

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

LUANA DA CONCEIÇÃO LOPES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO INSETO *TRIBOLIUM
CASTANEUM* ATRAVÉS DA ALIMENTAÇÃO COM CASEÍNA.**

MACEIÓ-AL

2023

LUANA DA CONCEIÇÃO LOPES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO INSETO *TRIBOLIUM
CASTANEUM* ATRAVÉS DA ALIMENTAÇÃO COM CASEÍNA.**

Trabalho de Conclusão de Curso, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia pela Universidade Federal de Alagoas.

Orientador: Prof.º Dr.º Luciano Aparecido Meireles Grillo

MACEIÓ-AL

2023

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586a Silva, Luana da Conceição Lopes da.
Avaliação dos parâmetros bioquímicos do inseto *Tribolium castaneum*
através da alimentação com caseína / Luana da Conceição Lopes da Silva. –
2023.
28 f. : il.

Orientador: Luciano Aparecido Meireles Grillo.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia) –
Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió,
2023.

Bibliografia: f. 27-28.

1. *Tribolium*. 2. Caseínas. I. Título.

CDU: 577.1:547.963.2

LUANA DA CONCEIÇÃO LOPES DA SILVA

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO INSETO *TRIBOLIUM CASTANEUM* ATRAVÉS DA ALIMENTAÇÃO COM CASEÍNA

Trabalho de Conclusão de Curso,
submetido à banca avaliadora da
Universidade Federal de Alagoas e
aprovado no dia 09 de outubro de 2023.

Documento assinado digitalmente
 **LUCIANO APARECIDO MEIRELES GRILLO**
Data: 17/10/2023 09:23:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Professor Doutor Luciano Aparecido Meireles Grillo (Orientador – ICF-UFAL)

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 **CAMILLA CAMERINO SANTANA**
Data: 16/10/2023 12:19:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Professora Doutora Camilla Camerino Santana Davino Freire (ICBS-UFAL)

Documento assinado digitalmente
 **JOSIEL SANTOS DO NASCIMENTO**
Data: 09/10/2023 11:06:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Mestre Josiel Santos do Nascimento

AGRADECIMENTOS

A caminhada foi árdua, dolorida, demorada, mas satisfatória. A realização de um sonho, não só meu mais de toda minha família. Entrar em uma universidade é a mesma coisa que desbravar um novo mundo, esta/ essa é a sensação que tive e que perdura até hoje. Me sinto grata por tudo que realizei na instituição e na vida.

O novo mundo que desbravei durante tanto tempo me fez descobrir novos mundos que foram pessoas, projetos de vida meus e de amigos, sonhos partilhados e compartilhados, medos enfrentados e vencidos. Muitas vezes esmorecemos e pensamos que não iremos aguentar o fardo do misto de emoções que nós passamos. Mas, o que seria da vida se fosse cair e levantar? Acho que seria chata e monótona... não é fácil cair e muito menos levantar, porém precisamos, é assim que crescemos como seres humanos.

Até aqui nada foi fácil, mas sinto que venci uma das minhas batalhas, digo tudo isso para que saibamos que iremos cair, levantar, chorar, rir, ter momentos bons e ruins, pessoas maravilhosas e também aquelas que nos faz perder a fé. Todo momento deve ser vivido e lembrado para que ao olharmos ao passado e não comentamos mais erros sejam eles do passado ou futuro.

Gostaria de agradecer à Deus, que me fez forte, que me levantou, que colocou em meu coração o amor a minha profissão, que me deu coragem e bênçãos. Agradecer aos meus pais que me encorajaram sempre a estudar, a ter caráter e lutar. Mas, em especial a minha mãe que é exemplo de fé, força, coragem, resiliência, paciência, amor, meu. Palavras bonitas são finitas para a descrever, ela foi e é a pessoa a quem irei sempre agradecer por absolutamente tudo, principalmente por ter estado ao meu lado nos momentos mais difíceis da vida, então somente gratidão e amor por minha amada mãe Conceição.

In memoriam ao meu irmão Osman que se foi a 13 anos e que me lembro até hoje de sua ternura, fé e esperança. Meu querido Osman "quem amamos nunca morre apenas parte para a eternidade".

Não poderia esquecer de uma grande amiga que fiz para vida através da Ufal. Valéria Vieira, quantos perrengues e angústias compartilhadas com essa guerreira que em nenhum momento deixou de me dar forças, muito honrada por tê-la encontrado. Nas aulas encontrei Larissa Costa e Érika Gilmara, e logo nos afeiçoamos e assim trilhamos juntas uma nova caminhada em direção ao laboratório do Professor Luciano que nos acolheu como alunas do laboratório de bioquímica.

Foram ao todo 4 anos no Laboratório de Bioquímica de Insetos (LBM), aprendizados, vivências e bons momentos que já mais esquecerei.

