação de BSF na alimentação de leitões, foram estudadas as características morfológicas (análise quantitativa – estudo morfométrico dos segmentos intestinais) e características histológicas (análise semi-quantitativa).

Para o estudo morfométrico foram medidas a altura das vilosidade e profundidade das criptas intestinais bem como o rácio entre as duas. Biasato *et al.* (2019) e Spranghers *et al.* (2018) não observaram diferenças significativas entre os diferentes grupos em estudo. Por sua vez, Yu *et al.* (2020) verificou valores superiores na altura das vilosidades apenas no jejuno na dieta com incorporação de 2% comparativamente com a dieta de 0% e 1% de incorporação de farinha de larva BSF. Para os restantes segmentos não observaram alterações.

Biasato *et al.* (2019) avaliaram histologicamente os segmentos intestinais e os órgãos (estômago, fígado, baço, pulmão e rim) de leitões, onde atribuíram pontuações aos achados histológicos utilizando um sistema semi-quantitativo. No baço e pulmões não foram observadas alterações. No estômago e intestino identificaram infiltrados inflamatórios linfoplasmocitários e eosinofílicos ao nível da mucosa e submucosa com ou sem ativação do GALT. No fígado observaram degenerescência vacuolar dos hepatócitos e infiltrados inflamatórios linfoplasmocitários com ou sem fibrose. Nos rins foram também observados infiltrados inflamatórios linfoplasmocitários intersticiais e esteatose tubular. No entanto o desenvolvimento e gravidade das lesões não foram associadas aos diferentes níveis de incorporação de farinha de larva BSF, mas sim aos

níveis de stress e práticas de alimentação no caso do estômago e segmentos intestinais. No caso do fígado e rim, uma vez que foram observados em todos os grupos não foram consideradas clinicamente significativas.

3. Material e Métodos

3.1 Produção de BSF

Esta dissertação tem por base um estudo realizado em parceria com a EntoGreen, uma empresa que procura soluções para desenvolver a sustentabilidade da agropecuária, aproveitando e reduzindo desperdícios nutricionais numa economia circular e apostando no desenvolvimento de tecnologias inovadoras com base biológica, estando sediada em Santarém e com uma pequena unidade de investigação e desenvolvimento na EZN – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) à data do estudo. Todas as etapas do ciclo de vida da BSF, desde a postura dos ovos até à fase adulta (mosca), decorreram nas instalações da EntoGreen.

3.1.1 Reprodução e recolha de ovos

A espécie *Hermetia illucens* tem um ciclo de vida que demora entre 1 e 2 meses.

As moscas adultas, fêmeas e machos, eclodem das pupas, numa divisão que tem ligação direta a uma outra. Para que o comportamento reprodutivo natural ocorra normalmente, as condições de humidade, intensidade luminosa e temperatura devem ser rigorosamente controladas e ideais.

Após a cópula a fêmea coloca os ovos (figura 1) em dispositivos próprios, desenvolvidos pela EntoGreen. Estes dispositivos respeitam o comportamento natural da espécie e potenciam a postura dos ovos. Os dispositivos são retirados periodicamente respeitando os intervalos de tempo de modo a evitar a eclosão das larvas.



Figura 1: Postura de ovos da BSF (original do autor).



Figura 2: Ovos de BSF no vidro de relógio (original do autor).

3.1.2 Eclosão das larvas e bioconversão

Depois de retirados, os ovos são colocados num vidro de relógio laboratorial (figura 2) e pesados numa balança de precisão (BEM 200-3 KERN). São depois inoculados, em caixas empilháveis de dimensões reduzidas, num substrato, com

humidade e composição de proporções específicas que foram previamente definidas, de forma a garantir o desenvolvimento ideal das larvas.

As larvas vão eclodir e desenvolver-se num espaço de tempo de 5 dias. A fase seguinte é a da engorda que termina quando houver completa conversão do substrato.

Nesta fase as larvas juvenis são divididas e transferidas para caixas de maiores dimensões, com um substrato com diferente humidade relativa, comparativamente ao da fase anterior.

O objetivo final é obter um número *standard* de larvas que apresentem um tamanho homogéneo entre si. Esta etapa demora aproximadamente 15 dias em condições ótimas.

3.1.3 Separação das larvas do substrato

Após a conversão completa do substrato, as larvas são peneiradas, com recurso a uma peneira vertical vibratória, garantindo a separação das larvas do substrato. A utilização da peneira requer um substrato final com baixa humidade relativa a fim de facilitar e otimizar o processo.

O substrato é armazenado para posterior utilização como fertilizante de solos, mas apenas após cumprir processos de biossegurança para assegurar a eliminação de possíveis larvas.

As larvas seguem dois caminhos distintos, ou são mortas por congelação, de maneira rápida e eficaz, para posterior incorporação nas rações, ou transferidas para um novo ambiente, mais seco e com luminosidade reduzida, com o objetivo de evoluírem para pupas, estado que tem a duração de duas semanas, e que antecede a fase de mosca, o estado adulto, capaz de se reproduzir assegurando assim a repetição do ciclo e manutenção da colónia.

3.2 Ensaio *in vivo*

3.2.1 Alojamento e disposição dos animais e condicionamento ambiental

O ensaio foi aprovado pela ORBEA do INIAV.

O trabalho foi realizado em instalações cedidas pelo INIAV de Santarém (figura 3), onde foram utilizadas seis caixas metabólicas, uma para cada animal (com medidas ajustáveis consoante o tamanho do suíno) e oito parques individuais (1.80m por 1.32m) (figura 4), sendo que, dois dos parques tinham animais suplentes, caso fosse necessária a substituição de algum dos animais em estudo.

Cada uma das caixas metabólicas (figura 5) estava equipada com um comedouro, um tabuleiro para recolha das fezes (revestido por um saco de plástico) e um tabuleiro de latão, coberto por uma rede para evitar contaminação com ração e/ou fezes e um funil com filtro, anexo a um recipiente de recolha para a colheita de urina do animal.

Os animais encontravam-se numa sala com janelas basculantes utilizadas para controlo da temperatura e humidade.

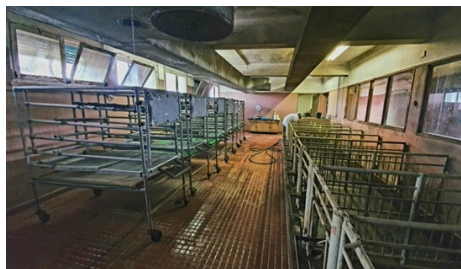


Figura 3: Alojamento dos animais durante o ensaio (original do autor).



Figura 4: Suínos nos parques (original do autor).



Figura 5: Caixa metabólica (original do autor).

O ensaio começou com a chegada de seis suínos, que foram submetidos a uma semana de adaptação nos parques. Uma semana depois foram transferidos para as caixas metabólicas e o segundo grupo de seis animais entrou para os parques para o período de habituação. O ensaio teve uma duração de 35 dias.

Durante o período de adaptação foi logo introduzida a ração de estudo correspondente a cada suíno. No grupo um, dos seis animais, dois animais ficaram com a ração controlo (BSF0), dois com 50% de substituição de bagaço e óleo de soja por farinha de larva BSF (BSF50) e dois com 100% de substituição (BSF100), no grupo dois, também com dois animais com a ração controlo (BSF0), dois com 50% de substituição (BSF50) e dois com 100% de substituição (BSF100). O peso vivo médio inicial dos 12 suínos em estudo era de 62 ± 3.6 kg.

Os animais ficaram 7 dias nas caixas metabólicas e outros 7 dias nos parques (período de descanso), alternado semanalmente durante todo o período de acabamento.

Na sala encontrava-se o material necessário para o trabalho diário, tais como, pás, vassouras individuais (para a recolha de fezes), jarro graduado (para administração de água), medidas de ração, balança e proveta graduada de plástico (para medição do volume de urina). A ração e outros materiais utilizados encontravam-se numa outra sala adjacente.

3.2.2 Caracterização e fabrico da ração

A elaboração e formulação das rações foi desenvolvida pelo INIAV de Santarém de modo a estas serem isoenergéticas e isoproteicas (15% PB). Foram produzidos três tipos diferentes de rações, a dieta controlo (BSF0) que não continha farinha de larva BSF, a dieta de 50% de substituição de bagaço e óleo de soja por farinha de larva BSF e a dieta de 100% de farinha de larva BSF.

