

Chamada CNPq/MCTI-FNDCT CT-Petro Nº 43/2022

Combate à poluição no mar e ambientes marinhos causada pelo plástico e seus subprodutos.

PROJETO DE PESQUISA COMPLETO

Título da Projeto:	Tratamento sustentável de lixo plástico por insetos e aplicação de subprodutos como adubo orgânico e ração animal
Coordenador:	Profa Dra Danielle da Silva Trentin
Instituição Executora:	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)
Instituições Colaboradoras:	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) Universidade de Brasília (UnB) Harvard University (EUA) Regenera Moléculas do Mar
Área do conhecimento Predominante e áreas do conhecimento correlatas	Tratamento biológico de resíduos Polímeros, aplicações Tratamentos e aproveitamento de rejeitos Química orgânica Microbiologia Aplicada Avaliação e análises toxicológicas Oceanografia biológica Fertilidade do solo e adubação
Palavras-chave:	Plásticos, tratamento de lixo, larvas de inseto, biodegradação, economia circular, sustentabilidade.
Resumo do projeto:	O aumento drástico no consumo de plásticos não tem sido acompanhado pelo desenvolvimento de procedimentos de descarte adequado. O acúmulo de lixo plástico nos mares representa um sério problema ambiental enfrentado pela sociedade atualmente. A capacidade de larvas de insetos em consumir e biodegradar plásticos tem despertado o interesse da comunidade científica e não científica dada a implicação como alternativa biotecnológica promissora a para biodegradação de plásticos. <i>Galleria mellonella</i> e <i>Tenebrio molitor</i> são as espécies mais estudadas para esse fim, e são capazes de biodegradar diversos tipos de plásticos a taxas muito superiores quando comparadas àquelas já descritas para microrganismos. Até o momento, os estudos relacionados a este tema concentram-se em pesquisas básicas e sugerem a aplicação das larvas de insetos como agentes de biodegradação. A presente proposta trata do planejamento,

	desenvolvimento e construção de um protótipo de estação de tratamento de lixo plástico, oriundo de ambiente aquático, por larvas de <i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i> em escala laboratorial. Este protótipo poderá ser posteriormente escalonado em um sistema que seja factível de ser estruturado em ambiente terrestre ou em plataforma marítima. Espera-se que a utilização sequencial de distintas espécies de insetos contribua na eficácia da biodegradação de plásticos e forneça a oportunidade de desenvolver um sistema de economia circular e ambientalmente sustentável, através do aproveitamento de subprodutos como matéria-prima de interesse comercial (carbonato, adubo orgânico e/ou ração animal). Atualmente somos o único grupo de pesquisa brasileiro estudando a biodegradação de plásticos por <i>G. mellonella</i> , e para o desenvolvimento desse projeto estruturamos uma equipe multi e interdisciplinar, envolvendo 7 instituições de pesquisa. Esta solução biotecnológica inovadora e inédita para o gerenciamento do lixo plástico aquático, está em consonância com os ODS da Agenda 2030 da ONU e o PNCLM.
Objetivo geral:	O objetivo geral deste projeto é a elaboração, o desenvolvimento e a construção de um protótipo de estação de tratamento de lixo plástico, oriundo de ambiente aquático, utilizando os insetos <i>Galleria mellonella</i> e <i>Tenebrio molitor</i> e, o aproveitamento dos resíduos gerados como produtos de interesse comercial (carbonato, adubo orgânico e/ou ração animal). Adicionalmente, visa aproximar a ciência e a sociedade, através de um plano de divulgação científica para público não especializado que envolve redes sociais e atividades educacionais em parceria com instituições de educação básica, com o intuito de promover a conscientização do uso de plásticos e impactos da poluição plástica no meio ambiente. Trata-se de uma proposta de solução biotecnológica inovadora, inédita e escalonável, em consonância com a economia circular e com o Plano Nacional de Combate ao Lixo no Mar, para o gerenciamento ambientalmente sustentável do lixo plástico de origem aquática e para a popularização da ciência.
Objetivos específicos:	- Realizar a coleta e caracterização do lixo plástico proveniente do estuário Lagoa dos Patos e da Ecobarreira Arroio Dilúvio. - Planejar e desenvolver um protótipo efetivo de uma estação de tratamento de resíduos plásticos através do uso sequencial de larvas de <i>Galleria mellonella</i> e <i>Tenebrio molitor</i> como agentes de biodegradação. - Detectar a presença de micro ou nanoplásticos no material orgânico residual gerado. - Realizar a caracterização química e ecotoxicológica do material orgânico gerado para a potencial

	aplicação como matéria-prima para adubo orgânico. - Realizar a caracterização bioquímica (valor nutricional), microbiológica e toxicológica do material orgânico gerado para a potencial aplicação como matéria-prima para ração animal. - Detectar os gases gerados a partir da biodegradação dos plásticos e transformar o CO ₂ em carbonatos de interesse comercial.
--	--

Assinale com um X a linha de pesquisa que o projeto se enquadra: (Marcar apenas uma linha)

()	Quantificação e tipificação do plástico.
(X)	Tecnologias para decomposição, tratamento e substituição do plástico.
()	Redes de monitoramento da cadeia produtiva do plástico incluindo descarte e reciclagem.

ATENÇÃO: FAVOR RESPONDER ÀS PERGUNTAS ABAIXO

A pesquisa contempla ações para soluções aos desafios postos pelos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS), da Agenda 2030 da ONU (<https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>).

☒ SIM ☐ NÃO

Em caso afirmativo, citar quais objetivos e metas ODS receberão a contribuição:

Esse projeto contribuirá com pelo menos 4 objetivos de desenvolvimento sustentável da Agenda 2030 da ONU, a saber:

Objetivo 6. Assegurar a disponibilidade e gestão sustentável da água e saneamento para todas e todos.

Meta 6.3 Até 2030, melhorar a qualidade da água, reduzindo a poluição, eliminando despejo e minimizando a liberação de produtos químicos e materiais perigosos, reduzindo à metade a proporção de águas residuais não tratadas e aumentando substancialmente a reciclagem e reutilização segura globalmente.

Objetivo 11. Tornar as cidades e os assentamentos humanos inclusivos, seguros, resilientes e sustentáveis.

Meta 11.6 Até 2030, reduzir o impacto ambiental negativo per capita das cidades, inclusive

prestando especial atenção à qualidade do ar, gestão de resíduos municipais e outros.

Objetivo 12. Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis.

Meta 12.4 Até 2020, alcançar o manejo ambientalmente saudável dos produtos químicos e todos os resíduos, ao longo de todo o ciclo de vida destes, de acordo com os marcos internacionais acordados, e reduzir significativamente a liberação destes para o ar, água e solo, para minimizar seus impactos negativos sobre a saúde humana e o meio ambiente.

Meta 12.5 Até 2030, reduzir substancialmente a geração de resíduos por meio da prevenção, redução, reciclagem e reuso.

12.c Racionalizar subsídios ineficientes aos combustíveis fósseis, que encorajam o consumo exagerado, eliminando as distorções de mercado, de acordo com as circunstâncias nacionais, inclusive por meio da reestruturação fiscal e a eliminação gradual desses subsídios prejudiciais, caso existam, para refletir os seus impactos ambientais, tendo plenamente em conta as necessidades específicas e condições dos países em desenvolvimento e minimizando os possíveis impactos adversos sobre o seu desenvolvimento de uma forma que proteja os pobres e as comunidades afetadas.

Objetivo 14. Conservação e uso sustentável dos oceanos, dos mares e dos recursos marinhos para o desenvolvimento sustentável.

Meta 14.1 Até 2025, prevenir e reduzir significativamente a poluição marinha de todos os tipos, especialmente a advinda de atividades terrestres, incluindo detritos marinhos e a poluição por nutrientes.

DETALHAMENTO DA PROPOSTA

a) Qualificação do principal problema a ser abordado:

Plásticos são polímeros sintéticos derivados de fontes naturais não renováveis e renováveis (celulose, carvão, gás natural e petróleo bruto) obtidos por meio de processos de polimerização. Estes materiais são projetados para atender diferentes necessidades de uma variedade de produtos e por isso, suas propriedades têm sido continuamente aprimoradas (PLASTICS EUROPE, 2021; THE WORLD COUNTS, 2021). Como resultado de sua ampla utilização, houve uma elevada produção mundial de plástico em 2020, estimada em 367 milhões de toneladas (PLASTICS EUROPE, 2021), e o Brasil contribuiu com 7,1 milhões de toneladas desta produção (1,8% da produção mundial no mesmo período) (ABIPLAST, 2021).

Segundo o Plano Nacional de Combate ao Lixo no Mar (PNCLM), plásticos, borrachas, metais, vidros, têxteis e papéis constituem majoritariamente o lixo do mar, sendo o resíduo plástico responsável por 90% de todo lixo monitorado em praias e restingas do

litoral brasileiro (BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, PLANO NACIONAL DE COMBATE DE LIXO NO MAR). Plásticos como poliéster, polietileno (PE), polipropileno (PP), policloreto de vinila (PVC) e poliestireno (PS) são facilmente encontrados em todos os ambientes aquáticos devido à sua característica de baixa densidade que facilita a dispersão destes materiais (PINHEIRO et al., 2021). Em 2010, cerca de 12 milhões de toneladas de plásticos foram introduzidos nos oceanos por países costeiros de todos os continentes (JAMBECK et al., 2015). Neste contexto, o PNCLM ainda ressalta a importância da conscientização de geração e gestão de resíduos sólidos, principalmente em áreas urbanas, uma vez que aproximadamente 80% do lixo no mar é originado no continente (BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, PLANO NACIONAL DE COMBATE DE LIXO NO MAR). Estima-se que a entrada global de plásticos no oceano a partir de sistemas ribeirinhos foi de 57.000 a 265.000 toneladas em 2018, da qual rios asiáticos foram os principais responsáveis (69%), seguido dos rios da América do Sul (13%), América do Norte (7,1%), América Central (5,5%), Europa (5%), e África e Oceania (0,5%) (PINHEIRO et al., 2021). Estes dados demonstram que a poluição plástica representa uma ameaça ecológica cada vez maior à vida selvagem terrestre e marinha. Estudos demonstram que a contaminação por plásticos nestes ambientes tem efeitos mortais em animais que ingerem ou ficam presos em detritos plásticos (NELMS, et al 2016).

O processo de degradação de plásticos no meio ambiente pode ocorrer por pelo menos um ou pela combinação de quatro mecanismos gerais, como a fotodegradação, a hidrólise, da degradação termoxidativa e a biodegradação (ALI et al., 2021; PIVATO et al., 2022). Em condições naturais (ambiente aquático, solo, etc.), o processo de degradação inicia com fotodegradação (principalmente devido à radiação UV-B) e prossegue com a termoxidação e, em menor grau, por hidrólise, ocasionando fragmentação destes materiais (ALI et al., 2021). Em ambientes aquáticos, estes eventos geram partículas menores conhecidas como microplásticos (<5 mm), cujo tamanho pode ser similar ao plâncton (0,2 a 200 µm), e devido a isto possuem capacidade de causar danos, tornar-se biodisponível, e ser transferido ao longo da teia trófica (PINHEIRO et al., 2021). Parte do plástico abioticamente degradado pode ser afetado por fatores bióticos através de um processo conhecido como biodegradação. O processo de biodegradação ocorre em quatro etapas: (i) biodeterioração, onde enzimas microbianas são secretadas no ambiente e podem atuar diretamente na superfície plástica; (ii) biofragmentação, na qual oligômeros com cerca de 500 Da são liberados através da despolimerização; (iii) bioassimilação, os oligômeros formados permeiam através da parede e membrana celular de microrganismos e são hidrolisados a monômeros pelas enzimas intracelulares, os quais são assimilados e utilizados na produção de biomassa celular; e (iv) biomineralização, etapa em que a biomassa é completamente metabolizada pelos microrganismos como constituinte

elementar e biomineralizada na forma de CO₂ ou metano (dependendo da disponibilidade de oxigênio) e H₂O (ALI et al., 2021; PIVATO et al., 2022).

A biodegradação de plásticos por microrganismos no ambiente é extremamente lenta, sendo estimado que uma taxa de 11 µm/ano para a superfície de sacolas plásticas, e é previsto que uma garrafa plástica permaneça cerca de 116 ou 500 anos, quando em ambiente marinho e terrestre, respectivamente (CHAMAS et al., 2020). Atualmente, os principais métodos utilizados no gerenciamento de resíduos plásticos são a reciclagem, a incineração e a disposição em aterro sanitário (PLASTICS EUROPE, 2021). Dados sobre a reciclagem de resíduo plástico no Brasil são inconsistentes e variaram de 1,28% (CUFFARI, 2019) a 23,1% (ABIPLAST, 2021), no ano de 2020. Isto significa que cerca de 67% dos resíduos plásticos gerados no país foram depositados em aterros sanitários e na natureza (CUFFARI, 2019).