Obrigada hoje as então doutoras Camilla Camerino, Mariana Macedo e

Meirielly Holanda, me sinto grata por todos os ensinamentos que vocês me deram nos anos em passamos juntas. Camilla sempre tão simpática, disponível em ajudar e de uma felicidade contagiante, grata a Meirielly que chegou revolucionando tudo, com várias ideias, ensinamento e um jeito leve de ser e ver a vida, muito grata a Mari que ficou responsável em me guiar pela biologia molecular e fez com maestria exemplar, que teve a paciência de um santo para passar todas as metodologias e ensinamentos. Mari querida eu e você falamos pouco, personalidades diferentes é claro, mas que bom foi a troca que tivemos, grata a você por tudo.

Josiel, sempre tão prestativo, legal, correto, e por dentro de todas as metodologias possíveis de serem utilizadas, querido obrigada por tudo que fizestes por mim quando me sentia perdida nos experimentos e também por toda palavra de força. Agradeço também a Thomás por toda força e esclarecimento, dicas que sempre posicionou a mim. A Cledson e Andréia por toda animação, conselhos acadêmicos e experimentais, boas risadas e histórias.

A Thays Fontes e Valéria Bigió, meninas que são grandes mulheres, obrigada por serem quem vocês são, as boas risadas e conselhos jamais serão esquecidos por mim. O jeito leve de Val sempre com as melhores repostas e as mais engraças e Thays obrigada pelo amor emanado a mim.

Larissa Costa lembro que fostes a primeira pessoa com quem devo ter trocados as primeiras palavras na graduação e que fostes tu que me incentivou a ser da pesquisa. Querida amiga, sempre doce, gentil, preocupada e disposta a ajudar, você foi um presente em minha vida. Foram longos anos de minha vida de graduação tendo o teu apoio, dividindo momentos que ficaram para sempre, seja feliz e siga seus sonhos e assim me deixaras realizada também, não se esqueça estarei aqui sempre.

Ao meu querido orientador Luciano Grillo, sou muito grata por toda a compreensão dada direta e indiretamente a mim, és um exemplo de ser humano e profissional que desperta resiliência, compreensão e inteligência aos que estão próximos a ti, sempre serei grata ao acolhimento e confiança dados a mim.

Dos dias bons desfrute, nos ruins lute e aprenda, e não desista de quem és por nada, ninguém, nem por você mesmo.

Luana Lopes.

RESUMO

O *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) é um besouro de coloração vermelho castanho bastante conhecido por ser uma praga de armazenamento de grãos e causar perdas econômicas no setor agrícola. É amplamente utilizado em estudos para controle de pragas através de produtos naturais como plantas com substâncias inseticidas, utilizados também em estudos genéticos, bioquímicos e metabolismo. Notando que existem estudos relevantes de caseína como ótima fonte proteica para animais e humanos, pretendeu-se investigar se à mesma causaria alguma alteração na bioquímica do inseto através de sua ingestão. As análises feitas por metodologias de medição de triglicerídeos e açúcares totais ajudaram a analisar dois órgãos de suma importância do inseto: corpo gorduroso e intestino. Por fim, observou-se diferença entre os grupos estudados sendo a análise de triglicerídeos a mais satisfatória.

Palavras chaves: *Tribolium castaneum*; Caseína.

ABSTRACT

Tribolium castaneum (Coleoptera: Tenebrionidae) is a brownish-red beetle well known for being a pest of grain storage and causing economic losses in the agricultural sector. It is widely used in studies to control pests through natural products such as plants with insecticidal substances, as well as in genetic, biochemical and metabolism studies. Noting that there are relevant studies on casein as an excellent source of protein for animals and humans, the aim was to investigate whether it would cause any changes in the insect's biochemistry through its ingestion. Analyses using triglyceride and total sugar measurement methodologies helped to analyze two of the insect's most important organs: the fat body and the intestine. Finally, there were differences between the groups studied, with the triglyceride analysis being the most satisfactory.

Palavras chaves: *Tribolium castaneum*; Casein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estágios de desenvolvimento do <i>Tribolium castaneum</i> : ovo, larva, pupa, adulto	17
Figura 2: Quantificação de triglicerídeos	24
Figura 3: Quantificação de açúcares totais.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍGLAS E SÍMBOLOS

T. castaneum

Tribolium castaneum

D. melanogaster

Drosófila melanogaster

Cas10%S

Caseína micelar sódica 10%

Cas20%S

Caseína micelar sódica 20%

Cas10%P

Caseína Pura 10%

Cas20%P

Caseína Pura 20%

Cg

Corpo gorduroso

In

Intestino

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BOBLIOGRÁFICA	15
2.1 Insetos como modelo de estudo.....	15
2.1.1 <i>Drosófila megalonaster</i>	15
2.1.2 Abelha (Hymenoptera)	16
2.1.3 <i>Tribolium castaneum</i>	16
2.2 Caseína	18
3 OBJETIVOS	20
3.1 Geral	20
3.1.1 Específico	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 Colônia de insetos.....	21
4.2 Dieta	21
4.3 Testes bioquímicos	21
4.3.1 Quantificação de proteínas.....	21
4.3.2 Quantificação de triacilglicerol	22
4.3.3 Quantificação de açúcares totais.....	22
4.4 Análise estatística	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
5.1 Triglicerídeos	23
5.2 Açúcares totais.....	24
6 CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	27

