

PUCRS

ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS
DOUTORADO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

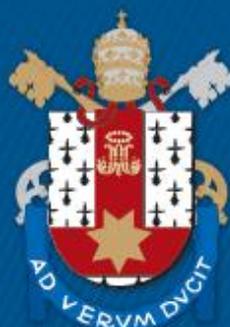
KAUÊ PELEGRINI

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MICROPLÁSTICOS NA PRAIA DE TORRES/RS,
PRODUÇÃO E ESTUDO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE MICRO/NANOPARTÍCULAS
DE POLIPROPILENO (PP) AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO DE *ZEBRAFISH*
(*DANIO RERIO*)**

Porto Alegre

2023

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul



**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MICROPLÁSTICOS NA PRAIA DE
TORRES/RS, PRODUÇÃO E ESTUDO DOS EFEITOS
TOXICOLÓGICOS DE MICRO/NANOPARTÍCULAS DE
POLIPROPILENO (PP) AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO DE
*ZEBRAFISH (DANIO RERIO)***

KAUÊ PELEGRINI

ENGENHEIRO AMBIENTAL

MESTRE EM ENGENHARIA DE PROCESSOS E TECNOLOGIAS

ORIENTADOR: PROF^a. DR^a. ROSANE ANGELICA LIGABUE

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. MAURICIO REIS BOGO

Tese realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre
Fevereiro, 2023**

Ficha Catalográfica

P381a Pelegrini, Kauê

Avaliação da presença de microplásticos na praia de Torres/RS, produção e estudo dos efeitos toxicológicos de micro/nanopartículas de polipropileno (PP) ao longo do desenvolvimento de zebrafish (*Danio rerio*) / Kauê Pelegrini. – 2023.

167 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Angelica Ligabue.

Coorientador: Prof. Dr. Mauricio Reis Bogo.

1. litoral. 2. microplásticos. 3. nanoplásticos. 4. polipropileno. 5. zebrafish. I. Ligabue, Rosane Angelica. II. Bogo, Mauricio Reis. III. , . IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

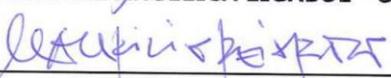
Avaliação da presença de microplásticos na praia de Torres/RS, produção e estudo dos efeitos toxicológicos de micro/nanopartículas de polipropileno (PP) ao longo do desenvolvimento de zebrafish (Danio rerio)

CANDIDATO: KAUÊ PELEGRINI

Esta Tese de Doutorado foi julgada para obtenção do título de DOUTOR EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.



DRA. ROSANE ANGÉLICA LIGABUE - ORIENTADORA

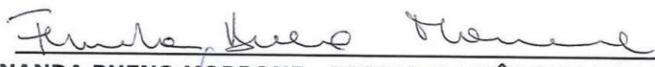


DR. MAURICIO REIS BOGO - COORIENTADOR

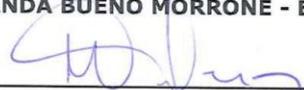
BANCA EXAMINADORA



DRA. VANUSCA DALOSTO JAHNO - TECNOLOGIAS DE MATERIAIS E PROCESSOS INDUSTRIAIS - UNIVERSIDADE FEEVALE



DRA. FERNANDA BUENO MORRONE - ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - PUCRS



DR. MARCUS SEFERIN - DO PGETEMA - ESCOLA POLITÉCNICA - PUCRS

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 32 - Sala 507 - CEP: 90619-900
Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625
E-mail: engenharia.pg.materiais@pucrs.br
www.pucrs.br/politecnica

*Science, like nature must also be
tamed with a view towards its
preservation.
(Neil Peart)*

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que acreditaram em mim, me incentivaram e me deram apoio durante essa jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Maria Eduarda pelo amor, carinho, incentivo e compreensão durante todo o período, por segurar a minha mão nos momentos difíceis e por comemorar e vibrar comigo os momentos felizes e alegres.

Aos meus pais Lilian e Volnei e meu irmão Iago pela paciência, suporte, apoio, todo o carinho de sempre e pela compreensão por eu não estar tão presente o quanto eu gostaria.

Aos meus sogros Lea Regina e Luiz Carlos por praticamente me adotarem aqui em Porto Alegre e por sempre me dar apoio quando precisei.

Aos meus orientadores Profa. Rosane Angelica Ligabue e Prof. Mauricio Reis Bogo pela amizade, pelo empenho, orientação e auxílio durante todo o tempo desse trabalho. Também, em especial, à Profa. Nara Regina de Souza Basso, pela amizade, incentivo e confiança durante todo o período em que estive me orientando e também durante o período pós.

A todos os técnicos dos laboratórios onde realizei atividades e funcionários do almoxarifado, sempre fui atendido com muito respeito e carinho.

Às colegas e amigas Thuany e Lilian pelos momentos de desabafo necessários, pela excelente companhia e pelo incrível suporte e auxílio durante todas as etapas dos experimentos.

A meus colegas do laboratório de química industrial Wesley, Tiago, Michele, Paulo e Jessica pela incrível amizade e por tornarem o ambiente de trabalho sempre mais leve e prazeroso.

Ao Centro Interdisciplinar de Nanociência e Micro- Nanotecnologia (NanoPUCRS) pela disponibilidade da infraestrutura.

À bolsista Cristina Wertheimer pela dedicação e auxílio em diversas etapas desse trabalho.

A meus colegas do Laboratório de Biologia Genômica e Molecular Camilo Alexandre Jablonski e Talita Carneiro Brandão Pereira pela ajuda e paciência durante os experimentos e desenvolvimento de artigos em uma área da qual eu não era familiarizado.

A meus grandes amigos Rossi e Dan por me fazerem sempre lembrar que eu tenho pessoas maravilhosas com quem eu sempre posso contar, não importando o dia ou a situação. A eles também agradeço a paciência por eu não estar tão presente o quanto eu gostaria. Rádio Gorila para sempre!

A meus amigos do CFC pela motivação e incentivo durante conversas elásticas que vão desde tópicos excepcionalmente profundos até necessariamente superficiais.