Neste contexto, a partir de 2010, começaram a surgir relatos na literatura sobre o consumo e biodegradação de plásticos por larvas de insetos (PIVATO et al., 2022). Desde então, este assunto é considerado um *hot topic*, e despertou interesse da comunidade científica e não científica (THE GARDIAN, 2017; BBC NEWS, 2017) dada a implicação como uma alternativa biotecnológica promissora a para biodegradação de plásticos. Dentre as 12 espécies de insetos já relatadas na literatura por suas capacidades de consumir e até digerir plásticos, *Tenebrio molitor* e *Galleria mellonella* são as espécies mais estudadas para esse processo (PIVATO et al., 2022).

T. molitor, larva da farinha, é um inseto pertencente à família Tenebrionidae e à ordem Coleoptera, encontrado em todo o mundo. Esse animal alimenta-se naturalmente de farinha e outros produtos de grãos, embora não esteja associado a danos às plantações (HOWARD, 1955). Outras fontes de alimento para este inseto incluem os resíduos e os subprodutos orgânicos, como resíduos de restaurantes e domésticos, subprodutos de matadouros, estrume animal e resíduos de jardinagem (HARSÁNYI et al., 2020). Por este motivo, larvas de *T. molitor* são utilizadas na bioconversão alimentar de resíduos, pois emitem menos gases de efeito estufa (como CO₂) em comparação a suínos e ruminantes (OONINCX et al., 2010). De acordo com a literatura, durante o consumo destes resíduos orgânicos não há emissão de gás metano (HACKSTEIN E STUMM, 1994; OONINCX et al., 2010). O ciclo de vida deste inseto é constituído por quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto (besouro). O período larval varia de 22 a 100 dias, enquanto o período pupal dura cerca de 8 dias (SIMON et al., 2013), dependendo de condições de umidade e temperatura e da disponibilidade de fontes nutricionais. Em 2015, Yang e colaboradores relataram, pela primeira vez, que larvas de *T. molitor* alimentadas com PS como dieta única sobreviveram e se comportaram como aquelas alimentadas com farelo por um período de 1 mês. Os autores confirmaram a clivagem da cadeia polimérica do PS e a formação de metabólitos

despolimerizados no intestino larval, e importantemente evidenciaram que 47,7 % do PS é biomineralizado em CO₂ e incorporado aos lipídios do inseto (YANG et al., 2015). O processo de biodegradação do PS virgem por larvas de *T. molitor* é descrito na literatura (YANG et al., 2015b, 2015c, YANG et al., 2018a). Resumidamente, (i) o polímero é fragmentado em partículas menores pela mastigação, (ii) as partículas ingeridas são despolimerizadas em compostos de baixa massa molecular por enzimas extracelulares secretadas pela microbiota intestinal, (iii) os produtos são biomineralizados em CO₂ por vários microrganismos e/ou pelas próprias larvas, e os carbonos dos produtos são assimilado na biomassa; e (iv) finalmente, os fragmentos residuais de plástico e outros intermediários são excretados nas fezes das larvas (YANG et al., 2015b, 2015c, YANG et al., 2018a). Adicionalmente, também foi relatado na literatura que larvas de *T. molitor* são capazes de biomineralizar PE em 40% de CO₂ (YANG et al., 2021), e PVC em 0,003% de HCl (PENG et al., 2020). Além dos plásticos citados, este animal também é capaz de consumir outros tipos, como PP, poliácido láctico (PLA), poliuretano (PU) e politereftalato de etileno (PET), demonstrando a capacidade do inseto *T. molitor* no processo de biodegradação plástica (PENG et al., 2019; WANG et al., 2022; BEALE et al., 2022).

G. mellonella, a traça maior da cera, é um inseto pertencente à família Pyralidae e à ordem Lepidoptera, encontrado em todo o mundo e conhecido por invadir e danificar colmeias de abelhas. De forma semelhante ao *T. molitor*, seu ciclo de vida é constituído por quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto (mariposa), e o tamanho do ciclo varia dependendo de condições de umidade e temperatura e da disponibilidade de fontes nutricionais. Assim, os ovos levam de 3 a 30 dias para eclodirem em larvas, já a fase larval pode durar cerca de 28 dias a 5 meses (WILLIAMS, 1997). O estágio de pupa leva de 1 a 9 semanas, e as mariposas adultas podem durar cerca de 12 dias (fêmea) e 21 dias (macho). Após o acasalamento, a fêmea oviposita em média 700 ovos (ELLIS et al., 2013; NOMURA et al., 2006; SHIMANUKI, 1981). Em 2017, Bombelli e colaboradores relataram pela primeira vez a capacidade de larvas de *G. mellonella* em consumir PE a uma taxa de 1,84 mg.larva⁻¹.d⁻¹, muito superior às taxas de biodegradação relatadas para microrganismos (BOMBELLI et al., 2017). Apesar da maioria dos trabalhos na literatura tratar sobre a biodegradação de PE por larvas de *G. mellonella*, estudos recentes mostram que este inseto apresenta capacidade para biodegradar outros plásticos como PS, PP, PU, PET e o copolímero acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS) (ZHU et al., 2021; BARRIONUEVO et al., 2022; BEALE et al., 2022).

Interessantemente, estudos envolvendo a biodegradação de plásticos por larvas de *G. mellonella* e *T. molitor* evidenciaram que a alimentação dos animais com materiais plásticos suplementada com uma fonte de alimento nutritivo é essencial para que estes insetos possam completar seus ciclos de vida, e eventualmente aumentar o consumo de

plásticos (BRANDON et al., 2018; PENG et al., 2019; LOU et al., 2021; ZHONG et al., 2021; RÉJASSE et al., 2022). Para larvas de *T. molitor*, Brandon e colaboradores (2018) observaram um aumento de 28% e 38%, respectivamente, nas taxas de consumo de PE ($0,32 \text{ mg.larva}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e PS ($0,29 \text{ mg.larva}^{-1}.\text{d}^{-1}$) na co-alimentação com farelo de trigo (proporção plástico:farelo 1:1 m/m) em comparação com as taxas da dieta constituída somente pelos plásticos (BRANDON et al., 2018). Semelhantemente, larvas de *G. mellonella*, quando submetidas à co-alimentação de PE e pólen, apresentaram uma taxa de consumo de $0,48 \text{ mg.larva}^{-1}.\text{d}^{-1}$, a qual foi 23% maior que a taxa de consumo quando somente PE foi oferecido como fonte de alimentação (RÉJASSE et al., 2022).

Nosso grupo de pesquisa é pioneiro e, até o momento, único no Rio Grande do Sul na criação laboratorial e uso de *G. mellonella* como hospedeiro para infecção microbiana. Desde o ano 2000, esses invertebrados vêm sendo utilizados como modelo experimental alternativo *in vivo* para pesquisa microbiológica (TSAI et al., 2016), tendo grande aceitação da comunidade científica, o que pode ser evidenciado através das nossas pesquisas (SILVA et al., 2017; SILVA et al., 2018; CAMPOS-SILVA et al., 2019; PINTO et al., 2020). Além disso, cabe destacar que somos o único grupo no Brasil que atua no estudo na biodegradação de plásticos por larvas de *G. mellonella*. Esta recente e promissora linha de pesquisa surgiu em 2018, quando observamos que esses animais em estágios larvais eram capazes de danificar, através da sua ingestão, potes plásticos em que estavam armazenados. Assim, dada a originalidade e relevância para o desenvolvimento técnico, científico e de inovação, o projeto de pesquisa intitulado “Como as larvas de *Galleria mellonella* são capazes de degradar plástico sintético?”, coordenado pela Profª Drª Danielle Trentin, foi um dos 24 selecionados dentre as 663 inscrições para o edital do Instituto Serrapilheira de 2018, sendo pioneiro e único na UFCSPA.

Desde então, os grupos de pesquisa da PUCRS e da UFMS vêm colaborando neste estudo através da caracterização físico-química dos materiais plásticos e análises biológicas para elucidar o processo bioquímico de biodegradação. Através da utilização de diferentes técnicas de análises físico-químicas, evidenciamos que parte do PE é fragmentado mecanicamente pelas larvas e após ser ingerido, é metabolizado e atinge a hemolinfa do animal (absorvido), sendo que alguns produtos de biodegradação estão presentes no casulo de seda produzido pelas larvas (PIVATO et al, 2021). Esses resultados foram obtidos no trabalho de mestrado da aluna Andressa Pivato, exemplificando a contínua formação de recursos humanos em uma área de interface do conhecimento entre a química, biologia, microbiologia e biotecnologia. Também observamos, em outro estudo em andamento, que as taxas de consumo de polimetilmetacrilato (PMMA) moído (tamanho de partícula < 1 mm) por larvas de *G. mellonella* é 1,1 vezes maior do que a taxa de consumo desse plástico fragmentado (tamanho de partícula < 6,3 mm). Esse resultado está de acordo com o que foi

relatado por Zhu e colaboradores (2021), que observaram um aumento de 2,5 vezes no consumo de PS por *G. mellonella* quando este foi fornecido em escala micrométrica (tamanho de partícula < 125 µm) (ZHU et al., 2021). Estes dados sugerem que processos de trituração do plástico antes da sua exposição às larvas de inseto promove o aumento das taxas de consumo, e possivelmente da biodegradação.

A utilização de larvas de inseto para a biodegradação de plásticos fornece a oportunidade de desenvolvimento de um sistema de economia circular e ambientalmente sustentável, através da associação do processo de biodegradação de plásticos com estratégias eficientes de aproveitamento destas larvas como produtos de valor agregado (como farinhas, óleos, extratos protéicos e adubos orgânicos) (SANGIORGIO et al., 2021). Nesse contexto, há um grande potencial no uso de farinhas de insetos como ração animal, uma vez que se constitui de um material rico em nutrientes como proteínas, aminoácidos essenciais, lipídios, fibras, minerais e vitaminas (HAUPT, 2019; SRIPRABLOM et al., 2022). As principais vantagens do uso de insetos como fonte protéica, em comparação com a pecuária convencional, incluem (i) redução das áreas de pastagem, o que acarreta em menor emissão de gases de efeito estufa e no uso da água, e (ii) maior eficiência de conversão alimentar. Curiosamente, espécies de insetos relatados como biodegradadores de plásticos, tais como *T. molitor*, *Zophobas atratus*, *G. mellonella* e *Achroia grisella*, podem ser aplicados para este fim, como proposto pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) (SRIPRABLOM et al., 2022). *T. molitor* é o primeiro inseto aprovado como novo alimento pela União Europeia (Regulamento de Implementação da Comissão 2021/882), após a avaliação favorável da EFSA sobre os riscos potenciais associados ao consumo desse inseto, como a presença e acúmulo de parasitas, microorganismos, micotoxinas e metais pesados (SANGIORGIO et al., 2021). Além disso, adubos orgânicos alternativos, obtidos a partir de larvas de insetos, estão sendo desenvolvidos para minimizar o impacto ambiental adverso dos agentes químicos fitofarmacêuticos. Przemieniecki e colaboradores (2021) utilizaram farelo de larvas de *T. molitor* como adubo orgânico, o qual foi incorporado a um fertilizante com alto teor de nitrogênio orgânico. Os autores avaliaram o efeito dessa mistura no crescimento do trigo, microorganismos do solo e da rizosfera, incluindo fungos fitopatogênicos do gênero *Fusarium*, e ciclo de nitrogênio. Como resultado foi observado que a presença do farelo das larvas contribuiu para o aumento das concentrações de fósforo, potássio e magnésio no solo. Além disso, estimulou o crescimento de bactérias do gênero *Bacillus*, as quais são rizobactérias promotoras de crescimento vegetal e utilizadas como agente de controle biológico de fitopatógenos. Portanto, a mistura obtida a partir de farelo de larvas de *T. molitor* oferece uma alternativa viável aos fertilizantes minerais (PRZEMIENIECKI et al., 2021).