1 INTRODUÇÃO

Pragas de insetos resultam em grandes perdas de grãos de alimentos armazenados, milho, farinha, farelo especialmente em ambientes tropicais e semitropicais. Sendo assim, necessário desenvolver inseticidas seguros e eficazes contra estes insetos. Porém, nem sempre esta alternativa é benéfica ao meio ambiente, animais e seres humanos, pois, o risco de poluição ambiental, contaminação de alimentos mesmo que em baixa escala, toxicidade e em alguns casos algum tipo de câncer. Por isso, modelos como o inseto *Tribolium castaneum* é amplamente utilizado em pesquisas para controle de pragas (TRIPATHI, 2001). Também, tem se destacado como modelo de estudo para evolução de mecanismos que controlam o desenvolvimento embrionário em artrópodes, já que existem muitas ferramentas moleculares e genéticas disponíveis para estudos com o *T. castaneum* (Macaya, C.C., Saavedra, P.E., Cepeda, R.E. *et al*, 2016). Estudos de Metabolismo de insetos já vem sendo bastante descrito em literatura para este inseto, principalmente em relação a digestão e metabolismo de lipídeos provenientes de sua dieta. Como já sabemos o leite é um dos alimentos mais completos encontrados disponíveis em nosso meio, sendo em sua maior parte constituído por proteínas, na qual se divide em caseína e proteínas do soro. Sendo a caseína importante na alimentação para humanos, pois possui alto valor biológico. Seria interessante saber se pode haver alguma interferência na parte bioquímica do inseto após a ingestão de caseína através de sua alimentação. Analisando seus principais órgãos entre eles corpo gorduroso e intestino que são importantes em seu metabolismo. O estudo da ingestão de caseína na alimentação do inseto pretende elucidar possíveis alterações bioquímicas do inseto, através de metodologias já conhecidas como análise de triglicerídeos e açúcares totais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. 1 Insetos como modelo de estudo

Existem vários motivos para a utilização de insetos como modelos de estudos e posterior efetivação em experimentos. Primeiramente, é encontrado em abundância no meio ambiente e em diversas espécies, altamente adaptados e desenvolvidos ao meio em que vive, tem grande sucesso evolutivo, além de serem encontrados em todos os lugares e épocas do ano. A fácil manutenção e manuseio em laboratório, associados ao seu ciclo de vida curto, mas rápida reprodução e tamanho reduzido o tornam de grande valia para a ciência.

2. 1. 1 *Drosófila megalonaster*

Dentre os modelos mais estudados temos a *Drosófila megalonaster*. Segundo SILVA ROQUE (2016), citado por Eisenhardt (2016) as moscas são insetos da ordem Diptera, e seu representante mais estudado é a *D. melanogaster*. As drosófilas são insetos pequenos, que se alimentam de leveduras em frutos já caídos e em estado de decomposição, não sendo prejudiciais para a agricultura e por isso ficaram conhecidas como as moscas das frutas. Esta espécie de mosca apresenta dimorfismo sexual. As fêmeas têm cerca de 2,5 milímetros (mm), apresentam uma alternância típica de listas claras e escuras no abdômen. Os machos, além de serem, geralmente, menores que as fêmeas, apresentam a extremidade do abdômen negra. Esta espécie é uma das mais utilizadas em experiências genéticas, sendo de extrema importância para a biologia (SILVA ROQUE 2016).

Segundo GOTTSCHALK (2008), citado por SILVA (2018) no Brasil são conhecidas mais de 300 espécies de drosofilídeos, muito apropriados para estudos ecológicos voltados à Biologia da Conservação, em virtude de sua ampla distribuição geográfica; ao elevado número de espécies e de indivíduos; ao conhecimento taxonômico da família; fácil captura e manipulação em laboratório; e por serem sensíveis às mudanças ambientais (POWELL, 1997, apud SILVA 2018).

Além disso, muitos sistemas e órgãos de mamíferos tem genes homólogos bem conservados em drosófilas. Inicialmente, a mosca da fruta foi um organismo essencial para se chegar às informações de genética clássica, sendo reconhecida e utilizada posteriormente como ferramenta para estudos de diferentes problemas biológicos. Nos últimos 50 anos, estudos genéticos usando este organismo modelo vêm sendo

aplicados para decifrar os principais mecanismos que sustentam uma variedade de fundamentos biológicos e seus processos, incluindo sinalização celular, ciclo celular, sistema nervoso, comportamento, desenvolvimento e aspectos de doenças humanas (SILVA ROQUE, 2016), citado por Eisenhardt (2016)

2. 1 .2 Abelha (Hymenoptera)

Abelhas vivem em contato direto com meio ambiente, coletando assim pólen, néctar, água e resina para sua colônia sendo devidamente puras e livres de contaminantes (JACOB, 2012). Sendo assim, as abelhas se tornaram indicadores ambientais, pois correspondem a contaminações químicas do ambiente em que estão inseridas, demonstrando alta mortalidade, características morfológicas que indicam impactos ambientais rural ou industrial, além de serem importantes na polinização de flores silvestres e cultivadas (JACOB, 2012).