Na tabela 1 está a composição das diferentes dietas utilizadas no estudo.

Tabela 1 – Composição das dietas em estudo.

Matéria prima	Quantidade (%)		
	BSF0	BSF50	BSF100
Milho	10,000	10,000	10,047
Trigo	26,576	30,000	10,558
Cevada	39,934	38,686	59,124
Bagaço de Soja 44%	17,560	8,518	0,000
Carbonato de Cálcio	0,565	0,192	0,076
Fosfato bicálcico 17,5/2	1,643	1,303	0,944
L-Lisina HCL	0,248	0,304	0,333
Metionina	0,152	0,160	0,176
Bicarbonato de sódio	0,085	0,085	0,085
Sal marinho	0,375	0,375	0,375
Graintec TS	0,000	0,100	0,000
LUMANCE Dry (Novyrate C / Adimix PRECISION / Novyrate / Adimix 30 coated)	0,075	0,075	0,075
Vitatec Porcos crescimento/acabamento	0,400	0,400	0,400
Escent S (Unike Plus Dry)	0,075	0,075	0,075
Betaína HCL	0,150	0,150	0,150
L-Triptofano	0,003	0,009	0,016
Treonina	0,000	0,002	0,008
Larvas Mosca (<i>Hermetia illucens</i>)	0,000	8,780	17,560
Óleo de soja	2,160	0,786	0,000
Total	1000,0	1000,0	1000,0

BSF0 – dieta controlo com 0% de farinha de larva BSF, BSF50 - dieta com 50% de substituição de bagaço e óleo de soja por farinha de larva BSF, BSF100 dieta com 100% de substituição de bagaço e óleo de soja por farinha de larva BSF.

3.2.3 Secagem das larvas

As larvas foram descongeladas e colocadas em tabuleiros de plástico com uma rede e folhas de papel na base, devidamente identificados, foram distribuídas de modo a

ficar com uma altura aproximada de 3 cm para secarem de forma homogénea. Posteriormente foram colocadas na estufa com ventilação a uma temperatura de 60°C, onde permaneceram até se obterem valores de peso constante em pesagens consecutivas.

Por fim foram embaladas em vácuo até serem transportadas para a fábrica de rações.

3.2.4 Registos diários e semanais

A quantidade de alimento e água para cada animal era calculado a cada semana de acordo com o seu peso, de modo a terem alimento *ad libitum*.

Procedeu-se diariamente ao registo do volume de fezes, urina e alimento ingerido e desperdiçado por cada animal nas caixas metabólicas, sendo posteriormente analisado.

3.3 Abate e recolha de amostras

Concluída a terceira réplica de cada grupo, os animais foram abatidos com um peso vivo final de 100 ± 6.6 Kg, no matadouro certificado da EZN de Santarém. Os animais foram insensibilizados com uma descarga elétrica, na cabeça e tórax, com recurso a uma pinça de atordoamento elétrico. De seguida foram sangrados e após a morte foram lavados para garantir a higienização necessária para se proceder à evisceração e recolha de órgão para posterior análise. Só depois de eviscerados é que se realizou a chamuscagem.

Foram pesados individualmente o coração, os pulmões, o baço e fígado e recolhidas amostras de todos os animais dos seguintes órgãos e estruturas: duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon, fígado, estômago, rins, pâncreas, testículos, baço, linfonodos mesentéricos, pulmão, coração, gordura retroperitoneal, gordura mesentérica e gordura coronária.

A colheita das amostras de tecido foi realizada pelo Dr. Pedro Faísca, Dr. José Catarino e Dra. Antonieta Muñoz de forma sistemática e uniforme em todos os animais. Após recolha, as amostras foram colocadas em formol a 10% em recipientes plástico com tampa de enroscar e devidamente identificadas (número do animal, órgão, data de colheita) para serem transportadas até ao laboratório da FMV-ULHT.

3.4 Recolha e fixação das amostras histológicas

No laboratório da FMV-ULHT, as amostras foram retiradas dos recipientes com formol, com recurso a uma pinça de disseção bico de pato, para serem colocadas em

cassetes de histologia devidamente identificadas a lápis com o número correspondente ao animal (1 a 12) e a letra correspondente ao tecido (A a Q). Com um bisturi foram realizados cortes dos tecidos para que estes ficassem com dimensões e espessura correspondente ao tamanho e altura da cassete, para melhor infiltração do formol em todo o tecido.

As cassetes foram colocadas em recipientes que continham formol a 10%, uns eram de plástico outros eram de vidro, e estavam devidamente identificados. As amostras ficaram em formol, antes do seu processamento, por um período mínimo de 24 horas.

3.5 Desidratação das amostras

Este passo foi realizado num processador de tecidos (Microm STP 120) onde as amostras foram sujeitas ao processamento dos álcoois, para extração gradual da água presente nos tecidos. A desidratação dos tecidos é conseguida pela passagem das amostras por concentrações crescentes de álcool (70%, 96%, 100%), seguida pela passagem por um solvente orgânico (Clear Rite® - substituto do xilol), miscível com o álcool e meio de inclusão (parafina) e por último por parafina (60-65°C).

As cassetes com as amostras foram colocadas no cesto metálico do processador, no número máximo de 120 cassetes por cesto.

Através do sistema de programação do processador, foi possível colocar automaticamente o tempo de imersão pretendido em cada reagente, bem como a hora de início do processo. Os tempos de imersão em cada fase foram ajustados, tendo em conta as amostras colocadas, como descrito no protocolo de processamento histológico (Apêndice I).

Depois de concluído o programa, as cassetes foram retiradas do cesto do processador e ficaram prontas para a próxima etapa, a inclusão em parafina.

3.6 Inclusão das amostras em parafina e corte no micrótomo rotativo

As cassetes retiradas do processador foram colocadas num compartimento da estação de inclusão de parafina (Microm EC 350 (1 e 2)).

Preparou-se o doseador de parafina colocando no reservatório a parafina com o ponto de fusão de 63°C, para depois se proceder à colocação das amostras nos moldes individuais.

Para uma boa execução do corte dos blocos preencheu-se o fundo do molde com parafina para que a amostra ficasse no centro do bloco e com a superfície de corte na

horizontal. De seguida colocou-se a cassette sobre o molde e acrescentou-se a parafina líquida até preencher o molde na totalidade.

Posteriormente os moldes com as cassetes foram colocados na placa fria (-10°C) para que ocorresse a solidificação rápida e imediata da parafina.

Quando a parafina solidificou, retiraram-se os blocos dos moldes e estes ficaram na placa fria até seguirem para a próxima etapa.

Fixou-se a cassette com o bloco, no micrótomoto rotativo, e retirou-se o excesso de parafina sem comprometer a amostra.

Os blocos desbastados foram arrefecidos na placa fria e depois cortados. Alinhou-se o ângulo de corte e procedeu-se ao corte dos blocos até chegar à zona onde se encontra a amostra de tecido. A espessura do corte na área do bloco onde se encontra amostra do tecido foi três 3 µm.

Utilizou-se uma pinça para orientar a saída dos cortes (ténia), os quais foram colocados num recipiente com água fria para posterior seleção. Escolhidos os melhores cortes, foram alinhados na lâmina onde serão montados.

Depois foram transferidos para água quente no banho-maria (40-50°C) para que ocorresse a sua extensão.

Retirou-se a lâmina com os cortes selecionados do banho-maria e o excesso de água.

Por último, a lâmina foi identificada com o nome da amostra, identificando o animal e o tecido correspondente, e colocadas num suporte de lâminas de plástico, com capacidade para 20 lâminas, prontas para serem colocadas na estufa.

3.7 Coloração das amostras: Hematoxilina-Eosina

Esta etapa foi realizada numa capela de exaustão devido à utilização de substâncias tóxicas.

Após incubação das lâminas em estufa a 60°C durante uma hora, realizou-se a coloração das amostras, como descrito no protocolo de coloração de rotina HE (Apêndice II).

