

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO

**INFLUÊNCIAS E ALTERAÇÕES NO PERFIL METABÓLICO
DE *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera:Tenebrionidae) EM SUA
UTILIZAÇÃO COMO BIODEGRADADOR DE
POLIESTIRENO.**

Luana da Silva Nascimento Hastenreiter

Fevereiro/2022



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

INFLUÊNCIAS E ALTERAÇÕES NO PERFIL METABÓLICO
DE *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera:Tenebrionidae) NA SUA
UTILIZAÇÃO COMO BIODEGRADADOR DE
POLIESTIRENO.

LUANA DA SILVA NASCIMENTO HASTENREITER

Sob orientação do professor

Emerson Guedes Pontes

e Co-orientação do Professor

Marco Andre Alves de Souza

Dissertação submetida ao programa de Pós
Graduação em Biologia Animal da UFRRJ,
como requisito para obtenção do grau de
Mestre em Ciências - Biologia Animal.

Seropédica, RJ

Fevereiro/2022

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

LUANA DA SILVA NASCIMENTO HASTENREITER

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no curso de Pós-Graduação em Biologia Animal, área de concentração em Biodiversidade Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM:

Dr. Emerson Guedes Pontes - IQ/UFRRJ
(Orientador)

Dr. Jayme Magalhães Santangelo

Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo

AGRADECIMENTOS

Inicialmente a Deus, por ter me dado a oportunidade de trilhar o honroso caminho da Ciência e de aprender com grandes mestres.

Ao meu esposo Allam Bruno Hastenreiter, pelo apoio e companheirismo nos momentos difíceis.

Aos meus pais e familiares, por sempre acreditarem no meu potencial.

Ao Prof^o Emerson Guedes Pontes, pelos valiosos ensinamentos que carregarei por toda a vida, pelo exemplo, confiança, estímulo e, acima de tudo, por me ensinar que é possível transformar grandes sonhos em realidade.

Ao Prof^o Marco André Alves de Souza, por todo apoio, confiança e orientação principalmente na reta final.

Aos meus amigos e parceiros de muitas batalhas científicas, Luan Valim, Marcela Alves, Elaine Rodrigues e Matheus Caiado, pelo companheirismo e constante motivação ao longo dos últimos anos.

Agradeço aos demais integrantes do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes pelo auxílio constante.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal que me proporcionou a oportunidade de fazer esse trabalho.

Agradeço aos professores que compartilharam comigo parte do seu conhecimento, principalmente Maristela Peckle.

Agradeço a Prof^a Cristina Amorim e Túlio Reis, pelas diversas vezes que solicitei ração para os insetos, sempre me atenderam prontamente.

Agradeço ao Erinaldo Pereira que me salvou diversas vezes nos contratempos científicos.

Agradeço aos membros da banca que prontamente aceitaram ao meu convite.

Agradeço aos amigos da vida, por todos os momentos alegres. Meus sinceros agradecimentos amigos.

Agradeço a Capes pelo financiamento relativo à pesquisa realizada ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço a tudo e todos que me deram forças para continuar e concluir.

“Um cientista em seu laboratório não é um mero técnico: ele também é uma criança que enfrenta fenômenos naturais que o impressionam como se fossem contos de fadas.”

(Marie Curie)

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estruturas de plásticos petroquímicos convencionais. Polietileno (PE), Policloreto de vinila (PVC), Polipropileno (PP), Poliestireno (PS), Polietileno tereftalato (PET), Poliuretano(PU). | 6 |
| Figura 2. Estrutura química de plásticos biodegradáveis. Poli(ácido láctico) (PLA), Poli(3-hidroxi-butirato) (PHB), Poli(propionolactona) (PPL), Poli(ϵ -caprolactona) (PCL), Poli(etileno succinato) (PES), Poli(butileno succinato) (PBS), Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV) e Poli(éster carbonato) (PEC). | 6 |
| Figura 3. A cadeia Petroquímica e o plástico. | 7 |
| Figura 4. Fotografias de animais vítimas da poluição de plástico. | 10 |
| Figura 5. Processos e rotas de destinação de plásticos. | 11 |
| Figura 6. Incineração do lixo. | 12 |
| Figura 7. Esquema de um reator pirolítico. | 12 |
| Figura 8. Centro de reciclagem. | 13 |
| Figura 9. Ciclo de vida do <i>A. diaperinus</i> e distribuição na cama de frangos. | 17 |
| Figura 10. Sistema de criação das larvas sob suas respectivas dietas (jejum, poliestireno e ração). A- Larvas dentro dos tubos de ensaio, acondicionadas a seus tratamentos; B- Tubos organizados em caixas maiores para armazenamento em câmara BOD, com temperatura e umidade controladas. | 25 |
| Figura 11. Larvas de <i>A. diaperinus</i> se alimentando de lascas $\pm 3,5 \times 0,5$ cm (A x L) de poliestireno. A- A larva entrando no pedaço do isopor; B- A larva escavando tuneis dentro do pequeno bloco de PS. | 29 |
| Figura 12. Biodegradação de poliestireno por larvas de <i>A. diaperinus</i> ao final de 8 dias de alimentação. A- Intensidade de escavação e formação dos tuneis nos blocos de PS; B- Os tuneis e buracos resultados da biodegradação das larvas; C- Féculas e fragmentos de PS digeridos e não digeridos no término do 8º dia de alimentação. | 30 |
| Figura 13. Taxa de sobrevivência de <i>A. diaperinus</i> após 8 dias. | 31 |
| Figura 14. Desenvolvimento da larva de <i>A. diaperinus</i> sob as diferentes dietas. Em A- larva recém saída da pré-dieta com ração; B- larva pós alimentação com ração (PAR) em dieta de ração após 8 dias; C- larva pós alimentação com ração (PAR) submetida ao jejum (fome) após 8 dias; D- Larva pós alimentação com ração (PAR) em dieta de Poliestireno após 8 dias. | 33 |

| | |
|---|----|
| Figura 15. Peso seco por larva em miligramas pós alimentação com ração (PAR) e condicionadas nas diferentes dietas. | 34 |
| Figura 16. Regressão linear simples do peso seco de larva em miligramas pós alimentação com ração (PAR) e condicionadas nas diferentes dietas. | 34 |
| Figura 17. Canal alimentar larval de <i>A. diaperinus</i> sob diferentes estresses alimentares. Estas larvas foram alimentadas com ração por 15 dias a partir da eclosão dos ovos e colocadas para sua respectiva dieta por 8 dias. A- Larva alimentada com ração para aves de corte; B- Larva em estado de jejum completo; C- Larva alimentada com poliestireno. | 37 |
| Figura 18. Análise subtrativa das concentrações das principais classes de metabólitos (Ração – Poliestireno) encontrados no extrato bruto das larvas de <i>A. diaperinus</i> submetidas as dietas. | 41 |
| Figura 19. Análise subtrativa das concentrações das principais classes de metabólitos (Ração – Jejum) encontrados no extrato bruto das larvas de <i>A. diaperinus</i> submetidas as dietas. | 42 |
| Figura 20. Análise de agrupamentos de nível de similaridade entre as larvas alimentadas com ração, sob jejum e alimentadas com PS. | 43 |
| Figura 21: Metabólitos que apresentaram significância | |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Tabela de Identificação e Simbologia de Resinas. | 8 |
| Tabela 2. Tabela dos estágios de desenvolvimento do <i>A. diaperinus</i> de acordo com diferentes trabalhos. | 17 |
| Tabela 3. Tabela de sobrevivência de <i>A. diaperinus</i> mediante as diferentes dietas (ração, jejum e poliestireno). | 31 |
| Tabela 4. Concentrações médias dos metabólitos presentes no extrato bruto de larvas de <i>A. diaperinus</i> , submetidos as diferentes dietas (ração, jejum e poliestireno). | 39 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|-----------------|--|
| ABNT | Associação Brasileira de Normas e Técnicas |
| Acetil- CoA | Acetil-coenzima A |
| ANOVA | Análise de Variância |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| BOD | Biochemical Oxygen Demand |
| CG | Corpo gorduroso |
| CG-MS | Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas |
| CH ₄ | Metano |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| DHAP | Di-hidroxiacetona-fosfato |
| EPS | Poliestireno Expandido |
| FADH | Dinucleótido de flavina e adenina |
| Gli-3-F | Glicerol-3-Fosfato |
| GOD | Glicose oxidase |
| H ₂ | Hidrogênio molecular |
| IA | Intestino anterior |
| IM | Intestino médio |
| IP | Intestino posterior |
| LDH | Lactato desidrogenase |
| MSTFA | n-metil-n-trimetilsilil trifluoracetamida |
| Mtons | Milhões de toneladas |
| N ₂ | Gás nitrogênio |
| NADH | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo |
| P | Fósforo |
| PAH | Hidrocarbonetos aromáticos policíclico |
| PAR | Pós alimentação com ração |
| PBS | Poli(butileno succinato) |
| PCL | Poli(ε-caprolactona) |
| PE | Polietileno |
| PEAD | Polietileno de alta densidade |
| PEBD | Polietileno de baixa densidade |
| PEC | Poli(ester carbonato) |
| PES | Poli(etileno succinato) |
| PET | Poli(tereftalato de etileno) |
| PH | Potencial hidrogeniônico |
| PHB | Poli(3-hidroxi butirato) |
| PHBV | Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) |
| PLA | Poli(ácido lático) |
| PP | Polipropileno |
| PPL | Poli(propriolactona) |
| PS | Poliestireno |
| PVC | Cloreto de polivinila |
| SD | Desvio padrão |
| TM | Túbulos de Malpighian |
| TS | Taxa de sobrevivência |

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO LITERÁRIA | 4 |
| 2.1 A indústria do plástico: visão mundial e nacional | 4 |
| 2.2 Caracterização, síntese e categoria dos polímeros | 4 |
| 2.3 Descarte e manejo dos plásticos pós-consumo | 7 |
| 2.3.1 Deposição em aterros..... | 10 |
| 2.3.2 Incineração..... | 11 |
| 2.3.3 Reciclagem | 13 |
| 2.4 Biodegradação | 13 |
| 2.5 <i>Alphitobius diaperinus</i> : origem, morfologia e ciclo de vida | 16 |
| 2.6 Distribuição espacial na cama aviária..... | 18 |
| 2.7 Demanda nutricional em insetos..... | 19 |
| 2.8 Hábitos alimentares de <i>A. diaperinus</i> | 21 |
| 3. OBJETIVOS..... | 23 |
| 3.1 Objetivo geral | 23 |
| 3.2 Objetivos específicos | 23 |
| 4. METODOLOGIA..... | 24 |
| 4.1 Manutenção da colônia de <i>A. diaperinus</i> | 24 |
| 4.2 Dietas oferecidas ao <i>A. diaperinus</i> | 24 |
| 4.3 Tratamentos realizados com as larvas | 24 |
| 4.4 Determinação de sobrevivência e tamanho corporal das larvas | 25 |
| 4.5 Determinação do peso seco das larvas após o consumo das dietas | 25 |
| 4.6 Análise da estrutura do trato digestivo das larvas de <i>A. diaperinus</i> mediante os tratamentos..... | 26 |
| 4.7 Avaliação do perfil metabólico das larvas de <i>A. diaperinus</i> | 26 |
| 4.8 Análises Estatísticas..... | 27 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 28 |
| 5.1 Consumo de poliestireno e sobrevivência de <i>A. diaperinus</i> submetidas as dietas..... | 28 |

| | | |
|-----|---|----|
| 5.2 | Comprimento e peso de larvas de <i>A. diaperinus</i> sob o efeito de diferentes tratamentos..... | 32 |
| 5.3 | Canal alimentar de larva de <i>A. diaperinus</i> sob o efeito das diferentes dietas..... | 35 |
| 5.4 | Análise do perfil metabólico por CG-EM em larvas de <i>A. diaperinus</i> com dietas distintas | 38 |
| 6. | CONCLUSÕES | 49 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 50 |

RESUMO

HASTENREITER, Luana da Silva Nascimento. Influências e alterações no perfil metabólico de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera:Tenebrionidae) na sua utilização como biodegradador de poliestireno. 2022. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal, Biodiversidade). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2022.

A produção mundial de plásticos aumentou de forma bastante rápida nos últimos 50 anos, com destaque para a produção chinesa, responsável por ¼ da produção mundial. Até ao presente não está disponível um método favorável ao meio ambiente para eliminar os resíduos plásticos, que se acumulam em aterros ou são espalhados como microplásticos.

Nesse contexto, a biodegradação emerge como alternativa sustentável, pois consiste na mineralização desses materiais mediante submissão ao metabolismo microbiano. Pesquisas atuais relataram que algumas espécies de coleópteros são capazes de degradar plásticos com o auxílio das suas peças bucais de mastigação e à atividade metabólica de sua microbiota intestinal. Este estudo mostra que o *Alphitobius diaperinus* é capaz de se alimentar e aparentemente degradar o poliestireno. O perfil metabólico de larvas alimentadas com ração para aves, submetidas a jejum absoluto e alimentadas com poliestireno foram caracterizados através de uma abordagem metabolômica onde as etapas da análise do perfil metabólico envolveram a preparação da amostra, extração das substâncias do tecido do organismo vivo, derivatização das substâncias extraídas, injeção no cromatógrafo, processamento e identificação das substâncias, análises estatísticas e interpretação dos resultados. Junto a isso foi medido o comprimento da larva, peso seco e integridade do trato digestivo.

Foram encontrados 57 metabólitos e dentre eles os metabólitos das classes dos poliálcoois, nitrogenados e aminoácidos em larvas de *A. diaperinus* submetidas ao jejum e na dieta de Poliestireno (PS), tiveram um aumento significativo em relação as larvas alimentadas com a ração para aves. Mostrando que ainda que fossem capazes de mastigar/triturar o poliestireno, o metabolismo das larvas alimentadas com PS é bem similar ao das larvas em condição de jejum.

Apesar disso, esta pesquisa apoia a noção de que, embora as moléculas sintéticas, ao contrário da maioria dos compostos naturais, geralmente não entrem na cadeia alimentar natural para serem degradadas pela microbiota ambiental, algumas espécies de degradadores de

plásticos alternativos podem ser capazes de decompor plásticos. Em virtude dos resultados encontrados, o *A diaperinus* ainda que não decomponha todo o PS, pode ser utilizado como degradador inicial do mesmo. A partir disso depreende-se que o presente estudo contribuirá a longo prazo para fornecer um manejo adequado, sustentável e lucrativo a esses materiais pós-consumo.

Palavras-chave: biodegradação, isopor, plásticos, larva, coleóptero, metabólica.

ABSTRACT

HASTENREITER, Luana da Silva Nascimento. Influences and changes in the metabolic profile of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera:Tenebrionidae) in its use as a polystyrene biodegrader. 2021. Dissertation (Master Science in Animal Biology, Biodiversity). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2021.

The world production of plastics has increased very quickly in the last 50 years, with emphasis on the Chinese production, responsible for ¼ of the world production. To date, no environmentally friendly method is available to dispose of plastic waste, which accumulates in landfills or is scattered as microplastics.

In this context, biodegradation emerges as a sustainable alternative, as it consists in the mineralization of these materials through submission to microbial metabolism. Current research has reported that some coleopteran species are able to degrade plastics with the aid of their chewing mouthparts and the metabolic activity of their intestinal microbiota. This study shows that *Alphitobius diaperinus* is able to feed on and apparently degrade polystyrene. The metabolic profile of larvae fed with poultry feed, subjected to absolute fasting and fed with polystyrene were characterized through a metabolic approach where the steps of the analysis of the metabolic profile involved sample preparation, extraction of substances from the tissue of the living organism, derivatization of extracted substances, injection into the chromatograph, processing and identification of substances, statistical analysis and interpretation of results. Along with this, the larval length, dry weight and integrity of the digestive tract were included.

A total of 50 metabolites were found and among them the metabolites of the polyalcohol, nitrogen and amino acid classes in *A. diaperinus* larvae submitted to fasting and in the Polystyrene (PS) diet had a significant increase in relation to larvae fed with ration for birds. Showing that even if they were able to chew/crush polystyrene, the metabolism of larvae fed with PS is very similar to that of larvae in fasting condition.

Despite this, this research supports the notion that while synthetic molecules, unlike most natural compounds, do not generally enter the natural food chain to be degraded by environmental microbiota, some species of alternative plastic degraders may be able to decompose plastics. Due to the results found, *A. diaperinus*, although it does not decompose all the PS, can be used as its initial degrader. From this it appears that the present study will

contribute in the long term to provide adequate, sustainable and profitable management of these post-consumer materials.

Key Words: biodegradation, styrofoam, plastics, larvae, coleopteran, metabolomics.

1. INTRODUÇÃO

A produção global de plástico tem crescido ininterruptamente ao longo dos últimos anos e a poluição do plástico é um dos desafios ambientais globais que exigem com urgência não apenas metodologias e estratégias para a gestão de resíduos, mas também um conhecimento abrangente sobre seus riscos tóxicos reais para o meio ambiente e a saúde humana. Em 2019, a produção de plástico atingiu 368 milhões de toneladas (Mtons) (PLASTICS EUROPE, 2020), com a Ásia contribuindo com 51% desta produção, sendo a China o país com maior percentagem de produção de plástico (31%). Entre 1950 e 2015, a produção de plástico foi estimada em 8.300 Mtons, com uma quantidade de resíduos plásticos (resíduos plásticos primários e reciclados) de 6.300 Mtons; 78% de que foi descartado em aterros sanitários e no meio ambiente (GEYER et al., 2017). Além disso, as estratégias atuais de gestão de resíduos plásticos, como a incineração (incluindo pirólise para recuperação de energia) e reciclagem, não têm sido satisfatórias para aliviar a alta e contínua disponibilidade de plástico no ambiente (DILKES-HOFFMAN et al., 2018). Ainda assim, a destinação de resíduos plásticos em aterros sanitários e meio ambiente ainda é a principal alternativa para o descarte de resíduos plásticos. Evidentemente, esta tática não é o mais ambientalmente sustentável devido à alta durabilidade de materiais plásticos e sua fragmentação progressiva em partículas de tamanho nanométrico, que podem atingir ecossistemas de água doce e marinhas, e serem transportados para áreas remotas, ou mesmo acrescentados nas teias tróficas (ALLEN et al., 2019; BERGAMI et al., 2020) .

Recentemente, larvas de insetos atraíram a atenção de pesquisadores de biodegradação do plástico devido à capacidade de algumas espécies de mastigar e ingerir polímeros sintéticos. Larvas de espécies de coleópteros, tais como *Tenebrio molitor* (BRANDON et al., 2018; PENG et al., 2020a, 2020b; YANG et al., 2015a, 2015b), *Tenebrio obscurus* (PENG et al., 2019), *Zophobas atratus* (PENG et al., 2020b; YANG et al., 2020), *Tribolium castaneum* (WANG et al., 2020), e *Plesiophthalmus davidis* (WOO et al., 2020), e espécies de lepidópteros, como *Plodia interpunctella* (YANG et al., 2014), *Galleria mellonella* (BOMBELLI; et al., 2017) e *Achroia grisella* (KUNDUNGAL et al., 2019) são capazes de comer o poliestireno (PS) de polímeros não biodegradáveis, polietileno (PE), cloreto de polivinila (PVC) e polipropileno (PP). CASSONE et al. (2020) classificou estas larvas comedoras de plástico, como “plastívoras”.

O *Alphitobius diaperinus* é um inseto da ordem Coleóptera, comumente denominado de “cascudinho da cama das aves”. Este besouro é muito habitual em ambiente de criações de aves de corte, em consequência ao sistema de criação utilizado, onde o piso é revestido por serragem (maravalhas), que misturado a fezes, ração excessiva e água, tornam o ambiente propício ao desenvolvimento deste inseto. A população de cascudinho está localizada no solo, preferencialmente embaixo dos comedouros e bebedouros onde existe alimento abundante e umidade alta (CHERNAKI & ALMEIDA, 2001a; DUNFORD & KAUFMAN, 2006; SALIN et al., 2000).

Em função disso torna-se um vinculador de diversos patógenos, destacando-se bactérias, protozoários, fungos e vírus que causam imunossupressão das aves (CHERNAKI-LEFFER et al., 2002). Isso porque o cascudinho é ingerido pelas aves no lugar da ração balanceada, como consequência disso, adultos e larvas de *A. diaperinus* podem causar obstrução intestinal nas aves confinadas para o abate (UEMURA et al., 2008). Este fato pode causar lesões microscópicas ao longo da parede intestinal das aves, proliferando doenças e reduzindo a ingestão de alimento (FRANCISCO & PRADO, 2001). Além do contato direto do inseto com a cama das aves, o hábito de se alimentar de aves moribundas e mortas, faz do *A. diaperinus* um veiculador de diversos patógenos (CHERNAKI & ALMEIDA, 2001).

Recentemente, um estudo metagenômico analisou a genômica da comunidade de microrganismos intestinal de larvas de *A. diaperinus* criadas em poliestireno e comparou com larvas de controle alimentadas com vegetais. Diversas entidades bacterianas e fúngicas foram significativamente moduladas em animais alimentados com poliestireno. Alguns destes correspondem a táxons já relatados neste contexto em outros organismos, já outros nunca foram relatados, mas exibem características bioquímicas que sugerem um possível papel neste processo (CUCINI et al., 2020).

Em seu trabalho CUCINI et al., (2020) argumenta, que *Pseudomonas* já foram identificadas no contexto de estudos sobre degradação de plástico e proposta como estritamente associada ao consumo de poliestireno, ainda que exija uma quebra inicial do polímero, onde estudos anteriores tentaram identificar as classes de enzimas que, com base em sua estrutura e parâmetros funcionais, podem ser responsáveis pela degradação de diversos tipos de polietileno e poliestireno. O gene *alkB*, encontrado em *Pseudomonas* foi identificado como uma dessas enzimas chaves na biodegradação de alceno durante a degradação do polietileno (PE). Outro ponto é a bactéria *Azotobacter beijerinckii* HM121 é conhecida por produzir uma hidroquinona peroxidase capaz de levar a degradação de poliestireno em um sistema diclorometano-água. O

gênero *Kocuria*, encontrado significativamente super-representado no intestino de larvas de *A. diaperinus* alimentadas com poliestireno, nunca foi registrado como associado ao consumo de plástico. No entanto, *K. rósea* é capaz de degradar o verde malaquita, um composto químico que é utilizado como corante têxtil ou como antimicrobiano em aquiculturas. Este composto apresenta uma estrutura central de estireno, uma subestrutura molecular que também está presente no poliestireno.