Dentre alguns estudos na qual a abelha se destaca como modelos damos ênfase ao campo na neurociência, onde o cérebro da abelha sendo um dos mais simples entre os vertebrados tem seu sistema visual rico e bastante similar ao dos primatas incluindo o homem, em relação a processos cognitivos de percepção visual e termos psicofísicos. Tudo isso foi comprovado por um estudo realizado por Daumer (1956) em que fica claro que as abelhas tem visão tricromática e em cores (PAGY, 2013). As abelhas tem capacidade de memorizar e aprender padrões visuais como formas, direção, contrastes, intensidade de luz, movimentos e outros (PAGY, 2013).

2. 1. 3 *Tribolium castaneum*

Insetos pragas que atacam grãos armazenados têm causado grande impactos econômicos. Dentre estes insetos destaca-se o *Tribolium castaneum* (Herbts) (Coleoptera: Tenebrionidae) que também pode alimentar-se de farinha, farelo, ração, grãos (SILEEM, 2019) (Figura 1).

O inseto é cosmopolita e possuindo metamorfose completa (ovo, larva, pupa e adulto), os estágios larvais e adultos são totalmente distintos morfologicamente. Devido ao seu ciclo de vida curto, disponibilidade de genoma completo sequenciado *T. castaneum* torna-se um modelo completo para estudos (GOMES, 2022) (Figura 1).

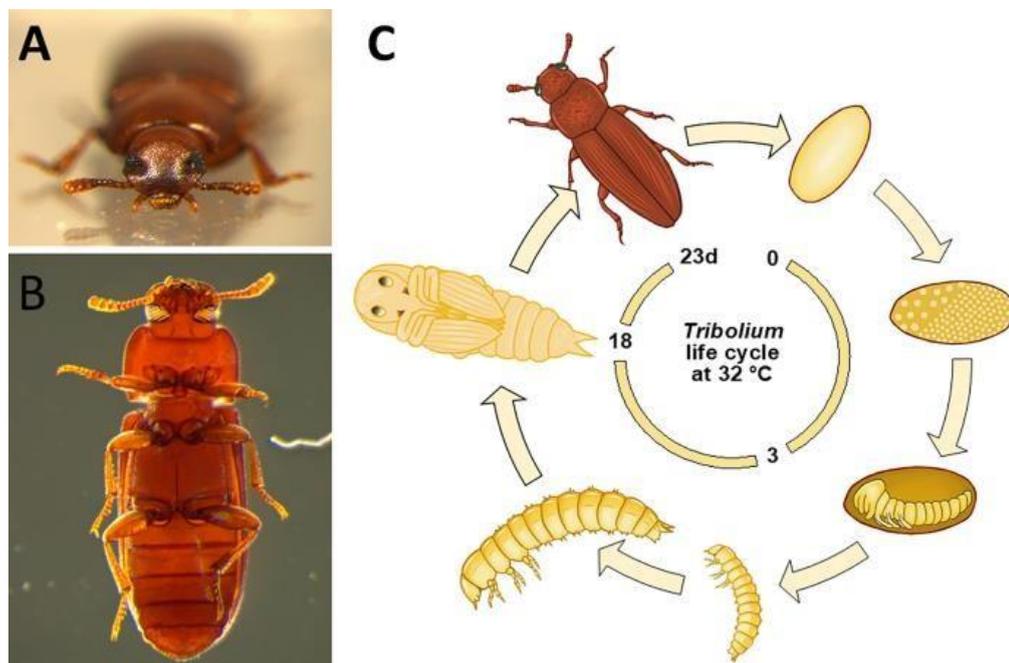
Para o desenvolvimento embrionário do inseto a temperatura adequada está entre 22 e 32 ° C, com a temperatura estável em 32°C temos a diminuição da

metamorfose de 74 dias a 22,5 ° C para cerca de 23 dias a 32 ° C, o que é ótimo para estudos genéticos em larga escala (Klingler et. al 2022).

Para controle deste inseto praga faz-se o uso de inseticidas sintéticos e fumigantes, o que tem causado problemas ao ambiente, além do aumento dos custos de aplicação, resistência de praga e efeitos nocivos a outros organismos no ambiente e toxicidade direta aos humanos (SILEEM, 2019).