A meus amigos e ex-colegas de apartamento Alessandro e Eduardo pelas risadas e pelos momentos de descontração durante todo o período.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivos Específicos	24
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1. Poluição plástica	25
3.2. Poluição de resíduos plásticos no ambiente costeiro e marinho.....	28
3.3. Micro e nanoplásticos.....	31
3.3.1. Geração primária	32
3.3.2. Geração secundária.....	33
3.3.2.1. Degradação e geração de microplásticos de polipropileno.....	35
3.3.3. Coleta e identificação de microplásticos em ambientes costeiros	38
3.3.4. Toxicidade de micro e nanoplásticos	40
3.4. Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	42
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO VOLUME I	45
5. METODOLOGIA	46
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
6.1. Tipos de plásticos, dimensões e fontes de geração	52
6.2. Organismos-teste e efeitos tóxicos causados por micro e nanoplásticos .	58
6.3. Polietileno (PE)	64
6.4. Polipropileno (PP)	66
6.5. Politereftalato de etileno (PET)	69
6.6. Policloreto de vinila (PVC).....	72
6.7. Poliestireno (PS).....	74
6.8. Outros plásticos	78
6.9. Toxicidade de micro e nanoplásticos em <i>zebrafish</i>	81
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS O VOLUME II	87
8. METODOLOGIA	88
8.1. Coleta de amostras	89
8.2. Separação por densidades.....	91
8.3. Digestão química.....	93

8.4. Identificação e quantificação dos microplásticos	94
8.5. Caracterização por μ Raman	97
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
9.1. Quantificação dos microplásticos	99
9.2. Identificação e caracterização dos microplásticos	107
10. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO VOLUME III	115
11. METODOLOGIA.....	116
11.1. Geração das partículas	117
11.2. Exposição à Câmara de Envelhecimento Acelerado.....	118
11.3. Degradação mecânica por meio de abrasão.....	119
11.4. Caracterização das micro/nanopartículas de PP.....	119
11.4.1. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	119
11.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV- FEG).....	120
11.4.3. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	120
11.5. Preparação das suspensões para exposição dos organismos	121
11.6. Manutenção dos organismos <i>zebrafish</i> , reprodução e coleta dos embriões	122
11.7. Delineamento experimental.....	123
11.8. Movimento espontâneo	124
11.9. Batimentos cardíacos	124
11.10. Morfologia	124
11.11. Locomoção	124
11.12. Taxa de eclosão e sobrevivência.....	125
11.13. Análise estatística	125
12. RESULTADOS E DISCUSSÃO	126
12.1. Caracterização das micro/nanopartículas de PP.....	126
12.1.1. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	126
12.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV- FEG).....	128
12.1.3. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	131
12.2. Avaliação da toxicidade das micro/nanopartículas de PP.....	133

12.2.1. Sobrevida.....	134
12.2.2. Taxa de eclosão	135
12.2.3. Movimento espontâneo	136
12.2.4. Batimentos cardíacos.....	137
12.2.5. Morfologia.....	138
12.2.6. Locomoção.....	141
13. CONCLUSÕES GERAIS	146
14. PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS.....	149
15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	150
APÊNDICES	164

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais setores na demanda da produção de polímeros.....	26
Figura 2: Geração diária de resíduos totais e poliméricos pelos dez países mais geradores do mundo	27
Figura 3: Principais rios que contribuem para o transporte de resíduos poliméricos até os oceanos e suas respectivas quantidades	29
Figura 4: Etapas do processo de fotodegradação de poliolefinas	37
Figura 5: Reações de Norrish do tipo I e II	38
Figura 6: Metodologia aplicada para pesquisa, refinamento e análise de dados do estudo de revisão	47
Figura 7: Resultado do processo de aplicação dos critérios de exclusão dos artigos científicos	48
Figura 8: Quantidade relativa de publicações para cada tipo de plástico em escala micro e nanométrica.....	53
Figura 9: Relação entre a produção anual dos principais tipos de polímeros e a parcela de artigos que estudaram sua toxicidade	54
Figura 10: Quantidade absoluta de publicações com micro e nanoplásticos divididos por tipo de plástico ao longo dos anos	55
Figura 11: Proporção relativa das dimensões das partículas por tipo de plástico.....	56
Figura 12: Quantidade relativa de publicações para cada forma de obtenção de partículas para cada tipo de plástico	58
Figura 13: Comparação da toxicidade causada por diferentes dimensões e diferentes formas de obtenção das partículas poliméricas	60
Figura 14: Quantidade relativa de publicações para cada categoria de organismo ..	61
Figura 15: <i>Heatmap</i> do número de publicações e presença de efeitos toxicológicos em cada categoria	63

Figura 16: Dispersão da quantidade relativa de publicações para cada classe de organismos levando em consideração as dimensões das partículas de PE	66
Figura 17: Dispersão da quantidade relativa de publicações para cada classe de organismos levando em consideração as dimensões das partículas de PP	68
Figura 18: Dispersão da quantidade relativa de publicações para cada classe de organismos levando em consideração as dimensões das partículas de PET	71
Figura 19: Dispersão da quantidade relativa de publicações para cada classe de organismos levando em consideração as dimensões das partículas de PVC.....	74
Figura 20: <i>Heatmap</i> do número de publicações e presença de efeitos toxicológicos causados pelo PS em cada categoria de toxicidade para cada classe de organismo.....	77
Figura 21: Dispersão da quantidade relativa de publicações para cada classe de organismos levando em consideração as dimensões das partículas de PS	78
Figura 22: Dispersão da quantidade relativa de publicações para cada classe de organismos levando em consideração as dimensões das partículas de outros plásticos	80
Figura 23: Quantidade absoluta de publicações que apresentaram a presença e ausência de efeitos toxicológicos para cada categoria de toxicidade durante a exposição de <i>zebrafish</i> a microplásticos	82
Figura 24: Quantidade absoluta de publicações que apresentaram a presença e ausência de efeitos toxicológicos para cada categoria de toxicidade durante a exposição de <i>zebrafish</i> a nanoplásticos.....	83
Figura 25: Comparação da predominância de efeitos tóxicos entre micro e nanoplásticos em estudos com <i>zebrafish</i>	85
Figura 26: Fluxograma dos processos da avaliação da presença de microplásticos na praia de Torres/RS	88
Figura 27: Mapa e pontos de coleta das amostras de areia na praia de Torres/RS..	89
Figura 28: Localização da Linha da Maré Alta (LMA) (A), pontos de coleta na quadrícula (B) e amostra de areia coletada (C).....	91