As atuais estratégias para gestão de plásticos pós-consumo, promovem danos desastrosos aos ecossistemas. Diante disso, é urgente e imprescindível criar, estratégias e alternativas que visem a contornar a situação, sob o ponto de vista ecológico e financeiro. A biodegradação de resíduos plásticos, vem sendo estudada por diferentes grupos pelo mundo e já apresenta resultados bastante promissores, principalmente com o uso de larvas de coleópteros. Devido ao surgimento de novas discussões, acerca do uso de *A. diaperinus* como um possível biodegradador de Poliestireno, surgiu o interesse de investigar seu comportamento metabólico diante a dieta com poliestireno, comparando com o estado de jejum absoluto e uma dieta a base de ração para frangos, com objetivo de descrever seu perfil metabólico utilizando técnicas analíticas e verificar as implicações dessas dietas sobre o seu metabolismo energético, visando contribuir para o esclarecimento da ecologia nutricional e as estratégias adaptativas dos insetos, que ainda não são totalmente compreendidas.

2. REVISÃO LITERÁRIA

2.1 A indústria do plástico: visão mundial e nacional

Os avanços tecnológicos sofridos pela sociedade nas últimas décadas impulsionaram o desenvolvimento de materiais versáteis, eficientes e de alta durabilidade, que fossem capazes de dar suporte ao intenso crescimento industrial de escala global. Diante desse panorama surgiram os plásticos, polímeros sintéticos de cadeias longas e alta massa molecular da qual propriedades físico-químicas os tornam favoráveis para atender a essa demanda. Plásticos são produzidos a partir de derivados do petróleo, compostos majoritariamente por hidrocarbonetos, além de conter aditivos como os corantes e antioxidantes responsáveis pelo aumento de sua resistência à degradação, de modo a aumentar sua durabilidade (SIDDIQUI & REDHWI, 2009).

A produção de plásticos aumentou aceleradamente nos últimos 50 anos (DIAS, 2016). Em 1964 a produção era de 15 milhões de toneladas, já em 2014, esta produção passou para 311 milhões de toneladas (PLASTICS EUROPE, 2015). Espera-se que em 2050 esta produção chegue a 1.124 milhões de toneladas e que o setor de plástico seja responsável por 20% do consumo total de petróleo, considerando uma taxa esperada de crescimento da demanda total de petróleo de 0,5% ao ano (DIAS, 2016).

A projeção feita para 2050 também engloba outros indicadores. Um deles é a proporção entre resíduos plásticos descartados no oceano e a quantidade de peixes, em peso absoluto. Em 2014 esta taxa era de 1 plástico para 5 peixes e a previsão é de que em 2050 esta taxa seja de 1 plástico para 1 peixe. O outro indicador importante foi o percentual do carbono emitido por atividade relacionadas a produção de plástico e incineração pós uso. Em 2014 os plásticos eram responsáveis por 1% de todo o carbono emitido e a previsão para 2050 é de uma taxa de 15% (DIAS, 2016).

2.2 Caracterização, síntese e categoria dos polímeros

O petróleo é elemento basal de muitos produtos, sendo matéria-prima fundamental na sociedade, atualmente. A maioria dos plásticos é produzida a partir do petróleo. A estrutura, as propriedades físicas e químicas e mecânicas de polímeros são indispensáveis para o compreensão da síntese e da degradação dos plásticos (DIAS, 2016; PEIXOTO, 2013).

A conformação dos átomos ao longo da cadeia polimérica, sua distribuição espacial e a massa molecular são aspectos chaves da estrutura de polímeros. A estrutura química dessas macromoléculas pode ser constituída por repetições de um único componente químico ligadas covalentemente, formando uma estrutura homogênea, os homopolímeros, ou por diferentes unidades monoméricas unidas por ligações covalentes, formando um mosaico molecular, os copolímeros. As unidades monoméricas dos copolímeros podem estar arranjadas de forma aleatória, sem que exista uma ordenação predeterminada, ou de forma alternada, na qual os componentes se estruturam de modo determinado e recorrente (MÜLLER, 2002; SPERLING, 2001). Estruturas químicas mais comuns de plásticos petroquímicos convencionais, na figura 1 e biodegradáveis, na figura 2.

O Petróleo e gás natural são normalmente percebidos como sendo essencialmente fontes primárias de combustíveis, entretanto o processamento inicial desses mesmos recursos naturais que provêm as matérias-primas básicas de um dos pilares do sistema industrial moderno, a indústria petroquímica. A Indústria Petroquímica tem sua base nas matérias-primas obtidas da indústria de energia, principalmente nafta (derivada do petróleo), líquidos de gás natural (extraídos do gás) e carvão (Broliato Plásticos Ltda, 2022).

A cadeia produtiva dos plásticos da início com o uso desse mesmo nafta, e tipicamente, podem ser distinguidos três estágios, ou gerações, industriais na cadeia da atividade petroquímica: (1) indústrias de 1ª geração, que fornecem os produtos petroquímicos básicos, tais como eteno, propeno, butadieno, etc; (2) indústrias de 2ª geração, que transformam os petroquímicos básicos nos chamados petroquímicos finais, como polietileno (PE), polipropileno (PP), polivinilcloro (PVC), poliésteres, óxido de etileno etc.; (3) indústrias de 3ª geração, onde produtos finais são quimicamente modificados ou conformados em produtos de consumo. A indústria do plástico é o setor que movimenta a maior quantidade de produtos fabricados com materiais petroquímicos (DIAS, 2016).

A primeira geração petroquímica é encarregada pela obtenção das cadeias básicas de hidrocarbonetos. A formação de resinas a partir dos produtos petroquímicos básicos compõe a segunda geração petroquímica. As resinas plásticas produzidas são então processadas para a geração de variados produtos, ou seja, nas empresas da terceira geração petroquímica (Figura 3) (SIQUIM/EQ/UFRJ, 2003). As resinas plásticas são divididas em 7 tipos. Na tabela 1 observa-se o símbolo de identificação de cada um. O alvo desta padronização é promover a triagem de resíduos plásticos ao serem encaminhados à reciclagem.

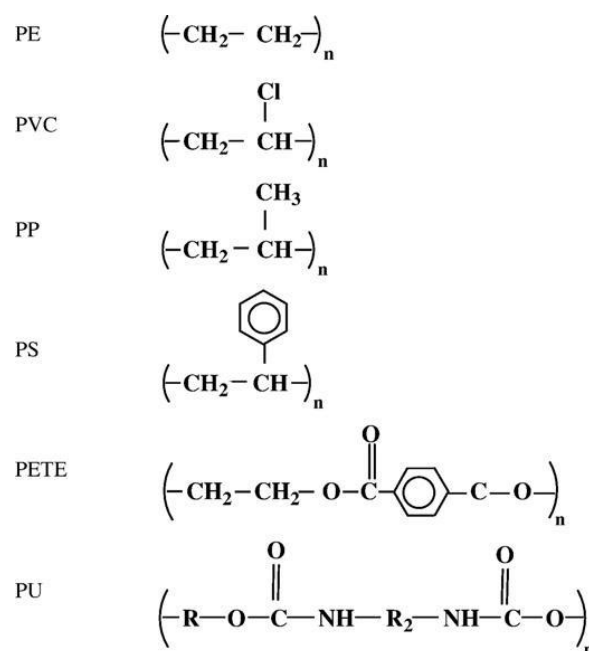


Figura 1: Estruturas de plásticos petroquímicos convencionais. Polietileno (PE), Policloreto de vinila (PVC), Polipropileno (PP), Poliestireno (PS), Polietileno tereftalato (PET), Poliuretano (PU). Retirado de PAVIA et al., 1988.

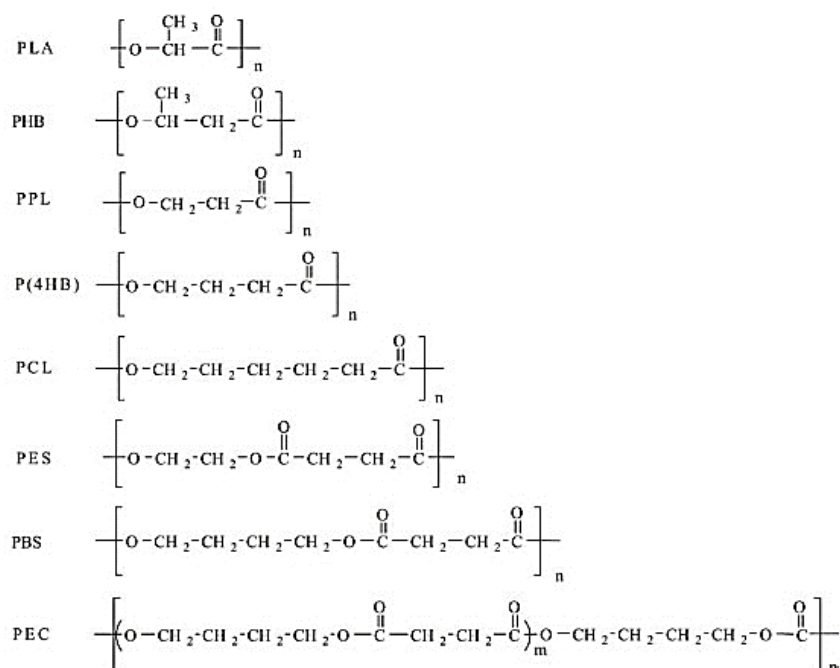


Figura 2: Estrutura química de plásticos biodegradáveis. Poli(ácido láctico) (PLA), Poli(3-hidroxi-butirato) (PHB), Poli(propriolactona) (PPL), Poli(ϵ -caprolactona) (PCL), Poli(etileno succinato) (PES), Poli(butileno succinato) (PBS), Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV) e Poli(éster carbonato) (PEC). Retirado de TOKIWA & CALABIA, 2004.

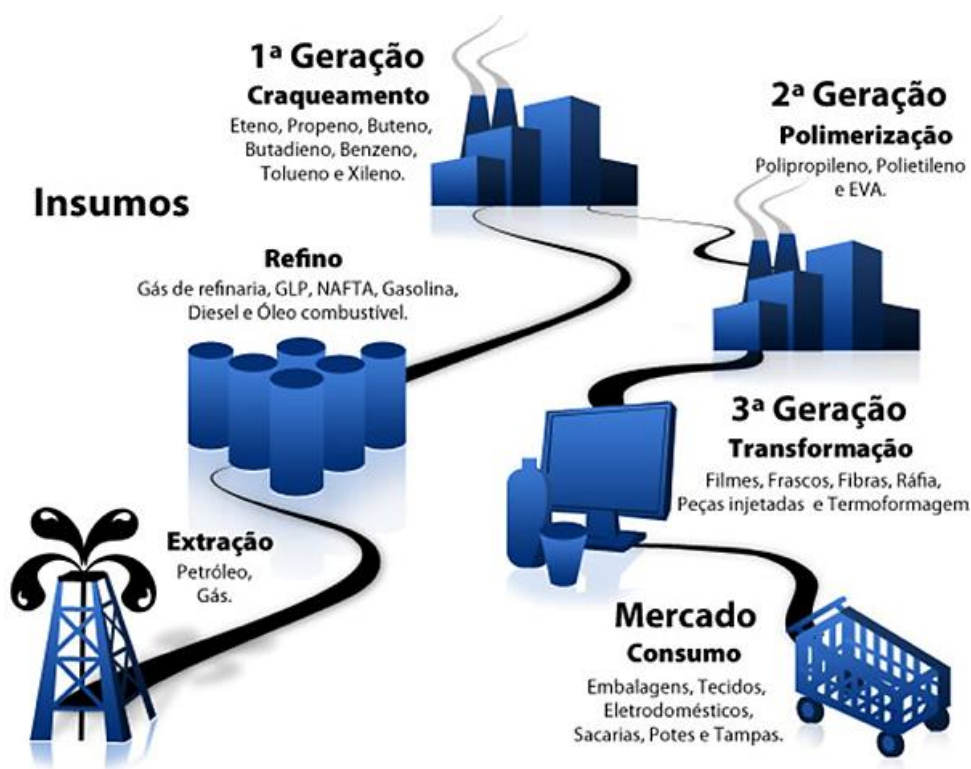


Figura 3: A cadeia Petroquímica e o plástico. Fonte site: Quattor Química S.A, acesso <https://www.quattor.com.br/quattorweb/pt/industria.aspx> em 20/01.








2.3 Descarte e manejo dos plásticos pós-consumo

O plástico apresenta muitos benefícios quando comparado aos demais materiais em vários tipos de aproveitamentos diferentes, apesar disso, como os plásticos são feitos a partir de misturas de polímeros e alguns aditivos, estes podem conter substâncias impuras e contaminantes, acarretando riscos à saúde do homem, aos animais e às plantas.

Junto a isso, até ao presente há incertezas sobre as possíveis consequências de exposição em longo prazo a substâncias encontradas nos plásticos. O mau gerenciamento dos resíduos sólidos e a falta de conscientização da população podem intensificar os problemas ambientais gerados pelo uso do plástico.

Quase 260 milhões de toneladas de polímeros sintéticos são mundialmente utilizadas por ano, de modo que 8% da produção mundial de olefinas é destinada a suprir essa demanda (THOMPSON et al., 2009). O Brasil é responsável por mais de dois milhões de toneladas desse contingente (Plastivida, 2020). Esses plásticos produzidos por polímeros sintéticos são extremamente estáveis e inertes, visto que não entram com facilidade nos ciclos biogeoquímicos (SHIMAO, 2001).

Tabela 1: Tabela de Identificação e Simbologia de Resinas. Fonte: ABNT-NBR 11752, (2017).

| Símbolo | Resina termoplástica | Abreviatura em português | Abreviatura em inglês |
|--|---------------------------------------|--------------------------|-----------------------|
|  PET | Poli(tereftalato de etileno) | PET | PET |
|  PEAD | Polietileno de alta densidade | PEAD | HDPE |
|  PVC | Poli(cloreto de vinila) | PVC | V |
|  PEBD | Polietileno de baixa densidade | PEBD | LDPE |
| | Polietileno de baixa densidade linear | PEBDL | LLDPE |
|  PP | Polipropileno | PP | PP |
|  PS | Poliestireno | PS | PS |
|  OUTROS | Outras resinas | Outros | Other |

As exposições relacionadas ao uso de plásticos e embalagens plásticas se concentram em três áreas: a degradação dos sistemas naturais, como consequência de lançamento de plásticos especialmente nos oceanos, a emissão de gases do Efeito Estufa durante a produção dos plásticos e na incineração dos plásticos pós uso e os prováveis impactos na saúde e meio ambiente causados pelas substâncias componentes dos plásticos . O descarte de forma irregular do plástico, é um dos principais problemas enfrentados pela reciclagem no Brasil e no mundo. O dano anual dos plásticos no ecossistema marinho é de cerca de 13 bilhões de Dólares e segundo dados da Cooperação econômica Ásia-Pacífico, os custos dos plásticos no oceano para o turismo, pesca e marinha mercante é de aproximadamente 1,3 bilhões de Dólares na referida região (DIAS, 2016).

Plásticos são transportados a longas distâncias das áreas de origem pelo vento ou carregados pela água, acumulando-se sobretudo nos oceanos, onde podem ocasionar um grande número de impactos ambientais e econômicos (THOMPSON et al., 2009). Tais resíduos podem exercer efeitos em animais e em sistemas terrestres e de água doce, incluindo emaranhamento, ingestão por animais, podendo levar a morte, bloqueio de sistemas de drenagem, impactos estéticos, além de serem observadas contaminações pelos seus aditivos (Figura 4) (BARNES et al., 2009).

As primeiras descrições de contaminação do meio ambiente por plásticos datam da década de 1960, em carcaças de aves marinhas contendo pedaços de plásticos na costa da Nova Zelândia (BARNES et al., 2009). Atualmente foram citadas mais de 260 espécies com hábitos alimentares distintos (filtradores, detritívoros, decompositores) encontradas engasgadas, sufocadas, presas e imobilizadas por resíduos plásticos. Tais resíduos também foram encontrados em estômagos e cloacas de animais. Entre as espécies encontram-se invertebrados, aves marinhas, peixes, mamíferos e tartarugas (THOMPSON et al., 2009)

A questão ambiental do plástico deve ser avaliada de forma global, ou seja, é importante avaliá-la não somente no seu pós-uso, mas também em todo seu ciclo de vida. Até mesmo o desenvolvimento do chamado plástico biodegradável não é uma solução a longo prazo para o problema do plástico, porque muitos desses materiais contêm apenas uma proporção de materiais biodegradáveis (amido, por exemplo), deixando para trás fragmentos microscópicos de plástico (KLEMCHUK, 1990).

As predileções na gestão dos resíduos sólidos urbanos devem ser inicialmente a minimização da geração desses resíduos, através de mudanças de hábitos de consumo e a produção de produtos com menor quantidade de material, feitos de material reciclável, etc. Em seguida

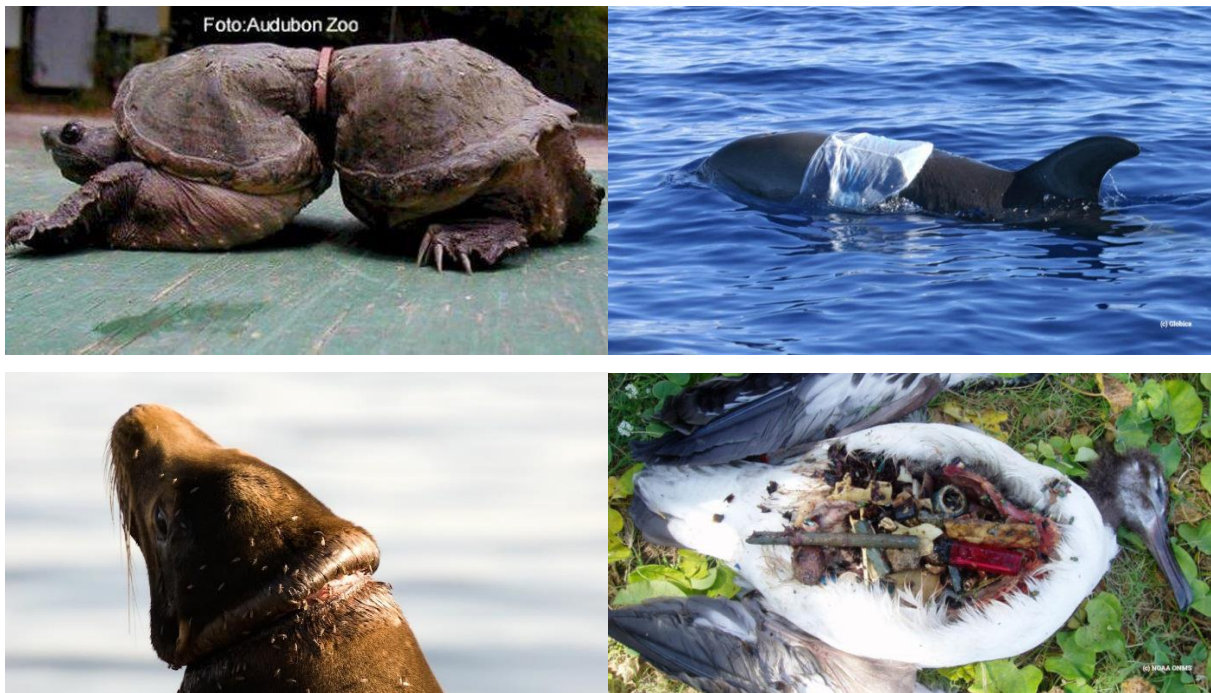


Figura 4: Fotografias de animais vítimas da poluição de plástico. Retirado de Mega Curioso, acesso: <https://www.megacurioso.com.br/sustentabilidade/37254-entenda-como-o-descarte-indevido-de-plastico-esta-destruindo-nosso-planeta.htm>; Funverde, acesso: <https://www.recicloteca.org.br/coleta-seletiva/lista-de-cooperativas-do-rio-de-janeiro-rj>

minimizar a geração de resíduos, a preocupação deve se voltar para a sua destinação: reciclagem, incineração e disposição, nesta ordem (DEMAJOROVIC, 1995; ROLIM, 2000).

Algumas alternativas para a minimização da geração de resíduos é a redução na fonte, produzindo produtos com menos plástico, o reuso e a reciclagem, fabricando produtos com material reciclado (DIAS, 2016).

2.3.1 Deposição em aterros

A estratégia mais usual para lidar com os plásticos pós-consumo é a deposição em aterros. Esse método é responsável por graves problemas ecológicos, visto que são necessários de 100 a 500 anos para sua decomposição, sendo estes, considerados não biodegradáveis, acumulando no meio ambiente, expondo o ecossistema a danos irreversíveis (Figura 5) (DIAS, 2016).