T. castaneum são de fácil cultivo precisando alimentá-los por exemplo farinha de trigo integral, que é rica em nutrientes para ele. Somente para a coleta de ovos, os besouros são mantidos em farinha branca, além de que, o inseto não precisa ingerir líquidos, pois derivam todos os fluidos corporais da matéria seca: a queima de amido produz água. É preciso que a umidade deve ser de 30%. O tempo de vida dos besouros é aproximadamente um ano, no entanto, a taxa de postura dos ovos é alta apenas nos primeiros 3 meses – 4 meses (Klingler et. al 2022).

Figura 1: estágio de metamorfose do inseto.



Fonte: Klingler & Bucher, 2022

O *T. castaneum* é amplamente utilizado em pesquisas não somente no controle de pragas, mas também em estudos de biologia molecular por ter genoma bastante descrito em literatura, destaca-se também em estudos comportamentais, fisiológicos, bioquímicos.

2.2 Caseína

O leite é umas das principais fontes de proteínas na alimentação de humanos e animais, podendo ser considerado um dos alimentos mais completos da natureza. O leite é constituído por água, gordura, sais minerais, lactose e em sua maior quantidade por proteínas que compreendem duas frações principais: caseínas, que se apresentam principalmente no estado de partículas coloidais, (micelas) e proteínas do soro, que estão em solução (SOARES, 2013).

As propriedades que a caseína apresenta não podem ser substituídas por outras proteínas em certas aplicações e vem sendo produzida há cerca de 70 anos. Sendo comumente utilizados em formulação de produtos cárneos, lácteos, produtos de panificação, chocolates e outros (ROMAN, 2005).

A caseína é uma das maiores moléculas de proteína e por isso sua digestão é lenta, porém, é bem absorvida tendo alto valor biológico. A caseína auxilia na perda de peso, aumento de força muscular e em processos anti-cabólico, mas se consumida em excesso pode prejudicar o funcionamento dos rins. Ocasionalmente ocasionar problemas coronarianos, alergias, diabetes mellitus tipo 1 (DA SILVA, 2019).

A caseína desempenha papel importante nas glândulas mamárias de animais, pois é ela quem transporta cálcio, fósforo e proteína aos neonatos. A caseína divide-se em quatro principais tipos, sendo eles α_1 -caseína, α_2 -, β -caseína e κ -caseína, representando cerca de 38%, 10%, 35% e 15% (BRASIL, NICOLAU et. al 2015). Por possuir regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, executa atividade anfipática; como a conformação das moléculas de caseína expõe seus resíduos hidrofóbicos elas formaram fortes associações entre caseínas que as tornaram insolúveis em água. Além de suas sequências fosforiladas interagirem com fosfato de cálcio, tornando-as capazes de sequestrar fosfato de cálcio, formando assim agrupamentos de íons circundados por uma camada de proteína (BRASIL, NICOLAU et. al 2015).

Atualmente a caseína é utilizada nos estudos em relação nutricional e impacto ao transtorno do espectro autista, como descreve Alves (2017, p. 5) “Tendo em conta isto, a dieta sem glúten e sem caseína surge como uma terapêutica nutricional para melhorar os sintomas gastrointestinais e também alguns sintomas comportamentais e sociais característicos do autismo”. Há estudos com caseína para a produção de

fungos entomopatogênicos para aplicação no controle biológico de insetos (Gimenes, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar o metabolismo energético do inseto *T. castaneum* frente a dieta com caseína micelar sódica e caseína pura.

3.1.1 Específico

Avaliar a disponibilidade de açúcares totais frente a dieta com diferentes concentrações de caseína micelar sódica e caseína pura no corpo gorduroso e intestino.

Avaliar a disponibilidade de triacilglicerol frente a dieta com diferentes concentrações de caseína micelar sódica e caseína pura no corpo gorduroso e intestino.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. 1 Colônia dos insetos

Os insetos são cultivados em colônia própria do Laboratório de Bioquímica Metabólica que está localizado na Universidade Federal de Alagoas, os insetos são mantidos em estufa a 30°C com umidade relativa em torno de 70 e 80% e fotoperíodo claro/escuro de 12h.

4. 2 Dieta

A dieta base dos insetos consiste somente em farinha de trigo. Mas para o presente trabalho foi inserido em sua dieta dois tipos de caseína sendo a caseína micelar sódica e a caseína pura (ambas as caseínas são comerciais das marcas Kasvi e caseína pura Êxodo científica, respectivamente) com duas concentrações de caseína 10 e 20%. Foram utilizados 15 adultos para cada experimento.

O trabalho foi dividido em três grupo, o grupo controle com 3,000 gramas de farinha de trigo somente, o grupo com 10% de caseína onde se tinha 2,700 gramas de farinha de trigo e 0,300 gramas de caseína, e o último grupo que era o de caseína 20% com 2,400 gramas de farinha de trigo e 0,600 gramas de caseína. A farinha e caseína eram pesadas separadamente e após a pesagem eram maceradas juntas para total mistura e então os insetos eram adicionados as suas respectivas dietas em placas de petri. Após 7 dias os insetos eram analisados e feitos os testes bioquímicos.