Figura 29: Indicação da trajetória da varredura no filtro durante a análise de microscopia	97
Figura 30: Fluorescência dos diferentes tipos de polímeros, com e sem a marcação com o fluoróforo <i>Red Nile</i> , sob as luzes branca, UV e azul	100
Figura 31: Partículas encontradas durante a etapa de análise por microscopia de fluorescência em diferentes aumentos e sob diferentes luzes. (A) e (C) 100 μm e luz branca, (B) e (D) 100 μm e luz azul, (E) 20 μm e luz branca, (F) 20 μm e luz azul.....	102
Figura 32: Quantidade total de microplásticos, diferenciando-os por fragmentos e fibras, encontrados em cada ponto amostral.....	104
Figura 33: Mapa com as concentrações de microplásticos em cada ponto amostral.....	105
Figura 34: Quantidade relativa de microplásticos por faixa de dimensões encontrados em cada ponto amostral	106
Figura 35:Imagens de alguns microplásticos encontrados e seus respectivos espectros Raman	108
Figura 36: Tipos dos polímeros das partículas e sua frequência em relação à amostra total.....	110
Figura 37: Mapa com os principais tipos de plásticos encontrados em regiões costeiras e próximas a ambientes aquáticos em diversas localizações do globo	112
Figura 38: Fluxograma dos processos desta etapa de estudo de caracterização e avaliação da toxicidade de micro e nanopartículas	117
Figura 39: Esquema de diluição para a obtenção de cada uma das concentrações das suspensões utilizadas nesse estudo	122
Figura 40: Desenho experimental da avaliação da toxicidade no zebrafish durante a exposição à micro e nanopartículas de PP	123
Figura 41: Espectros de FTIR das amostras antes e após exposição à câmara de envelhecimento	127
Figura 42: Micrografias da superfície das amostras de PP após processo de fotodegradação e abrasão mecânica em diferentes aumentos. (A-B) 100 μm , (C-D) 50 μm , (E) 5 μm , (F) 10 μm , (G-I) 1 μm	130

Figura 43: Distribuição do tamanho de partículas das amostras de micro/nanopartículas de PP obtida a partir da técnica de DLS	132
Figura 44: Fotografia dos embriões de peixe-zebra expostos às diferentes suspensões	133
Figura 45: Resultados preliminares da sobrevivência do <i>zebrafish</i> ao longo dos tempos dos experimentos	135
Figura 46: Resultados preliminares da taxa de eclosão dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos ao longo dos tempos dos experimentos	136
Figura 47: Resultados preliminares da contagem de movimentos espontâneos dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos.....	137
Figura 48: Resultados preliminares da frequência dos batimentos cardíacos dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos.....	138
Figura 49: Resultados preliminares da distância axial dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos.....	139
Figura 50: Resultados preliminares da distância ocular dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos.....	140
Figura 51: Resultados preliminares da área ocular dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos.....	141
Figura 52: Resultados preliminares da distância total percorrida dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos.....	142
Figura 53: Resultados preliminares da velocidade média dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos	143
Figura 54: Resultados preliminares do tempo na periferia dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos	144
Figura 55: Resultados preliminares do meandro absoluto dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos	145
Figura 56: Espectro Raman de uma partícula de PE encontrada na costa de Torres/RS.....	164

Figura 57: Espectro Raman de uma partícula de PP encontrada na costa de Torres/RS.....	165
Figura 58: Espectro Raman de uma partícula de PET encontrada na costa de Torres/RS.....	166
Figura 59: Espectro Raman de uma partícula de PA encontrada na costa de Torres/RS.....	167

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplo de categorização dos parâmetros avaliados na revisão bibliográfica	48
Tabela 2: Categorias dos efeitos avaliadas e suas respectivas descrições	50
Tabela 3: Principais tipos de microfibras, sua origem e características morfológicas	96

LISTA DE ABREVIATURAS

ACHÉ	Acetilcolinesterase
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
cm	Centímetro
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
EC50	Concentração Efetiva Mediana
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
g	gramas
GPGP	Great Pacific Garbage Patch
h	hora
hpf	horas pós-fecundação
J/kg.°C	Joules por quilograma Celsius
kg	quilogramas
kV	Quilovolt
L	Litros
LC50	Toxicidade Aguda
LMA	Linha da Maré Alta
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo
mg/L	miligramas por litro
mL	Mililitros
mm	milímetros
ng	nanogramas
nm	nanômetro
PA	Poliamida
PE	Polietileno
PET	Politereftalato de etileno
PHB	Polihidroxiacetato
PLA	Poliácido láctico
PMMA	Polimetilmetacrilato
PP	Polipropileno
ppb	partes por bilhão
ppm	partes por milhão

PS	Poliestireno
PU	Poliuretano
PVC	Policloreto de vinila
ROS	Espécies Reativas ao Oxigênio
UV	Ultravioleta
μm	micrômetro
μRaman	Micro Raman
°C	Celsius

RESUMO

PELEGRINI, Kauê. **Avaliação da presença de microplásticos na praia de torres/RS, produção e estudo dos efeitos toxicológicos de micro/nanopartículas de polipropileno (PP) ao longo do desenvolvimento de zebrafish (*Danio rerio*)**. Porto Alegre. 2023. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

A contaminação do meio ambiente por micro e nanoplásticos está presente em praticamente todos os ambientes, sendo esses uma possível ameaça a diversos organismos da fauna e da flora. Entretanto, dados a respeito da dimensão dessa contaminação no litoral brasileiro, e de sua toxicidade causada a organismos ainda são escassos. Assim, esse trabalho divide-se em três volumes, os quais apresentam: 1) uma revisão da literatura sobre efeitos toxicológicos causados por micro e nanoplásticos; 2) a quantificação da contaminação por microplásticos em uma praia do litoral gaúcho; 3) a geração e avaliação da toxicidade de micro e nanoplásticos em *zebrafish* (*Danio rerio*). Durante a etapa de revisão, 90,9% das publicações de estudos toxicológicos com nanoplásticos utilizaram o PS como plástico a ser exposto aos organismos e a categoria de organismos mais estudados foi Artrópodes (19,5%). As categorias de toxicidade mais estudadas foram Estresse Oxidativo, Sobrevivência/Letalidade e Biomassa e, de maneira geral, os nanoplásticos apresentaram maior presença de efeitos em relação aos microplásticos. Em relação ao estudo da presença de microplásticos na praia, foi possível verificar uma maior concentração de microplásticos em locais próximos ao Rio Mampituba em comparação aos outros pontos. Além disso, os principais tipos de plásticos avaliados por μ Raman foram o polietileno (PE), polipropileno (PP) e poliamida (PA). Durante a etapa de geração e exposição de micro e nanoplásticos em *zebrafish*, verificou-se que a maioria das partículas geradas apresentaram dimensões próximas de 80-90 nm, como indicaram as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG) e de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), e essas aderiram ao córion dos embriões.