Concluído o processo de coloração, realizou-se a montagem das lâminas utilizando o meio de montagem Bio-mount HM Bio-óptica. Com uma pipeta de Pasteur colocou-se uma gota do meio de montagem no centro da amostra sobre a qual se colocou uma lamela. Com a ajuda de uma pinça, exerceu-se uma ligeira pressão sobre a lamela

para remoção das bolhas de ar que restaram. Por último, deixaram-se ficar a secar as lâminas, durante 48h.

3.8 Análise histológica

Após o processamento de todas as amostras, as lâminas foram observadas, por dois observadores, ao microscópio ótico. As alterações observadas foram anotadas num documento Excel, para posterior tratamento dos dados.

As alterações histopatológicas observadas foram avaliadas por meio de um sistema de pontuação semi-quantitativo de acordo com Biasato *et al.* (2019). Foram atribuídas as seguintes pontuações, dependendo das alterações correspondentes aos graus de inflamação observados, em que 0 corresponde a inflamação leve, 1 a inflamação moderada e 3 a inflamação grave. Apenas uma única pontuação foi atribuída aos seguintes tecidos (pâncreas, fígado, baço, linfonodo, rim, pulmão, coração e testículo). Os restantes tecidos (estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon) foram avaliados separadamente para a mucosa e submucosa.

Para o estudo morfométrico das gorduras foram digitalizadas as lâminas das diferentes gorduras (retroperitoneal, mesentérica e pericárdica) pertencentes a cada animal. Após a digitalização no NanoZoomer-SQ Digital Slide Scanner (Hamamatsu NanoZoomer-Hamamatsu Photonics), foi utilizado o *software* NDP.view2 para visualização das imagens em formato TIFF com uma ampliação 2,5x e foram exportadas a 20x e com uma resolução 10944x6144 píxeis.

De seguida foi utilizado um segundo *software*, Image J, para quantificar a área de perfil dos adipócitos. Para fazer a medição dos adipócitos foram realizados os comandos demonstrados na seguinte tabela 2.

Tabela 2 – Macro para medição da área de perfil dos adipócitos

```
open("File directory");
selectWindow("file name.tif");
run("Set Scale...", "distance=225 known=100 pixel=1 unit=µm global");
run("8-bit");
setAutoThreshold("Default dark");
//run("Threshold...");
```

```
setAutoThreshold("Default");
//setThreshold(0, 215);
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Close-");
run("Dilate");
//run("Threshold...");
setAutoThreshold("Default dark");
//setThreshold(0, 128);
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=330-150000 circularity=0.02-1.00 display exclude
clear summarize add in_situ");
```

4. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do *software* SPSS (versão 26) e do *software* R (versão 3.6.1).

A comparação de grupos relativamente às variáveis quantitativas foi efetuada com recurso à análise de variância (ANOVA) e relativamente às variáveis qualitativas foi efetuada com recurso ao teste exato de Fisher.

Em todas as análises foi considerado o nível de significância $\alpha=0.05$ e valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Para avaliar a concordância inter-observador foi calculado o coeficiente de Kappa de Cohen. Para o coração não foi possível obter o valor de Kappa de Cohen pois apenas apresentava um valor discordante entre os dois observadores.

Nas medições dos adipócitos devido à distribuição assimétrica das variáveis em estudo, foi considerado o logaritmo de cada uma das variáveis de forma a normalizar a distribuição das mesmas.

A análise dos pesos dos órgãos e da carcaça foi realizada através do teste de Shapiro-Wilk, onde foi possível assumir a normalidade para todas as variáveis, exceto para o coração, que após transformação logarítmica, se pôde assumir a normalidade do seu peso, sendo possível assim utilizar esta transformação para a análise dos resultados.

5. Resultados

Os animais foram separados em três grupos (BSF0, BSF50 e BSF100) de acordo com os seus regimes alimentares. Para avaliar a presença de alterações nos diferentes grupos foram avaliados os seguintes parâmetros: peso dos órgãos (fígado, baço, coração e pulmão); alterações histopatológicas nos diferentes tecidos; classificação da inflamação por grupo; estudo morfométrico dos adipócitos nas gorduras retroperitoneal, mesentérica e pericárdica.

5.1 Peso dos órgãos

Através da análise (ANOVA) das pesagens dos órgãos (fígado, baço, coração e pulmão) e da carcaça não foram identificadas diferenças significativas entre grupos como apresentado na tabela 3.

Tabela 3: Médias dos pesos (kg) dos órgãos, para amostra total e por grupo

Órgão	Total	BSF0	BSF50	BSF100	p*
	média (dp)	média (dp)	média (dp)	média (dp)	
Fígado	1,32 (0,17)	1,24 (0,13)	1,43 (0,23)	1,31 (0,08)	0,274
Baço	0,17 (0,03)	0,15 (0,03)	0,18 (0,04)	0,18 (0,03)	0,395
Coração**	-0,87 (0,21)	-0,99 (0,13)	-0,76 (0,32)	-0,86 (0,05)	0,307
	[0,42]	[0,37]	[0,47]	[0,42]	
Pulmão	0,80 (0,14)	0,69 (0,08)	0,88 (0,14)	0,84 (0,13)	0,114
Carcaça	79,5 (3,42)	79,8 (3,86)	80,8 (4,54)	77,9 (1,31)	0,523

*ANOVA

**logaritmo do peso do coração [peso após transformação inversa]

dp – desvio padrão;

BSF0 – dieta controlo com 0% de farinha de larva BSF; BSF50 - dieta com 50% de substituição de bagaço e óleo de soja por farinha de larva BSF; BSF100 dieta com 100% de substituição de bagaço e óleo de soja por farinha de larva BSF.

5.2 Concordância entre observadores

As pontuações da inflamação dos tecidos foram obtidas dependentes da concordância (analisada estatisticamente através do valor de Kappa de Cohen) entre os dois patologistas.

Os dois observadores classificaram todos os animais como 0 (sem inflamação) para o pâncreas, baço e testículo sendo a concordância perfeita.

O coração apresentava apenas um valor discordante entre os dois observadores, não sendo possível obter o valor de Kappa de Cohen. Um dos observadores classificou todos os animais como 0 (sem inflamação) e o segundo observador classificou todos os animais como 0 (sem inflamação), à exceção de um animal classificado com 1 (inflamação leve).

Apenas para o linfonodo e para o pulmão o nível de concordância foi inferior a “elevada” (0,61-0,80).

Na tabela 4 estão os valores obtidos da concordância entre as pontuações atribuídas pelos dois patologistas para cada órgão.

Tabela 4: Concordância inter-observador na análise da inflamação

Órgão	Kappa de Cohen (ep)	p*	Concordância
Estômago	1,000 (0,000)	<0,001	Quase perfeita
Duodeno	0,874 (0,119)	<0,001	Quase perfeita
Jejuno	0,745 (0,166)	<0,001	Elevada
Íleo	0,640 (0,163)	<0,001	Elevada
Ceco	0,657 (0,160)	<0,001	Elevada
Cólon	0,733 (0,166)	<0,001	Elevada
Pâncreas	-	-	
Fígado	0,860 (0,126)	<0,001	Quase perfeita
Baço	-	-	
Linfonodo	0,167 (0,157)	0,296	Fraca
Rim	0,636 (0,219)	0,018	Elevada
Pulmão	0,467 (0,146)	0,008	Boa
Coração	-	-	
Testículo	-	-	

*Kappa de Cohen

ep - erro padrão da estatística Kappa

Escala de concordância: < 0 sem concordância; 0-0,20 fraca; 0,21-0,40 aceitável; 0,41-0,60 boa; 0,61-0,80 elevada; 0,81-1 quase perfeita.

5.3 Análise histopatológicas dos tecidos

Na análise histopatológica foram observadas alterações nos segmentos intestinais (duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon), no estômago, no fígado, nos rins, nos linfonodos e nos pulmões, em todos os grupos. Já no pâncreas, baço, coração e testículo não foram identificadas alterações.

5.3.1 Estômago

No estômago observaram-se infiltrados inflamatórios linfoplasmocitários discretos na mucosa e submucosa, apenas um suíno da dieta BSF100 apresentou infiltrado inflamatório linfoplasmocitário moderado (figura 6, figura 7 e figura 8).

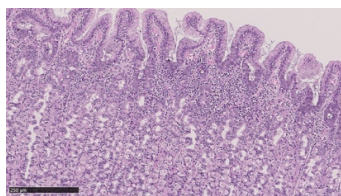


Figura 6 – Estômago 100x HE. Dieta BSF0. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário. Original do autor.