4. 3 Testes bioquímicos

Para os testes bioquímicos foram utilizados os corpos gordurosos e o intestino do inseto.

4. 3. 1 Quantificação de proteínas

Todas as amostras foram padronizadas por curva de proteínas pelo método de Bradford (1976) e então normalizados para 20 µg de proteínas. A metodologia desse método consiste em utilizar a Albumina de Soro Bovino para a criação da curva padrão (0,01mg/mL até 1mg/mL). Todas as leituras foram realizadas em microplaca, com as seguintes proporções para a reação: 10µL da amostra + 190µL de reagente de Bradford, havendo um volume total de reação de 200 µL e para o branco foi usado

10µL de água no lugar a amostra. Após preparar toda a reação, todas as amostradas foram incubadas por 5 min e logo em seguida medidas as absorbâncias a 595nm como auxílio de uma leitora de microplacas (Flexstation 3). Para todas as amostras foram realizadas triplicatas e suas unidades são mg/ml de proteína.

4. 3. 2 Quantificação de triacilglicerol

Para quantificar o triacilglicerol foram utilizados kits Bioclin® monoreagente com adaptação. O corpo gorduroso e o intestino de aproximadamente 10 larvas de cada grupo de análise foram macerados em 400µL de solução salina a 0,9% e o homogenato foi centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e o volume correspondente a 20µg de proteína de cada extrato foi utilizado para medir o triacilglicerol (TAG), utilizando as amostras obtidas e o reagente específico. Os valores de absorbância obtidos foram convertidos em concentração usando uma curva padrão para triacilglicerol.

4. 3. 3 Quantificação de açúcares totais

A quantificação dos açúcares totais foi determinada pelo método fenolsulfúrico (DUBOIS et al., 1956). 20 larvas por grupo foram lavadas e secas, maceradas em 300 µl de ácido perclórico. O sobrenadante foi transferido para um ependorfe. Foram utilizados 10 µL deste sobrenadante para preparar a solução, adicionando 190 µL de ácido perclórico. A placa foi incubada por 10 minutos a 37°C, para posterior análise. Foram adicionados 30 µL desta solução, 30 µL de fenol a 5 % e 140 µL de ácido sulfúrico a cada poço, numa placa de 96 poços, em triplicata. A placa foi incubada por 10 minutos a 37 °C, para posterior análise em um leitor Flex Station 3 (Molecular Devices, Califórnia, EUA) com comprimento de onda de 490nm. Os valores de absorbância obtidos foram convertidos para a concentração através de uma curva de calibração obtida usando a glicose como padrão.

4. 4 Análise estatística

Os dados foram catalogados e analisados estatisticamente usando o software GraphPad Prism®. As diferenças estatísticas entre os dados paramétricos e não paramétricos foram determinadas pela análise de variância ANOVA unidirecional ou bidirecional, assumindo significância quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Triglicerídeos

Pela falta de capacidade dos insetos em sintetizar alguns metabólitos, faz-se preciso que o inseto através de sua alimentação adquira nutrientes, dessa nutrição temos o triacilglicerol como principal componente lipídico da nutrição (BEHMER et al, 1999). Triacilglicerol é a forma como os ácidos graxos são armazenados para a homeostase energética (BEENAKKERS et al. 1985).

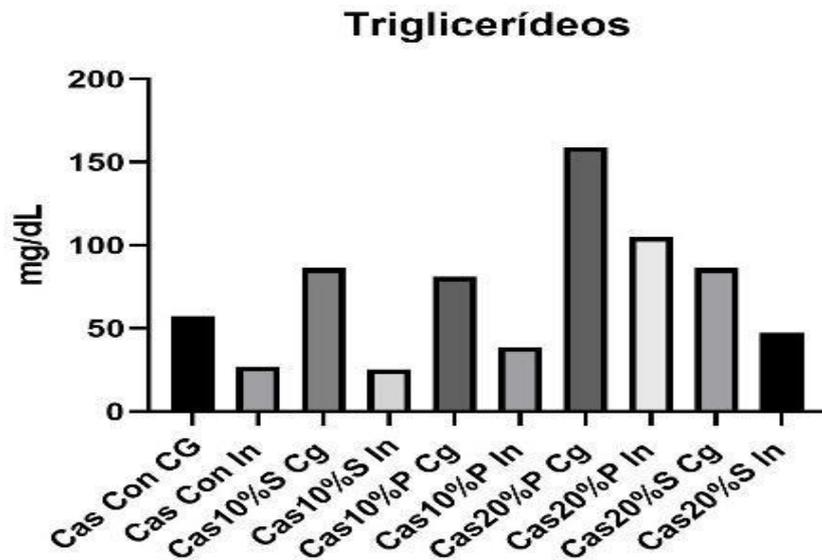
Nos insetos o corpo gorduroso é análogo ao fígado e o tecido adiposo, sendo responsável pela síntese de boa parte das lipoproteínas que está presente na hemolinfa, além de estocar glicogênio e ser o destino final de estocagem de lipídeos (BEENAKKERS ET AL, 1985). Já o intestino do inseto é responsável pela digestão, absorção e transporte de lipídios ingeridos na dieta (TURUNEM et al, 1996).