Palavras-Chaves: litoral, microplásticos, nanoplásticos, polipropileno, zebrafish.

ABSTRACT

PELEGRINI, Kauê. **Evaluation of the presence of microplastics on the beach of Torres/RS, production and study of the toxicological effects of micro/nanoparticles of polypropylene (PP) during the development of zebrafish (*Danio rerio*)**. Porto Alegre. 2023. PhD Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Contamination of the environment by micro and nanoplastics is present in virtually all environments, which is a possible threat to multiple organisms of fauna and flora. However, data regarding the extent of this contamination on the Brazilian coast, and its toxicity to organisms are still scarce. Thus, this work is divided into three volumes, which present: 1) a review of the literature on toxicological effects caused by micro and nanoplastics; 2) quantification of contamination by microplastics on a beach on the coast of Rio Grande do Sul; 3) the generation and evaluation of the toxicity of micro and nanoplastics in *zebrafish* (*Danio rerio*). During the review step, 90.9% of the publications of toxicological studies with nanoplastics used PS as the plastic to be exposed to organisms and the category of organisms most studied was Arthropods (19.5%). The most tested toxicity categories were Oxidative Stress, Survival/Lethality and Biomass and, in general, nanoplastics showed greater presence of effects compared to microplastics. Regarding the study of the presence of microplastics on the beach, it was possible to verify a higher concentration of microplastics in places close to the Mampituba River compared to other sites. In addition, the main types of plastics evaluated by μ Raman were polyethylene (PE), polypropylene (PP) and polyamide (PA). During the step of generation and exposure of micro and nanoplastics in zebrafish, it was found that most of the generated particles had dimensions close to 80-90 nm, as indicated by Field Emission Scanning Electron Microscopy (FEG-SEM) analyses. and Dynamic Light Scattering (DLS), and these adhered to the embryos' chorion.

Keywords: coastline, microplastics, nanoplastics, polypropylene, zebrafish

1. INTRODUÇÃO

A contaminação do meio ambiente por resíduos sólidos, entre eles os plásticos, é um dos principais problemas ambientais da atualidade. Quando dispostos de forma inadequada, esses resíduos podem ser encaminhados até meios aquáticos, tais como rios e oceanos, afetando, principalmente, os organismos ali presentes. Esses resíduos poliméricos podem ser ingeridos involuntariamente pelos organismos, ou, dependendo dos tamanhos das partículas poliméricas, absorvidos pela derme, podendo causar diversos efeitos, tais como estresse oxidativo, alteração de expressão gênica, citotoxicidade, neurotoxicidade, entre outros efeitos toxicológicos (Cheng *et al.*, 2021; Missawi *et al.*, 2020).

De acordo com a estimativa de Eriksen *et al.* (2014), cerca de 5,25 trilhões de partículas, pesando no total mais de 250.000 toneladas, estejam presentes na superfície dos oceanos. Jambeck *et al.* (2015) estimaram que, no ano de 2010, entre 4,8 e 12,7 milhões de toneladas de resíduos poliméricos atingiram os oceanos. Estima-se que 18% dos resíduos poliméricos encontrados no ambiente marinho sejam oriundos de atividades pesqueiras e sua geração se deve, principalmente, à disposição inadequada de redes de pesca nos oceanos (Andrady, 2011). Entretanto, segundo o mesmo autor, a maior parcela de geração de resíduos nos ambientes marinhos se deve ao transporte de resíduos gerados em terra, incluindo os resíduos gerados nas praias, atingindo os oceanos.

De acordo com o relatório de *Plastics Europe* (2021), o setor com maior demanda na produção de polímeros sintéticos é o de embalagens plásticas, que utiliza principalmente as poliolefinas, como polietileno e polipropileno. Isso se reflete, invariavelmente, na presença desses polímeros nos ambientes aquáticos,

marinhos e costeiros. De acordo com Andrady (2011), os principais tipos de polímeros encontrados nos ambientes marinhos são o polietileno (PE) e o polipropileno (PP) seguido do poliestireno (PS), politereftalato de etileno (PET), policloreto de vinila (PVC) e da poliamida (Andrady, 2011).

Outra parcela significativa de resíduo polimérico presente nos oceanos é referente aos *pellets* de resinas virgem, que atingem os oceanos através de perdas acidentais durante o seu transporte marítimo, ou pelo seu escoamento em indústrias de processamento de polímeros para os corpos hídricos.

Os resíduos poliméricos presentes nos ambientes aquáticos, principalmente fragmentos menores, devido à sua grande área superficial em relação ao seu volume, são suscetíveis à contaminação por vários poluentes aquosos, incluindo metais (Ashton, Holmes e Turner, 2010; Betts, 2008), produtos químicos de desregulação endócrina (Ng e Obbard, 2006) e poluentes orgânicos persistentes (POPs). Esses poluentes são normalmente encontrados em maiores concentrações nas camadas mais superficiais dos oceanos, onde os microplásticos de menores densidades também são mais abundantes (Ng e Obbard, 2006; Rios, Moore e Jones, 2007; Teuten *et al.*, 2009). Os POPs podem ser divididos em dioxinas e furanos, policlorobifenilos (PCBs) e pesticidas, tais como o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). Esses compostos são substâncias químicas lipofílicas estáveis que se aderem e se concentram na superfície hidrofóbica dos plásticos, com concentrações ambientais registradas na ordem de ppb (ng/g) – ppm (µg/g) (Barnes *et al.*, 2009; Teuten *et al.*, 2007, 2009).

Durante a exposição dos resíduos poliméricos aos fatores ambientais, tais como radiação solar, ventos, entre outros, esses podem sofrer processos degradativos, e assim serem reduzidos a partículas poliméricas na escala micro e nanométrica, sendo conhecidas por micro/nanoplásticos. Essas partículas podem ser ainda mais nocivas aos organismos em comparação a fragmentos maiores, visto que essas conseguem atingir regiões inacessíveis para partículas maiores ou mesmo serem consumidas, involuntariamente, por organismos menores.

Nesse cenário, o polipropileno é um dos tipos de polímero mais utilizados no mundo, visto a sua versatilidade nas aplicações, porém é também um dos polímeros mais suscetíveis à degradação por radiação UV. Dessa forma, o polipropileno, exposto ao ambiente, se torna uma ameaça aos organismos, principalmente aquáticos/costeiros, visto que a partir dele podem ser gerados microplásticos que eventualmente atinjam os corpos hídricos, podendo ser absorvidos ou consumidos pelos organismos, causando possíveis efeitos toxicológicos a esses.