Um grande impacto ambiental é causado pelos aditivos, como corantes e antioxidantes, utilizados na confecção dos plásticos, que acarretam na formação de resíduos tóxicos e persistentes (HAMID et al., 1992). Junto a atenção com o meio ambiente, está a falta de espaço

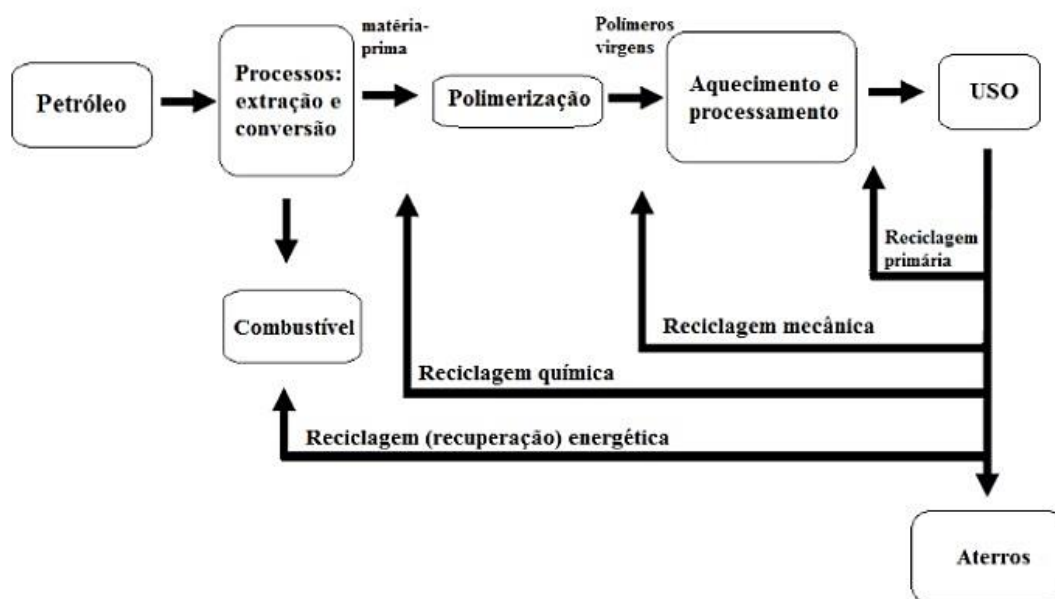


Figura 5: Processos e rotas de destinação de plásticos. Fonte: DIAS, (2016).

físico disponível para suportar esse grande volume de materiais descartados (ITÄVAARA; VIKMAN, 1995), tornando emergencial o desenvolvimento de estratégias adicionais a fim de interromper essa aglomeração.

2.3.2 Incineração

Pretendendo ser uma alternativa a dificuldade causada pela deposição dos plásticos em aterros ou ambientes naturais, é empregada a técnica de incineração de materiais pós-consumo. O benefício dessa estratégia é a diminuição do volume do material em cerca de 90-95%, mas, em compensação, implica numerosos prejuízos ao ambiente. Processos de incineração e combustão liberam substâncias tóxicas e prejudiciais, incluindo os carcinogênicos, compostos aromáticos (benzeno, tolueno, xileno e estireno) e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH), compostos de cloro, metais pesados, monóxido e dióxido de carbono, radicais livres, aldeídos, ácidos, cetonas, lactonas, hidrocarbonetos saturados, éteres cíclicos, ésteres cíclicos, alcenos e dienos (Figura 6) (ARACIL et al., 2005; HOFF & JACOBSSON, 1981; SIDDIQUI & REDHWI, 2009)

A pirólise (Figura 7), degradação térmica de macromoléculas em altas temperaturas e ausência de oxigênio, é uma alternativa à incineração capaz de reduzir o volume de gases. Além de ser capaz de recuperar diversos hidrocarbonetos que podem, até mesmo, servir como



Figura 6: Incineração do lixo. Retirada do Portal Ambiente Legal, acesso: <https://www.ambientelegal.com.br/minas-gerais-vai-proibir-incineracao-de-lixo/>

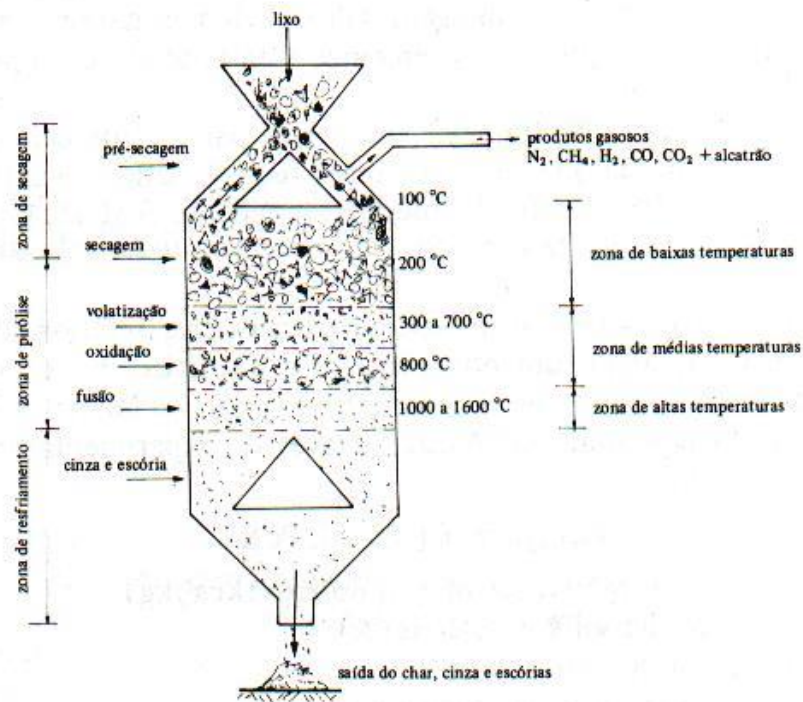


Figura 7: Esquema de um reator pirolítico. Imagem retirada de “Pirólise - acesso: <http://www.geocities.ws/reciclagem2000/pirolise.htm>”

matéria-prima para combustíveis, como gasolina, querosene e diesel, em refinarias (SIDDIQUI & REDHWI, 2009), considerando que os métodos de incineração e pirólise são capazes de reaver parte da energia contida no material. Embora seja uma alternativa menos prejudicial, que apresenta reduções no nível de poluentes emitidos, a pirólise ainda é responsável pela liberação de vários resíduos recalcitrantes, não podendo ser considerada uma opção limpa ou segura em termos ecológicos (DIAS, 2016).

2.3.3 Reciclagem

A reciclagem de plásticos é um processo de gestão dos resíduos pós-consumo marcado pela redução do impacto ambiental e da depleção de recursos naturais. A maioria dos plásticos pós-consumo é destinada a aterros ou incinerada, e apenas 7% é reciclada (Figura 8) (DIAS, 2016).

Este processo é favorecido de grande complexidade, e inclui quatro categorias de reciclagem: primária, secundária, terciária e quaternária. A reciclagem primária, ou *loop-fechado*, resume-se em um processamento mecânico tendo como produto um material com propriedades equivalentes, enquanto a secundária, ou reciclagem de desclassificação, gera materiais do qual propriedades diferem entre si, mas ainda é determinada como reciclagem mecânica. A reciclagem terciária, recuperação da matéria-prima ou reciclagem química, visa a recuperação dos constituintes químicos, ou seja, da matéria-prima, através da despolimerização do plástico original (qual os insetos se encaixam), e a quaternária, ou recuperação de energia, fica à recuperação da energia contida nos compostos das etapas iniciais (Figura 5) (FISHER, 2003; PEIXOTO, 2013; SONG et al., 2009; WILLIAMS & WILLIAMS, 1999).



Figura 8: Centro de reciclagem. Imagem retirada do site “Cooperativas do Rio de Janeiro: endereços, telefones e mapa”, acesso: <https://www.recicloteca.org.br/coleta-seletiva/lista-de-cooperativas-do-rio-de-janeiro-rj>

2.4 Biodegradação

A biodegradação de um determinado material ocorre quando ele é usado como nutriente por um determinado conjunto de microrganismos (bactérias, fungos ou algas) que vive no meio ambiente onde o material vai ser degradado. A piora dos problemas relacionados ao uso intenso

de materiais plásticos, em colaboração à necessidade do aperfeiçoamento e do desenvolvimento de métodos que amenizem essa questão, acabou na intensificação de estudos baseados na criação de técnicas alternativas para manejo dos pós-consumo. As pesquisas a respeito do tema visam a descontinuar a produção de materiais não-degradáveis e, simultaneamente, solucionar os obstáculos vivenciados em decorrência dos plásticos inertes já existentes. Isto porque os processos de deposição em aterro, incineração e reciclagem apresentam grandes dificuldades e inúmeras consequências indesejáveis a serem contornadas (PEIXOTO, 2013).

A inércia e a alta resistência desses produtos se explicam pela elevada massa molecular, alto grau de compactação da molécula e por sua natureza altamente hidrofóbica, fatores que influenciam na disponibilidade da molécula ao ataque microbiano (HADAD et al., 2005). Quanto menores e mais repetitivos forem os monômeros, mais forte é a cristalização da molécula, deste modo menos biodegradável ela se torna. A baixa flexibilidade do polímero, que impossibilita seu ajuste no sítio catalítico das enzimas microbianas excretadas, junto a sua incapacidade em cruzar a membrana celular, própria de moléculas de alta massa molecular, tornam inviável sua catálise (CHANDRA & RUSTGI, 1998). As enzimas são proteínas de alta especialização e podem favorecer as reações químicas com grande eficiência catalítica e elevado grau de especificidade por seus substratos (NELSON & COX, 2014). Desse modo, moléculas com as características citadas têm sua degradação comprometida e, até mesmo, impedida (CHANDRA & RUSTGI, 1998). Sendo assim, a degradação biológica de polímeros está ligada a degradação enzimática de polímeros, pois de fato, o polímero é catalisado pela ação das enzimas excretadas pelos microrganismos.

Há três elementos primordiais para o processo de biodegradação de polímeros:

- Organismos: Exercem ações metabólicas específicas para a síntese de enzimas que permitem o início do processo de despolimerização e mineralizam os monômeros e oligômeros formados por este processo;
- Ambiente: Temperatura, PH, presença de ativadores ou inibidores no meio, sais e umidade, sendo este último o mais importante;
- Substrato: Estrutura do polímero. Este fator inclui os tipos de ligação química, níveis de ramificação e de polimerização, distribuição de massa molar, cristalinidade, área superficial e outros aspectos morfológicos dos polímeros (PEIXOTO, 2013).

O processo da biodegradação acontece em duas fases, a despolimerização do plástico e a mineralização. A primeira origina a quebra das ligações poliméricas, gerando a fragmentação do material, chamada de oligômeros. Logo após, inicia a decomposição das macromoléculas

em cadeias menores, chegando aos monômeros (“Revista Plástico Moderno”, 2016). A segunda fase, a mineralização, acontece quando os fragmentos são satisfatoriamente pequenos para serem transportados pelo interior dos organismos onde eles são transformados em biomassa e, então, mineralizados. Este processo produz água, sais minerais, novas biomassas e alguns gases como CO₂, CH₄, N₂ e H₂ (PEIXOTO, 2013).

Considera-se que o método de hidrólise é o mais importante para dar início a biodegradação de polímeros sintéticos, com ênfase para os poliésteres e que ele normalmente acontece por meio da atuação de enzimas da classe das hidrolases. Para mais, sabe-se que este processo seja especialmente relevante para degradação de polímeros como o Polietileno tereftalato (PET). Geralmente, a biodegradação do plástico é um processo heterogêneo devido a insolubilidade da água e do tamanho das moléculas do polímero (MUELLER, 2006).

Um estudo realizado por SILVA (2009), observou a biodegradabilidade de polímeros sintéticos por ação de fungos cultivados em resíduos agroindustriais. As linhagens de fungos lignocelulolíticos utilizados no referido estudo mostraram ter a capacidade de se desenvolverem em meios contendo fonte de carbono sintético e de difícil degradação, apresentando graus variáveis de crescimento. Também apresentaram um grande potencial na produção de enzimas lignocelulolíticas.

A equipe de YANG et al., (2015b, 2015a) mostraram que o *Tenebrio molitor* transforma metade do isopor consumido em dióxido de carbono e a outra metade em excremento como fragmentos decompostos. Além de que, comprovaram que o consumo de plástico não afeta a saúde das larvas, as transformando em uma grande possibilidade para a reciclagem de resíduos plásticos. A capacidade de degradação destas larvas estaria nas bactérias associadas aos seus sistemas digestivos, que teriam aptidão de decompor o plástico.

YOSHIDA et al., (2016) identificou uma bactéria, isolada de amostras ambientais contaminadas com detritos de PET, que conseguiria digerir plásticos PET, transformando o material em dióxido de carbono e água. Este estudo teve uma repercussão enorme mundialmente. Nesta pesquisa, a quebra das moléculas do polímero PET seria feita por duas enzimas da bactéria identificada. Estas enzimas foram batizadas de Petase e Metase. Ainda identificaram a enzima ISF6_4831, que usa água para quebrar as moléculas do polímero em substâncias intermediárias. Essas substâncias são definitivamente quebradas pela ação de uma segunda enzima, a ISF6_0224.

2.5 *Alphitobius diaperinus*: origem, morfologia e ciclo de vida

O *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) é um besouro do Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Coleoptera e Família Tenebrionidae (PAIVA, 2000). Originário do leste africano onde ocorre naturalmente em ninhos de pássaros e nas cavernas em guano de morcegos, se alimenta de fragmentos de detritos (VAUGHAN et al., 1983). Conhecido popularmente como cascudinho da cama de frangos é uma espécie cosmopolita, comumente encontrada infestando resíduos de produtos úmidos estocados, e que provavelmente migrou para os aviários através de rações ou de fazendas vizinhas que estocavam alimentos (REZENDE, 2009).

Esta adaptação ao ambiente de aves destinadas à corte, é devido ao sistema de criação utilizado. Onde o piso é revestido por serragem (maravalhas), que misturado a fezes, ração excedente e água, tornam o ambiente propício ao desenvolvimento deste inseto. Sua população fica localizada no solo, preferencialmente embaixo dos comedouros e bebedouros onde existe alimento abundante e umidade alta (CHERNAKI-LEFFER et al., 2007; SALIN et al., 2000).

O ciclo biológico de *A. diaperinus*, em laboratório, se completa em 46 dias (figura 9) , sob temperatura de 28°C e 80% de UR (SALLET, 2013). O ciclo de desenvolvimento do *A. diaperinus*, consiste nos períodos de pré-ovoposição, ovoposição, eclosão dos ovos, muda das larvas, pupação e período de eclosão de insetos adultos (tabela 2)(SILVA et al., 2005).

Após dois dias da postura (SALLET, 2013), eclode de cada ovo uma larva esbranquiçada, com 1.2 mm de comprimento (SILVA et al., 2005). A fase larval estende-se por 35 dias (SALLET, 2013), passando por 6 a 11 ínstars (VERGARA-COBIÁN & GAZANI B, 1996; PAIVA, 2000) quando os imaturos atingem o tamanho de 13,8mm de comprimento e coloração marrom escura (JAPP; BICHO; SILVA, 2010). Após a fase larval, sofrem ecdise e entra em fase de pupa por quatro dias (SALLET, 2013), emergindo adultos de coloração branca e sem quitinização (é adquirida em cerca de quatro dias), que em 20 dias atingem a maturidade sexual e começa a se reproduzir novamente, onde o coleóptero adulto pode viver entre 14 e 16 meses (DASS; S; AGARW, 1984; PAIVA, 2000; SALLET, 2013).

Durante sua vida, a fêmea tem potencial para botar mais de 2.000 ovos, escolhendo o local ideal para o desenvolvimento da larva, que em aviários seria geralmente nas linhas de comedouros e bebedouros (PAIVA, 2000).

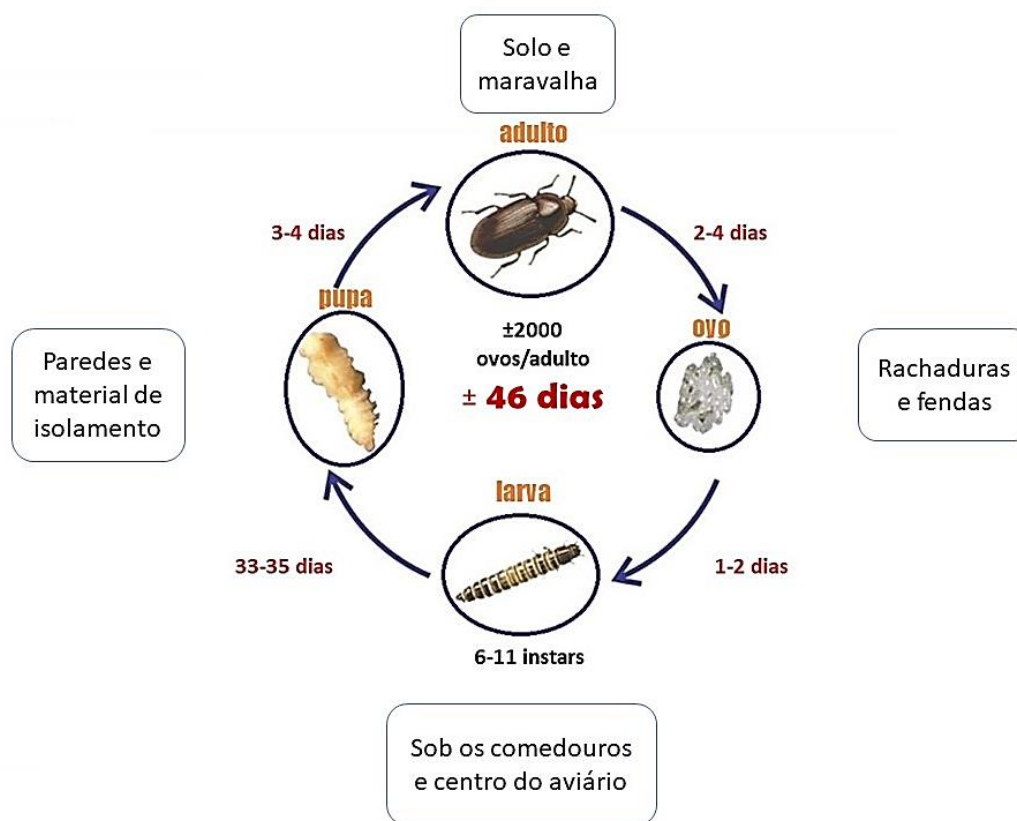


Figura 9: Ciclo de vida do *A. diaperinus* e distribuição na cama de frangos.

Tabela 2. Tabela dos estágios de desenvolvimento do *A. diaperinus* de acordo com diferentes trabalhos.

| Fases de Desenvolvimento | Duração de cada fase | | | |
|--------------------------|---|--|--|---|
| | (DASS et al., 1984) Temperatura ± 27° C, Umidade Relativa ± 65% | (VERGARA-COBIÁN & GAZANI B, 1996) Temperatura ± 32° C | (SILVA et al., 2005) Temperatura ± 27° C, Umidade Relativa ± 80% | (SALLET, 2013) Temperatura ± 28°C, Umidade Relativa ± 80% |
| Pré-ovoposição | - | - | 3 dias | 4 ± 2 dias |
| Ovos | 6,60 dias | 4 dias | 5 dias | 2 ± 1 dias |
| Larvas | 68,80 dias | 49,9 dias | 38 dias | 35 ± 2 dias |
| Pupas | 8,40 dias | 10,4 dias | 5 dias | 4 ± 1 dia |

continuação

| | | | | |
|---|--------------|-----------|---------|-------------|
| Adultos sem quitinização | - | - | 4 dias | 4 ± 1 dia |
| Maturidade sexual | 35 dias | - | 20 dias | 12 ± 3 dias |
| Período de Ovoposição até o adulto | 70 a 89 dias | 64,3 dias | 55 dias | 46 dias |
| Total | 118,8 dias | 64,3 dias | 75 dias | 61 dias |

2.6 Distribuição espacial na cama aviária

É indispensável avaliar a distribuição espacial de insetos-praga para determinar uma metodologia de controle satisfatória e auxiliar na estratégia de manejo em locais de grande densidade populacional, reduzindo a quantidade de inseticida utilizado (UEMURA et al., 2008).

A estrutura espacial dessa população de insetos no solo, em uma granja avícola, apresenta alta heterogeneidade (SALIN et al., 2000). A proliferação do cascudinho se deve, pela regularidade da faixa de temperatura de operação no interior dos galpões, pelos níveis de umidade naturalmente observados na cama, pelo reaproveitamento desta no intervalo de lotes e pela disponibilidade de alimento e refúgio para os insetos (figura 9) (UEMURA et al., 2008).

Todos os estágios de desenvolvimento vivem na cama das aves. Os cachos de ovos são colocados em fendas naturais, rachaduras e lixo. As larvas costumam fazer um túnel para o interior do material de instalação de edifícios para pupar. A pupação também ocorre em partes da cama (na interface entre o solo e a serapilheira) e no próprio solo (SALIN et al., 2000).

As larvas de últimos estágios de vida, pupas e adultos, são localizadas no solo, cerca de 10cm de profundidade, preferencialmente abaixo dos comedouros, onde o substrato apresenta-se denso, compactado e com umidade baixa. Esses insetos, em reduzidas temperaturas e/ou situações de estresse, não realizam diapausa, como os demais insetos, migrando em movimentos verticais para baixo em direção ao solo (SALIN et al., 2000). Essas larvas, não só procuram o solo para o desenvolvimento das fases de pupa e adultos, mas também substratos, como o isolamento da parede do aviário (DESPINS; TURNER; RUSZLER, 1987).

Dessa forma, esses insetos podem causar danos estruturais que resultarão em alternância de temperatura, fazendo com que a conversão alimentar das aves se torne prejudicada (FRANCISCO & DO PRADO, 2001). Este comportamento permite a sobrevivência dos insetos na retirada da cama e garante a possibilidade de novos indivíduos infestarem novamente o

aviário após a colocação do novo substrato e/ou lote de aves (GEDEN; ARENDS; AXTELL, 1987). Quando adultos, esses insetos também podem ser atraídos pela luz das residências, e vão em busca por alimentos e locais para reprodução (SINGH & JOHNSON, 2015).

2.7 Demanda nutricional em insetos

Um dos mecanismos adequados à sobrevivência dos insetos é o seu estado nutricional, no qual, através da alimentação, obtém nutrientes essenciais para suprir as demandas energéticas associadas à manutenção geral, além de estimular o crescimento e a reprodução (BEHMER, 2008; GULLAN & CRANSTON, 2017).