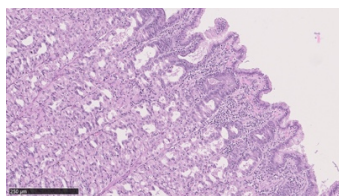


Figura 7 – Estômago 100x HE. Dieta BSF50. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário. Original do autor.

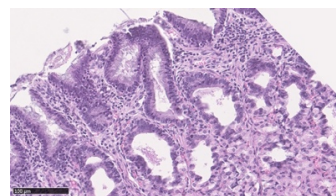


Figura 8 – Estômago 200x HE. Dieta BSF100. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário. Original do autor.

5.3.2 Segmentos intestinais

Em todos os segmentos intestinais foram identificados infiltrados inflamatórios eosinofílicos e linfoplasmocitários a nível da mucosa e submucosa, com reatividade do GALT (figuras 9, figura 10, figura 11, figura 13, figura 14, figura 15, figura 16 e figura 17). No ceco, em dois animais do grupo BSF0, foram identificados focos de erosão da mucosa (figura 12).

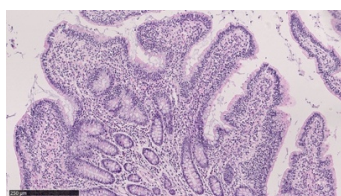


Figura 9 – Intestino delgado 100x HE. Dieta BSF0. Infiltrados inflamatório linfoplasmocitário a nível da

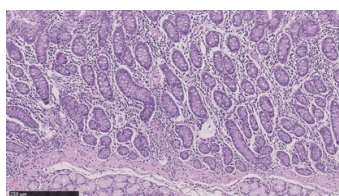


Figura 10 – Intestino delgado (duodeno) 100x HE. Dieta BSF50. Infiltrados inflamatório linfoplasmocitário a nível da

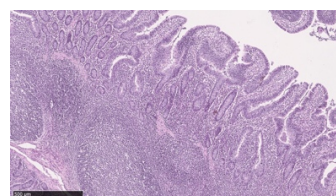


Figura 11 – Intestino delgado (íleo) 50x HE. Dieta BSF100. Infiltrados inflamatório linfoplasmocitário a nível da mucosa com reatividade do

mucosa e presença de eosinófilos. Original do autor.

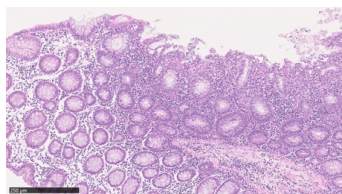


Figura 12 - Ceco 100x HE.
Dieta BSF0. Erosão da mucosa com infiltrados neutrofílicos secundários. Infiltrados inflamatório linfoplasmocitário a nível da mucosa. Original do autor.

mucosa e presença de eosinófilos. Original do autor.

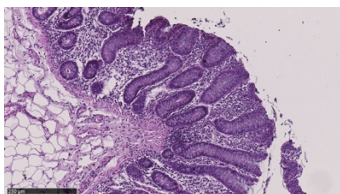


Figura 13 – Ceco 100x HE.
Dieta BSF50. Infiltrados inflamatório linfoplasmocitário a nível da mucosa e submucosa. Original do autor.

GALT e presença de eosinófilos. Original do autor.

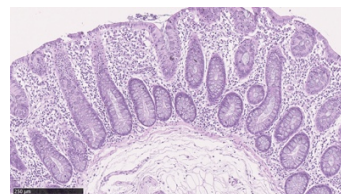


Figura 14 – Ceco 100x HE.
Dieta BSF100. Infiltrados inflamatório linfoplasmocitário a nível da mucosa e submucosa. Original do autor.

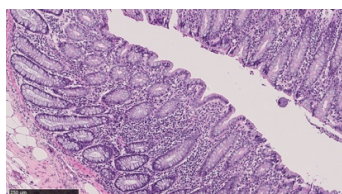


Figura 15 – Cólon 100x HE.
Dieta BSF0. Infiltrados inflamatório linfoplasmocitário a nível da mucosa. Original do autor.

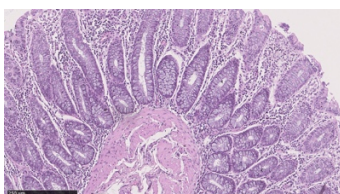


Figura 16 – Cólon 100x HE.
Dieta BSF50. Infiltrados inflamatório linfoplasmocitário a nível da mucosa. Original do autor.

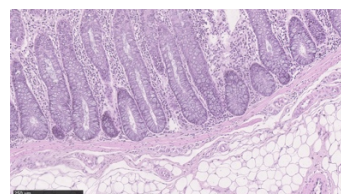


Figura 17 – Cólon 100x H.E.
Dieta BSF100. Infiltrados inflamatório linfoplasmocitário a nível da mucosa e submucosa. Original do autor.

5.3.3 Fígado

No fígado, os animais apresentaram infiltrados inflamatórios linfoplasmocitários periportais discretos (figura 18), apenas um suíno da dieta BSF100 apresentou infiltrado inflamatório linfoplasmocitário moderado.

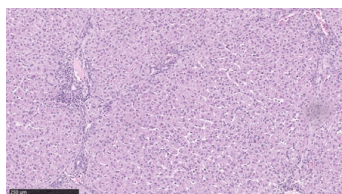


Figura 18 – Fígado 100x HE.
Dieta BSF100. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário

periportal discreto. Original do autor.

5.3.4 Linfonodos mesentéricos

Observou-se a reatividade dos linfonodos e infiltrados eosinofílicos (figura 19, figura 20 e figura 21).

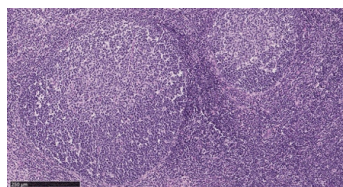


Figura 19 – Linfonodo mesentérico 100x HE. Dieta BSF0. Reatividade do linfonodo com hiperplasia do folículo linfóide com centro germinativo. Original do autor.

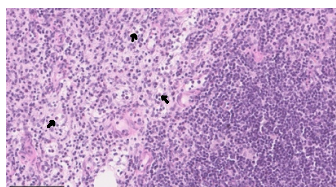


Figura 20 – Linfonodo mesentérico 200x HE. Dieta BSF50. Reatividade do linfonodo com presença de eosinófilos (seta). Original do autor.

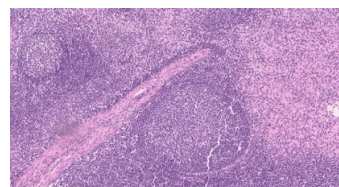


Figura 21 – Linfonodo mesentérico 100x HE. Dieta BSF100. Reatividade do linfonodo com hiperplasia do folículo linfóide com centro germinativo. Original do autor.

5.3.5 Rim

Nos rins identificaram-se infiltrados inflamatórios linfoplasmocitários intersticiais discretos (figura 22).

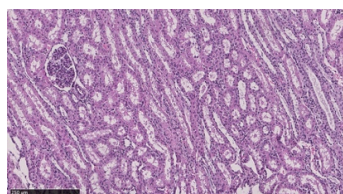


Figura 22 – Rim 100x HE. Dieta BSF0. Discretos infiltrados inflamatórios linfoplasmocitários intersticiais. Original do autor.

5.3.6 Pulmão

Nos pulmões, os animais apresentaram hiperplasia do tecido linfóide associado à mucosa brônquica (BALT) acompanhada de infiltrados inflamatórios perivascular e intersticiais ricos em linfócitos, plasmócitos e alguns macrófagos (figura 23, figura 24 e

figura 25). Observaram-se focos com espessamento da parede alveolar e zonas de consolidação.

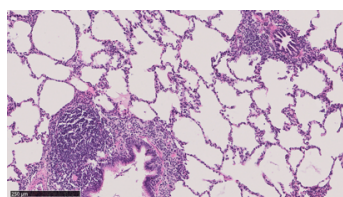


Figura 23 – Pulmão 100x HE. Dieta BSF0. Hiperplasia do BALT e infiltrados inflamatórios perivascular e intersticiais ricos em linfócitos, plasmócitos e alguns macrófagos. Original do autor.