A partir desse contexto, esse estudo visa realizar um estudo de revisão sobre diferentes fatores e aspectos da toxicidade causada por micro e nanoplásticos em diferentes organismos; avaliar a presença de microplásticos em uma praia de Torres, município do litoral do Rio Grande do Sul; gerar micro/nanoplásticos de polipropileno a partir de um polímero comercial, utilizando-se uma metodologia que simula fatores ambientais; e avaliar a toxicidade destas partículas em *zebrafish* (*Danio rerio*).

A justificativa e importância desse trabalho se deve ao fato de que não há, atualmente, na literatura um estudo que tenha coletado e compilado informações de forma sistemática sobre dimensões, tipos e fontes de geração de micro e nanoplásticos e seus potenciais efeitos toxicológicos em todos os tipos de organismos com o intuito de apontar lacunas de informações. Além disso, apesar de o Brasil ser um dos países mais geradores de resíduos poliméricos e o país com uma das maiores áreas costeiras do mundo, há pouca informação sobre as quantidades e identificação de microplásticos nessas regiões. Por fim, o polipropileno, apesar de ser um dos polímeros mais utilizados no mundo, e, conseqüentemente, um dos mais presentes dentro da esfera de contaminação plástica, apresenta uma escassez no que diz respeito aos estudos de avaliação dos seus efeitos tóxicos em organismos. Todas essas lacunas de informações tornam esse estudo relevante, e os seus resultados importantes para compreender o contexto atual da poluição polimérica e seus efeitos causados em organismos.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a contaminação por microplásticos na costa brasileira e seus potenciais efeitos toxicológicos em organismos.

2.1. Objetivos Específicos

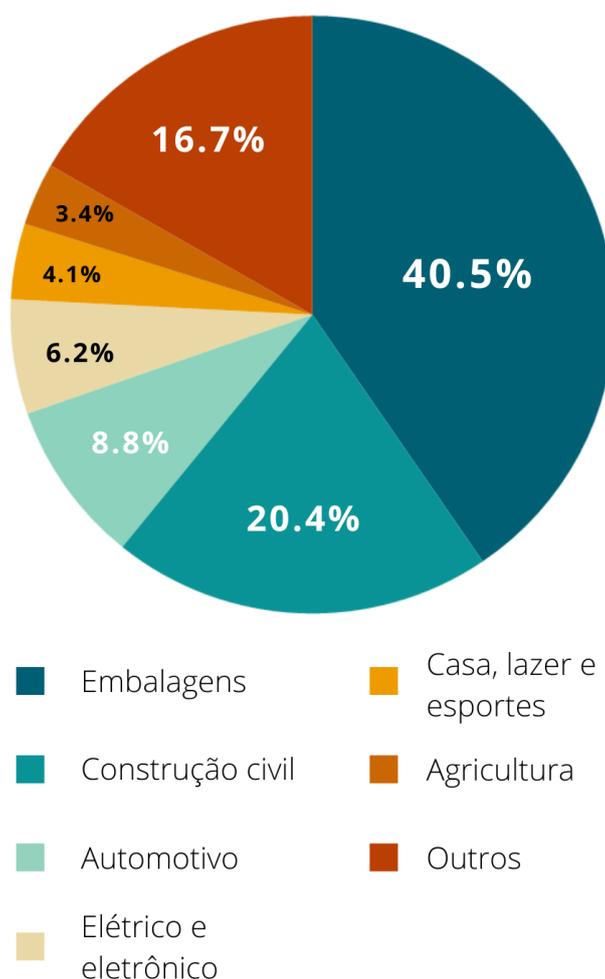
- Desenvolver uma revisão sistemática que engloba fatores como tamanho, tipo, fontes de geração e potenciais efeitos toxicológicos de micro e nanoplásticos em diferentes organismos;
- Coletar, quantificar e identificar os microplásticos presentes na Praia Grande no município de Torres/RS;
- Desenvolver e validar uma metodologia de geração de micro e nanopartículas de polipropileno a partir do plástico comercial, caracterizando-as pelas suas propriedades térmicas, químicas, morfológicas e físicas;
- Avaliar os efeitos toxicológicos em *zebrafish* expostos a micro e nanopartículas de polipropileno em relação à alteração da frequência de batimentos cardíacos, movimento espontâneo, locomoção, taxa de eclosão, sobrevivência e morfologia.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Poluição plástica

Grande parcela dos polímeros são materiais de baixo custo, de fácil processamento, alta resistência, flexíveis e bioinertes, sendo utilizados em praticamente todas as aplicações do cotidiano, desde utilidades domésticas até componentes do ramo automotivo (Lebreton, Egger e Slat, 2019; Urban-Malinga *et al.*, 2020). A partir de suas excelentes propriedades e, conseqüentemente, da sua vasta lista de aplicações, os polímeros sintéticos passaram a se tornar materiais essenciais na nossa vida. De acordo com o relatório anual da *Plastics Europe* (2021), foram produzidas cerca de 367 milhões de toneladas de polímeros no ano de 2020. Devido às suas características, estima-se que essa demanda aumentará ainda mais, chegando a dobrar a sua produção em até 20 anos (Lebreton, Egger e Slat, 2019). O setor em que há a maior demanda na produção de polímeros é o setor de embalagens, que gera anualmente 146 milhões de toneladas, sendo esse valor referente a 40,5% da produção total de polímeros sintéticos, seguido de outros setores tais como os ramos de construção civil, setor automotivo, entre outros apontados na Figura 1.