Dessa forma, os insetos apenas diferem de outros animais porque são capazes de obter seus nutrientes de diferentes fontes de alimentos que, por diversos motivos, não estão disponíveis para a maioria dos outros animais. Por exemplo, cupins se alimentam de madeira, baratas de material vegetal morto, os insetos sugadores das seivas do floema e xilema de planta (pulgões, cigarrinhas e cigarras), piolhos sugadores de sangue de vertebrado e algumas formigas e besouros conseguem seus nutrientes cultivando fungos (BEHMER, 2008).

Ademais, a propriedade dos nutrientes necessários à grande maioria dos insetos é semelhante, considerado que a composição química básica de seus tecidos e seus processos metabólicos são geralmente similares. No entanto, há grandes diferenças nas necessidades nutricionais, podendo ser o efeito de mudanças evolutivas associadas à alimentação em substratos com quantidades e qualidades nutricionais desiguais (CHAPMAN, 2012). Insetos armazenam reservas metabólicas dos mesmos três grupos principais de macronutrientes: aminoácidos, carboidratos e lipídios (HAHN & DENLINGER, 2007).

As proteínas são nutrientes importantes, que oferecem aminoácidos envolvidos em diversos processos como crescimento, morfogênese, esclerotização cuticular e produção de ovos, além de atuarem como neurotransmissores (CHEN, 1966; DADD, 1985; KLOWDEN, 2013). O corpo gorduroso é o local fundamental de síntese de aminoácidos nos insetos, mesmo ocorrendo também em outros tecidos (GULLAN & CRANSTON, 2017). Também é nesse órgão que ocorre a síntese da vitelogenina, a principal molécula necessária ao sucesso reprodutivo nas fêmeas (COELHO et al., 2016; HUO et al., 2018; KLOWDEN, 2013; SALMELA & SUNDSTRÖM., 2017).

Muitos insetos em diapausa armazenam aminoácidos em proteínas especializadas. Essas proteínas, que podem se tornar muito abundantes, foram inicialmente denominadas proteínas

de diapausa, contudo análises posteriores demonstraram que a maioria pertence à família de proteínas de insetos de hexamerina de armazenamento (DENLINGER et al., 2012; HORSTEN BURMESTER, 1999). Estas são geralmente acumuladas antes da diapausa e seus aminoácidos constituintes podem ser usados para suprir o metabolismo intermediário e respiratório durante a diapausa e funções pós diapausa, como a retomada do desenvolvimento (DENLINGER et al., 2012).

Os carboidratos tem uma importância bastante expressiva, pois são as fontes energéticas basais da maioria dos insetos. Eles podem ser transformados em gorduras e colaborar para a produção de aminoácidos. Participam também do desenvolvimento cuticular, das estruturas reprodutivas e do processo pré-vitelogênico (ARRESE et al., 2009). A reserva primária de carboidratos em insetos em diapausa ou não é o glicogênio polissacarídeo, enquanto a trealose é o açúcar primário na hemolinfa (HAHN & DENLINGER, 2007). O dissacarídeo trealose, encontrado na hemolinfa dos insetos e o polissacarídeo glicogênio, formado por unidades de glicose, são importantes fontes de carboidratos nos insetos. Eles dois podem ser facilmente convertidos em glicose quando há necessidade e, assim, mobilizada para a região de interesse (GULLAN; CRANSTON, 2017; KLOWDEN, 2013; YAMADA et al., 2018).

Já os lipídios estão presentes em muitos tecidos dos insetos, incluindo o intestino médio, ovários e discos imaginais, entretanto, o corpo gorduroso (CG) é o principal local de armazenamento de gordura. O principal papel do inseto CG é a coordenação do metabolismo energético, que é baseado em reservas, como lipídios e glicogênio. Esses recursos são produzidos e utilizados para diversas atividades fisiológicas, como diapausa, fome ou voos de longo prazo e desenvolvimento embrionário (ARRESE & SOULAGES, 2010; GONDIM et al., 2018).

Os lipídeos são importantes reservas que disponibilizam energia para atividades que exigem grande esforço metabólico, como tolerância a temperaturas mais baixas, metamorfose, produção de ovos e longevidade, além de atuarem na composição de membranas celulares (BRETAS, 2016; CANAVOSO et al., 2001a). Eles são absorvidos tanto como ácidos graxos como diacilgliceróis no intestino anterior e nos cecos gástricos (KLOWDEN, 2013). Quase toda gordura nos insetos está estocada no corpo gorduroso em células denominadas trofócitos (GULLAN; CRANSTON, 2017) e mais de 90% do armazenado é triglicérido (ARRESE; SOULAGES, 2010). Os triacilglicerídeos podem ser obtidos diretamente dos alimentos ou sintetizados a partir de carboidratos ou precursores de aminoácidos via intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico, como nos vertebrados (CANAVOSO et al., 2001; DOWNER &

MATTHEWS, 1976). O corpo gorduroso é o local primordial de síntese de ácidos graxos, produção e armazenamento de triacilglicerídeos em insetos, embora alguns triacilglicerídeos sejam armazenados em tecidos metabolicamente ativos, como a musculatura do voo torácico (CANAVOSO et al., 2001b; ZERA & DENNO, 1997). Nesse aspecto, os nutrientes são de fundamental importância para o desenvolvimento, à capacidade de defesa e, sobretudo, a reprodução dos insetos (CHAPMAN, 2012; GULLAN & CRANSTON, 2017; KLOWDEN, 2013).

2.8 Hábitos alimentares de *A. diaperinus*

As peças bucais na ordem Coleóptera são do tipo mastigador e com mandíbulas bem desenvolvidas. Os besouros desta ordem possuem hábito alimentar e habitat bem variado, pois se alimentam de todos os tipos de materiais vegetais e animais (MENDES & POVALUK, 2017). Os *A. diaperinus* podem apresentar hábito alimentar saprofítico, podendo alimentar-se de material orgânico em decomposição. Na cama de aviário, estes insetos alimentam-se de restos de ração misturados a excretas e penas, além da carne e órgãos internos de aves moribundas ou mortas (REZENDE, 2009).

Pesquisas recentes relataram que algumas espécies de coleópteros são capazes de destruir os plásticos devido ao aparelho bucal de mastigação e à atividade metabólica da microbiota intestinal. Trabalhos anteriores tentaram destacar as características bacterianas e fúngicas dentro desta espécie, com foco em seu possível papel como fonte de alimento alternativo a carne (STOOPS et al., 2017; WYNANTS et al., 2018). CUCINI et al., (2020) investigou as comunidades bacterianas e fúngicas abrigadas dentro do intestino de larvas de *A. diaperinus* criadas em poliestireno. Diferentes espécies bacterianas e fúngicas foram moduladas em animais alimentados com poliestireno, incluindo táxons já relatados neste contexto em outros organismos.

Nesse contexto, duas opções sustentáveis surgem como cerne promissor e extremamente eficaz para minimizar a produção de materiais não-degradáveis e deteriorar as bilhões de toneladas já existentes. A primeira delas é a síntese de polímeros biodegradáveis em substituição aos plásticos até então comercializados, e, a segunda, é a essência do presente trabalho, que é possibilitar a biodegradação dos plásticos persistentes que já foram produzidos e acumulados. Visto que a comunidade microbiana de *A. diaperinus*, inclui táxons relacionados a biodegradação de plásticos, nunca foi caracterizado o perfil metabólico dessas larvas quando

alimentadas com o Poliestireno (PS). Então para entender melhor os processos metabólicos envolvidos nós avaliamos o extrato bruto (larva inteira) de larvas de *A. diaperinus*, alimentadas com ração (para aves) e com o poliestireno (isopor), e em jejum., com o objetivo de quantificar os metabólitos totais ou pertencentes a uma determinada classe de moléculas, com participação em determinada rota metabólica. Inicialmente analisamos a taxa de sobrevivência, tamanho e o peso seco das larvas. Em seguida, investigamos a influência das dietas na estrutura do trato intestinal e caracterizamos seu perfil metabólico utilizando a técnica de metabólica. Isso pode ser vital na relevância da manutenção dos processos fisiológicos, podendo esclarecer os mecanismos adaptativos que esses insetos desenvolveram na quebra de polímeros sintéticos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade do inseto *Alphitobius diaperinus* digerir poliestireno e suas implicações sobre o seu metabolismo energético, traçando um perfil metabólico através de técnicas analíticas como a cromatografia acoplada a espectrometria de massas (CG-MS).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a taxa de sobrevivência das larvas de *A. diaperinus* sob condições de jejum e alimentadas com ração e poliestireno.
- Analisar o tamanho corporal de larvas de *A. diaperinus* diante dos tratamentos proporcionados;
- Determinar o peso seco de larvas *A. diaperinus* submetidas a condições de jejum e alimentadas com ração e poliestireno;
- Avaliar a integridade e conteúdo do trato digestivo no intestino de *A. diaperinus* sob os diferentes tratamentos;
- Investigar o perfil metabólico das larvas mediante as diferentes dietas.

4. METODOLOGIA

4.1 Manutenção da colônia de *A. diaperinus*

Todos os experimentos foram realizados com coleópteros *A. diaperinus* da colônia no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes (LBBMA), Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, sob a coordenação do Dr. Emerson Guedes Pontes. Os animais foram mantidos em recipientes plásticos 2500ml (dimensões 13x20x15(AxL)), com ração balanceada para criação de frango de corte, fornecidos pelo Centro de Criação Avícola da UFRRJ (cedido pela Dr^a Cristina Amorim Ribeiro de Lima) e serragem como cobertura para manter a umidade. Todo material foi previamente autoclavado para evitar qualquer tipo de contaminação que influenciasse nos resultados. Os recipientes plásticos foram cobertos com tecido (filó) e fechados com elástico para evitar a infestação de outros insetos ou outros tipos de contaminantes. Esses recipientes foram mantidos em câmara BOD com temperatura controlada e umidade controlada com temperatura de $32^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $70\% \pm 10\%$ de umidade.

4.2 Dietas oferecidas ao *A. diaperinus*

A ração utilizada como fonte de alimento para as larvas de *A. diaperinus* foram fabricadas na fábrica de ração do Centro de Produção Integrada da UFRRJ para utilização no setor de avicultura, oferecido para aves pré-inicial (em crescimento). O poliestireno expandido (classe P tipo 1 de acordo com a norma (“ABNT-NBR 11752”, 2017)) adquirido na Isomil - Fábrica de Isopor EPS, localizado na rua da Matriz, 3500 - Coelho da Rocha, São João de Meriti - RJ, 25550-170.

4.3 Tratamentos realizados com as larvas

As larvas foram coletadas 24 horas após sua eclosão e mantidas em uma pré-dieta, onde eram alimentadas com ração balanceada para criação de frango de corte (ver item 4.1), durante 15 dias. Em seguida, cada a larva foi acondicionada em um tubo de ensaio de vidro (vol. 10 ml) com suas respectivas dietas (ração, jejum e poliestireno) (figura 10A), a fim de garantir que



Figura 10: Sistema de criação das larvas sob suas respectivas dietas (jejum, poliestireno e ração). A- Larvas dentro dos tubos de ensaio, acondicionadas a seus tratamentos; B- Tubos organizados em caixas maiores para armazenamento em câmara BOD, com temperatura e umidade controladas.

fosse sua única fonte de alimentação, pois há relatos de canibalismo entre as larvas. Estes tubos foram vedados com algodão, para evitar entrada de outros insetos e manter a umidade (figura 10A), organizados dentro de uma caixa (figura 10B) e armazenado dentro da câmara BOD, com temperatura e umidade controladas (item 4.1), se mantendo durante 8 dias.

4.4 Determinação de sobrevivência e tamanho corporal das larvas

O número de larvas sobreviventes foi avaliado diariamente, durante 8 dias, sendo os insetos mortos descartados. A contagem foi feita de maneira mecânica, com o auxílio de uma pinça, e ambos os grupos (jejum, poliestireno e ração) foram avaliados. As comparações entre os tratamentos foram submetidos a análise de One-way ANOVA ($P < 0.05$), a partir de 7 réplicas biológicas obtidas de pools de 20 larvas \pm SD.

As larvas foram medidas no dia 0, assim que saíram da primeira quinzena de vida sob a dieta com ração (item 4.3) e no 8º dia, após serem submetidos as dietas propostas.

4.5 Determinação do peso seco das larvas após o consumo das dietas

A determinação do peso seco das larvas foi feita a partir do 2º, 4º, 6º e 8º dia, após serem submetidas as dietas. As larvas foram retiradas dos tubos de ensaio (item 4.3), colocadas em placas de Petri, colocadas no freezer a temperatura -20°C por 2 horas. Após esse período as placas foram mantidas em estufa a temperatura de 38°C por 7 dias. Após esse período foram

pesadas. As médias entre os tratamentos foram submetidos a análise de One-way ANOVA ($P < 0.05$), a partir de 3 réplicas biológicas obtidas de pools de 20 larvas \pm SD.

4.6 Análise da estrutura do trato digestivo das larvas de *A. diaperinus* mediante os tratamentos

Foram utilizadas larvas do 8º dia, após serem submetidas as dietas propostas. A dissecação foi realizada em água MilliQ, no gelo com o auxílio de pinças e um microscópio estereoscópico SZX16, no Laboratório de Microscopia e Processamento de Bioimagens (LAMBIO), do Departamento de Parasitologia Animal (UFRRJ), de modo que todo intestino das larvas fosse removido íntegro, para verificação do conteúdo e integridade do trato digestivo. Os outros tecidos, tais como corpo gorduroso e exoesqueleto foram descartados durante a remoção do intestino. 4 réplicas biológicas foram utilizadas.

4.7 Avaliação do perfil metabólico das larvas de *A. diaperinus*

a) Extração:

As amostras contendo 150 mg dos insetos (20 larvas) dos tratamentos foram transferidas para microtubos e armazenadas a -80°C . Os insetos foram homogeneizados por 5 min a 20 Hz (Retsch, MM400) em 500 μl de etanol absoluto a -10°C com 90 μl de padrão interno ribitol (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Em seguida, as amostras foram agitadas em termomixer (Eppendorf, Thermomixer Comfort) por 15 min a 70°C a 950 rpm e centrifugado por 10 min a 11.000 g. O sobrenadante foi transferido para um frasco de vidro e a ele adicionado 750 μl de clorofórmio a -20°C e 1500 μl de água a 4°C . A solução foi igualmente agitada em vórtex por 30s e centrifugada a 11.000 g por 5 minutos. A fase polar (superior) foi retirada 600 μL , transferidas para microtubos de 1,5 ml e seca em um concentrador de vácuo, Speed Vac (Eppendorf, Concentrator plus) sem aquecimento, onde foi armazenada a -80°C .

b) Derivatização das substâncias no extrato:

As amostras nos microtubos foram colocados por 30 min no concentrador a vácuo, Speed Vac (Eppendorf, Concentrator plus) e após foi adicionado 40 μL de cloridrato de metoxiamina (20mg ml^{-1}). Os tubos foram agitados por 2 horas a 900rpm e 37°C no Thermomixer (Eppendorf, Thermomixer Comfort) e após, adicionou-se 70 μL de MSTFA (n-metil-n-

trimetilsilil trifluoracetamida). Logo após, os tubos foram agitados por 30 min a 900 rpm e 37°C, no Thermomixer (Eppendorf, Thermomixer Comfort). As amostras foram transferidas para “vials” apropriados para CG-EM.

c) Análise química, quantificação e caracterização dos metabólitos:

Logo depois a derivatização, alíquotas de 1 µL foram injetadas no CG-MS - QP2010 Plus (Shimadzu) Coluna: Factor Four/VF-5ms (30X0.25X0.25) para a análise do perfil metabólico. O equipamento trabalhando com fonte de íons de temperatura 250°C, tempo de corte do solvente 5,75 min, faixa de massa de 40 – 800 m/z, forno de coluna temperatura de 70 °C, temperatura de injeção de 230 °C, modo de injeção Split e coluna fluxo de 1mL/min de gás hélio. O índice de retenção foi calculado com base na retenção índice de série de n-alcanos (C9-C30). A identificação dos picos e construção da biblioteca foi estabelecida ponderando o índice de retenção calculado com base nos tempos de retenção dos metabólitos detectados nas amostras e nas misturas de ésteres metílicos de ácidos graxos, também por comparação com os padrões analíticos injetados nas mesmas condições e por comparação com a biblioteca NIST 2008. A biblioteca de aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e outros compostos foram feitas com base em padrões analíticos adquiridos na sigma-aldrich (realizadas pelo professor Marco André Alves de Souza IQ/UFRRJ em outro projeto) a partir de dois parâmetros, o índice de retenção e fragmentos de massa específicos para cada metabólito. A análise de variância, o erro padrão, os testes de significância ($\alpha = 0,05$) e os gráficos a partir dos dados obtidos foram realizados através do programa GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, USA).

4.8 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram avaliados inicialmente quanto à sua normalidade e homogeneidade das variâncias. Nas análises estatísticas e representações gráficas foi utilizado o Prism 8.0.1 software (GraphPad Software, USA). Os resultados foram expressos como médias e desvio padrão da média. As comparações entre os tratamentos foram realizadas através de Teste t e teste de Mann-Whitney ou através ANOVA one-way / two-way seguida do teste de Tukey. A significância estatística foi determinada a $p < 0,05$. Para a análise de agrupamento foi utilizado o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) e o empregando o índice de similaridade de correlação de distância, utilizando o programa PAST 4.03.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Consumo de poliestireno e sobrevivência de *A. diaperinus* submetidas as dietas.

Ensaio de alimentação foram realizados com larvas de *A. diaperinus* da colônia mantidas no Laboratório de Bioquímica e Biologia molecular, Departamento de Bioquímica, UFRRJ. As amostras de isopor utilizadas não foram pré-tratadas de forma alguma e não continham aditivos. As larvas de cascudinho foram pré-alimentadas com ração para aves do Centro de Produção Integrada da UFRRJ, livre de qualquer tipo de antibiótico, por 15 dias. Já que o estudo de Wang et al., (2020) relata que a microbiota intestinal de insetos desempenha um papel importante na sua digestão. O teste durou um total 23 dias. Sendo 15 dias na pré-dieta e 8 dias nas dietas propostas (ração, jejum e poliestireno). Cada larva foi acondicionada em um tubo de ensaio de vidro com suas respectivas dietas como na figura 10A, onde cada tubo continha uma larva e o alimento ou não (no caso do jejum). As larvas em particular são conhecidas por serem canibais e pela atividade quitinase em suas secreções digestiva (SAXENA & SARIN, 1971). Portanto, nossos insetos criados em laboratório foram usados para minimizar e eliminar o risco de canibalismo neste estudo, com o objetivo de assegurar que fosse sua única fonte de alimentação, visto que há relatos de canibalismo entre as larvas (PENG et al., 2019; YANG et al., 2021). Uma vez que o objetivo era uma análise mediante uma dieta exclusiva.

Inicialmente acompanhamos o comportamento das larvas mediante a dieta com o poliestireno. As larvas de *A. diaperinus* comeram o poliestireno como esperado. Estas mastigaram e penetraram a espuma de PS (BRANDON et al., 2018; WANG et al., 2020; YANG et al., 2015a, 2015b) como demonstrado na Figura 11A e 11B, fizeram buracos e túneis. A atividade alimentar das larvas no isopor apareceu alta e criou cavidades nos blocos de isopor ainda que houvesse variações na intensidade (figura 12A e 12B). As mesmas observações foram repetidas nas 7 vezes (réplicas), independentes. Observou-se que a mastigação/trituração reduziu o tamanho do plástico e foi eliminado junto as fezes. Na figura 12C, pode-se observar féculas com/e restos de pequenos fragmentos de PS, no fim do 8º dia pós alimentação com ração (PAR).

Admitimos que a mastigação e ingestão de espuma de PS foi semelhante ao relatado por outros autores com outros exemplares de Coleópteros (BRANDON et al., 2018; PENG et al., 2020a, 2020b; WANG et al., 2020; WOO et al., 2020; YANG et al., 2021, 2015a, 2015b)

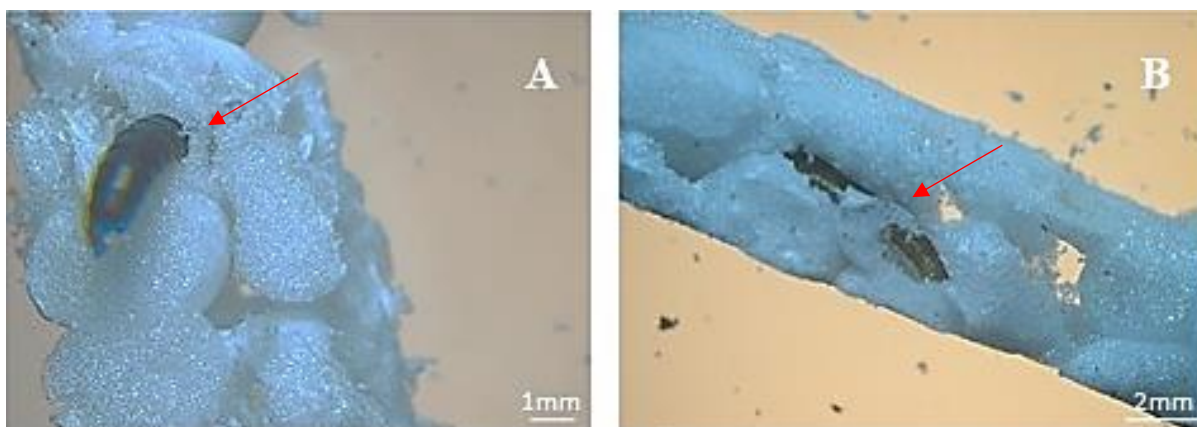


Figura 11: Larvas de *A. diaperinus* se alimentando de lascas $\pm 3,5 \times 0,5$ cm (A x L) de poliestireno. A- A larva entrando no pedaço do isopor; B- A larva escavando tuneis dentro do pequeno bloco de PS.

Segundo Pereira & Salvadori, (2006), essa fácil adaptação ao alimento, deve-se a sua ampla distribuição, uma vez que os insetos da Ordem Coleóptera ocupam quase todos os ecossistemas, com exceção dos mares abertos, os mesmos apresentam adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais.