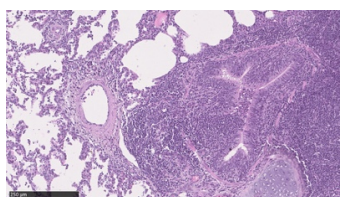


Figura 24 – Pulmão 100x HE. Dieta BSF50. Infiltrados inflamatórios perivascular e intersticiais ricos em linfócitos, plasmócitos e alguns macrófagos. Original do autor.

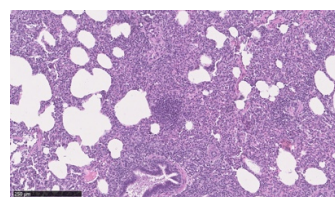


Figura 25 – Pulmão 100x HE. Dieta BSF50. Infiltrados inflamatórios perivascular e intersticiais ricos em linfócitos, plasmócitos e alguns macrófagos. Original do autor.

5.4 Classificação da inflamação dos tecidos

Para avaliar o grau de inflamação (infiltrados inflamatórios e reatividade do tecido linfoide associado) dos tecidos, dividiram-se os órgãos consoante a dieta e através dum sistema semi-quantitativo de pontuações realizou-se a comparação entre os grupos (tabela 5).

Foi utilizado o seguinte sistema de classificação dependendo do grau de inflamação: para o estômago e segmentos intestinais (duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon), 0 (sem inflamação); 1-2 (leve); 3-4 (moderada); 5-6 (severa); para o pâncreas, fígado, baço, rim, linfonodo, pulmão, coração e testículo, 0 (sem inflamação); 1 (leve); 2 (moderada); 3 (grave).

Não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos.

O pâncreas, baço, linfonodo, coração e testículo não apresentaram alterações inflamatórias.

Para o estômago a maioria dos animais apresentou inflamação leve (infiltrados linfoplasmocitários discretos).

Nos segmentos intestinais verificou-se que a maioria dos animais apresentaram inflamação leve no duodeno, jejuno e cólon e inflamação moderada a nível do íleo e ceco. Observaram-se infiltrados linfoplasmocitários e eosinofílicos discretos (inflamação leve) e moderados (inflamação moderada) e reatividade do GALT.

A maioria dos animais não apresentaram inflamação a nível do fígado e rim.

No pulmão grande parte dos animais apresentaram inflamação leve (hiperplasia do BALT e infiltrados inflamatórios perivasculares e intersticiais discretos, com linfócitos, plasmócitos e alguns macrófagos).

Tabela 5: Distribuição da análise da inflamação, total e por grupo

Órgão	Total n (%)	BSF0 n (%)	BSF50 n (%)	BSF100 n (%)	p*
Estômago					0.273
Sem inflamação	2 (17)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	
Inflamação leve	9 (75)	4 (100)	2 (50)	3 (75)	
Inflamação moderada	1 (8)	0 (0)	0 (0)	1 (25)	
Duodeno					1.000
Inflamação leve	10 (83)	3 (75)	3 (75)	4 (100)	
Inflamação moderada	2 (17)	1 (25)	1 (25)	0 (0)	
Jejuno					1.000
Inflamação leve	7 (58)	3 (75)	2 (50)	2 (50)	
Inflamação moderada	5 (42)	1 (25)	2 (50)	2 (50)	
Íleo					0.455
Inflamação leve	5 (42)	1 (25)	1 (25)	3 (75)	
Inflamação moderada	7 (58)	3 (75)	3 (75)	1 (25)	
Ceco					0.212
Inflamação leve	5 (42)	0 (0)	2 (50)	3 (75)	
Inflamação moderada	7 (58)	4 (100)	2 (50)	1 (25)	
Cólon					1.000
Inflamação leve	10 (83)	3 (75)	4 (100)	3 (75)	
Inflamação moderada	2 (17)	1 (25)	0 (0)	1 (25)	
Pâncreas					-
Sem inflamação	12 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	
Fígado					0.455
Sem inflamação	6 (50)	3 (75)	1 (25)	2 (50)	
Inflamação leve	5 (42)	1 (25)	3 (75)	1 (25)	
Inflamação moderada	1 (8)	0 (0)	0 (0)	1 (25)	
Baço					-

Sem inflamação	12 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	
Linfonodo					-
Sem inflamação	12 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	
Rim					0.418
Sem inflamação	8 (67)	2 (50)	4 (100)	2 (50)	
Inflamação leve	4 (33)	2 (50)	0 (0)	2 (50)	
Pulmão					0.345
Inflamação leve	7 (58)	2 (50)	1 (25)	4 (100)	
Inflamação moderada	3 (25)	1 (25)	2 (50)	0 (0)	
Inflamação grave	2 (17)	1 (25)	1 (25)	0 (0)	
Coração					-
Sem inflamação	12 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	
Testículo					-
Sem inflamação	12 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	

*Teste exato de Fisher

BSF0 – dieta controlo com 0% de farinha de larva BSF; BSF50 - dieta com 50% de substituição de bagaço e óleo de soja por farinha de larva BSF; BSF100 dieta com 100% de substituição de bagaço e óleo de soja por farinha de larva BSF.

5.5 Estudo morfométrico dos adipócitos

Através da medição da área de perfil dos adipócitos, recorrendo à análise de variância (ANOVA), não foram observadas diferenças significativas entre as diferentes dietas.

A tabela 6 apresenta a distribuição dos três tipos de gordura (após transformação logarítmica), para a amostra total e por grupo.

Tabela 6: Distribuição dos três tipos de gordura, para amostra total e por grupos

	Total	BSF0	BSF50	BSF100	p*
	média (dp)	média (dp)	média (dp)	média (dp)	
Gordura retroperitoneal	1698,7 (355,3)	1940,7 (378,5)	1648,2 (329,5)	1507,2 (284,0)	0,226
Gordura mesentérica	1600,9 (209,9)	1680,5 (264,7)	1498,7 (142,8)	1623,4 (219,3)	0,500

Gordura pericárdica	1379,9 (246,2)	1455,5 (72,3)	1473,7 (350,8)	1210,5 (190,6)	0,259
---------------------	-------------------	------------------	-------------------	-------------------	-------

*ANOVA

dp – desvio padrão;

BSF0 – dieta controlo com 0% de farinha de larva BSF; BSF50 - dieta com 50% de substituição de bagaço e óleo de soja por farinha de larva BSF; BSF100 dieta com 100% de substituição de bagaço e óleo de soja por farinha de larva BSF.

6. Discussão

O presente estudo apresenta resultados concordantes com outros estudos previamente realizados em leitões (Biasato *et al.*, 2019) e frangos (Dabbou *et al.*, 2018) onde se conclui que os diferentes níveis de inclusão de farinha de larva BSF não afetam nem o desenvolvimento nem a gravidade das alterações histopatológicas. A gravidade das alterações histopatológicas foi avaliada através de um sistema de pontuação semi-quantitativo utilizado anteriormente por Biasato *et al.*, 2019. Utilizou-se este método pois, atualmente, é um dos métodos mais indicados para avaliar a gravidade de lesões proliferativas e não proliferativas (não neoplásicas), obtendo-se assim uma concordância superior entre os patologistas, bem como maior consistência científica e reprodutibilidade dos resultados.

Não foi efetuado o estudo morfométrico para a medição da altura das vilosidades e profundidade das criptas intestinais como realizado em estudos anteriores (Spranghers *et al.*, 2007; Biasato *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2020) pois não é possível realizar em cortes histológicos em duas dimensões (2D) a não ser através de técnicas estereológicas.

Na observação histológica dos tecidos, a inflamação gástrica, dos segmentos intestinais e consequentemente reatividade dos linfonodos mesentéricos pode ter como causa o stress a que os animais foram sujeitos durante todo o período de ensaio, nomeadamente devido ao manejo (limpeza das caixas, recolha das fezes e urina, práticas de alimentação, pesagem semanal e troca de parques) como já tinha sido descrita em ensaios anteriores com leitões onde foram observadas alterações semelhantes (Biasato *et al.*, 2019). Para tentar confirmar esta possibilidade poderiam ser realizadas análise para medir os níveis de cortisol no plasma ou saliva dos animais (Hart, 2012).