Figura 1: Principais setores na demanda da produção de polímeros

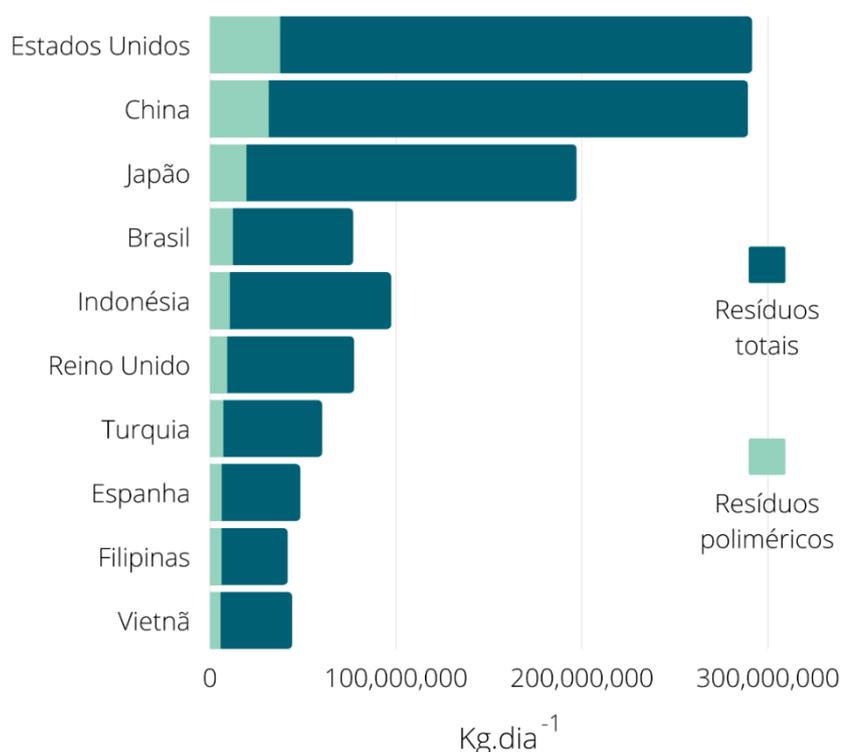


Fonte: Adaptado de Plastics Europe (2021)

Entretanto, devido ao aumento na demanda por polímeros sintéticos, há, conseqüentemente, um aumento progressivo na geração de resíduos poliméricos. A geração de resíduos poliméricos mundial era de 120 milhões de toneladas no ano de 1990, entretanto, no ano de 2015, essa geração atingiu o valor estimado de 381 milhões de toneladas, ocorrendo um aumento de 217,5% (Ritchie e Roser, 2018). De acordo com as estimativas do estudo de Jambeck *et al.* (2015), os Estados Unidos é o país que mais gera resíduos

poliméricos, seguido da China e do Japão. O Brasil ocupa o quarto lugar dessa lista, apesar de apresentar valor estimados menores do que Indonésia e Reino Unido para resíduos totais, ou seja, considerando todos os tipos de resíduos e não somente os poliméricos. A Figura 2 apresenta os dados da geração diária de resíduos totais e poliméricos pelos dez países mais geradores do mundo conforme o estudo de Jambeck *et al.* (2015).

Figura 2: Geração diária de resíduos totais e poliméricos pelos dez países mais geradores do mundo



Fonte: Adaptado de Jambeck *et al.*, 2015

Devido ao descarte indevido, às deficiências na gestão desses resíduos, à inércia da degradação dos polímeros, entre outros fatores, esses podem permanecer no meio ambiente por muito tempo, podendo levar de 20 a 450

anos para serem completamente degradados (Urban-Malinga *et al.*, 2020; Zaman e Newman, 2021).

Uma das soluções propostas para se conter a poluição polimérica é a utilização de polímeros biodegradáveis (Filiciotto e Rothenberg, 2021; Rahman e Bhoi, 2021). Os polímeros biodegradáveis fazem parte de um grupo maior, que são os bioplásticos. Segundo a *European Bioplastics* (2016), são chamados de bioplásticos os polímeros com características de biodegradação e/ou de base biológica. Os bioplásticos se degradam quase por completo em 180 dias em composteiras (Anderson e Shenkar, 2021; European Bioplastics, 2016). Entretanto, em outros ambientes, tais como o ambiente marinho, os bioplásticos podem desempenhar papel semelhante aos polímeros derivados do petróleo quando expostos em ambientes marinhos (Anderson e Shenkar, 2021).

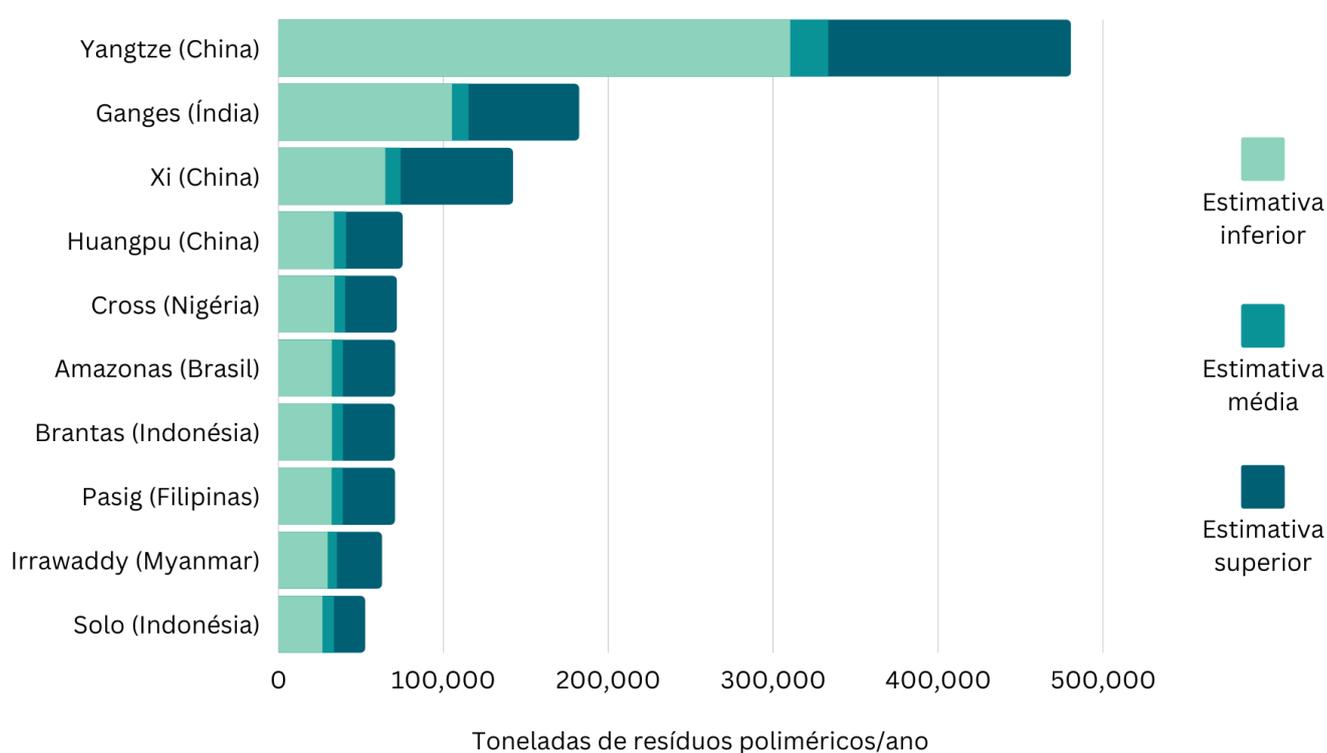
3.2. Poluição de resíduos plásticos no ambiente costeiro e marinho