Nesse contexto, o objetivo do projeto proposto é a elaboração, o desenvolvimento e

a construção em escala laboratorial de uma estação de tratamento de lixo plástico, oriundos de ambientes aquáticos, através do uso sequencial de larvas dos insetos *G. mellonella* e *T. molitor*, com o aproveitamento dos resíduos gerados como adubo orgânico e ração animal. Destaca-se que o desenvolvimento desse projeto trará uma solução biotecnológica inovadora, inédita, e escalonável, em consonância com a economia circular, objetivos de desenvolvimento sustentável da Agenda 2030 da ONU, bem como com o PNCLM, para o gerenciamento ambientalmente sustentável do lixo plástico aquático.

b) Metodologia a ser empregada:

1. Lixo plástico de origem aquática

O lixo plástico será obtido de duas fontes aquáticas: (i) através de coleta na Ecobarreira Arroio Dilúvio, uma barreira ecológica que barra todo o lixo flutuante, descartado incorretamente no Arroio Dilúvio, impedindo que chegue e contamine as águas do Lago Guaíba, em Porto Alegre (RS), e (ii) coleta no entorno do maior estuário do RS, o Estuário da Lagoa dos Patos (coordenadas geográficas: 32° 09' 09.3"S e 52° 06' 03.1"O), ambiente de transição entre o continente e o oceano, o qual recebe contaminação por resíduos plásticos de ambos os ambientes, com registro de até 22 itens.m⁻² (PINHEIRO et al., 2021). O lixo plástico será coletado e transportado até a UFCSPA por prestação de serviço terceirizado. Esses materiais irão entrar na estação de tratamento sem lavagem prévia, mantendo a presença de possíveis microrganismos aderidos aos plásticos.

1.1. Caracterização do lixo plástico recolhido

O lixo plástico será inicialmente avaliado qualitativamente quanto a suas características estruturais (estrutura química) por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). As análises de infravermelho serão realizadas em equipamento *Perkin Elmer Instruments Spectrum One FT-IR Spectrometer* e a aquisição do espectro será feita com o acessório de amostras UATR (acessório de refletância atenuada total universal) no intervalo de número de onda de 4000 a 650 cm⁻¹ e 12 varreduras. Esta análise será realizada no Laboratório de Espectroscopia da Escola Politécnica/PUCRS. Além disso, serão realizadas análise elementar (teores de carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre), análise imediata (carbono fixo, umidade, teor de cinzas, matéria volátil) e de cromatografia de permeação em gel (GPC) por meio de prestação de serviços terceirizados.

2. Insetos biodegradadores de plásticos

2.1. *Galleria mellonella*

O ciclo de vida do inseto *G. mellonella* é mantido no Laboratório de Bacteriologia e Modelos Experimentais Alternativos da UFCSPA sob temperatura controlada de 22 a 32 °C,

sendo as larvas alimentadas com dieta laboratorial (composta por farinha de trigo, farelo de trigo grosso, gérmen de trigo, leite em pó, mel líquido, glicerol e açúcar mascavo). Para que todo o ciclo de vida do inseto ocorra de forma natural dentro da estação de tratamento, larvas em diferentes instares (estágio de desenvolvimento larval) serão adicionadas na primeira batelada. Além disso, será fornecido a esses insetos uma co-alimentação de farelo de trigo e plástico (3:7 m/m).

2.2. *Tenebrio molitor*

Larvas de *T. molitor* serão fornecidas pela empresa Nui Insect Science Serviços em Pesquisa Científica e Inovação Tecnológica Ltda (Pelotas, RS). Igualmente a *G. mellonella*, larvas de *T. molitor* em diferentes instares serão adicionadas na primeira batelada para que todo o ciclo de vida do inseto ocorra de forma natural dentro da estação de tratamento. Além disso, será fornecido a esses insetos uma alimentação constituída de matéria orgânica proveniente de *G. mellonella* (insetos, fezes e casulos), plástico residual e seus produtos que eventualmente não foram metabolizados na primeira etapa de biodegradação na estação de tratamento.

3. Projeto, desenvolvimento e construção de uma estação de tratamento de lixo plástico aquático por larvas de insetos

A estação de tratamento de lixo plástico em escala laboratorial será um protótipo para posterior escalonamento de um sistema que seja factível de ser estruturado em ambiente terrestre ou em plataforma marítima. Trata-se de um sistema contínuo de biodegradação sequencial de lixo plástico por larvas de *G. mellonella* e *T. molitor* em biorreatores de 10 litros, uma vez que é esperado a presença de plástico residual nas excretas dos animais presentes no primeiro biorreator. Assim, o uso sequencial de duas espécies de insetos, em co-alimentação, amplia a possibilidade de completa biodegradação das partículas plásticas que entrarão no sistema. O processo de tratamento dos resíduos plásticos consistirá em cinco etapas principais: (i) trituração seguida de peneiramento (30 mesh) e deslocamento do material através de rosca transportadora, (ii) biorreator 1, local de ação das larvas de *G. mellonella*, (iii) trituração e deslocamento do material através de rosca transportadora, (iv) biorreator 2, local de ação das larvas de *T. molitor* e (v) trituração e coleta do subproduto (Figura 1). Pontos de amostragem serão adicionados após as etapas de trituração (iii e v) para permitir a coleta e caracterização dos materiais.

3.1 Entrada de lixo plástico no sistema

Aproximadamente 4,2 quilos de lixo plástico, provenientes de fontes aquáticas, entrarão na estação de tratamento (Figura 1) sem lavagem prévia. Concomitantemente,

Diagrama de um sistema de biorrefino de resíduos plásticos e farelo de trigo. O processo começa com a entrada de "Lixo plástico" e "Farelo de trigo" em um tanque de mistura (T1). A mistura é bombeada (P) para um reator (R1) com uma coluna de troca iônica (S1). O reator é conectado a um tanque de separação (J1) que contém uma cultura de larvas de *Galleria mellonella* (B1). O tanque J1 tem um manômetro (MN 1) e uma válvula (V2). O líquido do tanque J1 é bombeado para um segundo reator (R2) com uma coluna de troca iônica (S2). O reator R2 é conectado a um tanque de separação (J2) que contém uma cultura de larvas de *Tenebrio molitor* (B2). O tanque J2 tem um manômetro (MN 2) e uma válvula (V4). O líquido do tanque J2 é bombeado para um tanque de lavagem alcalina de gases (V5) e depois para um tanque de carbonato. O líquido do tanque J2 também é bombeado para um tanque de matéria orgânica (T3). A matéria orgânica é usada para produzir adubo orgânico e/ou ração animal. O ciclo de vida de *Tenebrio molitor* é mostrado no tanque J2.

Transportadora (R1), Substrato 1 (S1), Válvula de fundo 2 (V2), Janela 1 (J1), Biorreator 1 (B1), Medidor de Nível 1 (MN 1), Válvula de fundo 3 (V3), Triturador 2 (T2), Substrato 2 (S2), Rosca Transportadora (R2), Janela 2 (J2), Biorreator (B2), Medidor de Nível 2 (MN 2), Válvula de fundo 4 (V4), Triturador 3 (T3) e Válvula agulha (V5).

3.1.1 Uso de micropartículas de plásticos fluorescentes

Para detectar a possível presença de micro e/ou nanoplástico na matéria orgânica final da estação de tratamento, em uma das bateladas, micropartículas de plásticos fluorescentes (Cospheric LLC, EUA e Thermo Fisher Scientific, Brasil) serão adicionadas ao lixo plástico triturado e entrarão no sistema através do biorreator B1.

3.2 Biorreator 1: *Galleria mellonella*

O substrato S1 será transferido para o biorreator B1, que será construído em inox com janela (J1) para proporcionar a visualização do conteúdo interno, onde larvas de *G. mellonella* em diferentes instares serão adicionadas. Assim, todo o ciclo de vida do animal, envolvendo os estágios de larva, pupa, mariposa adulta macho e fêmea e ovo, ocorrerá dentro do biorreator B1.

O biorreator B1 irá possuir fundo em funil, de modo que as larvas fiquem em contato com o substrato S1. O fluxo de material será controlado, pelo medidor de nível MN1, para formação de uma coluna de ar na parte superior do biorreator, a qual é necessária para o desenvolvimento dos animais e acasalamento das mariposas adultas. Na parte superior do biorreator B1 haverá um sistema de abertura acoplado a uma tela de inox, para evitar a saída dos insetos.

Considerando a taxa média de consumo de plástico triturado por larvas de *G. mellonella* determinada pelo nosso grupo em experimentos prévios ($0,1 \text{ mg.dia}^{-1}.\text{larva}^{-1}$) e o tempo necessário para completar o ciclo de vida do inseto dentro do biorreator B1, inicialmente o material ficará exposto à ação das larvas de *G. mellonella* (e seus microrganismos) durante 30 dias. Posteriormente, a válvula de fundo V3 do biorreator B1 será aberta para que o material residual (insetos, resíduos por eles produzidos, como casulo de seda e fezes, farelo de trigo, plásticos e seu subprodutos), nomeado substrato S2, passe pelo triturador T2 e seja deslocado pela rosca transportadora R2 para biorreator B2.

3.3 Biorreator 2: *Tenebrio molitor*

Ao biorreator B2, que será construído em inox e contará com janela (J2) para proporcionar a visualização do conteúdo interno, serão adicionadas larvas de *T. molitor* em diferentes estágios de desenvolvimento. Todo o ciclo de vida do animal, envolvendo os estágios de larva, pupa, besouro adulto macho e fêmea e ovo, ocorrerá dentro do biorreator

B2.

O substrato S2 servirá como fonte nutricional para possibilitar que segundo inseto *T. molitor* complete seu ciclo de vida e consuma maior quantidade de plástico, visto que esses animais se alimentam no ambiente com matéria orgânica. O substrato S2 entrará pela parte superior do biorreator B2, o qual também possuirá um fundo em funil, possibilitando o contato com as larvas. O fluxo de material será controlado, pelo medidor de nível MN2, para formação de uma coluna de ar na parte superior do biorreator B2, a qual é necessária para o desenvolvimento dos animais e acasalamento dos besouros adultos. Na parte lateral do biorreator B2 haverá um sistema de abertura acoplado a uma tela de inox, para evitar a saída dos animais.

Considerando a taxa de biodegradação de plástico por larvas de *T. molitor* ($0,3 \text{ mg.dia}^{-1}.\text{larva}^{-1}$) e o tempo necessário para se obter todo o ciclo de vida do animal dentro do biorreator, inicialmente o substrato S2 ficará exposto à ação de larvas de *T. molitor* (e seus microrganismos) durante 30 dias. Relatos da literatura demonstram que *T. molitor* é capaz de biodegradar 47,7% de PS e 40% de PE em seu produto (CO_2) e 0,03% de PVC em HCl (Yang et al., 2015; Yang et al., 2021; Peng et al., 2020). Considerando que haverá uma mistura de plásticos entrando no sistema, estima-se que a produção de HCl seja inferior a essa taxa, sendo o CO_2 o efluente gasoso majoritário. Dessa forma, os gases gerados serão coletados a partir da válvula agulha V5 acoplada em uma abertura do biorreator B2 para posterior análise e tratamento dos mesmos.

A válvula de fundo V4 do biorreator B2 será aberta para que a massa produzida, incluindo os insetos de *T. molitor*, passe pelo triturador T3 e obtenha-se o material orgânico final. Espera-se que após os 30 dias do material no biorreator B2 o sistema entre em fluxo contínuo, com aproximadamente 100 g de substrato S1.dia^{-1} entrando no biorreator B1 e a mesma taxa de substrato S2 entre no biorreator B2. Assim, calcula-se que no 40º dia, 1 quilo do substrato S1 entre no biorreator B1, e que haverá a saída de 1 quilo do substrato S2 para entrada no biorreator B2.

4. Estudo e caracterização dos subprodutos durante e após o processo de tratamento

4.1 Detecção e tratamento de gases

Durante a permanência do substrato S2 no biorreator B2, espera-se obter como gás majoritário o gás carbônico (CO_2), conhecido como produto de biodegradação do plástico em atmosfera aeróbia e gerado nesse processo por larvas de *T. molitor* e seus microrganismos. Nesse sentido, o gás gerado será coletado a partir do biorreator B2 e analisado quali e quantitativamente por Cromatografia Gasosa (CG) por meio de prestação de serviço terceirizado. Como método de tratamento para o gás gerado, um lavador de gases será acoplado a estação de tratamento, no qual passará uma solução alcalina, com o

objetivo de capturar o CO₂ e transformá-lo em carbonatos insolúveis metálicos (carbonato de cálcio, bário, etc.), que sejam de interesse comercial. Caso uma pequena fração de HCl seja gerada no biorreator B2, este mesmo tratamento poderá ser aplicado para neutralização do ácido, obtendo-se como produto cloretos, como cloreto de cálcio ou de bário. Para verificar o grau de pureza do carbonato, devido a possível formação de cloreto, será realizada análise termogravimétrica (TGA) no Laboratório de Caracterização de Materiais da Escola Politécnica da PUCRS, em um equipamento SDT Q600 (TA Instruments, EUA) aplicando-se uma rampa de aquecimento da temperatura ambiente até 1000 °C a uma taxa de 20 °C.min⁻¹.

4.2 Avaliação do material orgânico

Amostras coletadas após as etapas de trituração, bem como o material orgânico residual da estação de tratamento, composto por restos de *T. molitor*, *G. mellonella* e microrganismos, será caracterizado por diversas técnicas físico-químicas a fim de conhecer sua composição elementar e química, bem como detectar possível presença residual de plásticos.