As alterações observadas a nível renal e hepático variaram de ligeiras a moderadas, não sendo possível avaliar se estas afetam as funções dos órgãos uma vez que não foram realizadas análises sanguíneas. Contudo Biasato *et al.* (2019), verificaram lesões histológicas semelhantes e nas análises hematológicas não detetaram valores alterados, concluindo que o grau das lesões não apresentava relevância clínica.

Todos os animais apresentaram alterações pulmonares que podem ter como causa as condições pouco adequadas de ventilação e algum grau de stress que tenha comprometido a integridade da barreira intestinal o que pode também ter aumentado os níveis de células inflamatórias a nível do pulmão influenciando os achados.

No entanto, não se podem descartar outras causas, nomeadamente de origem infecciosa, pois a presença de infiltrados inflamatórios em vários órgãos é sugestivo de infeção subclínica. Teria sido interessante realizar testes serológicos, moleculares, coprológicos e bacterianos (cultura), para os agentes patogénicos mais prevalentes em suínos de engorda. De origem viral: o herpesvírus suíno 1 (doença de Aujeszky), arterivírus (síndrome respiratória e reprodutiva suína), vírus influenza A (gripe suína), circovírus suíno tipo 2, coronavírus e rotavírus. Origem bacteriana: *Escherichia coli*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Brachyspira*, *Lawsonia*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Mycoplasma*. Origem parasitária: *Ascaris suum*.

Para análise das gorduras (retroperitoneal, mesentérica e pericárdica) foi utilizado um método de análise morfométrica para obter a média da área de perfil dos adipócitos nos diferentes grupos (BSF0, BSF50, BSF100) para posterior comparação estatística. Não foi observada variação significativa entre os diferentes grupos.

Nas pesagens dos órgãos (fígado, baço, coração e pulmão) e da carcaça não foram identificadas diferenças significativas entre grupos como apresentado na tabela 3. Relativamente ao peso do fígado, baço e coração os resultados do presente estudo estão de acordo com outros realizados noutras espécies (perdizes e frangos) onde o peso dos órgãos não apresentava diferença significativas entre os grupos (Loponte *et al.*, 2017; Schiavone *et al.*, 2018).

Yu *et al.* (2020) verificou um aumento de peso do fígado, que sendo o principal local de degradação de aminoácidos, pode estar associado a uma maior quantidade de compostos nitrogenados processados pelo órgão. Também para o pâncreas se verificou esse aumento, possivelmente resultante do aumento da atividade das enzimas pancreáticas necessária para digerir uma maior quantidade de proteína.

Para este estudo teria sido benéfico a utilização de um número superior de animais para conseguir obter resultados mais representativos, também as condições ambientais poderiam ser mais controladas de forma a garantir um ambiente adequado e controlado de temperatura humidade e ventilação no alojamento dos animais durante o ensaio. Os níveis de stress provocados pelo manuseamento humano e pelas condições das instalações, poderiam ser reduzidos através do enriquecimento ambiental através da

introdução de materiais de enriquecimento variados. Uma aproximação ao sistema de produção intensivo seria interessante pois resultados obtidos em condições de experimentação tendem a sofrer variações.

Tendo em conta a escassez de outros estudos semelhantes, bem como das interdições legais a todo o processo de aceitação da utilização de insetos para consumo animal e até humano, o presente estudo demonstrou resultados bastante positivos para a indústria dos insetos. Colocando a BSF um passo mais próximo da introdução na alimentação animal com resultados bastante indicativos de que estes não parecem interferir negativamente na saúde dos animais. Até aprovação legal, mais estudos devem ser realizados para aumentar a evidência e a base científica.

7. Conclusão

Com o presente estudo foi possível concluir que a incorporação de farinha de larva BSF em substituição de bagaço e óleo de soja, na alimentação de suínos em fase de acabamento não afetou negativamente os parâmetros histológicos e o grau de inflamação dos tecidos avaliados. Através do estudo morfométrico (área média dos adipócitos) das três gorduras analisadas também não foram observadas diferenças significativas entre os três grupos. Relativamente às diferenças observadas nos pesos dos órgãos também não foram significativas, no entanto seria interessante realizar análises sanguíneas específicas para avaliar a função dos mesmos. Em estudos futuros seria interessante avaliar um maior número de animais para conseguir avaliar uma amostra mais representativa e em condições mais aproximadas possíveis com os sistemas de produção.

Apostar nos insetos como aditivo alimentar e estudar novas propriedades, que os valorizem e distingam na indústria, tanto alimentar como outras, nomeadamente o potencial dos insetos como alternativa aos antibióticos e de que forma as diferentes dietas impactam nas suas propriedades antimicrobianas.

Procurar saber a opinião dos consumidores quanto à sua disponibilidade económica, enfatizando e demonstrando os benefícios ambientais e nutricionais que o setor pode desempenhar.

Estudos sensoriais são também importantes de forma a compreender a aceitação por parte dos consumidores, no que diz respeito ao consumo direto de insetos, ou consumo indireto, no caso de animais alimentandos com os mesmos.

Por último, mas não menos importante, estudar novas espécies de insetos e desenvolver o melhoramento genético, com a finalidade de tornar os mesmos, mais competitivos e eficientes.

8. Referências bibliográficas

Altmann, B. A., Neumann, C., Rothstein, S., Liebert, F., & Mörlein, D. (2019). Do dietary soy alternatives lead to pork quality improvements or drawbacks? A look into micro-alga and insect protein in swine diets. *Meat science*, 153, 26-34.

Andersen, M. L., & Winter, L. M. (2019). Animal models in biological and biomedical research-experimental and ethical concerns. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91.

Barragan-Fonseca, K. B., Dicke, M., & van Loon, J. J. (2017). Nutritional value of the black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) and its suitability as animal feed—a review. *Journal of Insects as Food and Feed*, 3(2), 105-120. doi:10.3920/jiff2016.0055

Beauchamp, T. L., & Degrazia, D. (2020). Principles of Animal Research Ethics. doi:10.1093/med/9780190939120.001.0001

Biasato, I., Renna, M., Gai, F., Dabbou, S., Meneguz, M., Perona, G., *et al.* (2019). Partially defatted black soldier fly larva meal inclusion in piglet diets: Effects on the growth performance, nutrient digestibility, blood profile, gut morphology and histological features. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10(1). doi:10.1186/s40104-019-0325-x

Bimczok, D., & Rothkötter, H. J. (2006). Lymphocyte migration studies. *Veterinary research*, 37(3), 325-338.

Bradley, S. W., & Sheppard, D. C. (1984). House fly oviposition inhibition by larvae of *Hermetia illucens*, the black soldier fly. *Journal of Chemical Ecology*, 10(6), 853-859. doi:10.1007/bf00987968

Brandon, A. M., El Abbadi, S. H., Ibekwe, U. A., Cho, Y. M., Wu, W. M., & Criddle, C. S. (2019). Fate of hexabromocyclododecane (HBCD), A common flame retardant, in polystyrene-degrading mealworms: elevated HBCD levels in egested polymer but No

bioaccumulation. *Environmental Science & Technology*, 54(1), 364-371. doi:10.1021/acs.est.9b06501

Caligiani, A., Marseglia, A., Leni, G., Baldassarre, S., Maistrello, L., Dossena, A., & Sforza, S. (2018). Composition of black soldier fly prepupae and systematic approaches for extraction and fractionation of proteins, lipids and chitin. *Food Research International*, 105, 812-820. doi:10.1016/j.foodres.2017.12.012

Chia, Tanga, Osuga, Alaru, Mwangi, Githinji, *et al.* (2019). Effect of Dietary Replacement of Fishmeal by Insect Meal on Growth Performance, Blood Profiles and Economics of Growing Pigs in Kenya. *Animals*, 9(10), 705. doi:10.3390/ani9100705

Dabbou, S., Gai, F., Biasato, I., Capucchio, M. T., Biasibetti, E., Dezzutto, D., ... & Schiavone, A. (2018). Black soldier fly defatted meal as a dietary protein source for broiler chickens: Effects on growth performance, blood traits, gut morphology and histological features. *Journal of animal science and biotechnology*, 9(1), 1-10.