Um dos principais destinos dos resíduos poliméricos são os oceanos. De acordo com Egger *et al.* (2020), a quantidade de resíduos poliméricos que atingem os oceanos anualmente é de alguns milhões de toneladas. Andrady, (2011) e Halle *et al.* (2017) apontam que a maior parcela de geração de resíduos nos ambientes marinhos se deve ao transporte de resíduos gerados em terra. Nessa linha, Meijer *et al.* (2021) comenta que essa fonte de geração se deve principalmente à emissão direta desses resíduos em áreas costeiras ou por meio de transporte pelos rios. Esse segundo evento ocorre porque, quando esses são descartados de maneira inadequada, os resíduos poliméricos podem ser carregados por ventos e chuvas aos corpos hídricos, atingindo eventualmente os oceanos (Meijer *et al.*, 2021).

De acordo com Lebreton *et al.* (2017), cerca de 1,15 a 2,41 milhões de toneladas de resíduos poliméricos atingem os oceanos a partir de rios, anualmente. Os dados dos principais rios que contribuem para o transporte de

resíduos poliméricos até os oceanos e suas respectivas quantidades foram estudados por Lebreton *et al.* (2017) e estão apresentados na Figura 3.

Figura 3: Principais rios que contribuem para o transporte de resíduos poliméricos até os oceanos e suas respectivas quantidades



Fonte: Adaptado de Lebreton *et al.* (2017)

Também já foi documentado que uma parcela significativa dos resíduos poliméricos pode atingir os oceanos por meio de eventos extremos, tais como tempestades, inundações, ciclones e tsunamis (Eriksen, Thiel e Lebreton, 2016). Outra parcela significativa de resíduo polimérico presente nos oceanos é referente aos *pellets* de resinas virgem, que atingem os oceanos através de perdas acidentais durante o seu transporte marítimo, ou pelo seu escoamento em indústrias de processamento de polímeros para os corpos hídricos (Andrady, 2011).

A quantidade e massa de partículas poliméricas na superfície dos oceanos é muito difícil de serem mensuradas e são calculadas a partir de estimativas em modelos matemáticos. De acordo com o estudo de Eriksen, Thiel e Lebreton (2016), estima-se que na superfície dos oceanos estejam presentes, no mínimo, 5,25 trilhões de partículas poliméricas, pesando, no total, 268.940 toneladas. Entretanto, o estudo de Seville *et al.* (2015) estima que a quantidade de partículas na superfície é maior, de 15-51 trilhões, porém a quantidade em massa seria menor, de 93 a 236 mil toneladas. Segundo Stanton *et al.* (2021), a quantificação referente à estimativa quantitativa de plásticos nos oceanos é um desafio e, de acordo com os autores, esse impasse de valores reais do plástico em mar aberto pode estar relacionado com a dificuldade e as diferentes formas de como essa quantificação é realizada. Lebreton, Egger e Slat (2019) relataram a descrição de ao menos três possíveis combinações para explicar tais variações. A primeira hipótese é que a quantidade de plástico que entra nos oceanos pode ser superestimada, as avaliações dos insumos são baseadas em dados estatísticos em escala nacional sobre a geração de resíduos municipais, nos quais apenas uma pequena fração chega aos oceanos. A segunda hipótese é que a massa plástica total flutuante encontrada na superfície dos oceanos, também pode estar superestimada. Geralmente as concentrações de plástico flutuante são monitoradas por meio de redes de Neuston e os dados adquiridos são acoplados aos modelos de dispersão global para então avaliar a massa total dos resíduos plásticos encontrados na superfície dos oceanos. E a terceira hipótese é que os plásticos flutuantes encontrados na superfície do mar podem sofrer incrustações e, conseqüentemente, perder a sua flutuabilidade. Com o aumento da densidade os resíduos plásticos flutuantes são então transportados para as profundezas marinhas.

Ao atingirem os oceanos, os polímeros podem ser encaminhados para zonas de acúmulo de resíduos poliméricos presentes nos giros subtropicais dos oceanos. Essas zonas de acúmulo são causadas por movimentações de água superficiais causadas pelo vento, a partir do modelo de transporte de

Ekman, resultando em campos rotacionais que encaminham os resíduos flutuantes para seu centro (Sebille, England e Froyland, 2012). A maior zona de acúmulo de resíduos poliméricos nos oceanos é conhecida por “The Great Pacific Garbage Patch (GPGP)” e essa é localizada entre a Califórnia e o Havaí. De acordo com (Lebreton *et al.*, 2018), a área estimada da GPGP tem 1,6 milhões km², que é três vezes o tamanho da França. Além disso, segundo os mesmos autores, levando em consideração somente a parte mais densa de resíduos, ou seja, o seu centro, a GPGP apresenta uma massa de 80.000 toneladas de resíduos poliméricos.

É importante destacar que, de acordo com as projeções do estudo de (Lebreton, Egger e Slat, 2019), se as entradas de resíduos poliméricos nos oceanos fossem zeradas a partir de 2020, ocorreria uma redução progressiva da quantidade de macroplásticos nesses ambientes. Porém nesse mesmo cenário, em se tratando de microplásticos, o seu crescimento, apesar de desacelerado, ainda ocorre, pelo menos até 2050, principalmente devido a sua geração a partir dos macroplásticos já existentes no meio ambiente.