4.2.1 Caracterização do material orgânico residual

4.2.1.1 Análise elementar e imediata

Após a coleta de material orgânico residual (final do biorreator B2) e nos pontos de amostragem, definidos no item 3, serão realizadas análise elementar (teores de carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre) e análise imediata (carbono fixo, umidade, teor de cinzas, matéria volátil) por meio de prestação de serviços terceirizados.

4.2.1.2 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM) e análises estatísticas

As amostras coletadas serão analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM) em um equipamento UFLC da Shimadzu (Tóquio, Japão) acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A e um espectrômetro de massas MicrOTOF-Q III (Bruker Daltonics) com ionização por eletrospray (IES) e analisador QqTOF (quadrupolo e tempo de voo em sequência). As análises serão realizadas em modo de ionização positiva e negativa. As colunas cromatográficas empregadas serão uma Kinetex C18 (150 x 2,1 mm, Phenomenex) e outra Kinetex HILIC (150 x 2,1 mm, Phenomenex).

Os dados serão inicialmente processados através do DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics). O alinhamento e redução dos dados serão realizados com os programas MetAlign e MSClust. As análises estatísticas (univariadas e multivariadas) serão realizadas

através da plataforma on-line Metaboanalyst 5.0 com os dados previamente normalizados e transformados em log. Os compostos orgânicos presentes nas amostras serão anotados através dos dados espectrais de UV, EM (massa acurada) e perfil de fragmentação em comparação com dados da literatura. Redes moleculares serão confeccionadas através da plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) e as anotações também serão realizadas com o auxílio desta plataforma.

4.2.1.3 Análise bromatológica

A fim de determinar o teor nutricional do material orgânico residual, serão realizadas análises centesimais de acordo com a Portaria do MAPA, nº 349 de 9 de julho de 2021, que inclui o teor de umidade, cinzas, a quantificação de proteína bruta e do extrato etéreo (lipídios), com a estimativa de carboidratos por diferença. As análises serão realizadas a partir de 100 g do material orgânico, conforme metodologia analítica da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005). Para determinar o teor de umidade a amostra será seca até peso constante, a 105° C; para determinar o teor de proteína bruta, será realizada a quantificação de nitrogênio, pelo método de Kjeldhal; e o perfil lipídico será avaliado pelo método de extração *Soxhlet*.

4.2.1.4 Determinação de pH

A determinação de pH do material orgânico residual (final do biorreator B2) e dos pontos de amostragem, definidos no item 3, será realizada a partir da diluição destas amostras em água ultrapura em pHmetro.

4.2.1.5 Detecção de micro e nano plástico no material orgânico

Para a detecção e identificação de possíveis partículas de plástico em escala micro e/ou nanométrica no material orgânico residual (final do biorreator B2) e nos pontos de amostragem, definidos no item 3, estas amostras serão liofilizadas e avaliadas por técnicas de determinação de tamanho de partícula e microscopia, espectroscopia no infravermelho (FTIR) e cromatografia de permeação em gel (GPC).

A distribuição de tamanho de partículas e o índice de polidispersão serão determinados em através da técnica de difratometria de laser (Mastersizer® 2000, Malvern) para avaliação da presença de nano e microplásticos. Além disso, as amostras serão avaliadas e caracterizadas morfológicamente, através de microscopia eletrônica de varredura, utilizando-se um microscópio eletrônico JEOL 6060 no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Análises de FTIR serão realizadas em equipamento *Perkin Elmer Instruments Spectrum One FT-IR Spectrometer* e a aquisição do espectro será feita com o acessório de

amostras UATR (acessório de refletância atenuada total universal) no intervalo de número de onda de 4000 a 650 cm^{-1} e 12 varreduras. Esta análise será realizada no Laboratório de Espectroscopia da Escola Politécnica/PUCRS. Para determinação das massas molares e distribuição de peso molecular será realizada análise de GPC por meio de prestação de serviço terceirizado do Instituto SENAI de Inovação em Engenharia de Polímeros (São Leopoldo, RS). Em caso de aquisição do equipamento com fomento por esse edital, a análise será realizada na PUCRS.

Uma vez detectada a presença de micro ou nanoplástico no material orgânico residual, prevemos como possibilidade de avaliação a digestão química da matéria orgânica com H_2O_2 (PENG et al., 2022), o que permitirá a coleta do plástico residual que será novamente adicionado na estação de tratamento.

4.2.2 Análise microbiológica

O material orgânico residual será avaliado por meio de ensaios microbiológicos conforme normativas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para controle de alimentos para uso animal (ração). Serão realizados os ensaios de detecção de patógenos (*Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*) e detecção, contagem e número mais provável (NMP) de microrganismos ou grupos indicadores (*Staphylococcus coagulase* positiva, coliformes, enterobactérias, mesófilos aeróbios viáveis) através de prestação de serviço com a Empresa Unianálises (Lajeado, RS).

Adicionalmente, será realizada a busca por bactérias probióticas, especialmente dos gêneros *Enterococcus* e *Bacillus*, conforme Portaria do MAPA nº 359 de 9 de julho de 2021. O isolamento de cepas bacterianas probióticas será realizado a partir da cultura do material orgânico residual de acordo com as condições relatadas na literatura (PRICHULA et al., 2016). As cepas probióticas serão avaliadas em relação a presença de *cluster* de genes que codificam moléculas com atividade antimicrobiana conforme Prichula et al. (2021). Para isso, o DNA genômico será extraído usando o *kit DNeasy blood and tissue kit* (Qiagen, USA) e quantificado usando *Qubit double-stranded DNA (dsDNA) high-sensitivity (HS) assay kit* (Life Technologies). Bibliotecas de DNA para o sequenciamento do genoma serão preparadas usando *Nextera XT DNA kit* e *index primers* (Illumina), e o sequenciamento será realizado utilizando a Plataforma *Illumina Miseq*. Posteriormente, os genomas serão trimados e montados usando *CLC genomics workbench* v8.0.3, e anotados usando o *NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAP). As espécies serão confirmadas por pairwise comparison por meio da identidade média de nucleotídeos (*Average Nucleotide Identity - ANI*) usando *JSpeciesWS* (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>). A presença de *clusters* de genes codificadores de moléculas antimicrobianas será verificada usando *Bagel4* (<http://bagel4.molgenrug.nl>) e (*Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell 5.0* -

Antismash5 (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>). Além disso, será verificada a presença de determinantes de virulência (genes de virulência e resistência a antimicrobianos) nos genomas usando a plataforma para (<https://www.genomicepidemiology.org>).

5. Avaliação de toxicidade do material orgânico residual

O material orgânico residual resultante da estação de tratamento, composto por restos de *T. molitor*, *G. mellonella* e microrganismos, será avaliado quanto a sua toxicidade e ecotoxicidade, considerando sua futura aplicação como adubo orgânico e/ou ração para animais.

5.1. Ecotoxicidade do material orgânico residual aplicado como adubo orgânico

5.1.1. Avaliação comportamental de minhocas da espécie *Eisenia andrei*

A avaliação da ecotoxicidade do material orgânico residual da estação de tratamento será realizada por meio do comportamento de minhocas da espécie *Eisenia andrei*, seguindo as recomendações da NBR ISO 17512-1 (2011). As minhocas serão expostas ao solo combinado com proporções crescentes de material orgânico residual da estação de tratamento e distribuído em recipientes plásticos. O tratamento controle será conduzido com solo, sem adição do material orgânico residual e estará presente em todas as unidades experimentais. Desta forma, as minhocas selecionarão o solo de maior interesse, fugindo de solos pobres ou contaminados. O ensaio terá duração de 48 h, sendo cada tratamento testado em triplicada, contendo 10 minhocas adultas por unidade experimental. Ao final das 48 h, as minhocas serão contabilizadas em cada solo de cada unidade experimental. O ensaio é invalidado se o número de mortes for maior que 10% por tratamento. Solos teste com menos de 20% do número total de minhocas são classificadas como estando com sua função de habitat limitada. Se uma atração maior de 80% pelo solo teste for observada, a presença de substâncias químicas não pode ser descartada, os resultados devem ser avaliados como um efeito.

5.1.2 Avaliação da emergência e crescimento de mudas da espécie *Lactuca sativa* L.

O teste de toxicidade avaliará os efeitos da exposição de plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) ao material orgânico residual da estação de tratamento conforme as condições estabelecidas na norma OECD Test 208 (OECD, 2006). As sementes serão semeadas em substrato orgânico combinado com proporções crescentes de material residual e distribuído em vasos (15 x 20 cm). O tratamento controle será conduzido com solo, sem adição do material residual. O crescimento inicial das plântulas será avaliado pelo comprimento (parte aérea e raiz) e matéria seca das plântulas. A matéria seca será determinada após secagem

a 60 °C em estufa de circulação de ar. Evidências de clorose, necrose, alterações morfológicas ou de deficiência nutricional serão avaliadas. Análises serão realizadas entre 14 e 21 dias após 50% de emergência das mudas no grupo controle. Os experimentos serão conduzidos em ambiente com temperatura (25 °C) e fotoperíodo (16 h luz) controlados. A irrigação será realizada pela base do vaso, mantendo a capacidade de campo. Serão aliadas 20 repetições com 10 sementes/plântulas cada. Os dados serão testados para normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov ($p \geq 0,05$). Atingindo a homoscedasticidade, os dados serão submetidos à análise de variância de uma via e as médias separadas pelo Teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

5.2. Toxicidade do material orgânico residual aplicado como componente de ração animal

O presente estudo será submetido à avaliação no Comitê de Ética em animais e submetido à Comissão de Pesquisa (COMPESQ) da Faculdade de Farmácia da UFRGS, previamente ao início de sua execução. O estudo respeita as Resoluções Normativas 30/2016 (Diretrizes para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos), 33/2016 (Procedimentos – Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica), 37/2018 (Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA) e 39/2018 (Dispõe sobre restrições ao uso de animais em procedimentos classificados com grau de invasividade 3 e 4).

Nesse sentido, ratos Wistar com idade de 8 semanas e pesando aproximadamente 350 a 380 g serão utilizados para o estudo. Em todas as fases experimentais, os animais serão mantidos em padrão sanitário convencional controlado no laboratório de Experimentação Animal da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Durante o experimento, os animais serão mantidos em caixas-moradia coletivas contendo utensílios para enriquecimento ambiental (tubos de PVC, papel toalha, madeira para roer) e recobertas com maravalha, contendo de 3 a 4 animais por caixa. Os animais receberão água e ração padrão balanceada *ad libitum* para roedores (grupo controle) e os animais do grupo teste receberão a ração enriquecida com o material orgânico residual. Além disso, serão mantidos em um ciclo fotoperiódico de 12 horas claro/escuro em temperatura controlada ($22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) e umidade relativa do ar de 40 a 60%. Os animais permanecerão em período de quarentena (15 dias) sem manipulação para habituação. Serão considerados um número de 8 animais por grupo experimental.

Inicialmente, os animais serão alocados randomicamente para seus respectivos grupos experimentais e distribuídos considerando o peso ponderal a partir de extratos reapresentados pelos quartis de peso. Após a quarentena (15 dias), os animais serão pesados e agrupados conforme os grupos experimentais. Os animais serão identificados por

meio de marcações coloridas no rabo, as caixas serão identificadas de acordo com o grupo experimental, e serão distribuídos em 2 grupos experimentais, que serão avaliados após 8 semanas. Durante esse período de experimento, os animais serão monitorados 3 vezes por semana quanto à aparência; ao comportamento e interação social; ao microambiente e enriquecimento ambiental; a condição corporal; ao peso corporal; aos sinais clínicos gastrointestinais e aos sinais clínicos neurológicos. Para a pesagem semanal dos animais será utilizada uma balança eletrônica e os dados são anotados em gramas (g) de peso corporal. Esse é um indicador de saúde geral dos animais.