Todos os grupos de larvas sobreviveram durante os 21 dias do experimento e pequenas mortes em grupos aleatórios ocorreram entre o 7º e 8º dia, uma média 8% no grupo alimentado com ração, 19% no grupo sob jejum e 30% no grupo alimentado com ração. A partir disso calculamos a taxa de sobrevivência (TS) apenas no 8º dia. Na tabela 3 relatamos a taxa de sobrevivência das larvas em cada ensaio (7 réplicas de pools de 20 larvas), onde a menor sobrevivência foi na réplica 7 (R7), com 35,2% nas larvas alimentadas com Poliestireno.

Esse teste para a determinação da taxa de sobrevivência durou um período de 8 dias usando as mesmas larvas de *A. diaperinus* utilizadas no ensaio descrito anteriormente, e não mostrou diferença estatística entre as TS de larvas na ração, sob jejum e no isopor (figura 13), entretanto a média de sobrevivência nas larvas de ração foi mais alta do que a das larvas em jejum e as alimentados com poliestireno, 92% > 81% > 70%, respectivamente.

Ainda os grupos tenham sobrevivido durante todo o experimento, ensaios adicionais e mais focados são necessários para avaliar a capacidade de *A. diaperinus*, juntamente com insetos degradadores de plástico alternativos, de sobreviver por mais de uma geração em uma fonte de alimento não convencional, como o poliestireno. Estas observações sugerem que a alimentação com PS não representou um impacto negativo na capacidade de sobrevivência das larvas (CUCINI et al., 2020). E que talvez o uso de uma fonte combinada de energia e água no

tratamento com PS pode melhorar a resistência fisiológica do inseto ao estresse causado pelo uso de uma fonte alimentar não natural (YANG et al., 2018).

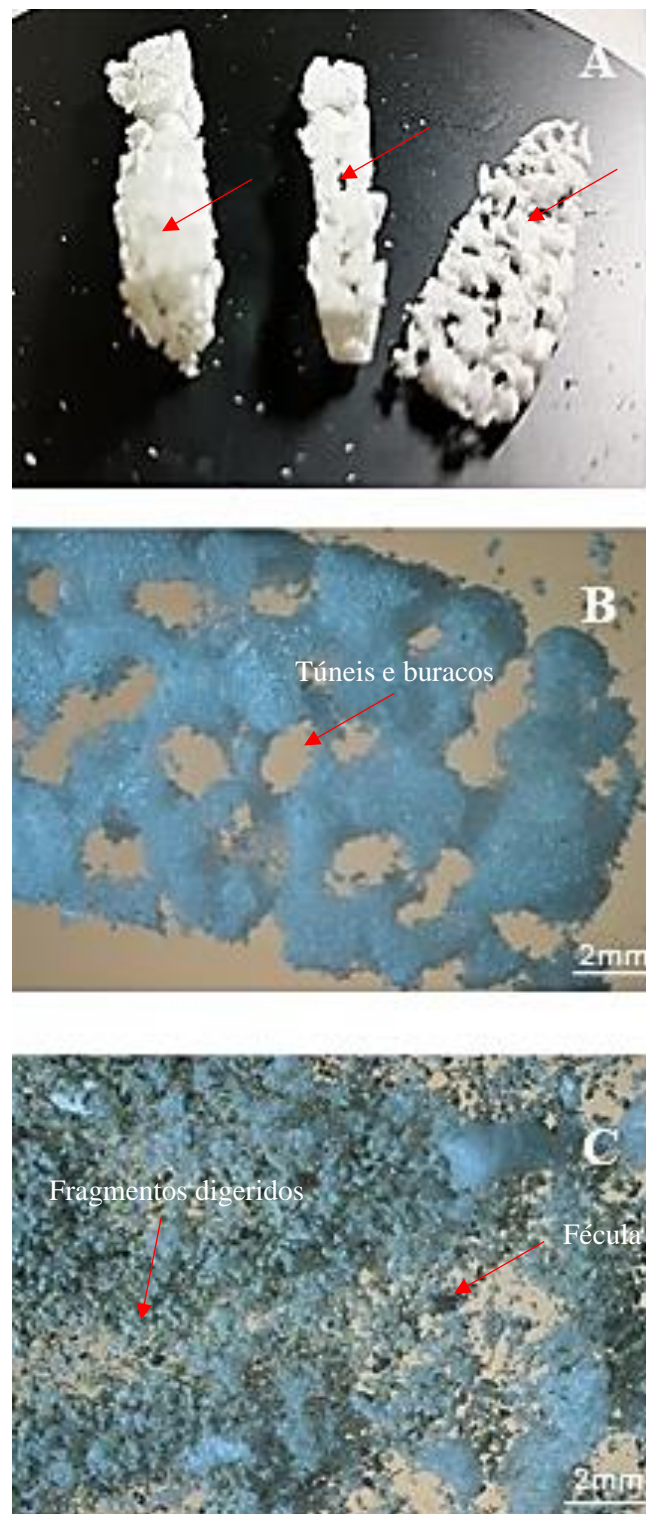


Figura 12: Biodegradação de poliestireno por larvas de *A. diaperinus* ao final de 8 dias de alimentação. A- Intensidade de escavação e formação dos tuneis nos blocos de PS; B- Os tuneis

e buracos resultados da biodegradação das larvas; C- Féculas e fragmentos de PS digeridos e não digeridos no término do 8º dia de alimentação.

Tabela 3: Tabela de sobrevivência de *A. diaperinus* mediante as diferentes dietas (ração, jejum e poliestireno). Estas larvas foram alimentadas com ração por 15 dias a partir da eclosão dos ovos e colocadas para sua respectiva dieta por 8 dias. Índices calculados em percentual, de acordo com o número de larvas de cada réplica (R).

| | R 1 | R 2 | R 3 | R 4 | R 5 | R 6 | R 7 | μ | σ |
|---------------------|------|-------|------|-------|------|-------|-------|-------|----------|
| Ração | 100% | 76,3% | 96,7 | 100% | 100% | 94,4% | 77,6% | 92% | 25,2 |
| Jejum | 95% | 46,2% | 100% | 97,1% | 100% | 66,3% | 62,8% | 81% | 22,0 |
| Poliestireno | 65% | 44,2% | 100% | 100% | 65% | 79,1% | 35,2% | 70% | 10,6 |

μ , média aritmética; σ , desvio padrão; Teste estatístico, One-way ANOVA (P<0.05)

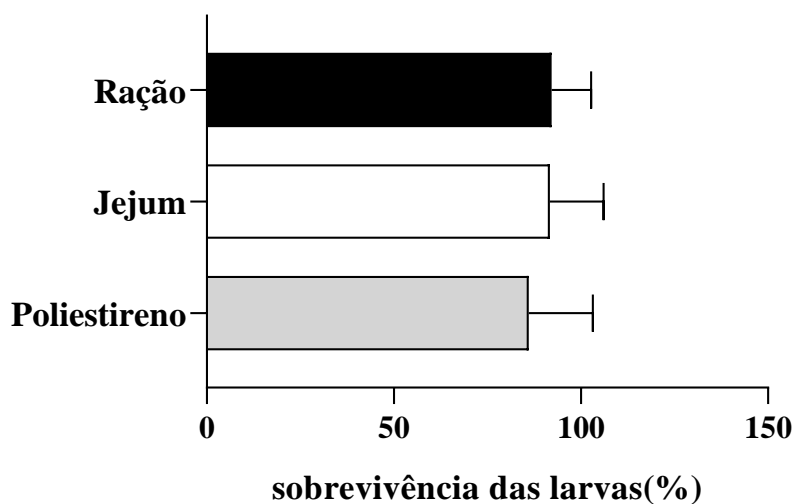


Figura 13: Taxa de sobrevivência de *A. diaperinus* após 8 dias. A taxa foi calculada apenas no 8º dia, pois até o 6º dia todas sobreviveram. Estas larvas foram alimentadas com ração por 15 dias a partir da eclosão dos ovos e colocadas para sua respectiva dieta por 8 dias. As diferenças estatísticas foram determinadas através de One-way ANOVA (P<0.05), 7 réplicas biológicas obtidas de pools de 20 larvas \pm SD.

5.2 Comprimento e peso de larvas de *A. diaperinus* sob o efeito de diferentes tratamentos.

Para avaliar a capacidade de desenvolvimento das larvas de *A. diaperinus* inicialmente, medimos a larva recém saída da pré-dieta em ração por 15 dias, e também medimos 8 dias após ser colocada na sua respectiva dieta proposta (ração, jejum e poliestireno), assim como foi descrito em materiais e métodos (item 4.3). Observou-se que em todas as dietas houveram crescimento corporal, quando comparado a larva recém saída da pré-dieta (Figura 14). Entretanto, notamos que as larvas que se mantiveram em ração dobraram seu tamanho, como representado na Figura 14B. Enquanto as que estiveram sob jejum e as que se alimentaram de PS, tiveram um crescimento mais lento e inferior (Figura 14C, 14D).

Os estudos laboratoriais com degradadores de plástico alternativos, sugerem que dietas ricas em plástico parecem não ser tóxico a julgar pelas altas taxas de sobrevivência e alterações mínimas no peso corporal das larvas durante um período de incubação de 3 a 4 semanas. Toda via, alguns estudos têm demonstrado que as larvas de *T. molitor* alimentadas com poliestireno como a única dieta perderam massa corporal (16-19% do peso inicial) após 21 dias de alimentação (URBANEK et al., 2020).

Após avaliar o desenvolvimento das larvas submetidas as diferentes dietas, fomos avaliar a massa corpórea (peso seco) nos animais mantidos em ração, sob jejum e em PS. Houve uma severa redução de peso seco nas larvas em condições de jejum e alimentadas com PS. Essa redução bastante alta observada no peso das larvas durante o experimento pode ser dependente das condições estressantes gerais de criação. As mudanças na massa das larvas de *A. diaperinus* foram registrados já a partir do 2º dia do experimento (Figura 15) e com o avançar dos dias observou-se perda de massa com exceção das larvas que continuaram se alimentando da ração, nelas houve um exponencial aumento de peso (Figura 15). Enquanto, nas larvas sob jejum e nas alimentadas com poliestireno houve perda de massa, diferenças significantes foram observadas entre o 2º e 4º dia, porém do 6º ao 8º não houveram diferenças significantes. A partir desses dados, traçamos uma linha de tendência e calculamos o coeficiente angular, dessas amostras (figura 16). Identificou-se tendências para crescimento nas larvas com ração, enquanto para jejum e PS, tendem a decréscimo, jejum mais rápido que PS.

Neste estudo os dados obtidos sugerem que larvas de *A. diaperinus* podem se alimentar, morder e mastigar polímeros estudados com eficácia dependendo de suas propriedades, mas não houve forte indicação para utilização (digestão/degradação) do mesmo, justificando a perda de peso brusca, análoga a condição de jejum. Urbanek et al., (2020), associou a perda de massa

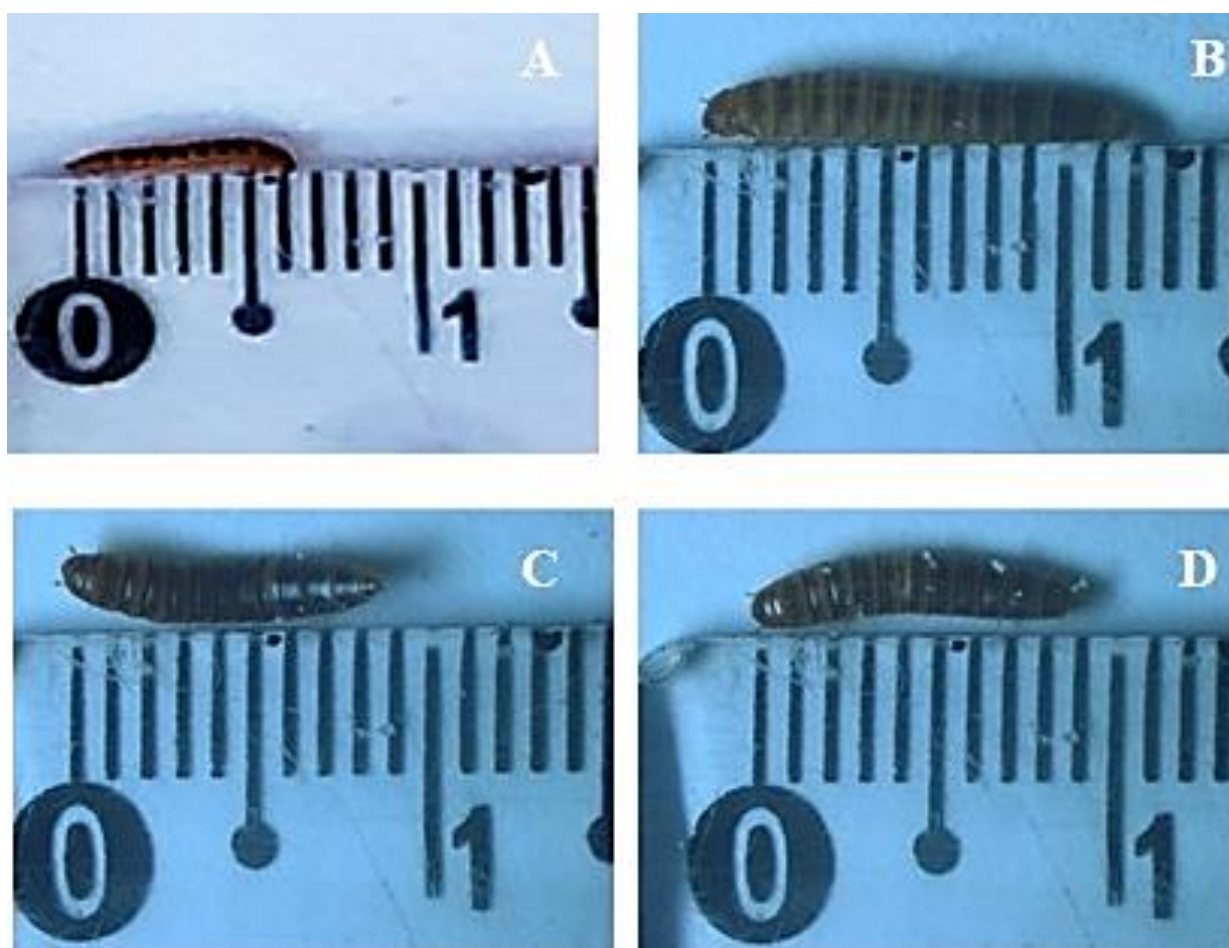


Figura 14: Desenvolvimento da larva de *A. diaperinus* sob as diferentes dietas. Em A- larva recém saída da pré-dieta com ração; B- larva pós alimentação com ração (PAR) em dieta de ração após 8 dias; C- larva pós alimentação com ração (PAR) submetida ao jejum (fome) após 8 dias; D- Larva pós alimentação com ração (PAR) em dieta de Poliestireno após 8 dias.

das larvas de *T. molitor* a perda de proteínas, açúcares e lipídios, pois em seu estudo as reservas diminuíram significativamente em larvas de *T. molitor* alimentadas com diversos tipos de PS, sugerindo que as larvas estão morrendo de fome, já seus resultados tiveram similaridade com as larvas em condição de fome.

Em nosso experimento houve uma mudança visível durante o ensaio, na mobilização de quase todo corpo gorduroso das larvas alimentadas com PS (resultado observado visualmente, pela não detecção do tecido), extremamente semelhante ao ocorrido com as larvas em condição de jejum. Já que durante a fome, o nível de gordura é degradado através da oxidação dos ácidos graxos armazenado na forma de triglicerídeos sendo uma das principais e mais importantes fonte de energia no inseto durante a desnutrição (RENAULT et al., 2002).

Acreditamos que quando o PS é aplicado como dieta única, há diminuição na massa do inseto, não afetando sua subsistência a curto prazo, mas há escassez de uma fonte de nutrição para o seu desenvolvimento.

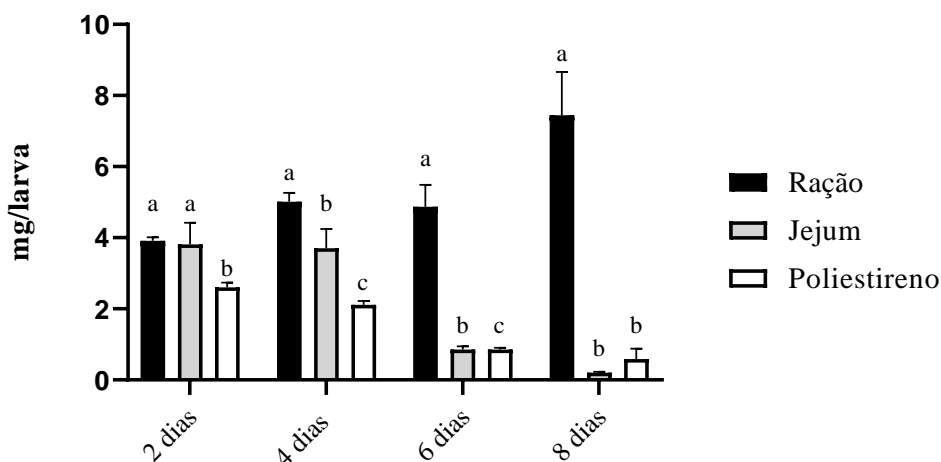


Figura 15: Peso seco por larva em miligramas pós alimentação com ração (PAR) e condicionadas nas diferentes dietas. Estas larvas foram alimentadas com ração por 15 dias a partir da eclosão dos ovos e colocadas para sua respectiva dieta por 8 dias. As diferenças estatísticas foram determinadas através de One-way ANOVA ($P < 0.05$), 3 réplicas biológicas independentes com pools de 20 larvas \pm SD.

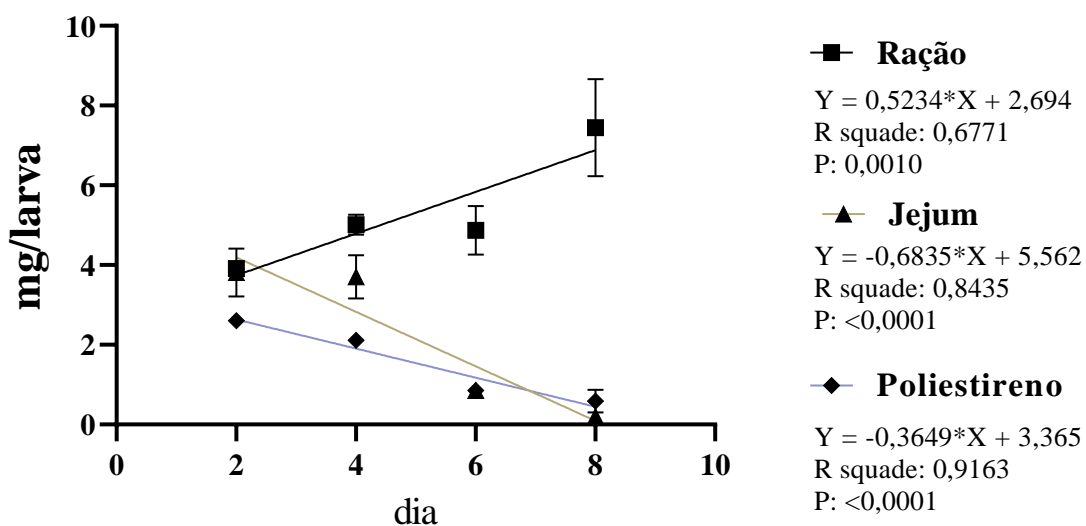


Figura 16: Regressão linear simples do peso seco de larva em miligramas pós alimentação com ração (PAR) e condicionadas nas diferentes dietas. Estas larvas foram alimentadas com ração por 15 dias a partir da eclosão dos ovos e colocadas para sua respectiva dieta por 8 dias. Figura calculadas a partir dos dados do peso seco.

5.3 Canal alimentar de larva de *A. diaperinus* sob o efeito das diferentes dietas

A morfologia do canal alimentar dos insetos está relacionada à sua alimentação e hábitos alimentares. Enquanto os insetos que se alimentam de material vegetal facilmente digerível têm intestino curto, aqueles que comem as fezes de vertebrados têm intestinos muito mais longos (KOÇAKOGLU & CANDAN, 2021). O trato digestivo é organizado em regiões anterior, média, posterior e reto, que podem ser facilmente demarcadas por meio visual.

Segundo Chapman, (2012), o intestino anterior começa na boca e inclui a cavidade bucal, a faringe, o esôfago e o papo. O canal alimentar de *A. diaperinus* é uma estrutura tubular, semelhante a maioria dos besouros que consomem grãos armazenados (MCALLISTER et al., 1995). O intestino anterior de larvas com instares tardios medem cerca 2,36 mm. O intestino médio demarcado da extremidade distal da valva proventricular até a extremidade distal da valva pilórica é medido 9,98 mm em larvas. O intestino posterior é dividido em intestino delgado e grosso. O intestino delgado é demarcado a partir da extremidade distal da válvula pilórica estendendo-se até o alargamento do canal, medindo 3,50 mm. O intestino grosso foi demarcado desde o alargamento do intestino até a origem do reto, medindo 2,14mm (CRIPPEN & ESQUIVEL, 2012).

No presente trabalho, foi analisado o canal alimentar das larvas de *A. diaperinus*, com a finalidade de verificar a integridade e conteúdo intestinal. Para isso foram removidos os tratos digestivos de larvas após 8 dias nas dietas propostas no tratamento (ração, jejum e poliestireno), pré alimentadas com ração por 15 dias, como mencionado no item 4.3. Foram removidos os tratos digestivos de 4 larvas para cada dieta mencionada.

As Figuras 17A, 17B e 17C, são os tratos digestivos removidos de larvas submetidas as dietas após 8 dias, onde 17A, larvas alimentadas com ração, apresenta um canal com as regiões bem definidas e os segmentos cheios, com uma coloração amarelada e opaca. A figura 17B, larvas em condição de jejum, as regiões são pouco definidas e os segmentos praticamente vazios, e na figura 17C, larvas alimentadas com PS, há um pouco mais de definição nas regiões e os intestinos anterior e médio apresentação quantidade mediana de contudo, comparada aos outros dois tratamentos.