Nos resultados para o teste de ingestão dos grupos de caseína micelar sódica 10% (cas10%S) e 20% (cas20%S) do corpo gorduroso (Cg), pode-se observar (figura 2) que os níveis de triglicerídeos se mantiveram iguais entre si sem diferença significativa, tendo apenas diferença para o grupo controle, enquanto os índices o grupo de caseína micelar sódica do intestino (In) se mantiveram diferentes sendo a 10% inferior à do grupo 20% o que é esperado já que o intestino de insetos somente digere, absorve e transporta triglicerídeos.

Notamos no grupo de caseína pura 10% (cas10%P) e 20% (cas20%P) que o grupo 20% do corpo gorduroso é maior que 10% do corpo gorduroso, respectivamente os grupos intestinos 10% e 20% seguem os mesmos parâmetros de diferença (figura 2).

A justificativa para tais dados se faz perante o fato de que os grupos de caseína micelar sódica e caseína pura teve maior relevância pois este grupo teve acesso maior a proteína na alimentação do que os insetos da dieta base (farinha de trigo) o que já era esperado. Mas, dentre os grupos de caseína o de mais relevância é a caseína pura por ela ter maior concentração de proteínas (ROMAN, 2005), fez com que o inseto tivesse mais aporte proteico para metabolizar em triglicerídeos.

Figura 2: Quantificação e comparação de triglicerídeos nos grupos: controle corpo gorduroso (Cas Com CG) e intestino (In), caseína micelar sódica 10% e 20% (cas10%S 20%) no corpo gorduroso e intestino, caseína pura 10% e 20% (cas10%P 20%) no corpo gorduroso e intestino. Pelo pelo teste ANOVA One Way.



Fonte: Autor, 2023.

5. 2 Açúcares totais

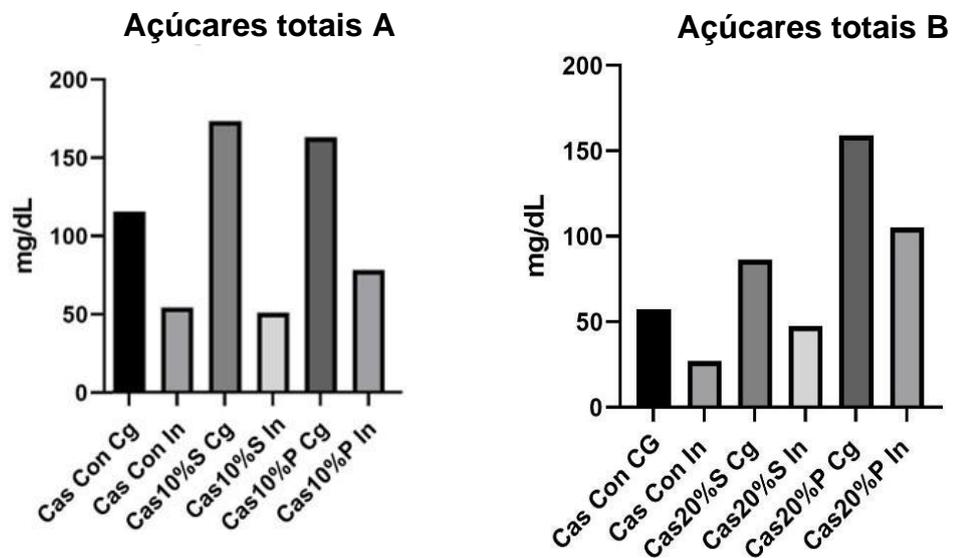
Quando comparamos o grupo controle com os grupos caseína micelar sódica 10% (cas10%S) e 20% (cas20%S) dos corpos gordurosos observamos mudanças significativas onde os grupos tratados com caseína se sobressaem ao grupo controle do corpo gorduroso (cas10%S) em relação ao intestino, enquanto o grupo (cas10%S) corpo gorduroso está muito acima do grupo controle. Se comparamos os grupos de caseína micelar sódica ao grupo caseína pura observamos os grupos de corpo gorduroso se destaca em relação ao grupo somente intestino.

Um das possíveis explicações para tais resultados seria de que a maior estocagem de lipídeos do inseto fique justamente neste órgão – corpo gorduroso, e a sua elevada fonte proteica advinda da alimentação, não há tanta discrepância em comparação de grupo controle e tratado, pois, a farinha de trigo também fornece carboidratos, açúcares e lipídios

No grupo de caseína 20% (figura 3 B), nota-se que existe diferença entre o grupo caseína micelar sódica e pura 20% em relação ao grupo controle, e que o grupo

caseína pura 20% intestino está elevado em relação ao grupo controle e grupo caseína micelar sódica 20% tanto para intestino o corpo gorduroso.