Os animais serão eutanasiados no tempo experimental de 8 semanas. O método será por parada cardio-respiratória induzida por overdose de inalação de Isoflurano na concentração de > 5%, e após os sinais clínicos condizentes com óbito (ausência de movimento respiratório, ausência de batimentos cardíacos, ausência de pulsação, mucosas pálidas e perda do reflexo corneal), serão monitorados por um período adicional de 10 minutos após parada respiratória. A partir dessas constatações os órgãos (cérebro, coração, fígado, rim, baço e pâncreas) serão retirados para análise morfológica em HE e análise imunohistoquímica. Após a morte dos animais e obtenção das peças para análise, as carcaças dos animais serão colocadas em sacos plásticos brancos próprios adequados para descarte de material biológico, e encaminhados para descarte seguindo os protocolos da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

6. Descarte de resíduos químicos e biológicos provenientes do processo

Os resíduos químicos e biológicos utilizados serão descartados e/ou armazenados de acordo com o preconizado pelos Planos de Gerenciamento de Resíduos elaborados pelos departamentos responsáveis das instituições executora e colaboradoras.

c) Principais contribuições científicas ou tecnológicas da proposta

Do ponto de vista técnico-científico, este projeto apresenta caráter de translação entre a pesquisa básica e a pesquisa aplicada. Com a execução desta proposta espera-se obter um protótipo biotecnológico escalonável para contribuir no gerenciamento do lixo plástico de origem aquática e reduzir os danos causados ao ambiente marinho. Neste contexto, a utilização de larvas de insetos como agentes de biodegradação de plásticos fornece a oportunidade de desenvolvimento de um sistema de economia circular e ambientalmente sustentável, através do aproveitamento dos subprodutos gerados em matéria-prima de interesse comercial, como carbonatos, adubo orgânico e ração animal. Adicionalmente, este trabalho será realizado por discentes, docentes e pesquisadores, e o seu desenvolvimento contribuirá na: (i) formação de recursos humanos, em nível de iniciação científica, mestrado, doutorado e pós-doutorado, com visão multi e interdisciplinar e

habilidades para o desenvolvimento de projetos em equipe/rede, intensificando a interação entre instituições brasileiras e internacionais; (ii) publicação de artigos científicos em periódicos internacionais e (iii) democratização do conhecimento científico a fim de acessar o público não especializado.

d) Orçamento detalhado, prevendo, inclusive, despesas para as reuniões de Acompanhamento e Avaliação

- Faixa de R\$ 1.000.000,00

Itens de dispêndio	Quantidade	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Custeio			
1. Material de Consumo			84.744,00
Insumo para a manutenção da criação de minhocas da espécie <i>Eisenia andrei</i> (solo e potes)	2	100,00	200,00
Aquisição minhocas da espécie <i>Eisenia andrei</i>	12	40,00	480,00
Material descartável (ponteiras, eppendorfs, tubos tipo falcon, parafilmes, placas de petri, placa de 96 poços, seringas, etc.)	-	-	10.360,00
Material de vidraria	-	-	3.500,00
Solo para mudas	6	60,00	360,00
Sementes de alface (<i>Lactuca sativus</i> L.)	3	30,00	90,00
Sacos para mudas	1	100,00	100,00
Paquímetro digital	2	150,00	300,00
Insumos para a manutenção da criação de larvas de <i>G. mellonella</i>	-	-	3.000,00
Reagentes químicos (solventes P.A, solventes grau HPLC, padrões analíticos e reagentes em geral)	-	-	8.518,00
Material para ensaios microbiológicos (meios de cultura e biologia molecular)	-	-	39.420,00
Caixas organizadoras com tampa (100 litros)	3	180,00	540,00
Vials e filtros de seringa 0,22 e 0,45 µm	-	-	8.400,00
Reagentes para análises histoquímicas e toxicológicas	-	-	4.000,00
Coletor (bolsa) da gases multicamada PE/alumínio	2	1.188,00	2.376,00
Microesferas fluorescente de PE vermelha (10 gramas) incluindo entrega	3	1.033,33	3.100,00
2. Diárias			2.880,00
Diárias em Brasília-DF	9	320,00	2.880,00
3. Passagens			6.000,00
Passagens (Porto Alegre- Brasília e Brasília-Porto Alegre)	3	2.000,00	6.000,00
4. Serviço de Terceiros			185.576,00
4.1 Pessoa Jurídica			178.376,00
Manutenção anual da estação de tratamento	3	12.000,00	36.000,00
Análise microbiológica	4	1.430,00	5.720,00
Caracterização de solo artificial para ensaio de ecotoxicidade em plantas	4	100,00	400,00
Análise elementar	36	403,00	14.508,00
Análise imediata	36	585,00	21.060,00
Análise de cromatografia gasosa	8	461,00	3.688,00

Transporte de amostras	4	500,00	2.000,00
Análise de cromatografia de permeação em gel	35	1000,00	35.000,00
Sequenciamento genômico	100	600,00	60.000,00
4.2 Pessoa física			7.200,00
Coleta de lixo plástico	2	600,00	1.200,00
Serviço de revisão de língua inglesa	3	2.000,00	6.000,00
Valor total Custeio (R\$)			279.200,00
Capital			
1. Equipamento e Material permanente			454.400,00
Estação de tratamento	1	120.000,00	120.000,00
Lavador de gases	1	60.000,00	60.000,00
Freezer vertical	1	3.000,00	3.000,00
Espectrofotômetro com fluorescência	1	165.000,00	165.000,00
Geladeira <i>frost free</i>	1	2.600,00	2.600,00
Jogo de pipetas e pipeta multicanal	1	9.500,00	9.500,00
Balança de precisão	1	300,00	300,00
Balança analítica	1	10.000,00	10.000,00
Capela de Fluxo Laminar	1	28.000,00	28.000,00
pHmetro	1	2.000,00	2.000,00
Estufa de Secagem	1	5.000,00	5.000,00
Estufa Bacteriológica	1	4.000,00	4.000,00
Incubadora BOD para larvas de <i>G.mellonella</i>	2	20.000,00	40.000,00
Computador acoplado a estação de tratamento	1	5.000,00	5.000,00
Valor total Capital (R\$)			454.400,00
3. Bolsas			
3.1 Bolsa DTI			252.000,00
Bolsa DTI A	1	4.000,00/mês	144.000,00
Bolsa DTI B	1	3.000,00/mês	108.000,00
3.2 Bolsa ATP			14.400,00
Bolsa ATP B	1	400,00/mês	14.400,00
Valor total Bolsa (R\$)			266.400,00
Total do Projeto (R\$)			1.000.000,00

- Faixa de R\$ 1.500.000,00

Itens de dispêndio	Quantidade	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Custeio			
1. Material de Consumo			86.244,00
Insumo para a manutenção da criação de minhocas da espécie <i>Eisenia andrei</i> (solo e potes)	2	100,00	200,00
Aquisição minhocas da espécie <i>Eisenia andrei</i>	12	40,00	480,00
Material descartável (ponteiras, eppendorfs, tubos tipo falcon, parafilmes, placas de petri, placa de 96 poços, seringas, etc.)	-	-	10.360,00
Material de vidraria	-	-	3.500,00
Solo para mudas	6	60,00	360,00
Sementes de alface (<i>Lactuca sativus</i> L.)	3	30,00	90,00
Sacos para mudas	1	100,00	100,00
Paquímetro digital	2	150,00	300,00
Insumos para a manutenção da criação de larvas de <i>G. mellonella</i>	-	-	3.000,00
Reagentes químicos (solventes P.A, solventes grau HPLC, padrões analíticos e reagentes em geral)	-	-	10.018,00
Material para ensaios microbiológicos	-	-	39.420,00

(meios de cultura e biologia molecular)			
Caixas organizadoras com tampa (100 litros)	3	180,00	540,00
Vials e filtros de seringa 0,22 e 0,45 µm	-	-	8.400,00
Reagentes para análises histoquímicas e toxicológicas	-	-	4.000,00
Coletor (bolsa) de gases multicamada PE/alumínio	2	1.188,00	2.376,00
Microesferas fluorescente de PE vermelha (10 gramas) incluindo entrega	3	1.032,00	3.100,00
2. Diárias			2.880,00
Diárias em Brasília-DF	9	320,00	2.880,00
3. Passagens			6.000,00
Passagens (Porto Alegre- Brasília e Brasília-Porto Alegre)	3	2.000,00	6.000,00
4. Serviço de terceiros			120.576,00
4.1 Pessoa jurídica			113.376,00
Manutenção anual da estação de tratamento	3	12.000,00	36.000,00
Análise microbiológica	4	1.430,00	5.720,00
Caracterização de solo artificial para ensaio de ecotoxicidade em plantas	4	100,00	400,00
Análise elementar	36	403,00	14.508,00
Análise imediata	36	585,00	21.060,00
Análise de cromatografia gasosa	8	461,00	3.688,00
Transporte de amostras	4	500,00	2.000,00
Sequenciamento genômico	50	600,00	30.000,00
4.2 Pessoa física			7.200,00
Coleta de lixo plástico	2	600,00	1.200,00
Serviço de revisão de língua inglesa	3	2.000,00	6.000,00
5. Despesas acessórias de importação			170.000,00
Taxa de importação do cromatógrafo de permeação em gel e exclusão de tamanho	1	170.000,00	170.000,00
Valor total Custeio (R\$)			390.700,00
Capital			
1. Equipamento e material permanente nacional			278.900,00
Estação de tratamento	1	120.000,00	120.000,00
Lavador de gases	1	60.000,00	60.000,00
Computador acoplado a estação de tratamento	1	5.000,00	5.000,00
Freezer vertical	1	3.000,00	3.000,00
Geladeira <i>frost free</i>	1	2.600,00	2.600,00
Jogo de pipetas e pipeta multicanal	2	9.500,00	19.000,00
Balança de precisão	1	300,00	300,00
Balança analítica	1	10.000,00	10.000,00
Capela de fluxo laminar	1	28.000,00	28.000,00
pHmetro	1	2.000,00	2.000,00
Estufa de secagem	1	5.000,00	5.000,00
Estufa bacteriológica	1	4.000,00	4.000,00
Incubadora BOD para larvas de <i>G.mellonella</i>	1	20.000,00	20.000,00
2. Equipamento importado			425.000,00
Cromatógrafo de permeação em gel e exclusão de tamanho	1	425.000,00	425.000,00
Valor total Capital (R\$)			703.900,00
Bolsas			
1. Bolsas DTI			396.000,00
Bolsa DTI A	2	4.000,00/mês	288.000,00
Bolsa DTI B	1	3.000,00/mês	108.000,00
2. Bolsas ATP			14.400,00

						X		X		X		X	
6.4	Análise microbiológica do material orgânico residual	Orçamento min. - Valor R\$ 112.070,00											
		Orçamento máx. - Valor R\$ 82.070,00											
						X		X		X		X	
7.	Avaliação de toxicidade do material orgânico residual	Orçamento min. - Valor R\$ 5.930,00											
		Orçamento máx. - Valor R\$ 5.930,00											
						X		X		X		X	
7.1	Ecotoxicidade do material orgânico residual para aplicação como adubo orgânico	Orçamento min. - Valor R\$ 1.930,00											
		Orçamento máx. - Valor R\$ 1.930,00											
						X		X		X		X	
7.2	Toxicidade do material orgânico residual para aplicação como componente de ração animal	Orçamento min. - Valor R\$ 4.000,00											
		Orçamento máx. - Valor R\$ 4.000,00											
						X		X		X		X	
8.	Descarte resíduos químicos e biológicos provenientes do processo	Orçamento min. - Valor R\$ 0,00											
		Orçamento máx. - Valor R\$ 0,00											
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9.	Divulgação científica	Orçamento min. - Valor R\$ 0,00											
		Orçamento máx. - Valor R\$ 0,00											
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10.	Reuniões de acompanhamento e avaliação	Orçamento min. - Valor R\$ 8.880,00											
		Orçamento máx. - Valor R\$ 8.880,00											
		X					X						X
11.	Relatórios técnicos e publicação de artigos	Orçamento min. - Valor R\$ 6.000,00											
		Orçamento máx. - Valor R\$ 6.000,00											
							X						X
Total		Orçamento min. - Valor R\$ 1.000.000,00											
		Orçamento máx. - Valor R\$ 1.500.000,00											
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

f) Grau de interesse e comprometimento de empresas com o escopo da proposta, quando for o caso;

Contamos com colaboração já estabelecida com duas empresas *startups*, a saber: Regenera Moléculas do Mar e Nui Insect Science Serviços em Pesquisa Científica e Inovação Tecnológica Ltda.

A Regenera Moléculas do Mar, representada pela pesquisadora Dr^a Vanessa Agostini, que atua como coordenadora de pesquisa e desenvolvimento, trata-se de uma empresa de base tecnológica focada em Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação cuja missão é disponibilizar a biodiversidade química brasileira de origem marinha para as necessidades de inovação da indústria sob as devidas licenças. Sendo assim, a empresa se pauta pela inovação tecnológica e pelos cuidados com o meio ambiente, foco deste edital. Desta forma, a empresa fornecerá suporte nas questões envolvendo inovação, bem como dará suporte aos ensaios toxicológicos envolvendo o resíduo gerado.