A larva que continuou na alimentação com ração para aves apresentou o canal alimentar como descritos acima por Crippen & Esquivel (2012) e McCallister et al., (1995), bem definidos e com as regiões anterior, média e posterior semelhantes (Figura 17C). Entretanto, as larvas que mudaram suas dietas, poliestireno e ou mantidas em jejum, apresentaram alterações visíveis

em seu trato digestivo. Observamos que a larva submetida ao poliestireno, teve o intestino médio (IM) reduzido e seu conteúdo parecia formar bolhas de ar (Figura 17B). A larva em condição de jejum além de estar reduzido todo o trato digestório, a região do intestino posterior (IP) praticamente desapareceu, e os túbulos de Malpighian (TM) ficaram imperceptíveis, frágeis e quebradiços sendo perdidos na dissecação, e o conteúdo no tubo quase completamente formado por bolhas de ar (Figura 17A).

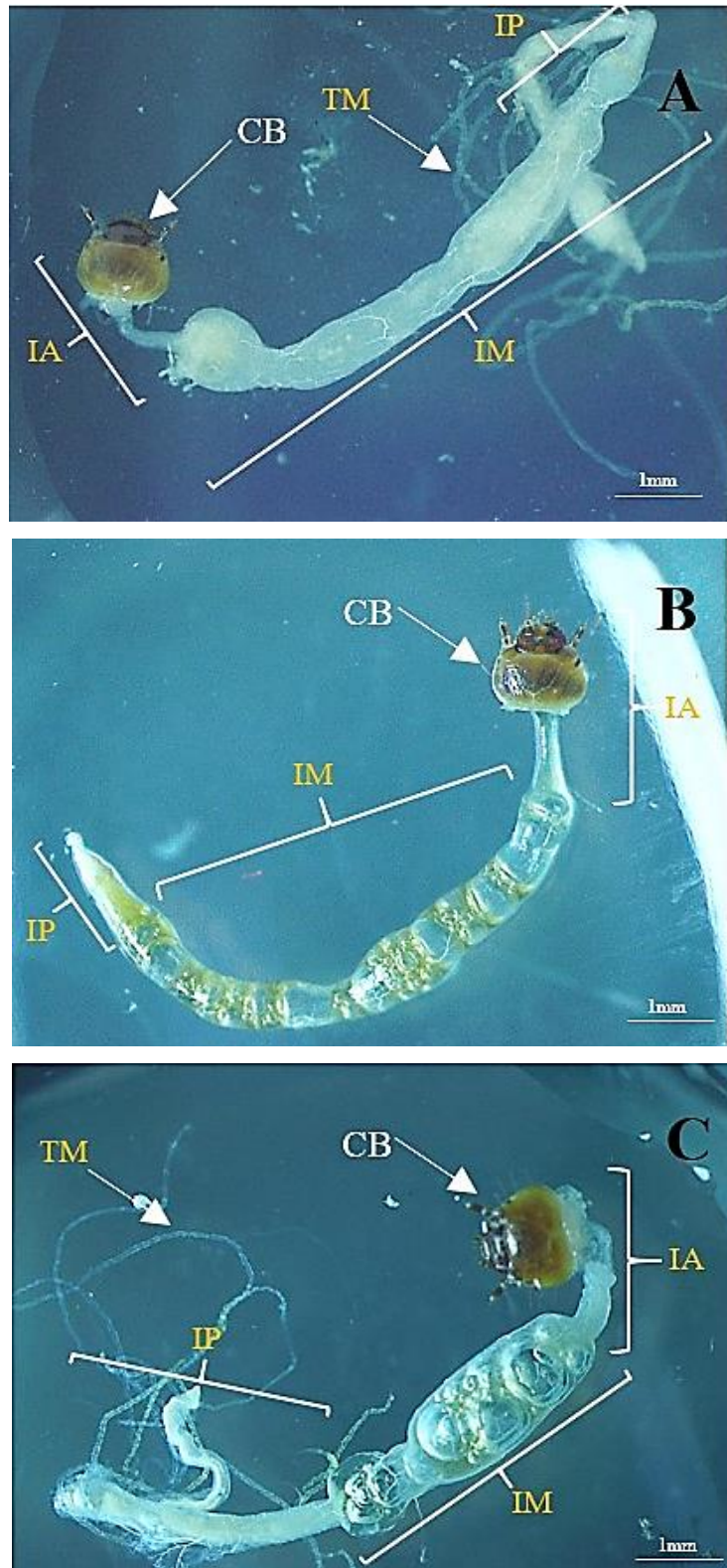


Figura 17: Canal alimentar larval de *A. diaperinus* sob diferentes estresses alimentares. Estas larvas foram alimentadas com ração por 15 dias a partir da eclosão dos ovos e colocadas para sua respectiva dieta por 8 dias. A- Larva alimentada com ração para aves de corte; B- Larva em

estado de jejum completo; C- Larva alimentada com poliestireno. CB: cabeça; IA: intestino anterior; IP: intestino posterior; IM: intestino médio; TM: Túbulos de Malpighian.

5.4 Análise do perfil metabólico por CG-EM em larvas de *A. diaperinus* com dietas distintas

Para a realização da análise metabolômica, foi preciso extrair os metabólitos das larvas de *A. diaperinus* no 8º dia das dietas propostas (ração, jejum e poliestireno), assim como descrito em materiais e métodos (item 4.3), e após, foi feita uma partição com solvente, seguido de exclusão da fração polar e posteriormente foi realizado o processo de derivatização, para que a amostra fosse preparada para ser aplicada no injetor do cromatógrafo.

Após a análise foram identificadas 57 substâncias, e 11 apresentaram significâncias, entre elas: ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares e poliálcoois (tabela 4). Observou-se aumento significativo de poliálcoois, nitrogenados e aminoácidos nas larvas de *A. diaperinus* submetidas ao jejum e na dieta de Poliestireno (Figura 18 e 19).

Entre os tratamentos (ração, jejum e poliestireno), nota-se uma similaridade entre as réplicas independentes das larvas alimentadas com ração de mais de 90% enquanto as larvas em jejum e alimentadas com PS possuem similaridade de 75%, de acordo com o corte do dendrograma (Figura 20).

A partir da tabela 4 isolamos os metabólitos que se diferenciaram e fizemos a figura 21. Destacando que entre os poliálcoois, houve um aumento significativo dos níveis de glicerol-3-fostato (Gli-3-F) nos animais em jejum e alimentados com PS. Nos compostos nitrogenados, a ureia difere significativamente também nos grupos jejum e PS. Dentre os aminoácidos, glutamato aumenta nas larvas em jejum, enquanto a concentração de lisina aumenta tanto nas larvas em jejum quanto nas alimentadas com PS. Já a prolina é diferente significativamente em todos as dietas, aumentando em jejum e PS (figura 21).

Houve aumento na glicose, ácido glucônico e ácido succínico, nas larvas em jejum. Ora nas larvas sob jejum e alimentadas com PS verificou-se aumento nas concentrações de ácido láctico, ácido oxálico e ácido fosfórico (figura 21).

A técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas é extremamente vantajosa para identificar metabólitos de baixo peso molecular (GARCIA; BARBAS, 2011). A técnica de CG-EM é uma técnica analítica que permite a construção de uma biblioteca de

Tabela 4. Concentrações médias dos metabólitos presentes no extrato bruto de larvas de *A. diaperinus*, submetidos as diferentes dietas (ração, jejum e poliestireno). Estas larvas foram alimentadas com ração por 15 dias a partir da eclosão dos ovos e colocadas para sua respectiva dieta por 8 dias.

| Metabólitos | ----- Concentração (µg/g larva) ----- | | | | | |
|-----------------------|---------------------------------------|----------|--------|-----------|--------------|------------|
| | Ração | ± SD | Jejum | ± SD | Poliestireno | ± SD |
| Eritrol | 226,4 | ± 63,7 | 492,1 | ± 534,3 | 377,0 | ± 227,4 |
| Galactitol | 19,0 | ± 8,0 | 116,0 | ± 90,2 | 107,7 | ± 82,5 |
| Glicerol-3-fosfato | 324,8 | ± 92,3b | 3053,3 | ± 3012,9a | 3499,4 | ± 1919,1a |
| Histidinol | 3,8 | ± 7,6 | 32,7 | ± 34,3 | 27,7 | ± 34,0 |
| Manitol | 53,5 | ± 10,0 | 0,0 | ± 0,0 | 1,0 | ± 1,9 |
| Mioinositol | 45,8 | ± 11,4 | 115,1 | ± 116,0 | 96,9 | ± 56,6 |
| Total de poliálcoois | 673,4 | ± 117,3 | 3708,4 | ± 3845,4 | 4109,6 | ± 2144,5 |
| Ácido úrico | 474,3 | ± 241,4 | 1091,1 | ± 663,6 | 3200,0 | ± 2099,8 |
| Carbodiimida | 21,8 | ± 3,9 | 385,3 | ± 398,7 | 244,6 | ± 211,1 |
| Etanolamina | 14,4 | ± 1,7 | 49,5 | ± 30,7 | 132,6 | ± 55,4 |
| Hidroxilamina | 0,9 | ± 1,7 | 93,4 | ± 126,2 | 49,5 | ± 47,8 |
| Putrescina | 16,2 | ± 5,6 | 188,6 | ± 181,0 | 189,2 | ± 163,6 |
| Ureia | 196,9 | ± 20,6b | 7077,5 | ± 6752,6a | 13094,6 | ± 16397,7a |
| Total de nitrogenados | 724,4 | ± 100,1 | 8885,5 | ± 3535,1 | 16910,4 | ± 8526,0 |
| Asparagina | 12,1 | ± 4,5 | 18,6 | ± 9,8 | 78,3 | ± 60,0 |
| Alanina | 686,9 | ± 57,3 | 3820,9 | ± 3800,4 | 3747,3 | ± 2792,0 |
| Aspartato | 10,8 | ± 1,2 | 153,8 | ± 152,8 | 32,5 | ± 25,2 |
| Cisteína | 6,0 | ± 3,0 | 4,1 | ± 3,6 | 74,2 | ± 94,8 |
| Fenilalanina | 139,4 | ± 41,4 | 241,7 | ± 190,4 | 93,2 | ± 90,8 |
| GABA | 16,9 | ± 2,2 | 28,9 | ± 24,0 | 142,9 | ± 76,0 |
| Glicina | 142,8 | ± 20,0 | 1857,6 | ± 1858,6 | 2512,0 | ± 2457,6 |
| Glutamato | 518,1 | ± 103,5b | 4609,9 | ± 5670,5a | 2782,1 | ± 1640,7ab |
| Glutamina | 171,1 | ± 29,5 | 94,3 | ± 144,9 | 270,0 | ± 189,1 |
| Histidina | 0,0 | ± 0,0 | 14,0 | ± 26,6 | 121,3 | ± 71,9 |
| Isoleucina | 110,4 | ± 24,7 | 282,4 | ± 401,8 | 331,0 | ± 240,3 |
| Lisina | 748,2 | ± 178,6b | 5793,3 | ± 5350,9a | 9521,1 | ± 8358,9a |
| Ornitina | 5,5 | ± 8,7 | 4,8 | ± 7,0 | 0,0 | ± 0,0 |

Continuação da tabela 4

| | | | |
|----------------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| Oxoprolina | 163,6 ± 16,5 | 1341,3 ± 1475,1 | 981,5 ± 582,1 |
| Prolina | 1309,1 ± 149,3c | 15491,1 ± 19007,8a | 10240,2 ± 7556,4b |
| Serina | 98,4 ± 21,1 | 860,0 ± 511,9 | 764,8 ± 313,0 |
| Tirosina | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 832,1 ± 523,1 |
| Treonina | 79,6 ± 13,5 | 83,1 ± 60,2 | 319,6 ± 205,4 |
| Valina | 163,8 ± 32,4 | 128,6 ± 76,7 | 417,2 ± 257,2 |
| Total de aminoácidos | 4392,7 ± 379,5 | 34801,4 ± 37260,4 | 33261,3 ± 23043,3 |
| Frutose | 19,7 ± 5,2 | 148,5 ± 133,5 | 28,1 ± 21,5 |
| Frutose-6-fosfato | 15,5 ± 8,2 | 5,4 ± 7,9 | 0,0 ± 0,0 |
| Galactose | 12,4 ± 2,4 | 31,7 ± 47,1 | 21,3 ± 11,8 |
| Gentibiose | 39,8 ± 74,2 | 0,0 ± 0,0 | 3,2 ± 6,4 |
| Glicose | 1253,2 ± 247,2b | 3741,4 ± 4291,6a | 1994,0 ± 819,1b |
| Glicose-6-fosfato | 17,7 ± 10,5 | 9,9 ± 14,5 | 2,4 ± 3,1 |
| Glicosamina | 13,6 ± 2,7 | 48,5 ± 64,7 | 81,7 ± 61,8 |
| Maltose | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 9,1 ± 18,2 |
| Manosamina | 2,8 ± 5,5 | 92,8 ± 44,2 | 190,4 ± 135,3 |
| Sacarose | 7,5 ± 7,5 | 37,4 ± 52,9 | 11,5 ± 22,9 |
| Trealose | 893,9 ± 177,3 | 1537,3 ± 2598,1 | 364,6 ± 190,0 |
| Total de açúcares | 2276,1 ± 423,3 | 5652,8 ± 6193,3 | 2706,2 ± 730,9 |
| Ácido cítrico | 69,2 ± 20,1 | 92,7 ± 38,0 | 35,2 ± 18,4 |
| Ácido galacturônico | 74,2 ± 24,1 | 37,0 ± 18,4 | 41,7 ± 28,3 |
| Ácido glicólico | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 20,0 ± 40,0 |
| Ácido glucônico | 462,3 ± 61,8b | 2112,1 ± 2057,0a | 61,9 ± 80,2b |
| Ácido glutárico | 96,8 ± 21,9 | 49,4 ± 39,2 | 52,5 ± 30,9 |
| Ácido láctico | 135,6 ± 61,2b | 629,4 ± 764,7ab | 968,4 ± 1438,7a |
| Ácido málico | 21,7 ± 7,8 | 120,6 ± 54,5 | 318,8 ± 212,6 |
| Ácido oxálico | 64,1 ± 14,3b | 945,7 ± 1103,0a | 986,5 ± 1255,6a |
| Ácido pirúvico | 1,8 ± 3,6 | 7,3 ± 12,8 | 15,4 ± 10,0 |
| Ácido propanoico | 46,5 ± 8,1 | 27,0 ± 31,7 | 20,5 ± 18,8 |
| Ácido subérico | 0,0 ± 0,0 | 72,7 ± 94,0 | 18,7 ± 37,4 |
| Ácido succínico | 117,0 ± 18,6b | 721,0 ± 901,6a | 361,7 ± 224,1ab |
| Total de ácidos orgânicos | 1089,3 ± 128,0 | 4814,7 ± 4819,2 | 2901,3 ± 2820,5 |

Continuação da tabela 4

| | | | |
|----------------------------|----------------|------------------|------------------|
| Ácido fosfórico | 664,9 ± 188,8b | 7510,7 ± 9031,1a | 6321,0 ± 9577,1a |
| Ácido beta-hidroxibutírico | 1,6 ± 3,2 | 0,0 ± 0,0 | 0,6 ± 1,3 |
| Uridina | 15,2 ± 3,2 | 20,6 ± 20,5 | 16,4 ± 19,2 |

Concentração relativa à área dos picos dos cromatogramas (CG-EM) normalizados com referência no padrão interno de ribitol. média de n = 7 com pools de 20 larvas ± o desvio padrão (SD). Os dados foram submetidos a análise de variância (two-way ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey (5%).

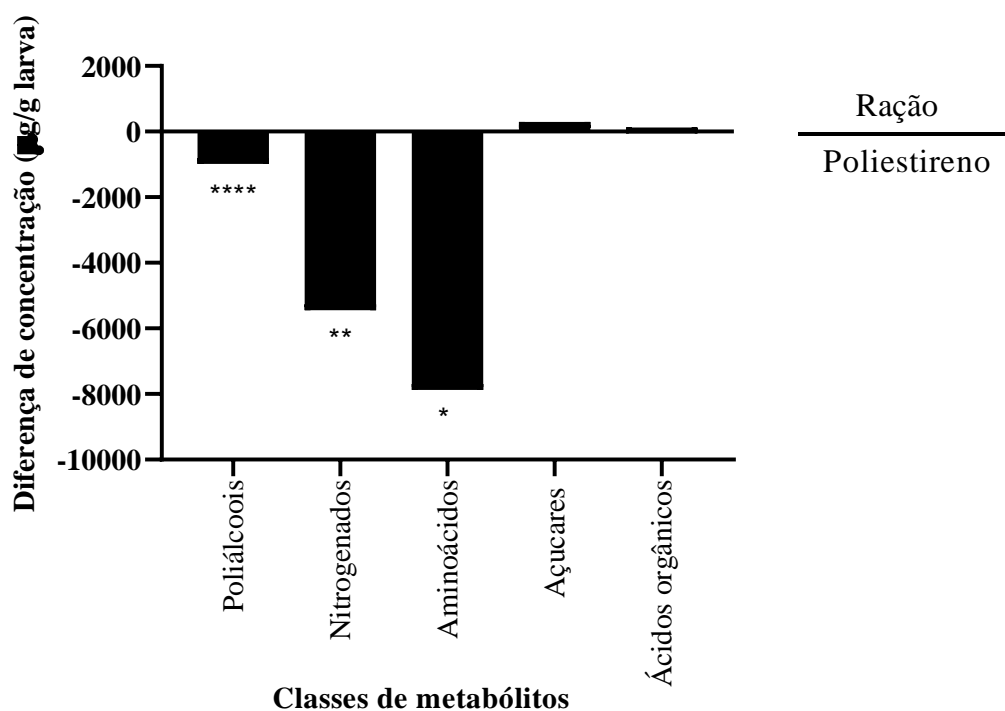


Figura 18: Análise subtrativa das concentrações das principais classes de metabólitos (Ração – Poliestireno) encontrados no extrato bruto das larvas de *A. diaperinus* submetidas as dietas. Estas larvas foram alimentadas com ração por 15 dias a partir da eclosão dos ovos e colocadas para sua respectiva dieta por 8 dias. Os dados foram submetidos ao teste t de Student e pelo teste Mann-Whitney (quando não paramétrico) (5%). ****, ***, ** e * significativo com valores de p <0,0001; <0,001; < 0,01 e <0,05, respectivamente.

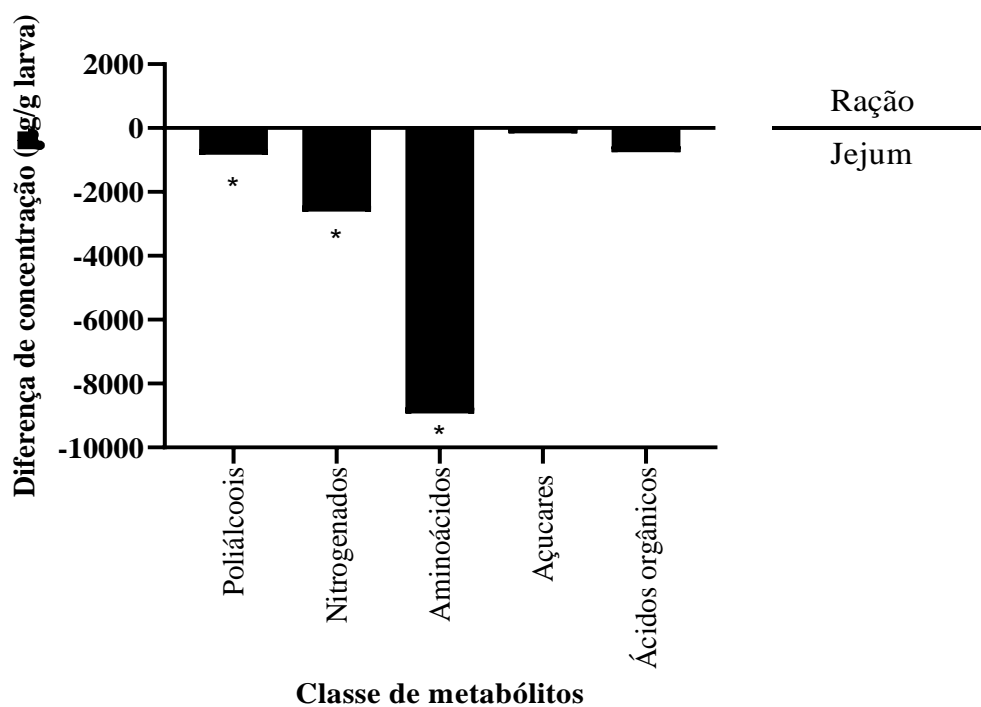


Figura 19: Análise subtrativa das concentrações das principais classes de metabólitos (Ração – Jejum) encontrados no extrato bruto das larvas de *A. diaperinus* submetidas as dietas. Estas larvas foram alimentadas com ração por 15 dias a partir da eclosão dos ovos e colocadas para sua respectiva dieta por 8 dias. Os dados foram submetidos ao teste t de Student e pelo teste Mann-Whitney (quando não paramétrico) (5%). ****, ***, ** e * significativo com valores de $p < 0,0001$; $< 0,001$; $< 0,01$ e $< 0,05$, respectivamente.