Figura 3: Quantificação e comparação de açúcares totais nos grupos: controle corpo gorduroso (Cas Com CG) e intestino (In), caseína micelar sódica 10% e 20% (cas10%S 20%) no corpo gorduroso e intestino, caseína pura 10% e 20% (cas10%P 20%) no corpo gorduroso e intestino. Pelo teste ANOVA One Way.



Fonte: Autor, 2023.

Não há clareza nesses dados citados acima, em relação ao grupo intestino estar mais elevado que o grupo do corpo gorduroso já que o intestino faz a função de digestão e transporte e não estoca.

6 Conclusão

Conclui-se com o presente trabalho que os estudos feitos com a caseína entre comparações entre tipos e concentrações resultou em pequenas diferenças no grupo tratado em relação ao controle como era esperado. Os resultados de maior relevância estão nas análises de triglicerídeos.

REFERÊNCIAS

- ALVES, Tânia Patrícia Correia. Dieta sem glúten e sem caseína e suplementação de ômega-3 como terapêutica nutricional no autismo. 2017.
- BEENAKKERS, A. M. T.; VAN DER HORST, D. J.; VAN MARREWIJK, W. J. Insect lipids and lipoproteins, and their role in physiological processes. **Progress in Lipid Research**. V.24, n.1, p.19-67, 1985.
- BEHMER, S. T.; ELIAS, D. O.; GREABENOK, R. J. Phytosterol metabolismo and absorption in the generalista grasshopper, *Schistocerca americana* (Orthoptera:criidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. V.42, p.13-25, 1999.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72, 248–254.
- BRASIL, Rafaella Belchior et al. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. 2015. *Ciência Animal* 25 (2): 71-80, 2015. Universidade Federal de Goiás; 2 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Goiás.
- DA SILVA, Lara Bezerra et al. PROTEINA DE NUTRIÇÃO: CASEÍNA. **Mostra Científica em Biomedicina**, v. 4, n. 1, 2019.
- Daumer, K. (1956). Reizmetrische untersuchung des Farbensehens der Bienen. *Z. vergl. Physiol.* 38, 413- 478.
- EISENHARDT, Érika Garcia. Desenvolvimento de um protocolo para microinjeção em insetos utilizando drosophila melanogaster como organismo modelo. Universidade Federal do Pampa, 2016.
(<https://repositorio.unipampa.edu.br/jspui/handle/rii/1328>).
- GOMES, Ian de Oliveira. O papel do fator de transcrição Zelda na regeneração de membros nas larvas do besouro *Tribolium castaneum*. 2022. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, 2022.
- JACOB, Cynthia Renata de Oliveira. Efeitos do inseticida fipronil sobre os corpos pedunculados de operárias de *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). 2012. 85 f. Dissertação - (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2012.
- Klingler, M., Bucher, G. O besouro da farinha vermelha *T. castaneum*: elaborado kit de ferramentas genéticas e triagem de RNAi em larga escala imparcial para estudar a biologia e a evolução dos insetos. *EvoDevo* 13, 14 (2022).
<https://doi.org/10.1186/s13227-022-00201-9>
- Macaya, C.C., Saavedra, P.E., Cepeda, R.E. et al. A *Tribolium castaneum* protocolo de cultura embrionária para estudar os mecanismos moleculares e movimentos

morfológicos envolvidos no desenvolvimento de insetos. *Dev Genes Evol* **226**, 53 – 61 (2016). <https://doi.org/10.1007/s00427-015-0524-1>.

PAGY, Matheus Diniz. Organização neural do complexo central no cérebro da abelha: um estudo comparativo, 2013. 51. Monografia de conclusão do Curso de Especialização do Programa de Pós Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.
<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUBD-9HCMCE>

RICHARDS, S.; GIBBS, R. A.; WEINSTOCK, G. M.; BROWN, S. J. et al. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 452, n. 7190, p. 949-955, Apr 24 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature06784> acessado em: outubro de 2023.

ROMAN, Janesca Alban; SGARBIERI, Valdemiro Carlos. Obtenção e caracterização química e nutricional de diferentes concentrados de caseína. **Revista de Nutrição**, v. 18, p. 75-83, 2005.

SILEEM, T. M.; MEHANY, A. L.; HASSAN, R. S. Toxicidade fumigante de alguns óleos essenciais contra besouros de farinha vermelha, *Tribolium castaneum* (Herbst) e sua segurança para mamíferos. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, p. 769-776, 2019.

SOARES, F. A. C. Composição do leite: fatores que alteram a qualidade química. **Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2013.

TRIPATHI, Arun K. et al. Toxicity, feeding deterrence, and effect of activity of 1, 8-cineole from *Artemisia annua* on progeny production of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of economic entomology**, v. 94, n. 4, p. 979-983, 2001.

TURUNEM, S.; CRAILSSHEIM, K. Lipid and sugar absorption. In: LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P.F. (Eds.). **Biology of insect midgut**. Londres: Chapman & Hall, p.293-320, 1996.