Di Ieva, A., Bruner, E., Widhalm, G., Minchev, G., Tschabitscher, M., & Grizzi, F. (2012). Computer-assisted and fractal-based morphometric assessment of microvasculature in histological specimens of gliomas. *Scientific reports*, 2(1), 1-10.

Dortmans, B. M. A., Diener, S., Verstappen, B. M., & Zurbrugg, C. (2017). Black Soldier Fly Biowaste Processing-A Step-by-Step Guide Eawag: Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology. *Dübendorf, Switzerland*, 100.

European Medicines Agency (2016). Guidelines on the principles of regulatory acceptance of 3Rs (replacement, reduction, refinement) testing approaches. Acedido em Outubro 2020 em https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-principles-regulatory-acceptance-3rs-replacement-reduction-refinement-testing-approaches_en.pdf.

Europeia, U. (2019). Directiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de setembro de 2010 relativa à proteção dos animais utilizados para fins

científicos. Acedido em Setembro 2020 em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=SV>

FAO (2009) How to Feed the World in 2050. Retrieved from http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf

FAO (2019). *The State of Food and Agriculture 2019. Moving forward on food loss and waste reduction*. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

FAO. (2012). *Pig Sector Kenya*. FAO Animal Production and Health Livestock Country Reviews. No. 3. Rome. <http://www.fao.org/3/a-i2566e.pdf>

F. A. W. C. (2009). *Farm animal welfare in Great Britain: past, present and future*. Farm Animal Welfare Council.

Feldman, A. T., & Wolfe, D. (2014). Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining. *Histopathology Methods in Molecular Biology*, 31-43. doi:10.1007/978-1-4939-1050-2_3

Furman, D. P., Young, R. D., & Catts, P. E. (1959). *Hermetia illucens* (Linnaeus) as a factor in the natural control of *Musca domestica* Linnaeus. *Journal of Economic Entomology*, 52(5), 917-921.

Galyean, M. (1989). Laboratory procedure in animal nutrition research. *Department of Animal and Life Science. New Mexico State University, USA*, 188.

Gasco, L., Finke, M., & Van Huis, A. (2018). Can diets containing insects promote animal health?. *Journal of Insects as Food and Feed*, 4(1), 1-4.

Gibson-Corley, K. N., Olivier, A. K., & Meyerholz, D. K. (2013). Principles for valid histopathologic scoring in research. *Veterinary pathology*, 50(6), 1007-1015.

Godyń, D., Nowicki, J., & Herbut, P. (2019). Effects of environmental enrichment on pig welfare—a review. *Animals*, 9(6), 383.

Guilloteau, P., Zabielski, R., Hammon, H. M., & Metges, C. C. (2010). Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man?. *Nutrition research reviews*, 23(1), 4-22.

Hart, K. A. (2012). The use of cortisol for the objective assessment of stress in animals: Pros and cons. *The Veterinary Journal*, 2(192), 137-139

Hawkinson, Candice. "Beneficial Insects in the Landscape: #51 Black Soldier Fly (Hermetia Illucens)." Beneficial Insects in the Landscape: #51 Black Soldier Fly (Hermetia Illucens). Galveston County Master Gardeners, 2005. Web. August 2020. https://aggie-horticulture.tamu.edu/galveston/beneficials/beneficial-51_black_soldier_fly.htm

Huis, A. V. (2020). Insects as food and feed, a new emerging agricultural sector: A review. *Journal of Insects as Food and Feed*, 6(1), 27-44. doi:10.3920/jiff2019.0017

Huis, A. V. (2013). Potential of Insects as Food and Feed in Assuring Food Security. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 563-583. doi:10.1146/annurev-ento-120811-153704

Huis, A. V., Itterbeeck, J. V., & Klunder, H. (2013). *Edible insects: Future prospects for food and feed security*. , Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Huis, A. V., & Oonincx, D. G. (2017). The environmental sustainability of insects as food and feed. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37(5). doi:10.1007/s13593-017-0452-8

IPIFF (2019). The European insect sector today: challenges, opportunities and regulatory landscape. IPIFF vision paper on the future of the insect sector towards 2030. Retrieved from https://ipiff.org/wp-content/uploads/2019/12/2019IPIFF_VisionPaper_updated.pdf

IPIFF (2020). The insect sector milestones towards sustainable food supply chains. Retrieved from <https://ipiff.org/the-insect-sector-milestones-towards-sustainable-food-supply-chains/>

Islam, M. M., & Yang, C. (2017). Efficacy of mealworm and super mealworm larvae probiotics as an alternative to antibiotics challenged orally with Salmonella and E. coli infection in broiler chicks. *Poultry Science*, 96(1), 27-34. doi:10.3382/ps/pew220

Knoblaugh, S. E., Hohl, T. M., & La Perle, K. M. (2019). Pathology principles and practices for analysis of animal models. *ILAR journal*, 59(1), 40-50. doi:10.1093/ilar/ilz001

Lacroix, I. M., Terán, I. D., Fogliano, V., & Wichers, H. J. (2018). Investigation into the potential of commercially available lesser mealworm (*A. diaperinus*) protein to serve as sources of peptides with DPP-IV inhibitory activity. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(3), 696-704. doi:10.1111/ijfs.13982

Lee, W., Ham, Y., Ban, T. W., & Jo, O. (2019). Analysis of Growth Performance in Swine Based on Machine Learning. *IEEE Access*, 7, 161716-161724.

Liu, J., Zhang, J., & Xia, W. (2008). Hypocholesterolaemic effects of different chitosan samples in vitro and in vivo. *Food chemistry*, 107(1), 419-425.

Loponte, R., Nizza, S., Bovera, F., De Riu, N., Fliegerova, K., Lombardi, P., ... & Moniello, G. (2017). Growth performance, blood profiles and carcass traits of Barbary partridge (*Alectoris barbara*) fed two different insect larvae meals (*Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens*). *Research in Veterinary Science*, 115, 183-188.

Loveday, S. M. (2019). Food Proteins: Technological, Nutritional, and Sustainability Attributes of Traditional and Emerging Proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10(1), 311-339. doi:10.1146/annurev-food-032818-121128

Makkar, H. P., Tran, G., Heuzé, V., & Ankers, P. (2014). State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 197, 1-33. doi:10.1016/j.anifeedsci.2014.07.008

Mayer, E. A. (2011). Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(8), 453-466.

Moberg, G. P., & Mench, J. A. (Eds.). (2000). *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. CABI.

Neumann, C., Velten, S., & Liebert, F. (2018). N Balance Studies Emphasize the Superior Protein Quality of Pig Diets at High Inclusion Level of Algae Meal (*Spirulina platensis*) or Insect Meal (*Hermetia illucens*) when Adequate Amino Acid Supplementation Is Ensured. *Animals*, 8(10), 172. doi:10.3390/ani8100172

Newton, G.L., Booram, C.V., Barker, R.W. and Hale, O.M., 1977. Dried *Hermetia illucens* larvae meal as supplement for swine. *Journal of Animal Science* 44: 395-400.

Newton, G. L., Sheppard, D. C., Watson, D. W., Burtle, G. J., Dove, C. R., Tomberlin, J. K. et al. (2005a, January). The black soldier fly, *Hermetia illucens*, as a manure management/resource recovery tool. In *Symposium on the state of the science of Animal Manure and Waste Management* (pp. 5-7)., San Antonio, TX, USA.

Newton, L. A. R. R. Y., Sheppard, C. R. A. I. G., Watson, D. W., Burtle, G. A. R. Y., Dove, R. O. B. E. R. T. (2005b). Using the black soldier fly, *Hermetia illucens*, as a value-added tool for the management of swine manure. *Animal and Poultry Waste Management Center, North Carolina State University, Raleigh, NC*, 17.

OECD/FAO (2019), *OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028*, OECD Publishing, Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2019-en

Pabst, R. (2020). The pig as a model for immunology research. *Cell and tissue research*, 380(2), 287-304.

Patterson, J. K., Lei, X. G., & Miller, D. D. (2008). The pig as an experimental model for elucidating the mechanisms governing dietary influence on mineral absorption. *Experimental Biology and Medicine*, 233(6), 651-664.