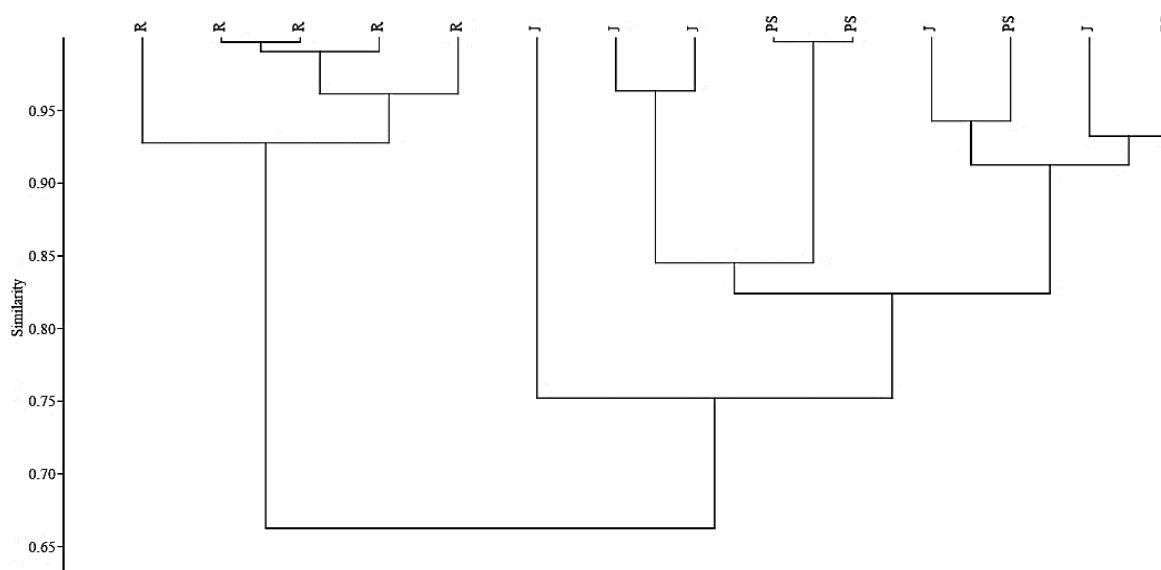


Figura 20: Análise de agrupamentos de nível de similaridade entre as larvas alimentadas com ração, sob jejum e alimentadas com PS. Os dados são amostras independentes entre si. Estas

larvas foram alimentadas com ração por 15 dias a partir da eclosão dos ovos e colocadas para sua respectiva dieta por 8 dias. R: ração; J: jejum; PS: poliestireno.

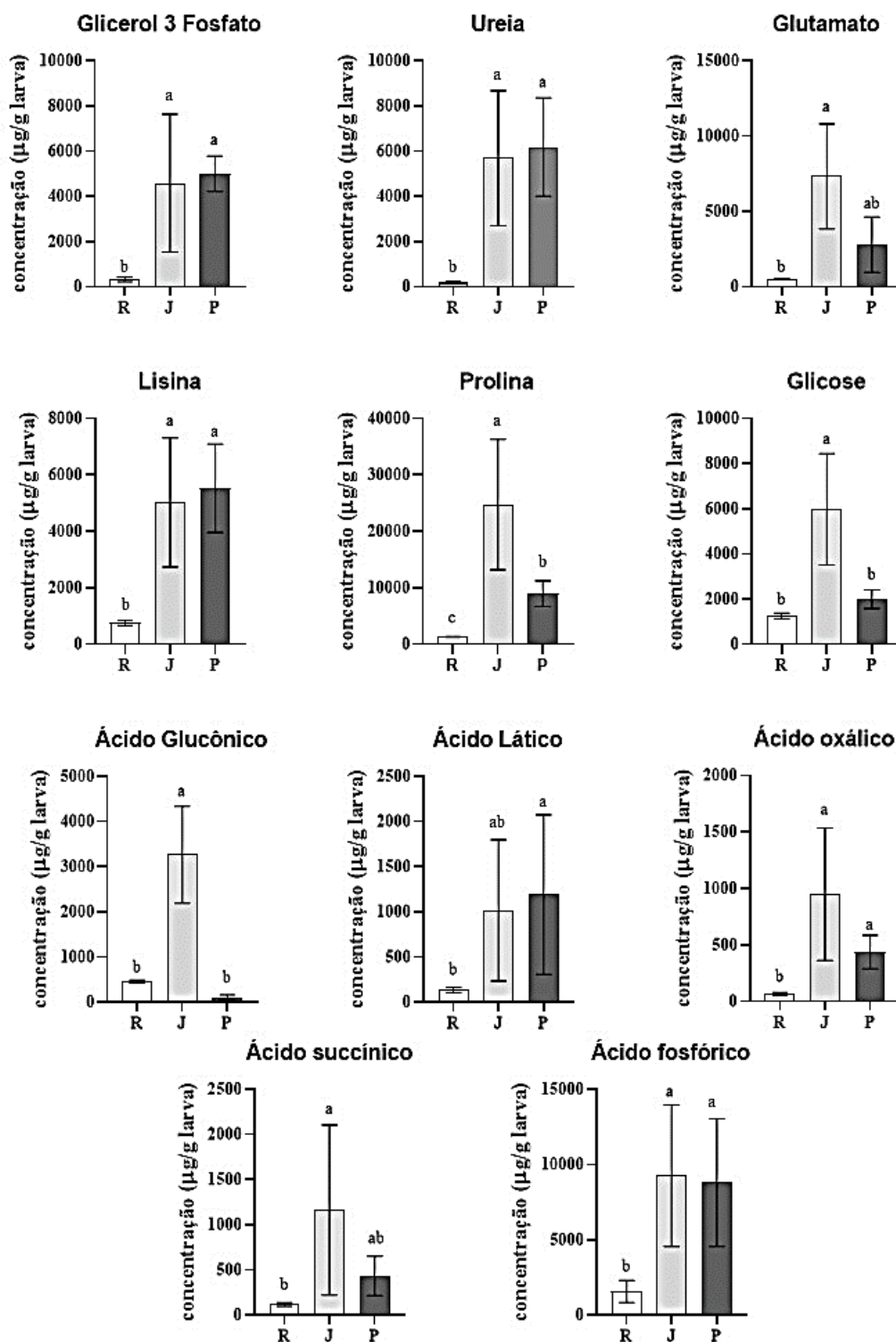


Figura 21: Metabólitos que apresentaram significância. Dados obtidos a partir da tabela 4. n = 7 com pools de 20 larvas \pm o desvio padrão (SD). Os dados foram submetidos a análise de

variância (two-way ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey (5%). R: ração; J: jejum; P: poliestireno.

espectros, baseada nos índices de retenção e no padrão de fragmentação dos íons, permitindo a identificação dos metabólitos (HILL & ROESSNER, 2013). É uma técnica de alta precisão, que possibilita a repetição de dados quantitativos, e por isso, é uma técnica central no estudo de análises metabolômicas (TSUGAWA et al., 2015).

Em conjunto, os resultados sugerem que a alteração na alimentação (jejum ou poliestireno) induziu uma mudança principalmente no metabolismo de aminoácidos, nitrogenados e poliálcoois, implicando desempenham um papel fundamental nos estágios iniciais da vida dos casudinhos. Aminoácidos são comumente usados como neurotransmissores e para a síntese de proteínas por invertebrados e outros insetos (SCHUSTER et al., 1991). Vários aminoácidos essenciais, estavam presentes em maior concentração a principalmente nas larvas em jejum e alimentadas com PS, os aminoácidos representam uma fonte chave de nitrogênio para os insetos (OUISSSE et al., 2020). Aumentando assim a concentração de substâncias nitrogenadas, proveniente da desaminação dos aminoácidos (BURSELL, 1967), também identificado em nosso estudo. Observamos o aumento de poliálcoois, estes são derivados de carboidratos, está associado à tolerância a altas concentrações de açúcar e envolvidos na fisiologia da tolerância ao frio em insetos (OUISSSE et al., 2020; PEREIRA, 2011).

As larvas em jejum e alimentadas com PS dispunham de uma concentração maior Gli-3-F do que as larvas alimentadas com ração, sugerindo que diante de um estresse metabólico, o catabolismo lipídico é acelerado para produzir e incorporar mais Gli-3-F na via glicolítica para obtenção de mais energia. Onde o glicerol-3-fosfato é um intermediário químico da via metabólica da glicólise, sendo um componente de fosfolídeos. Ou seja, a desidrogenação do glicerol 3-fosfato produz Di-hidroxiacetona-fosfato (DHAP), que é parte da entrada do glicerol (originado de triglicerídeos) na via glicolítica. A DHAP pode ser convertida em gliceraldeído 3-fosfato entrando na glicólise (NELSON & COX, 2014). Comportamento similar ocorre com fêmeas de *T. molitor* quando infectadas com *Hymenolepis diminuta* (BLACKBURN et al., 1995).

Em larvas com fome de *Helicoverpa armigera* aumenta a utilização de gordura/proteína em 48h pós-jejum (JIANG et al., 2019). Estudos em diversos organismos documentaram que o uso de fontes alternativas de combustível, como ácidos graxos ou proteínas, são uma estratégia metabólica adaptativa crítica à fome (NAKAYA et al., 2002). Em *Gryllus bimaculatus* sob

privação alimentar, as reservas de carboidratos foram consumidas principalmente nos três primeiros dias e, a partir daí, o metabolismo foi alimentado por reservas lipídicas (SINCLAIR et al., 2011). Outras espécies, como gafanhotos, besouros frugívoros e carrapatos, metabolizam os estoques de glicogênio durante os estágios iniciais de inanição (estado de uma célula ou de um organismo que carece de um elemento indispensável à sua vida), depois muda para o metabolismo de lipídios e proteínas quando os carboidratos se esgotam (AUERSWALD & GÄDE, 2000).

Em relação a Ureia, as larvas em jejum e alimentadas com PS acumularam mais ureia, do que as alimentadas com ração. Isso sugere que a taxa de síntese de ureia deve ser maior que a taxa de excreção de ureia. A taxa de síntese de ureia aumenta em resposta ao aumento na proteólise e catabolismo de aminoácidos, provocado pelo jejum. Em *Achatina fulica* diante do jejum, há aumento na excreção nitrogenada e no teor de ureia, implicando no aumento da produção de compostos amoníacos resultantes do aumento do catabolismo das proteínas (KUM et al., 2005). Ureia e amônia são encontradas como constituintes das excretas de outros membros da ordem, como no besouro *Attagenus piceus*, onde a ureia é a substância predominante, e quantidades substanciais de amônia são excretadas, na presença de aminoácidos contendo enxofre e cistina (BURSELL, 1967).

Em mamíferos, a quebra de proteínas representa grande fonte energética pela via gliconeogênica, enquanto aumenta a oferta de grupamentos amino que culminará na produção de ureia. A regulação do ciclo ocorre por alteração na velocidade de síntese das quatro enzimas do Ciclo da Ureia e por modulação alostérica da enzima carbamoilfosfato sintetase I, estimulada por N-acetilglutamato, composto produzido a partir de acetil-CoA e glutamato na reação catalisada pela N-acetilglutamato sintetase. Esta enzima, por sua vez, é ativada pela arginina. Sendo assim, caso a produção de ureia não ocorra em velocidade suficiente para eliminar a amônia gerada no catabolismo dos aminoácidos, haverá ao cúmulo de intermediários do Ciclo da Ureia, dentre eles a arginina, que estimulará a produção do modulador alostérico positivo da enzima reguladora da produção da ureia, permitindo, assim, a adequação da velocidade do ciclo (NELSON; COX, 2014).

O que justifica também o aumento da concentração de glutamato, nas larvas em jejum, onde o glutamato desidrogenase juntamente com o glutamato ligado aminotransferases efetua a remoção do nitrogênio α -amino de quase todos os aminoácidos via desaminação (BROSNAN, 2000).

Existem aminoácidos metabolicamente ativos que diminuem com o tempo de jejum (a partir do 10º dia, incluindo os precursores do ciclo do ácido cítrico (prolina, glutamato e glutamina), os quais são os aminoácidos com um sistema enzimático ativo de degradação por transferência de aminoácidos. Entretanto, existem aminoácidos metabolicamente inertes, como treonina, lisina e histidina, que não são degradados mesmo durante o jejum (durante 10 dias). Suas concentrações aumentam provavelmente porque as proteínas musculares são hidrolisadas e fornecem novas moléculas ao líquido extracelular e à hemolinfa. Onde a excreção destes componentes é lenta, podendo ser devido à sua utilização na síntese de novas proteínas (BUSCARLET et al., 1986). Neste estudo, os níveis de Lisina também aumentam nas larvas em jejum e alimentadas com PS, corroborando com Buscarlet et al., (1986).

No presente trabalho observamos nos insetos sob alimentação com PS e em condição de jejum aumento nos teores de prolina, que é um aminoácido comumente utilizado como fonte de energia pelos insetos (Tabela 4). Foram observados aumento nos níveis de prolina na hemolinfa de pupas de *Helicoverpa armígera* condicionadas ao estado de diapausa e o seu declínio após o período de diapausa (LU et al., 2014). Durante períodos de baixa demanda energética como a diapausa, os insetos estocam aminoácidos no corpo gorduroso e na hemolinfa (ZHANG et al., 2013). Após a oxidação de seus precursores, a prolina passa a ser encontrada em predominância na hemolinfa, sendo substrato para o ciclo de Krebs (metabolismo aeróbico) (STEC, 2018). A prolina é oxidada em glutamato e convertido em α -cetogluturato por desaminação oxidativa e em glicose (BUSCARLET et al., 1986).

O acúmulo de prolina na hemolinfa está relacionado à síntese de piruvato e consequentemente aos processos de obtenção de energia, sendo recurso para a fase de diapausa e para a fase pós diapausa, de intensa atividade metabólica (XU et al., 2012). Importante para a obtenção de energia, a prolina está relacionada a mecanismos de sobrevivência e reprodução (MICHALKOVA et al., 2014). Na mosca (*Drosophila immigrans*) foi observado que em condições ambientais a alteração dos níveis de prolina é uma alternativa para manter a homeostase e a sobrevivência (TAMANG et al., 2017). O mesmo foi observado em abelhas (*Apis mellífera*), submetidas a uma dieta suplementada com prolina, que apresentaram tolerância a baixas temperaturas (MOLLAEI et al., 2013).

Estudos mostram que durante 28 dias de inação (condição de fraqueza extrema causada pela ausência de alimentação) há um enriquecimento de nitrogênio, pois os aminoácidos derivados da quebra de proteínas são desaminados (HOBSON et al., 1993). Após a inanição, as concentrações de alanina nos músculos de voo, corpos lipídicos e hemolinfa de insetos

diminuem rapidamente, enquanto as de prolina permanecem altas (KEHL; FISCHER, 2012). Há ampla evidência de que aminoácidos extraídos da degradação de proteínas são degradados durante a inanição (HAUBERT et al., 2005).

Os carboidratos (açúcares) são uma importante fonte de energia para os insetos. Nas larvas em condição de jejum houve um aumento na glicose, não observado nas larvas alimentadas com ração e com poliestireno. A glicose é um carboidrato igualmente importante e todos os açúcares são eventualmente convertidos em glicose para fornecer ATP, uma fonte de energia e metabolismo metabólico (ZHANG et al., 2019). Além de ser o principal açúcar disponível na hemolinfa quando os níveis de trealose declinam (ZHOU et al., 2015). Em adição a desaminação oxidativa dos aminoácidos que desempenham um papel importante na produção de glicose a partir do ácido pirúvico (BUSCARLET et al., 1986).

No presente estudo notamos um aumento da concentração de ácido glucônico nas larvas em condição de jejum e uma diminuição nas larvas alimentadas com poliestireno. O ácido glucônico e os sais de gluconato ocorrem muito na natureza porque tais espécies derivam da oxidação da glicose. A formação de ácido glucônico está diretamente relacionada com a atividade da enzima Glicose oxidase (GOD), que é induzida na presença de níveis elevados de glicose. A oxidação da glicose a ácido glucônico pela GOD ocorre em duas etapas: formação de D-gluconolactona e peróxido de hidrogênio em seguida ocorre a hidrólise de D-gluconolactona a ácido glucônico. A primeira etapa é realizada pela ação catalítica da GOD (LOPES., 2011). O ácido glucônico também está associado a atividade antibacteriana é devido ao acúmulo de peróxido de hidrogênio (LOPES., 2011).

Foi demonstrado que há um aumento no conteúdo intermediário do ciclo de Krebs, ácido oxálico nas larvas em jejum e alimentadas com PS e ácido succínico apenas nas larvas em jejum. Esse aumento é apropriado já que o ciclo de Krebs é praticamente um centro universal na cadeia metabólica em que compostos derivados da quebra de carboidratos, lipídios e proteínas são oxidados para formar CO₂, e a energia da oxidação encontra-se temporariamente na NADH e FADH₂. A velocidade do ciclo de Krebs é controlado pela velocidade da conversão do piruvato a acetyl-CoA e pelo fluxo por citrato sintase, isocitrato desidrogenase e α -cetogluturato desidrogenase (NELSON & COX, 2014).

Também observamos um aumento de ácido láctico (lactato) nas larvas alimentadas com PS. O lactato é produzido no final da glicólise por meio conversão do piruvato à lactato (uma reação reversível) pela ação da enzima lactato desidrogenase (LDH). O equilíbrio dessa reação favorece fortemente a formação de lactato (NELSON & COX, 2014). Diferentes tecidos,

especialmente músculos, de insetos pertencentes a vários grupos foram extraídos e estudados quanto às suas atividades de LDH e α -glicerofosfato desidrogenase (GDH I) do ponto de vista comparativo (ZEBE; W, 1970). Em *Drosophila* foi encontrado o gene de chaski codifica uma proteína transportadora de monocarboxilato (MCT/SLC16A) que funciona como um transportador de lactato/piruvato, tendo influência em um processo de alta demanda de energia, como transmissão sináptica, bem como na locomoção e sobrevivência sob estresse nutricional (DELGADO et al., 2018).

O aumento de ácido fosfórico, nas larvas em jejum e alimentadas com poliestireno, pode estar envolvido com diversas vias metabólicas pois o fósforo (P) está presente em muitas etapas de gasto e ganho de ATP. O fósforo é um elemento de vital importância no crescimento e saúde dos animais, participando tanto da estrutura quanto das diversas funções bioquímicas e fisiológicas das células, sendo um componente de ácidos nucleicos, atua como constituinte de fosfolípidos, O fósforo é fundamental no metabolismo intermediário de proteína, lipídeos e carboidratos e como parte do glicogênio. Estimula enzimas glicolíticas (hexoquinase, fosfofrutoquinase) e participa na fosforilação de vários intermediários glicolíticos. O fosfato controla a atividade de enzimas como a glutaminase, essencial para a amoniogênese (estimulada pelo aumento das concentrações de fosfato), e a 1-alfa-hidroxilase, necessária para a ativação de vitamina D (estimulada pelas menores concentrações de fosfato) (VIERA, 2010). O fósforo é extremamente limitado no ambiente, em gafanhotos o P pode aumentar as taxas de crescimento de insetos, além de estar relacionado ganho de peso, e melhores condições na maturidade (RODE et al., 2017; VISANUVIMOL & BERTRAM, 2011).

Coletivamente, os dados metabólicos mostram que o estado fisiológico das larvas de *A. diaperinus* é de fato afetado pelo desafio nutricional (jejum e poliestireno) de curto prazo. Ainda que o perfil metabólico seja similar nas larvas em jejum e em poliestireno, o aumento de glutamato, glicose, ácido glucônico e ácido succínico nas larvas em jejum, podem ser a chave para diferenciação entre os metabolismos. Esses dados indicaram que o desafio influencia muito as vias energéticas. Além de apresentar um perfil metabólico das larvas de *A. diaperinus* diante de estresses alimentares apontando suas alterações.

6. CONCLUSÕES

Ficou demonstrado que as larvas de *A. diaperinus* podem ter capacidade para degradar PS, pois é capaz de mastigar e triturar o produto e sua taxa de sobrevivência não foi afetada mediante a dieta. Entretanto, as larvas sofreram redução de peso e retardação do desenvolvimento. Também foi evidenciado que a integridade do trato digestivo permaneceu inalterada durante 8 dias se alimentando com PS, embora o conteúdo intestinal defere das larvas alimentadas com ração.

Provou- que estado fisiológico das larvas de *A. diaperinus* é afetado diante do desafio nutricional. Onde as larvas de *A. diaperinus* sofreram alteração nas moléculas do metabolismo de ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares e poliálcoois, com o propósito de manter a sobrevivência. Onde substancias como prolina e ácido glucônico diferenciam as larvas em jejum das alimentadas com poliestireno.

Nosso trabalho revelou que as larvas de *A. diaperinus*, podem ser utilizadas como degradadoras iniciais de PS, pois são capazes de diminuir o tamanho do fragmento de PS através da mastigação. Mais estudos com tamanhos de amostra maiores são necessários para investigar larvas criadas a longo prazo (desde os ovos até a fase adulta) em diferentes cenários de exposição. Trabalhos futuros também são necessários para confirmar se *A. diaperinus* tem a capacidade de degradar outros plásticos comuns, como PE, PP, PVC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT-NBR 11752. **ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS**, 2017.

ALLEN, S. et al. Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment. **Nature Geoscience**, v. 12, n. 5, p. 339–344, 2019.

ARACIL, I.; FONT, R.; CONESA, J. A. Semivolatile and volatile compounds from the pyrolysis and combustion of polyvinyl chloride. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 74, n. 1–2, p. 465–478, 2005.

ARRESE, E. L. et al. Mobilization of lipid stores in *Manduca sexta*: cDNA cloning and developmental expression of fat body triglyceride-lipase, TGL. 2009.

ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 207–225, 2010.

AUERSWALD, L.; GÄDE, G. Metabolic changes in the African fruit beetle, *Pachnoda sinuata*, during starvation. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, p. 343–351, 2000.

BARNES, D. K. A. et al. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, p. 1985–1998, 2009.

BEHMER, S. T. **Nutrition in Insects** Springer, Dordrecht., , 2008. (Nota técnica).

BERGAMI, E. et al. Plastics everywhere: first evidence of polystyrene fragments inside the common Antarctic collembolan *Cryptopygus antarcticus*. 2020.

BLACKBURN, B. J.; MODHA, A.; NOVAK, M. Phosphate metabolites of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: tenebrionidae) infected with metacestodes of *Hymenolepis diminuta*. **Journal of medical entomology**, v. 32, n. 3, p. 223–228, 1995.

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. R292–R293, 24 abr. 2017.

BRANDON, A. M. et al. 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.

BRETAS, J. A. C. **CORPO GORDUROSO DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE)**. UFRRJ INSTITUTO DE BIOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL TESE, 2016.