A Nui Insect Science, representada pelos pesquisadores Dr. Rafael da Silva Gonçalves e Dr. Sandro Daniel Nörnberg, contribuirão com expertise na área de entomologia. A empresa fornecerá o inseto *T. molitor* para a implementação na estação de tratamento de lixo plástico, e prestará consultoria no estabelecimento do ciclo de vida do inseto no biorreator. A Nui Insect Science possui interesse na avaliação do consumo do

material orgânico residual para alimentação de animais de corte.

g) Identificação de todos os membros da equipe do projeto, com suas respectivas funções:

Nome	CPF	Instituição/ UF	Função	Dedicação (horas/ mês)
Danielle da Silva Trentin	00755701062	UFCSPA/RS	Coordenadora do projeto. Fará o acompanhamento de todas as etapas do projeto e será responsável pela criação do inseto <i>Galleria mellonella</i> e a implementação dos insetos (<i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i>) na estação de tratamento de lixo plástico. Irá colaborar na análise microbiológica do material orgânico residual gerado	40
Adriana Seixas	95468706091	UFCSPA/RS	Será responsável pela caracterização química do material orgânico gerado (análise bromatológica e determinação de pH). Irá colaborar na organização da coleta de lixo plástico de origem aquática.	16
Rosane Angélica Ligabue	50182277020	PUCRS/RS	Responsável pelo projeto e implementação da estação de tratamento de lixo plástico, bem como pela detecção e tratamento de gases produzidos e pela caracterização química do material orgânico gerado (análise elementar, e presença de micro e nanoplástico)	12
Eliane Romanato Santarém	56148593068	PUCRS/RS	Responsável pela caracterização (eco)toxicológica do material orgânico gerado em plantas (teste de emergência e crescimento de mudas).	8
Alexandre José Macedo	62649957034	UFRGS/RS	Responsável pelo projeto e implementação da estação de tratamento de lixo plástico, bem como pela caracterização microbiológica do material orgânico gerado.	4
Luiza Abrahão Frank	01416905006	UFRGS/RS	Será responsável pela caracterização do material orgânico gerado (determinação da presença de micro e nanoplástico através de análises de tamanho de partículas) e pela avaliação toxicológica em modelo animal roedor.	8
Denise Brentan da Silva	93662297191	UFMS/MS	Será responsável pela caracterização química do material orgânico gerado (estudo metabólico).	12
Jeane Estela Ayres de Lima	51141884020	UnB/DF	Responsável pelo projeto e implementação da estação de tratamento de lixo plástico, bem	40

			como pela detecção e tratamento de gases produzidos. Irá colaborar organização da coleta de lixo plástico de origem aquática.	
Vanessa Ochi Agostini	01858207002	Empresa Regenera Moléculas do Mar /RS	Será responsável pela avaliação da (eco)toxicidade em <i>Eisenia andrei</i> do material orgânico gerado no final do processo. Irá colaborar na organização da coleta de lixo plástico de origem aquática.	8
Janira Prichula	05621700902	Harvard University	Irá colaborar nas análises microbiológicas e <i>screening</i> genômico de microrganismos probióticos do material orgânico residual gerado.	4
Gabriela Messias Miranda Menezes	02743626003	PUCRS/RS	Responsável pelo projeto e implementação da estação de tratamento de lixo plástico, bem como pela detecção e tratamento de gases produzidos, e química do material orgânico gerado (análise elementar, e presença de micro e nanoplastico). Irá colaborar pela caracterização microbiológica e na coleta de lixo plástico de origem aquática.	160
Andressa Fernandes Pivato	06176237912	UFCSPA/RS	Responsável pelo projeto e implementação da estação de tratamento de lixo plástico, bem como pela caracterização microbiológica e química do material orgânico gerado (análise bromatológica e determinação de pH). Irá colaborar na coleta de lixo plástico de origem aquática	80

h) Indicação de colaborações ou parcerias já estabelecidas com outros centros de pesquisa no exterior nas respectivas áreas de atuação do projeto, com descrição detalhada das estratégias e mecanismos efetivos para concretização da colaboração ou parceria;

O projeto conta com a parceria estabelecida com a Harvard University, por meio da Dr^a Janira Prichula, pesquisadora no Massachusetts Eye and Ear Hospital da Harvard Medical School. A Dr^a Janira possui experiência nas áreas de bioinformática, biologia e microbiologia molecular, filogenética e filogenômica de procariotos. Será responsável pelas análises relacionadas com a detecção e o *screening* genômico de microrganismos probióticos no material orgânico residual da estação de tratamento de lixo plástico. Estuda especialmente bactérias do gênero *Enterococcus*, o objeto de sua tese de doutorado (PRICHULA et al., 2016; PRICHULA et al., 2021).

i) Disponibilidade efetiva de infraestrutura e de apoio técnico para o desenvolvimento do projeto

O Laboratório de Bacteriologia & Modelos Experimentais Alternativos (UFCSPA), sob responsabilidade da Prof. Danielle Trentin, foi inaugurado em 2022 e aloca a criação laboratorial do inseto *G. mellonella*, contando com o apoio técnico da bioterista Nicole Bondarczuk. Além disso, a docente atua no Laboratório de Microbiologia Molecular inaugurado em 2016. Equipamentos disponíveis incluem autoclaves, fluxo laminar, estufas microbiológicas, incubadoras, geladeiras, freezers, termociclador e PCR em tempo real. Adicionalmente, a UFCSPA conta com sequenciador Sistema MiSeq - Illumina, sendo este um equipamento multiusuário da Instituição. A UFCSPA possui central analítica moderna, multiusuário, que possui espectrofluorímetro, espectrofotômetro UV-VIS, espectrofotômetro de absorção atômica, cromatógrafo a gás acoplado a detector de massa, calorímetro de varredura diferencial, sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector espectrofotométrico de arranjo de diodos e detector de fluorescência, sistema de cromatografia líquida de alta velocidade com espectrofotômetro de arranjo de diodo detector e um extrator acelerado por solvente, os quais podem ser utilizados para o desenvolvimento desta proposta.

Os laboratórios proponentes da UFRGS estão inseridos em centros de excelência em pesquisa no país, a saber, na Faculdade de Farmácia e no Centro de Biotecnologia da UFRGS, e dispõem de toda a infraestrutura básica para o desenvolvimento dos objetivos aqui propostos. Equipamentos comuns de laboratório, como centrífuga, leitora de microplacas, estufa microbiológica, e estrutura para manutenção da larva *Galleria mellonella* e de *Eisenia andrei* estão disponíveis no Centro de Biotecnologia, assim como Zetasizer®, Mastersizer® e Nanosight®, estão disponíveis na Faculdade de Farmácia.

A PUC-RS, conta com o Laboratório de Caracterização de Materiais (LCM) e o Laboratório de Espectroscopia localizados na Escola Politécnica. O LCM possui equipamentos para análise termogravimétrica (SDT Q600 da *TA Instruments*), calorimetria exploratória diferencial (DSC Q20 da *TA Instruments*), análise dinâmico-mecânica (DMA Q800 da *TA Instruments*), reologia (Reômetro *Discovery TA Instruments*) e dureza nas escalas Shore A e D (Bareiss). Já o Laboratório de Espectroscopia possui equipamentos para análises de espectroscopia no infravermelho (Perkin Elmer), na região-UV-Vis (Agilent) e espectrometria de absorção atômica por chama (Varian). Além disso, conta com o Laboratório de Biotecnologia Vegetal localizada na Escola de Ciências da Saúde e da Vida, que possui uma infraestrutura robusta para análise do crescimento de plantas e do metabolismo celular, incluindo uma sala de cultivos com temperatura e luminosidade controlada, e uma casa de vegetação.

O Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM) da UFMS é um laboratório multiusuário de reconhecimento nacional e internacional. Atualmente, o LaPNEM conta com toda a infraestrutura para a cromatografia em coluna (vidrarias e materiais), um sistema de CLAE-DAD em escala semi-preparativa e um equipamento de CLAE-DAD-EM. Este equipamento de espectrometria de massas de alta resolução (MicroTOF-Q III - Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) é composto por fonte de ionização por eletrospray e analisadores de quadrupolo-*time-of-flight* (Q-TOF), o qual é um equipamento multiusuário e atende a diversos pesquisadores no Brasil. O LaPNEM disponibiliza uma agenda comum aos usuários dos equipamentos, para que todos possam agendar a utilização dos mesmo sem a necessidade de confirmar pessoalmente a disponibilidade do equipamento, e conta com duas técnicas que auxiliam em todos os experimentos.

j) Estimativa dos recursos financeiros de outras fontes que serão aportados pelos eventuais Agentes Públicos e Privados parceiros

Recentemente o projeto intitulado “Biodegradação de plástico por larvas de *Galleria mellonella*: caracterização do processo e papel da microbiota do animal”, sob coordenação da Prof^a. Danielle Trentin, foi aprovado para concessão de auxílio financeiro (R\$ 31.000,00) junto à Fundação de amparo à pesquisa do estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) no Programa Pesquisador Gaúcho (PqG) - Edital FAPERGS 07/2021. Trata-se de um trabalho de pesquisa básica em andamento em nosso laboratório, relacionando ao projeto aqui submetido, que estuda os mecanismos bioquímicos envolvidos na biodegradação de polietileno por larvas de *G. mellonella*, mas não objetiva a aplicação prática em um sistema, como o presente projeto visa. Novas submissões poderão ser realizadas no futuro para Editais/Chamadas de fomento à pesquisa, mas no momento não dispomos de outras fontes de financiamento para a execução do projeto proposto.

k) Caráter multidisciplinar e interdisciplinar da proposta

Esta proposta prevê a elaboração, o desenvolvimento e a construção de uma estação de tratamento de plásticos oriundos de ambientes aquáticos, utilizando larvas de insetos, e o aproveitamento dos resíduos gerados como produtos de interesse comercial (carbonato, adubo orgânico e/ou ração animal). Para tanto, uma equipe multi e interdisciplinar foi estruturada, incluindo pesquisadores com expertise (i) na criação de larvas de inseto, (ii) química orgânica, (iii) química de polímeros, (iv) engenharia dos materiais, (v) engenharia química, (vi) microbiologia, (vii) biologia marinha, (viii) biotecnologia, (ix) ecologia e (x) toxicologia. A interação entre diferentes áreas do conhecimento fornecerá visões complementares no intuito de contribuir em tecnologias sustentáveis para a decomposição

e o tratamento de plástico (Figura 2). Sendo assim, nossa equipe executora é composta por pesquisadores das seguintes instituições:

I. Universidade Federal de Ciência da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA): A Prof. Danielle Trentin (bolsista produtividade do CNPq PQ 2) realizou pós doutorado Centro de Biotecnologia da UFRGS (2013-2016) e é líder do grupo de pesquisa Bacteriologia & Modelos Experimentais Alternativos. É membro permanente dos Programas de Pós-Graduação em Biociências e possui experiência em Microbiologia, no estudo de larvas de *Galleria mellonella* e em Biotecnologia. Desenvolve pesquisas focadas para o estudo de moléculas com potencial biotecnológico para aplicação em processos de degradação de resíduos plásticos e em processos infecciosos. A Prof. Adriana Seixas realizou pós-doutorado durante os anos de 2008 a 2011 no Centro de Biotecnologia da UFRGS com estágio (2011) na Hokkaido University, Japão. É membro do Instituto Nacional em Entomologia Molecular. É membro permanente dos Programas de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e de Biociências e coordenadora do grupo de pesquisas em Biotecnologia em Saúde da UFCSPA. Desenvolve pesquisas com enfoque na prospecção e produção de moléculas bioativas, voltadas para o estudo de enzimas e seus inibidores, visando aplicação biotecnológica na área da saúde humana e animal e indústria de alimentos. A Me. Andressa Fernandes Pivato é Doutoranda e Mestra em Biociências (UFCSPA). Possui graduação em Engenharia Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e estuda a biodegradação de plástico sintético por larvas de *G. mellonella*. Outros discentes que atuam em projetos na área de biodegradação de plástico sintético por larvas de *G. mellonella* são Maria Luísa de Oliveira (nível mestrado), Isadora de Oliveira e Silva e Fernanda Perini Concatto (ambas nível iniciação científica).

II. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS): A Prof. Rosane Ligabue, vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA/PUCRS), possui expertise na área de Transformação e Reaproveitamento de Resíduos, incluindo a biodegradação de poliolefinas e transformação de CO₂ e CH₄. A Prof. Eliane Santarém é docente do Núcleo Permanente do Programa de Pós-graduação Ecologia e Evolução da Biodiversidade. Desenvolve pesquisas em desenvolvimento de plantas associadas a microrganismos do solo e no efeito da interação raízes-microrganismos na atenuação dos estresses vegetais bióticos e abióticos. Atualmente, conduz estudos em tolerância de bactérias a pesticidas e sua possível utilização como bioremediadores. A Me. Gabriela Messias é professora de Biologia no CNEC Santa Bárbara (Arroio dos Ratos/RS) e doutoranda e Mestra pelo PGETEMA/PUCRS. Possui graduação em Engenharia Química na PUCRS e tem experiência em degradação e biodegradação de polietileno via enzimática, desenvolvimento de nanodispersões aquosas de poliuretano com adição de cargas

inorgânicas para aplicação em tintas especiais, atendimentos e consultoria a empresas alimentícias em boas práticas de fabricação, orçamentos, normas e legislações acerca de análises microbiológicas e físico químicas em alimentos.

III. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O Prof. Alexandre Macedo (bolsista produtividade do CNPq PQ 2), é vinculado ao Departamento de Produção de Matéria-Prima da Faculdade de Farmácia e ao Centro de Biotecnologia. Realizou doutorado em Microbiologia no Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Alemanha. É líder do grupo de pesquisa Biofilmes e diversidade microbiana, possuindo expertise na área de Microbiologia, prospecção de metabólitos bioativos, e criação e estudo com larvas de *G. mellonella*. A Prof. Luíza Frank, vinculada ao Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia/UFRGS, tem experiência em nanotecnologia, desenvolvimento e validação de métodos analíticos e bioanalíticos e avaliação toxicológica *in vitro* e *in vivo*. Além disso, possui pós-doutorado pela Universidade de Harvard, onde adquiriu experiência na área de biologia celular e molecular. Em 2021 foi reconhecida entre as 25 cientistas da América Latina que se destacam por seu trabalho e iniciativas nas áreas da ciência e inovação.

IV. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS). A Prof. Denise Brentan da Silva (bolsista produtividade do CNPq PQ 2), está vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (UFMS), e sócia-fundadora da startup Arandu Biotecnologia e membro afiliada da Academia Brasileira de Ciências. Tem vasta experiência em caracterização de compostos orgânicos através de técnicas espectrométricas e aplicação de modernas ferramentas metabolômicas, atuando diretamente em inovação.

V. Universidade de Brasília (UnB). A Prof. Jeane Lima está vinculada ao Instituto de Química como professora visitante na área de concentração de Engenharia Química. Possui expertise na Transformação e Reaproveitamento de Resíduos, incluindo a biodegradação de poliolefinas, transformação de CO₂ e CH₄, reciclagem de materiais, sequestro de carbono, biomassa e biocombustíveis.

VI. Empresa Regenera Moléculas do Mar. A pesquisadora Dr^a Vanessa Agostini, é doutora em Oceanografia Biológica (FURG, 2018) e atuou como docente na Universidade Federal do Rio Grande. Atualmente é Coordenadora de Pesquisa e Desenvolvimento na empresa Regenera Moléculas do Mar. Possui experiência com ecologia, ecotoxicologia e biotecnologia aquática. Em relação ao Lixo no Mar, vem trabalhando desde 2018 na temática, tanto no Ensino e Extensão, quanto na Pesquisa. Neste último, incluindo publicações de artigos (quatro publicações em revistas de FI > 9,9) e orientações de alunos

de Pós-Graduação com trabalhos sobre a poluição por lixo no mar e a sua interação com o processo de bioincrustação e a influência da plastisfera na acumulação de outros contaminantes em resíduos plásticos e o seu papel na ecotoxicidade destes. Além disso, é uma das organizadoras do livro Mar de Plástico: o lixo na costa brasileira, que está em processo de publicação. Deste 2018 atua em projetos de pesquisa sobre: (i) Poluição por Microplásticos no Ecossistema de Marismas do Estuário da Lagoa dos Patos, RS – FURG n° 181; (ii) Biodegradabilidade de bioplástico em diferentes condições ambientais: potencial para formação de microbioplástico e isolamento de micro-organismos com potencial biotecnológico - UFRGS n° 37707; (iii) (Micro)plástico nas praias da costa do Rio Grande do Sul: origem, distribuição, impactos no ambiente e sua inserção no registro geológico - UFRGS n° 38122.

VII. Harvard University (EUA). A Dr^a Janira Prichula possui pós-doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências (PPGBio/UFCSPA) e é pesquisadora na Harvard Medical School (EUA). É especialista em Direito Ambiental Nacional e Internacional, com expertise nas áreas de bioinformática, biologia e microbiologia molecular, filogenética e filogenômica de procariotos.

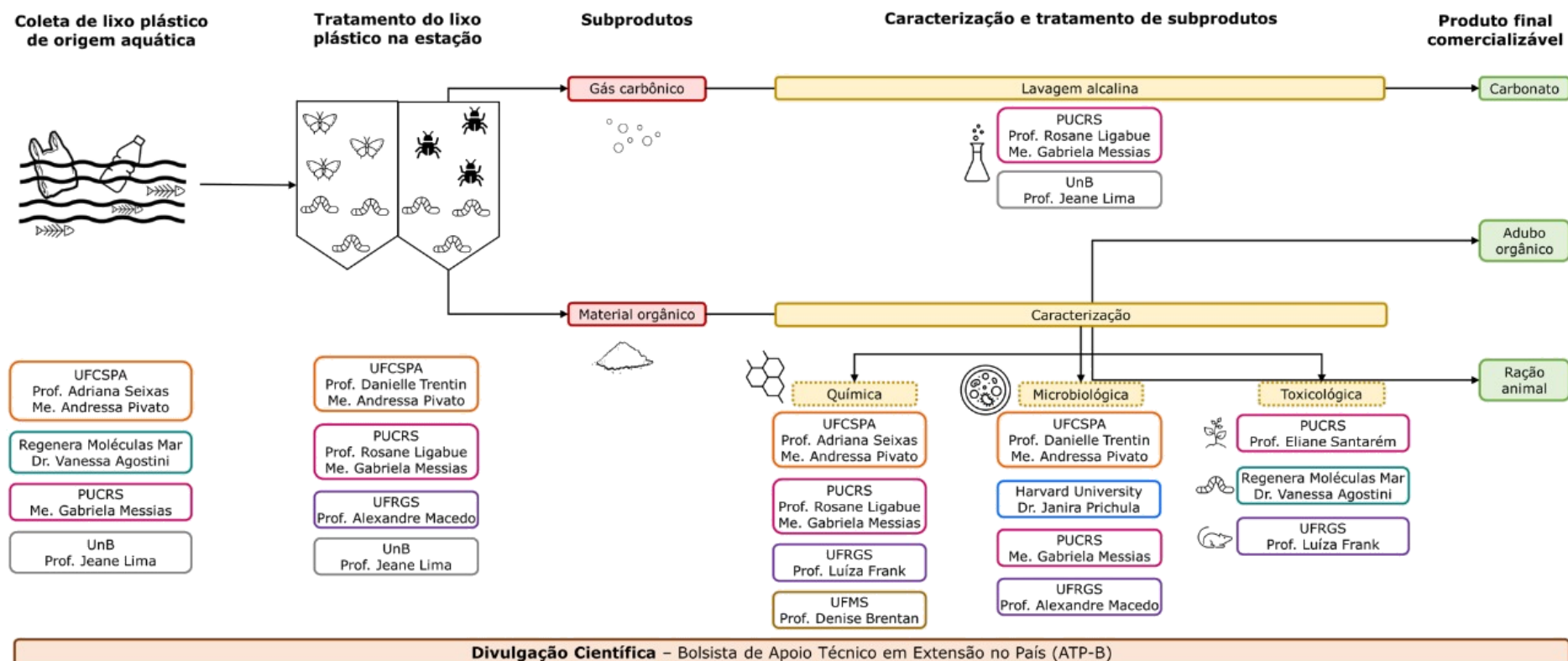


Figura 2: Ilustração esquemática da interação entre os membros da equipe e as respectivas ações/atividades no projeto proposto.

I) Estratégia de divulgação científica* descrevendo claramente os objetivos relacionados à divulgação e a difusão dos conhecimentos e tecnologias desenvolvidas constando, inclusive, as formas pelas quais isso será realizado. (*Entendida como um conjunto de ações para a democratização do conhecimento junto à sociedade, desde o início da pesquisa).

Com o objetivo de tornar a ciência acessível (democratização da ciência) e contribuir para a educação ambiental da sociedade, a principal estratégia de divulgação científica do projeto proposto é disseminar conhecimentos e resultados produzidos de forma didática, simples e explicativa, especialmente para público leigo. Para viabilizar a contínua divulgação científica, o projeto prevê um bolsista de apoio técnico em extensão no país (ATP-B), que estará diretamente envolvido nestas atividades, e alguns parâmetros foram estabelecidos no plano de divulgação científica:

Públicos-alvo:

- (i) Redes de educação básica, incluindo alunos de ensino fundamental e médio, professores, técnicos e gestores;
- (ii) Público não especializado (público leigo).

Canais de comunicação:

- (i) Plataformas de redes sociais, contemplando as plataformas Instagram, Facebook, TikTok e Youtube, a fim de aumentar a repercussão das produções científicas e ampliar o público alvo;
- (ii) Palestras, seminários presenciais e/ou *on-line*, e atividades educacionais com alunos de escolas de ensino fundamental e médio.

Estratégias de divulgação científica:

- (i) Nas redes sociais envolverá postagens, com periodicidade semanal, nas plataformas sociais citadas anteriormente, abordando a problemática do consumo e descarte inadequado de plástico, impacto do lixo plástico nos ecossistemas aquáticos, insetos biodegradadores de plásticos e sobre como o conhecimento da fisiologia do animal pode impactar no desenvolvimento biotecnológico de processos de biodegradação. Ainda, a Assessoria de Comunicação Social (ASCOM) das universidades envolvidas podem contribuir como ferramenta para facilitar a ampliação da informação a sociedade;
- (ii) Palestras, seminários e atividades educacionais (oficinas, ações coletivas para recolhimento de lixo plástico em praias e locais públicos de lazer, etc.) em parceria com instituições de educação básica, com o intuito de promover a conscientização do uso de plásticos e impactos da poluição plástica no meio ambiente. Para isso, serão escolhidas datas

comemorativas relacionadas ao meio ambiente e/ou ciência. De acordo com o envolvimento da equipe do projeto com algumas intuições de ensino, algumas parcerias estão sendo estabelecidas. É o caso do Colégio Cenecista Santa Bárbara, localizado no município de Arroio dos Ratos (RS) da rede de ensino Campanha Nacional das Escolas da Comunidade (CNEC), e colégios da rede de ensino Marista, na qual está incluída a PUCRS, instituição colaboradora deste projeto.

m) Principais Referências Bibliográficas.

ABIPLAST. **Perfil 2020**. Disponível em: <<http://www.abiplast.org.br/publicacoes/perfil-2020/>>. Acesso em: 12 jun. 2022.

ALI, S.S.; ELSAMAHY, T.; AL-TOHAMY, R.; ZHU, D.; MAHMOUD, Y.A.; KOUTRA, E.; METWALLY, M.A.; KORNAROS, M.; SUN, J. Plastic wastes biodegradation: Mechanisms, challenges and future prospects. **Science of Total Environment**, v. 780, p. 146590, 2021.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 17512-1: qualidade do solo — ensaio de fuga para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento - parte 1: ensaio com minhocas (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*)**. Rio de Janeiro, 2011, 26 p. Acesso em: 24 jul. 2022.

BARRIONUEVO, J.M.R.; MARTÍN, E.; CARDONA, A.G.; MALIZIA, A.; CHALUP, A.; CRISTÓBAL, R.E.; GARZIA, A.C.M. Consumption of low-density polyethylene, polypropylene, and polystyrene materials by larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae), impacts on their ontogeny. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 310, p. 127346, 2022.

BBC NEWS. **Plastic-eating caterpillar could munch waste, scientists say**. Disponível em: <<https://www.bbc.com/news/science-environment-39694553>>. Acesso em: 27 jul. 2022.

BEALE, D.J.; SHAH, R.M.; MARCORA, A.; HULTHEN, A.; KARPE, A.V.; PHAM, K.; WIJFFELS, G.; PAULL, C. Is there any biological insight (or respite) for insects exposed to plastics? Measuring the impact on an insects central carbon metabolism when exposed to a plastic feed substrate. **Science of the Total Environment**, v. 831, p. 154840, 2022.

BOMBELLI, P.; HOWE, C.J.; BERTOCCHINI, F. Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*. **Current Biology**, v. 27, n. 8, p. 292-293, 2017.

BRANDON, A.M.; GAO, S.H.; TIAN, R.; NING, D.; YANG, S.S.; ZHOU, J.; WU, W.M.; CRIDDLE, C.S. Biodegradation of polyethylene and plastic mixtures in mealworms (larvae of *Tenebrio molitor*) and effects on the gut microbiome. **Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 11, p. 6526-6533, 2018.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente (MMA). Secretaria de Qualidade Ambiental. **PLANO NACIONAL DE COMBATE DE LIXO NO MAR**. Brasília – DF, 2019.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 359, de 9 de julho de 2021. **Diário Oficial da União**. Brasília - DF, 2021. Ed. 130, Seção 1 p. 10.