Plaza-Díaz, J., Solís-Urra, P., Rodríguez-Rodríguez, F., Olivares-Arancibia, J., Navarro-Oliveros, M., Abadía-Molina, F. et al. (2020). The Gut Barrier, Intestinal Microbiota, and Liver Disease: Molecular Mechanisms and Strategies to Manage. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8351.

Recomendação (UE) 2016/336 da comissão. (2016). Execução da Diretiva 2008/120/CE do Conselho relativa às normas mínimas de proteção de suínos no tocante às medidas destinadas a reduzir a necessidade de corte da cauda.

Rehman, K., Rehman, R. U., Somroo, A. A., Cai, M., Zheng, L., Xiao, X., et al. (2019). Enhanced bioconversion of dairy and chicken manure by the interaction of exogenous bacteria and black soldier fly larvae. *Journal of environmental management*, 237, 75-83.

Sales, J., & Janssens, G. P. J. (2003). The use of markers to determine energy metabolizability and nutrient digestibility in avian species. *World's Poultry Science Journal*, 59(3), 314-327.

Salter, A. M. (2015). Animal Models in Nutrition Research. *Nutrition Research Methodologies*, 265-277.

Schiavone, A., De Marco, M., Martínez, S., Dabbou, S., Renna, M., Madrid, J., et al. Gasco, L. (2017). Nutritional value of a partially defatted and a highly defatted black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.) meal for broiler chickens: apparent nutrient digestibility, apparent metabolizable energy and apparent ileal amino acid digestibility. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 1-9.

Scudamore, C. L., Soilleux, E. J., Karp, N. A., Smith, K., Poulsom, R., Herrington, C. S. et al. Arends, M. J. (2016). Recommendations for minimum information for publication

of experimental pathology data: MINPEPA guidelines. *The Journal of pathology*, 238(2), 359-367.

Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. (2020) The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 18(7): e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>

Shackelford, C., Long, G., Wolf, J., Okerberg, C., & Herbert, R. (2002). Qualitative and quantitative analysis of nonneoplastic lesions in toxicology studies. *Toxicologic pathology*, 30(1), 93-96.

Slaoui, M., & Fiette, L. (2011). Histopathology procedures: from tissue sampling to histopathological evaluation. In *Drug safety evaluation* (pp. 69-82). Humana Press. doi:10.1007/978-1-60761-849-2_4

Sogari, G., Amato, M., Biasato, I., Chiesa, S., & Gasco, L. (2019). The Potential Role of Insects as Feed: A Multi-Perspective Review. *Animals*, 9(4), 119. doi:10.3390/ani9040119

Sprangers, T., Michiels, J., Vrancx, J., Ovyne, A., Eeckhout, M., Clercq, P. D. et al. (2018). Gut antimicrobial effects and nutritional value of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) prepupae for weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology*, 235, 33-42. doi:10.1016/j.anifeedsci.2017.08.012

Spring, P. (2013). The challenge of cost effective poultry and animal nutrition: Optimizing existing and applying novel concepts. *Lohmann Inf*, 48(1), 38-46.

Stull, V. J., Finer, E., Bergmans, R. S., Febvre, H. P., Longhurst, C., Manter, D. K., et al. (2018). Impact of Edible Cricket Consumption on Gut Microbiota in Healthy Adults, a Double-blind, Randomized Crossover Trial. *Scientific Reports*, 8(1). doi:10.1038/s41598-018-29032-2

Tan, X., Yang, H., Wang, M., Yi, Z., Ji, F., Li, J. et al. (2020). Amino acid digestibility in housefly and black soldier fly prepupae by growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 263, 114446. doi:10.1016/j.anifeedsci.2020.114446

Tran, G & Sauvant, D. (2004). Chemical data and nutritional value. In Sauvant, D., Perez, J., & Tran, G. *Tables of composition and nutritional value of feed materials: Pigs, poultry, cattle, sheep, goats, rabbits, horses and fish* (pp. 17-20). Wageningen, Netherlands: Wageningen Academic.

Ushakova, N. A., Dontsov, A. E., Sakina, N. L., Brodsky, E. S., Ratnikova, I. A., Gavrilova, N. N., et al. (2017). Melanin properties at the different stages towards life cycle of the fly *Hermetia illucens*. *Ukrainian Journal of Ecology*, 7(4), 424-431. doi:10.15421/2017_137

Ward, J. M., Schofield, P. N., & Sundberg, J. P. (2017). Reproducibility of histopathological findings in experimental pathology of the mouse: a sorry tail. *Lab animal*, 46(4), 146.

Welcome, M. O. (2018). Functional relationship between the gut and other tissues/organs of the body. In *Gastrointestinal Physiology* (pp. 1009-1028). Springer, Cham.

Ye, W., Liu, L., Yu, J., Liu, S., Yong, Q., Fan, Y. (2018). Hypolipidemic activities of partially deacetylated α -chitin nanofibers/nanowhiskers in mice. *Food & nutrition research*, 62.

Yi, Z., Li, X., Luo, W., Xu, Z., Ji, C., Zhang, Y. et al. (2018). Feed conversion ratio, residual feed intake and cholecystikinin type A receptor gene polymorphisms are associated with feed intake and average daily gain in a Chinese local chicken population. *Journal of animal science and biotechnology*, 9(1), 1-9.

Yu, M., Li, Z., Chen, W., Rong, T., Wang, G., Wang, F. et al. (2020). Evaluation of full-fat *Hermetia illucens* larvae meal as a fishmeal replacement for weanling piglets: Effects on the growth performance, apparent nutrient digestibility, blood parameters and gut morphology. *Animal Feed Science and Technology*, 264, 114431

Apêndices

Apêndice I - Protocolo de processamento histológico

Protocolo realizado para desidratação das amostras num processador de tecidos (Microm STP 120), indicando os diferentes reagentes e respectivos tempos de imersão utilizados em cada passo.

1. Reagente: Etanol a 70%; tempo de imersão: 30 minutos
2. Reagente: Etanol a 70%; tempo de imersão: 1.20 horas
3. Reagente: Etanol a 96%; tempo de imersão: 30 min
4. Reagente: Etanol a 96%; tempo de imersão: 1.20 horas
5. Reagente: Etanol a 100%; tempo de imersão: 30 minutos
6. Reagente: Etanol a 100%; tempo de imersão: 1.20 horas
7. Reagente: Etanol a 100%; tempo de imersão: 2 horas
8. Reagente: Clear-Rite®; tempo de imersão: 30 minutos
9. Reagente: Clear-Rite®; tempo de imersão: 1.30 horas
10. Reagente: Clear-Rite®; tempo de imersão: 2 horas
11. Reagente: Parafina 60-65°C; tempo de imersão: 1.30 horas
12. Reagente: Parafina 60-65°C; tempo de imersão: 2 horas

Apêndice II - Protocolo de coloração de rotina: Hematoxilina-Eosina

A coloração das amostras deve ser realizada numa capela de exaustão e deve seguir os seguintes passos:

1. Após incubação das lâminas em estufa a 60°C (1 hora) ou 37°C (durante a noite), proceder à desparafinação das lâminas em xilol e re-hidratação em concentrações decrescentes de etanol da seguinte forma:
 - 1.1. Xilol 1 (15 min)
 - 1.2. Xilol 2 (5 min)
 - 1.3. Álcool 100% (20 passagens / 1-2 minutos)
 - 1.4. Álcool 95% (20 passagens / 1-2 minutos)
 - 1.5. Álcool 70% (20 passagens / 1-2 minutos)
2. Hidratar em água destilada durante 5 minutos
3. Corar com hematoxilina de Harris modificada durante 3:30 minutos
4. Retirar o excesso de hematoxilina em água corrente

5. Fazer uma passagem (3 segundos) em HCl a 0,25% solução alcoólica
6. Azular em água corrente durante 2 minutos
7. Emergir as lâminas em álcool a 70 % durante 1 minuto
8. Corar com Eosina Y alcoólica durante 3 minutos
9. Diferenciar, desidratar e diafanizar da seguinte forma:
 - 9.1. Álcool 95% (20 passagens / 1-2 minutos)
 - 9.2. Álcool 100% (20 passagens / 1-2 minutos)
 - 9.3. Xilol 4 (5 minutos)
 - 9.4. Xilol 5 (10-15 minutos)
10. Montar em meio de montagem compatível com xilol (Bio-mount HM Bio-óptica)