BROSNAN, J. T. Glutamate, at the interface between amino acid and carbohydrate metabolism. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 4 SUPPL., p. 988–990, 2000.

BURSELL, E. The Excretion of Nitrogen in Insects. **Advances in Insect Physiology**, v. 4, n.

C, p. 33–67, 1967.

BUSCARLET, L. A.; RAVENEL, J. L.; GUITTON, A. Effects of fasting and irradiation on the free amino acid content of *Tribolium confusum* J. Du Val. (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 22, n. 4, p. 217–225, 1986.

CANAVOSO, L. E. et al. FAT METABOLISM IN INSECTS. 2001a.

CANAVOSO, L. E. et al. Fat Metabolism in Insects. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 23–46, 2001b.

CASSONE, B. J. et al. Role of the intestinal microbiome in low-density polyethylene degradation by caterpillar larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. 2020.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 23, p. 1273–1335, 1998.

CHAPMAN, R. F. **The Insects: Structure and Function**. 5th Editio ed. [s.l.] Cambridge University Press, 2012.

CHEN, P. S. Amino Acid and Protein Metabolism in Insect Development. **Adv. Insect Physiol**, v. 3, p. 53–132, 1966.

CHERNAKI-LEFFER, A. et al. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 3, p. 243–247, dez. 2002.

CHERNAKI-LEFFER, A. et al. Populational fluctuation and spatial distribution of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera; Tenebrionidae) in a poultry house, Cascavel, Parana state, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 2, p. 209–213, maio 2007.

CHERNAKI, A. M.; ALMEIDA, L. M. DE. Morfologia dos estágios imaturos e do adulto de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera, Tenebrionidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 2, p. 351–363, jun. 2001.

COELHO, R. R. et al. Vitellogenin knockdown strongly affects cotton boll weevil egg viability but not the number of eggs laid by females-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). **MGENE**, v. 9, p. 173–180, 2016.

Como funciona a cadeia petroquímica? Disponível em: <<https://www.broliato.com/br/faq/9/como-funciona-a-cadeia-petroquimica>>. Acesso em: 25 jan. 2022.

Cooperativas do Rio de Janeiro: endereços, telefones e mapa. Disponível em: <<https://www.recicloteca.org.br/coleta-seletiva/lista-de-cooperativas-do-rio-de-janeiro-rj/>>. Acesso em: 27 dez. 2021.

CRIPPEN, T. L.; ESQUIVEL, J. F. Improved visualization of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)-Part II: Alimentary canal components and measurements. **Psyche (London)**, v. 2012, 2012.

CUCINI, C. et al. Bacterial and fungal diversity in the gut of polystyrene-fed *Alphitobius diaperinus* (Insecta: Coleoptera). **Animal Gene**, v. 17–18, n. October, p. 200109, 2020.

DADD, R. H. **Nutrition: organisms**. 4th. ed. Oxford: Pergamon Press: In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 1985.

DASS, R.; S, A. V. N.; AGARW, R. A. Feeding potential and biology. v. 98, p. 444–447, 1984.

DELGADO, M. G. et al. Chaski, a novel *Drosophila* lactate/pyruvate transporter required in glia cells for survival under nutritional stress. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

DEMAJOROVIC, J. Da política tradicional de tratamento do lixo à política de gestão de resíduos sólidos as novas prioridades. **Revista de Administração de Empresas**, v. 35, n. 3, p. 88–93, 1995.

DENLINGER, D. L.; YOCUM, G. D.; RINEHART, J. P. **Hormonal Control of Diapause**. [s.l.] Elsevier, 2012.

DESPINS, J. L.; TURNER, E. C.; RUSZLER, P. L. Construction Profiles of High Rise Caged Layer Houses in Association with Insulation Damage Caused by the Lesser Mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) in Virginia. **Poultry Science**, v. 66, n. 2, p. 243–250, 1987.

DIAS, J. DE C. Rotas de destinação dos resíduos plásticos e seus aspectos ambientais: uma análise da potencialidade da biodegradação. **Dissertação**, p. 66, 2016.

DILKES-HOFFMAN, L. S. et al. 19. The Role of Biodegradable Plastic in Solving Plastic Solid Waste Accumulation. **Plastics to Energy**, p. 473–510, 2018.

DOWNER, R. G. H.; MATTHEWS, J. R. Patterns of Lipid Distribution and Utilisation in Insects. v. 16, p. 733–745, 1976.

DUNFORD, J. C.; KAUFMAN, P. E. Lesser Mealworm, Litter Beetle, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae) 1. **UF IFAS Extension University of Florida**, 2006.

EMWAS, A. H. et al. Nmr spectroscopy for metabolomics research. **Metabolites**, v. 9, n. 7, 2019.

Entenda como o descarte indevido de plástico está destruindo nosso planeta - Mega Curioso. Disponível em: <<https://www.megacurioso.com.br/sustentabilidade/37254-entenda-como-o-descarte-indevido-de-plastico-esta-destruindo-nosso-planeta.htm>>. Acesso em: 23 dez. 2021.

FISHER, M. M. PLASTICS RECYCLING. In: **Plastics and the Environmen**. [s.l: s.n.]. p. 563–627.

FRANCISCO, O.; PRADO, A. P. DO. Characterization of the larval stages of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) using head capsule width. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 61, n. 1, p. 125–131, fev. 2001.

GARCIA, A.; BARBAS, C. C. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)-Based

Metabolomics. **Methods in molecular biology (Clifton, N. J.)**, v. 708, p. 191–204, 2011.

GEDEN, C. J.; ARENDS, J. J.; AXTELL, R. C. Field trials of *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) for control of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) in commercial broiler and turkey houses. **Journal of economic entomology**, v. 80, n. 1, p. 136–141, 1987.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, 5 jul. 2017.

GONDIM, K. C. et al. Lipid metabolism in insect disease vectors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 101, n. August, p. 108–123, 2018.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Insetos: Fundamentos da Entomologia**. 5ª ed ed. Sao Paulo: Roca, 2017.

HADAD, D.; GERESH, S.; SIVAN, A. Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 5, p. 1093–1100, 2005.

HAHN, D. A.; DENLINGER, D. L. Meeting the energetic demands of insect diapause: Nutrient storage and utilization. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 8, p. 760–773, 2007.

HAMID, S. H.; AMIN, M. B.; MAADHAH, A. G. **Handbook of Polymer Degradation**. [s.l.] Marcel Dekker Inc, 1992.

HAUBERT, D. et al. Effects of food quality, starvation and life stage on stable isotope fractionation in *Collembola*. **Pedobiologia**, v. 49, n. 3, p. 229–237, 2005.

HILL, C. B.; ROESSNER, U. Metabolic Profiling of Plants by GC-MS. In: **The Handbook of Plant Metabolomics**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013. p. 1–23.

HOBSON, K. A.; ALISAUSKAS, R. T.; CLARK, R. G. Stable-Nitrogen Isotope Enrichment in Avian Tissues Due to Fasting and Nutritional Stress: Implications for Isotopic Analyses of Diet. **The Condor**, v. 95, n. 2, p. 388, 1993.

HOFF, A.; JACOBSSON, S. Thermo-oxidative degradation of low-density polyethylene close to industrial processing conditions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 26, n. 10, p. 3409–3423, 1981.

HORSTEN BURMESTER, T. Evolution and function of the insect hexamerins*. **European Journal of Entomology**, v. 96, n. 3, p. 213–225, 1999.

HUO, Y. et al. Insect tissue-specific vitellogenin facilitates transmission of plant virus. 2018.

ITÄVAARA, M.; VIKMAN, M. A SIMPLE SCREENING TEST FOR STUDYING THE BIODEGRADABILITY OF INSOLUBLE POLYMERS. **Science**, v. 31, n. 95, p. 4359–4373, 1995.

JAPP, A. K.; BICHO, C. DE L.; SILVA, A. V. F. DA. Japp, Bicho, Silva - 2010 - Importância

e medidas de controle para *Alphitobius diaperinus* em aviários. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1668–1673, 2010.

JIANG, T. et al. Effects of starvation on respiratory metabolism and energy metabolism in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 119, n. May, p. 103951, 2019.

KEHL, T.; FISCHER, K. Larval starvation reduces responsiveness to feeding stimuli and does not affect feeding preferences in a butterfly. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 7, p. 1028–1035, 2012.

KLEMCHUK, P. P. Degradable plastics: A critical review. **Polymer Degradation and Stability**, v. 27, n. 2, p. 183–202, 1990.

KLOWDEN, M. J. Physiological Systems in Insects: Third Edition. **Physiological Systems in Insects: Third Edition**, p. 1–682, 2013.

KOÇAKOĞLU, N. Ö.; CANDAN, S. Characterization of the alimentary canal and Malpighian tubules of *Chrysolina herbacea* (Duftschmid, 1825) (Coleoptera: Chrysomelidae): Anatomical and histological approaches. **Microscopy Research and Technique**, v. 84, n. 6, p. 1135–1144, 2021.

KUM, C. H. et al. Increases in urea synthesis and the ornithine-urea cycle capacity in the giant African snail, *Achatina fulica*, during fasting or aestivation, or after the injection with ammonium chloride. **Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology**, v. 303, n. 12, p. 1040–1053, 2005.

KUNDUNGAL, H. et al. Efficient biodegradation of polyethylene (HDPE) waste by the plastic-eating lesser waxworm (*Achroia grisella*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 18, p. 18509–18519, 2019.

LOPES., S. M. **Estudos preliminares de produção de ácido glucônico a partir de sacarose invertida em biorreator airlift**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2011.

LU, Y. X.; ZHANG, Q.; XU, W. H. Global metabolomic analyses of the hemolymph and brain during the initiation, maintenance, and termination of pupal diapause in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

MASAYUKI SHIMAO. Biodegradation of plastics Masayuki Shima. **Current Opinion in Biotechnology**, p. 242–247, 2001.

MCALLISTER, J. . C. .; STEELMAN, C. . D. .; CARLTON, C. . E. . Histomorphology of the Larval and Adult Digestive Systems of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera : Tenebrionidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 68, n. 2, p. 195–205, 1995.

MENDES, L. R.; POVALUK, M. CICLO E CONTROLE DO *Alphitobius diaperinus* (COLEOPTERA, TENEBRIONIDAE) NO MUNICÍPIO DE QUITANDINHA, PR. **Saude e Meio Ambiente**, v. 6, n. 1, p. 107–122, 2017.

MICHALKOVA, V. et al. Vitamin B6 generated by obligate symbionts is critical for maintaining proline homeostasis and fecundity in tsetse flies. **Applied and Environmental**

Microbiology, v. 80, n. 18, p. 5844–5853, 2014.

MINAS GERAIS VAI PROIBIR INCINERAÇÃO DE LIXO. Disponível em: <<https://www.ambientelegal.com.br/minas-gerais-vai-proibir-incineracao-de-lixo/>>. Acesso em: 23 dez. 2021.

MOLLAEI, M. et al. Short communication. impact of the amino acid proline on the cold hardiness of honey bee, *Apis mellifera* L. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 3, p. 714–717, 2013.

MUELLER, R.-J. Biological degradation of synthetic polyesters-Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2124–2128, 2006.

MÜLLER, R.-J. Biodegradability of Polymers: Regulations and Methods for Testing. **Biopolymers Online**, 25 fev. 2002.

NAKAYA, Y. et al. Time course of change in respiratory quotient during prolonged starvation in carbon tetrachloride-induced cirrhotic rats. **Nutrition Research**, v. 22, n. 6, p. 695–703, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6 ed. ed. Porto Alegre: 2014.

OUISSE, T. et al. Effects of elevational range shift on the morphology and physiology of a carabid beetle invading the sub-Antarctic Kerguelen Islands. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 0–12, 2020.

PAIVA, D. P. DE. **Simpósio sobre Resíduos da Produção Avícola 12 de abril de 2000-Concórdia, SC CONTROLE DE MOSCAS E CASCUDINHOS: DESAFIOS NA PRODUÇÃO AGRÍCOLA Doralice Pedroso-de-Paiva**. [s.l: s.n.].

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, M. G.; KRIZ, S. G. **Introduction to organic laboratory techniques**. 3 th ed. ed. [s.l.] Fort Worth, TX: Saunders, 1988.

PEIXOTO, J. B. Prospecção de microorganismos com potencial para biodegradação de polietileno. 2013.

PENG, B. Y. et al. 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. Y. et al. Biodegradation of Polyvinyl Chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. **Environment International**, v. 145, n. May, p. 106106, 2020a.

PENG, B. Y. et al. Biodegradation of low-density polyethylene and polystyrene in superworms, larvae of *Zophobas atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae): Broad and limited extent depolymerization. **Environmental Pollution**, v. 266, p. 115206, 2020b.

PEREIRA, I. B. Novos transportadores de poliois em *Debaryomyces hansenii*. **Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa**, p. 1–127, 2011.

PEREIRA, P. R. V. DA S.; SALVADORI, J. R. Identificação dos principais Coleoptera (Insecta) associados a produtos armazenados. **Embrapa. Documentos Online**, v. ISSN 1518-, 2006.

Pirólise -acesso: < <http://www.geocities.ws/reciclagem2000/pirolise.htm>>. Disponível em: <<http://www.geocities.ws/reciclagem2000/pirolise.htm>>. Acesso em: 23 dez. 2021.

PLASTICS EUROPE. An analysis of European plastics production, demand and waste data. 2015.

PLASTICS EUROPE. Plastics – the Facts 2020. **PlasticEurope-Association of Plastics Manufactures**, p. 1–64, 2020.

Plastivida. Disponível em: <<http://www.plastivida.org.br/index.php?lang=pt>>. Acesso em: 6 jan. 2022.

Poluição por plásticos mata milhões de animais todos os anos - FUNVERDE. Disponível em: <<https://www.funverde.org.br/blog/poluicao-por-plasticos-mata-milhoes-de-animais-todos-os-anos/>>. Acesso em: 23 dez. 2021.

Quattor Química S.A. Disponível em: <<https://www.quattor.com.br/quattorweb/pt/industria.aspx> em 20/01>. Acesso em: 25 jan. 2022.

RENAULT, D.; HERVANT, F.; VERNON, P. Comparative study of the metabolic responses during food shortage and subsequent recovery at different temperatures in the adult lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Physiological Entomology**, v. 27, n. 4, p. 291–301, 2002.

Revista Plástico Moderno. Disponível em: <<https://www.plastico.com.br/>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

REZENDE, R. **UFRRJ INSTITUTO DE ZOOTECNIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA DISSERTAÇÃO Fungos Entomopatogênicos no Controle do *Alphitobius Diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) como Estratégia de Biosseguridade na Avicultura**. [s.l.: s.n.].

RODE, M.; LEMOINE, N. P.; SMITH, M. D. Prospective evidence for independent nitrogen and phosphorus limitation of grasshopper (*Chorthippus curtipennis*) growth in a tallgrass prairie. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–12, 2017.

ROLIM, A. M. **A RECICLAGEM DE RESÍDUOS PLÁSTICOS PÓS-CONSUMO EM OITO EMPRESAS DO RIO GRANDE DO SUL**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2000.

SALIN, C. et al. Spatial distribution of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) in the soil of a poultry house along a breeding cycle. **Eur. J. Soil Biol.**, v. 33, p. 107–115, 2000.

SALLET, L. A. P. Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). p. 1–109, 2013.

SALMELA, H.; SUNDSTRÖM., L. Vitellogenin in inflammation and immunity in social insects. **Inflammation and Cell Signaling**, 3 maio 2017.

SAXENA, S. C.; SARIN, K. **Chitinase in the Alimentary Tract of the Lesser Mealworm, Alphitobius diaperinus (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)** Applied Entomology and Zoology, , 1971.

SCHUSTER, C. M. et al. Molecular Cloning of an Invertebrate Glutamate Receptor Subunit Expressed in Drosophila Muscle. **Science**, v. 254, p. 112–114, 1991.

SIDDIQUI, M. N.; REDHWI, H. H. Pyrolysis of mixed plastics for the recovery of useful products. **Fuel Processing Technology**, v. 90, p. 545–552, 2009.

SILVA, A. S. DA et al. Ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 2, p. 177–181, 27 jun. 2005.

SILVA, K. R. I. DA. **Biodegradação de polietileno tereftalato (PET) por fungos ligninolíticos**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2009.

SINCLAIR, B. J. et al. Metabolic rate does not decrease with starvation in *Gryllus bimaculatus* when changing fuel use is taken into account. **Physiological Entomology**, v. 36, p. 84–89, 2011.

SINGH, N.; JOHNSON, D. Baseline Susceptibility and Cross-Resistance in Adult and Larval *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) Collected from Poultry Farms in Arkansas. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 4, p. 1994–1999, 2015.

SIQUIM/EQ/UFRJ. **PROSPECTIVA TECNOLÓGICA DA CADEIA PRODUTIVA DE TRANSFORMADOS PLÁSTICOS**. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/5499313-Prospectiva-tecnologica-da-cadeia-produtiva-de-transformados-plasticos.html>>. Acesso em: 16 dez. 2021.

SONG, J. H. et al. Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, p. 2127–2139, 2009.

SPERLING, L. H. **Introduction to physical polymer science, 3rd edition**. [s.l.: s.n.]. v. 78

STEC, N. The Role of Proline Oxidation and Metabolome Dynamics During the Flight of *Bombus Impatiens*. p. 81, 2018.

STOOPS, J. et al. Minced meat-like products from mealworm larvae (*Tenebrio molitor* and *Alphitobius diaperinus*): microbial dynamics during production and storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 41, p. 1–9, 2017.

TAMANG, A. M.; KALRA, B.; PARKASH, R. Cold and desiccation stress induced changes in the accumulation and utilization of proline and trehalose in seasonal populations of *Drosophila immigrans*. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology**, v. 203, p. 304–313, 2017.

THOMPSON, R. C. et al. Our plastic age. **Philosophical Transactions of the Royal Society**

B: Biological Sciences, 2009.

TOKIWA, Y.; CALABIA, B. P. Degradation of microbial polyesters. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 1181–1189, 2004.

TSUGAWA, H. et al. Tms-diaL: data-independent ms/ms deconvolution for comprehensive metabolome analysis. **Nature Methods**, v. 12, n. n. 6, p. 523–526, 2015.

UEMURA, D. H. et al. Distribuição E Dinâmica Populacional Do Cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera : Tenebrionidae) Em Aviários De Frango De Corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 4, p. 429–435, 2008.

URBANEK, A. K. et al. A comprehensive assessment of microbiome diversity in *Tenebrio molitor* fed with polystyrene waste. **Environmental Pollution**, v. 262, 2020.

VAUGHAN, J. A.; TURNER, E. C.; RUSZLER, P. L. **EDUCATION AND PRODUCTION Infestation and Damage of Poultry House Insulation by the Lesser Mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) 1 ' 2.** [s.l: s.n.].

VERGARA-COBIÁN, C.; GAZANI B, R. **Biología de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)** *Revista Peruana de Entomología*, 1996.

VIERA, M. D. S. **BIOQUÍMICA DO FÓSFORO** Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, , 2010.

VISANUVIMOL, L.; BERTRAM, S. M. How dietary phosphorus availability during development influences condition and life history traits of the cricket, *Acheta domestica*. **Journal of Insect Science**, v. 11, p. 1–17, 2011.

WANG, Z. et al. A polystyrene-degrading *Acinetobacter* bacterium isolated from the larvae of *Tribolium castaneum*. **Science of the Total Environment**, v. 726, p. 138564, 2020.

WILLIAMS, P. T.; WILLIAMS, E. A. Interaction of Plastics in Mixed-Plastics Pyrolysis. **American Chemical Society-Energy & Fuels**, v. 13, p. 188–196, 1999.

WOO, S.; SONG, I.; CHA, H. J. Fast and Facile Biodegradation of Polystyrene by the Gut Microbial Flora of *Plesiophthalmus davidis* Larvae. 2020.

WYNANTS, E. et al. Microbial dynamics during production of lesser mealworms (*Alphitobius diaperinus*) for human consumption at industrial scale. **Food Microbiology**, v. 70, p. 181–191, 2018.

XU, W. H.; LU, Y. X.; DENLINGER, D. L. Cross-talk between the fat body and brain regulates insect developmental arrest. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 36, p. 14687–14692, 2012.

YAMADA, T. et al. Correction: Fat body glycogen serves as a metabolic safeguard for the maintenance of sugar levels in *Drosophila*. Fat body glycogen serves as a metabolic safeguard for the maintenance of sugar levels in *Drosophila*. 2018.

YANG, J. et al. Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of

plastic-eating waxworms. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 23, p. 13776–13784, 2014.

YANG, L. et al. 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. S. et al. Biodegradation of polystyrene wastes in yellow mealworms (larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus): Factors affecting biodegradation rates and the ability of polystyrene-fed larvae to complete their life cycle. **Chemosphere**, v. 191, p. 979–989, 2018.

YANG, S. S. et al. Biodegradation of polypropylene by yellow mealworms (*Tenebrio molitor*) and superworms (*Zophobas atratus*) via gut-microbe-dependent depolymerization. **Science of the Total Environment**, p. 144087, 2020.

YANG, Y. et al. 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, 2015a.

YANG, Y. et al. 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.

YOSHIDA, S. et al. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). **Science**, v. 351, n. 6278, 2016.

ZEBE, E. C.; W, H. M. LACTIC AND α -GLYCEROPHOSPHATE DEHYDROGENASES IN INSECTS. **The Journal of General Physiology**, v. 40, n. 5, p. 17–43, 1970.

ZERA, A. J.; DENNO, R. F. Physiology and ecology of dispersal polymorphism in insects. **Annual review of entomology**. Vol. 42, p. 207–230, 1997.

ZHANG, D. W. et al. Insect behavior and physiological adaptation mechanisms under starvation stress. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. MAR, p. 1–8, 2019.

ZHANG, Q.; LU, Y. X.; XU, W. H. Proteomic and metabolomic profiles of larval hemolymph associated with diapause in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, 2013.

ZHOU, L. et al. Developmental changes for the hemolymph metabolome of silkworm (*Bombyx mori* L.). **Journal of Proteome Research**, v. 14, n. 5, p. 2331–2347, 2015.