CAMPOS-SILVA, R.; BURST, F.R.; TRENTIN, D.S.; MACEDO, A.J. Alternative method in *Galleria mellonella* larvae to study biofilm infection and treatment. **MICROBIAL PATHOGENESIS**, v. 137, p. 103756, 2019.

CHAMAS, A.; MOON, H.; ZHENG, J.; QIU, Y.; TABASSUM, T.; JANG, J.H.; ABU-OMAR, M.; SCOTT, S.L.; SUH, S.. Degradation Rates of Plastics in the Environment. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 8, n. 9, p. 3494–3511, fev. 2020.

CUFFARI, B.. How Brazil is Tackling Pollution. **AZoCleantech**, [S. l.], p. 1-3, 27 ago. 2019. Disponível em: <<https://www.azocleantech.com/article.aspx?ArticleID=953>>. Acesso em: 8 jun. 2022.

ELLIS, J.D.; GRAHAM, J. R.; MORTENSEN, A.. Standard methods for wax moth research. **Journal of Apicultural Research**, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2013.

HACKSTEIN, J. H. P.; STUMM, C. K. Methane production in terrestrial arthropods. **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES**, v. 91, n. 12, p. 5441-5445, 1994.

HARSÁNYI, E.; JUHÁSZ, C.; KOVÁCS, E.; HUZSVAI, L.; PINTÉR, R.; FEKETE, G.; VARGA, Z. I.; ALEKSZA, L.; GUYRICZA, C. Evaluation of Organic Wastes as Substrates for Rearing *Zophobas morio*, *Tenebrio molitor*, and *Acheta domesticus* Larvae as Alternative Feed Supplements. **Insects**, v. 11, n. 9, p. 604, set. 2020.

HAUPT, L. **ANÁLISE CENTESIMAL DA FARINHA DE ZOPHOBAS MORIO E PROPOSTA DE INCLUSÃO NA FORMULAÇÃO DE PETISCOS PARA CÃES**. 2019, 55 p. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Tecnologia em Alimentos). Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Orientador: Adriana Seixas.

HOWARD, R. S. The Biology of the Grain Beetle *Tenebrio Molitor* with Particular Reference to Its Behavior. **Ecological Society of America**, v. 36, n. 2, p. 262-269, 1955.

JAMBECK, J. R.; GEYER, R.; WILCOX, C.; SIEGLER, T. R.; PERRYMAN, M.; ANDRADY, A.; NARAYAN, R.; LAW, K. L. Plastic waste inputs from land into the ocean. **Science**, v. 347, n. 6223, p. 768–771, 2015.

LUO, L.; WANG, Y.; GUO, H.; YANG, Y.; Q, N.; ZHAO, X.; GAO, S.; ZHOU, A. Biodegradation of foam plastics by *Zophobas atratus* larvae (Coleoptera: tenebrionidae) associated with changes of gut digestive enzymes activities and microbiome. **Chemosphere**, v. 282, p. 131006, 2021.

NELMS, S. E.; DUNCAN, E. M.; BRODERICK, A. C.; GALLOWAY, T. S.; GODFREY, M. H.; HAMANN, M.; LINDEQUE, P. K.; GODLEY, B.J. Plastic and marine turtles: a review and call for research. **ICES Journal of Marine Science**, v. 73, n. 2, p. 165–181, 2016.

NOMURA, E.; CHAUD-NETTO, J.; GOBBI, N. Diet effect on the biological cycle of the wax moths caterpillars *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera, Pyralidae) and *Achroia grisella* (Fabricius, 1754) (Lepidoptera, Pyralidae). **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2006.

OECD. Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Seção 2. Paris: OECD Publishing, 2006, 21p.

ONINCX, D. G. A. B.; VAN ITTERBEECK, J.; HEETKAMP, M. J. W.; VAN DEN BRAND, H.; VAN LOON, J. J. A. An Exploration on Greenhouse Gas and Ammonia Production by Insect Species Suitable for Animal or Human Consumption. **PLOS ONE**, v. 5, n. 12, p. e14445, 2010.

PENG, B.; SUN, Y.; WU, Z.; CHEN, J.; SHEN, Z.; ZHOU, X.; WU, M.; ZHANG, Y. Biodegradation of polystyrene and low-density polyethylene by *Zophobas atratus* larvae: Fragmentation into microplastics, gut microbiota shift, and microbial functional enzymes. **Journal of Cleaner Production**, v. 367, p. 132987, 2022.

PENG, B.; SU, Y.; CHEN, Z.; CHEN, J.; ZHOU, X.; BENBOW, M. E.; CRIDDLE, C. S.; WU, W.; ZHANG, Y. Biodegradation of polystyrene by dark (*Tenebrio obscurus*) and yellow (*Tenebrio molitor*) mealworms (Coleoptera: tenebrionidae). **Environmental Science and Technology**, v. 53, n. 9, p. 5256-5265, 2019.

PENG, B.; CHEN, Z.; CHEN, J.; YU, H.; ZHOU, X.; CRIDDLE, C. S.; WU, W.; ZHANG, Y. Biodegradation of polyvinyl chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: tenebrionidae) larvae. **Environmental International**, v. 145, p. 106106, 2020.

PINTO, H. B.; BRUST, F. R.; MACEDO, A. J.; TRENTIN, D. S. The antivirulence compound myricetin possesses remarkable synergistic effect with antibacterials upon multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. **MICROBIAL PATHOGENESIS**, v. 149, p. 1-8, dez. 2020.

PINHEIRO, L. M.; CARVALHO, I. V.; AGOSTINI, V. O.; MARTINEZ-SOUZA, G.; GALLOWAY, T. S.; PINHO, G. L. L. Litter contamination at a salt marsh: An ecological niche for biofouling in South Brazil. **Environmental Pollution**, v. 285, p. 117647, 2021.

PIVATO, A. F. **Consumo e biodegradação de plástico por larvas de inseto: um estudo sobre *Galleria mellonella***. 2021, 216 p. Dissertação (Mestrado em Biociências). Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 2021.

PIVATO, A. F.; MIRANDA, G. M.; PRICHULA, J.; LIMA, J. E. A.; LIGABUE, R. A.; SEIXAS, A.; TRENTIN, D. S. Petroleum-based plastics: progress and perspectives on consumption and biodegradation by insect larvae. **Chemosphere**, v. 293, p. 133600, abr. 2022.

PLASTICS EUROPE. **Plastics - The Facts 2021**. Disponível em: <<https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/12/Plastics-the-Facts-2021-web-final.pdf>>. Acesso em: 6 jul. 2022.

PRZEMIENIECKI, S. W.; KOSEWSKA, A.; PURWIN, C.; ZAPAŁOWSKA, A.; MASTALERZ, J.; KOTLARZ, K.; KOLACZEK, K.. Biometric, chemical, and microbiological evaluation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings fertilized with mealworm (*Tenebrio molitor* L.) larvae meal. **Applied Soil Ecology**, v. 167, p. 104037, 2021.

PRICHULA, J.; PRIMON-BARROS, M.; LUZ, R. C. Z.; CASTRO, Í. M. S.; PAIM, T. G. S.; TAVARES, M.; LIGABUE-BRAUN, R.; D'AZEVEDO, P. A.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A. P. G.; SEIXAS, A.; GILMORE, M. S. Genome Mining for Antimicrobial Compounds in Wild Marine Animals-Associated Enterococci. **Marine Drugs**, v.19, n. 6, p. 328, 2021.

PRICHULA, J.; PEREIRA, R. I.; WACHHOLZ, G. R.; CARDOSO, L. A.; TOLFO, N. C. C.; SANTESTEVAN, N. A.; MEDEIROS, A. W.; TAVARES, M.; FRAZZON, J.; D'AZEVEDO, P. A.; FRAZZON, A.P. G. Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 105, n. 1, p. 51-57, 2016.

RÉJASSE, A.; WAEYTENS, J.; DENISET-BESSEAU, A.; CRAPART, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; SANDT, Christophe. Plastic biodegradation: do *Galleria mellonella* larvae - bio-assimilate polyethylene? A spectral histology approach using isotopic labelling and infrared microspectroscopy. **bioRxiv** preprint, 2021.

SANGIORGIO, P.; VERARDI, A.; DIMATTEO, S.; SPAGNOLETTA, A.; MOLITERNI, S.; ERRICO, S. *Tenebrio molitor* in the circular economy: a novel approach for plastic valorisation and PHA biological recovery. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 52689–52701, 2021.

SHIMANUKI, H. **Controlling the Greater Wax Moth: a pest of honeycombs**. 2217. ed. Washington, D.C.: [s.n.], 1981. p. 1-11.

SILVA, L. N.; DA HORA, G. C. A.; SOARES, T. A.; BOJER, M. S.; INGMER, H.; MACEDO, A. J.; TRENTIN, D. S. Myricetin protects *Galleria mellonella* against *Staphylococcus aureus* infection and inhibits multiple virulence factors. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-16, 2017.

SILVA, L. N.; DA HORA, G. C. A.; SOARES, T. A.; BOJER, M. S.; MACEDO, A. J.; TRENTIN, D. S. Virulence of *Candida haemulonii* complex in *Galleria mellonella* and efficacy of classical antifungal drugs: a comparative study with other clinically relevant non-albicans *Candida* species. **FEMS YEAST RESEARCH (ONLINE)**, v. 18, n. 2823, p. 1-12, 2018.

SIMON, E.; BARANYAI, E.; BRAUN, M.; FÁBIÁN, I.; TÓTHMÉRÉSZ, B. Elemental concentration in mealworm beetle (*Tenebrio molitor* L.) during metamorphosis. **Biological trace element research**, v. 154, n. 1, p. 81-87, 2013.

SRIPRABLOM, J.; KITTHAWEE, S.; SUPHANTHARIKA, M. Functional and physicochemical properties of cookies enriched with edible insect (*Tenebrio molitor* and *Zophobas atratus*) powders. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 16, n. 3, p. 2181–2190, 2022.

THE GUARDIAN. **Plastic-eating bugs? It's a great story – but there's a sting in the tail.** Disponível em: <<https://www.theguardian.com/commentisfree/2017/apr/25/plastic-eating-bugs-wax-moth-caterpillars-bee>>. Acesso em: 4 jul. 2022.

THE WORLD COUNTS. **The World Counts.** Disponível em: <http://www.theworldcounts.com/counters/waste_pollution_facts/plastic_bags_used_per_year>. Acesso em: 11 jul. 2022.

TSAI, C. J.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-229, 2016.

WILLIAMS, J. L. **Insects: Lepidoptera (Moths)**. 1. ed. United States: [s.n.], 1997. p. 121-141.

WANG, S.; SHI, W.; HUANG, Z.; ZHOU, N.; XIE, Y.; TANG, Y.; HU, F.; LIU, G.; ZHENG, H. Complete digestion/biodegradation of polystyrene microplastics by greater wax moth (*Galleria mellonella*) larvae: direct in vivo evidence, gut microbiota independence, and potential metabolic pathways. **Journal of Hazardous Materials**, v. 423 (PART B), p. 127213, 2022.

YANG, L.; GAO, J.; LIU, Y.; ZHUANG, G.; PENG, X.; WU, W.; ZHUANG, X. Biodegradation of expanded polystyrene and low-density polyethylene foams in larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: tenebrionidae): broad versus limited extent depolymerization and microbe-dependence versus independence. **Chemosphere**, v. 262, p. 127818, 2021.

YANG, S.; GAO, J.; LIU, Y.; ZHUANG, G. PENG, Xiawei; WU, Wei-Min; ZHUANG, Xuliang. Ubiquity of polystyrene digestion and biodegradation within yellow mealworms, larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: tenebrionidae). **Chemosphere**, v. 212, p. 262-271, 2018.

YANG, Y.; YANG, J.; WU, W.; ZHAO, J.; SONG, Y.; GAO, L.; YANG, R. JIANG, Lei. Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: Part 1. Chemical and physical characterization and isotopic tests. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 20, p. 12080–12086, 2015.

YANG, Y.; YANG, J.; WU, W.; ZHAO, J.; SONG, Y.; GAO, L.; YANG, R.; JIANG, L. Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: Part 2. Role of gut microorganisms. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 20, p. 12087-12093, 2015b.

ZHONG, Z.; NONG, W.; XIE, Y.; HUI, J. H. L.; CHU, L. M. Long-term effect of plastic feeding on growth and transcriptomic response of mealworms (*Tenebrio molitor* L.). **Chemosphere**, v. 287, p. 132063, 2021.

ZHU, P.; PAN, X.; LI, X.; LIU, X.; LIU, Q.; ZHOU, J.; DAI, X.; QIAN, G. Biodegradation of plastics from waste electrical and electronic equipment by greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). **Journal of Cleaner Production**, v. 310, p. 127346, 2021.