3.3. Micro e nanoplásticos

Micro e nanoplásticos são partículas poliméricas, sendo a sua principal diferença a escala em que suas dimensões se encontram. Entretanto, tanto os microplásticos quanto os nanoplásticos apresentam divergências na definição das dimensões das partículas que as definem pela comunidade científica. Microplásticos, por exemplo, apresentam suas dimensões definidas entre 1 µm e 5 mm por alguns autores (Hamra e Patria, 2019; Wang *et al.*, 2021), e < 5 mm por outros autores (He *et al.*, 2019; Rillig e Lehmann, 2020). No caso de nanoplásticos, alguns autores apontam que a definição de nanoplásticos deve ser baseada na definição de nanomateriais, ou seja, com pelo menos uma de suas dimensões dentro da faixa de 1-100 nm (Briffa e Neira, 2021). Entretanto, alguns autores consideram toda a faixa de nanômetros, ou seja, de 1-1000 nm

(Costa, *et al.*, 2016; Gigault, Baudrimont e Pascal, 2018; Schwaferts *et al.*, 2019a). Tanto micro quanto nanoplásticos vêm sendo estudados nos últimos anos, principalmente, em função da preocupação de que esses podem afetar negativamente organismos e microrganismos que os ingerem ou os absorvem de alguma maneira.

Microplásticos foram encontrados nos oceanos e dentro de organismos em diversos estudos (Fang *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2019; Suaria *et al.*, 2020; Zhang, X. *et al.*, 2021). De acordo com Andrady (2011), a origem desses microplásticos pode ocorrer a partir de duas gerações distintas: a) geração primária: pela introdução direta a partir de um processo de lixiviação e b) geração secundária: pela fragmentação de partículas maiores, tais como mesopartículas (partículas do tamanho de *pellets*) e macropartículas (partículas até 10-15 cm) de resíduos poliméricos devido à degradação sofrida pelo ambiente.

3.3.1. Geração primária

Em relação à geração primária, Fendall e Sewell (2009) apontam a ocorrência do processo de lixiviação de micro e nanopartículas presentes, tipicamente, em produtos cosméticos, e Andrady (2011) aponta a ocorrência desse processo em lixas e abrasivos industriais. Os microplásticos usados em esfoliantes de limpeza de mãos e esfoliantes faciais, substituíram ingredientes naturais usados tradicionalmente, incluindo amêndoas moídas, farinha de aveia e pedra-pomes (Derraik, 2002; Fendall e Sewell, 2009). Tipicamente comercializados e conhecidos como “microesferas” ou “microesfoliadores”, estes microplásticos variam em forma, tamanho e composição, dependendo do produto (Fendall e Sewell, 2009). De acordo com Anagnosti *et al.* (2021), mais de 90% das microesferas em cosméticos apresentam uma composição de polietileno (PE), mas já foram observados outros tipos de polímeros também, como o polipropileno (PP), polimetilmetacrilato (PMMA), poliestireno (PS) e também o politereftalato de etileno (PET). O mesmo estudo apontou também a

existência de nanopartículas poliméricas em esfoliantes, mesmo que essas não cumpram a função de esfoliação devido ao seu tamanho reduzido. Segundo os autores, a presença dessas nanopartículas nesses produtos não é intencional e podem ter sido geradas a partir da degradação das micropartículas durante a sua preparação.

Um estudo conduzido por Rodríguez-Hernández *et al.* (2020) apresenta a possível geração de resíduos de nanoplásticos fazendo-se uso de impressoras 3D. De acordo com os autores, isso ocorre na etapa de limpeza com álcool no final do procedimento de utilização deste equipamento, originando pequenas partículas de polímero. Segundo os autores, partículas de tamanho nanométrico podem ser geradas quando o resíduo é exposto à luz solar após sua dissolução em álcool.

O estudo de Shruti, Pérez-Guevara e Kutralam-Muniasamy (2020) aponta a presença de microplásticos em bebedouros públicos na Cidade do México. Microplásticos foram detectados em todas as amostras analisadas e suas dimensões mais comuns variaram entre 0,1 e 1 mm. Segundo os autores, é possível que uma das contribuições para a presença desses microplásticos nessas águas esteja relacionada ao descarte de efluentes contaminados por essas partículas.

3.3.2. Geração secundária

Em relação à geração secundária de micro e nanoplásticos, ela ocorre a partir da fragmentação de partículas maiores de plásticos, fibras e espumas. (Chang *et al.*, 2020; Rios Mendoza, Karapanagioti e Álvarez, 2018). Andrady (2011) aponta que essa geração ocorre principalmente a partir do intemperismo sofrido por mesoplásticos e fragmentos maiores de resíduos poliméricos presentes nos ambientes costeiros. Ryan *et al.* (2009) e Thompson (2004) apontam que essa fragmentação pode ocorrer tanto no mar, como em terra. A combinação de processos químicos, físicos e biológicos ao longo do tempo

reduz a integridade estrutural de resíduos poliméricos resultando na sua fragmentação (Browne, Galloway e Thompson, 2007).

Segundo Jeong e Choi (2019), resíduos poliméricos podem se degradar gerando micropartículas poliméricas no ambiente marinho a partir de exposição à radiação UV e abrasão mecânica. Após períodos longos, a exposição à radiação UV pode resultar na fotodegradação de polímeros, visto que a radiação solar combinada com a presença de oxigênio pode causar oxidação na matriz polimérica, acarretando na cisão das cadeias do polímero (Andrady, 2011; Barnes *et al.*, 2009; Browne, Galloway e Thompson, 2007; Moore, 2008; Rios, Moore e Jones, 2007). Essa degradação oxidativa nos polímeros pode gerar em sua superfície uma camada frágil, quebradiça com desenvolvimento de fissuras.

As micropartículas poliméricas (microplásticos) podem ser derivados dessas superfícies frágeis degradadas, visto que essas superfícies são suscetíveis a fraturas por estresse induzido pela umidade, diferenças de temperatura e abrasão por grãos de areia nas praias (Andrady, 2011). A geração dessas microfissuras na superfície foi observada, principalmente, no polietileno de alta densidade (PEAD) (Chaochanchaikul *et al.*, 2012; Umar, Zainudin e Sapuan, 2012), polietileno de baixa densidade (PEBD) (Küpper *et al.*, 2004; Ranjan e Goel, 2019; Tavares *et al.*, 2003), e polipropileno (PP) (Badji *et al.*, 2017; Nakatani, Kyan e Muraoka, 2020; Yakimets, Lai e Guigon, 2004) que são os polímeros com maior demanda mundial, de acordo com *Plastics Europe* (2021).

Consistentemente com essas informações, também foram observadas microfissuras em detritos mesoplásticos coletados em praias no Havaí. (Cooper e Corcoran, 2010). Além disso, Andrady (2011) aponta que uma amostra de corda de polipropileno que havia permanecido em um píer por vários anos, ao enxaguada com água destilada, lixiviava grandes quantidades de microplásticos.

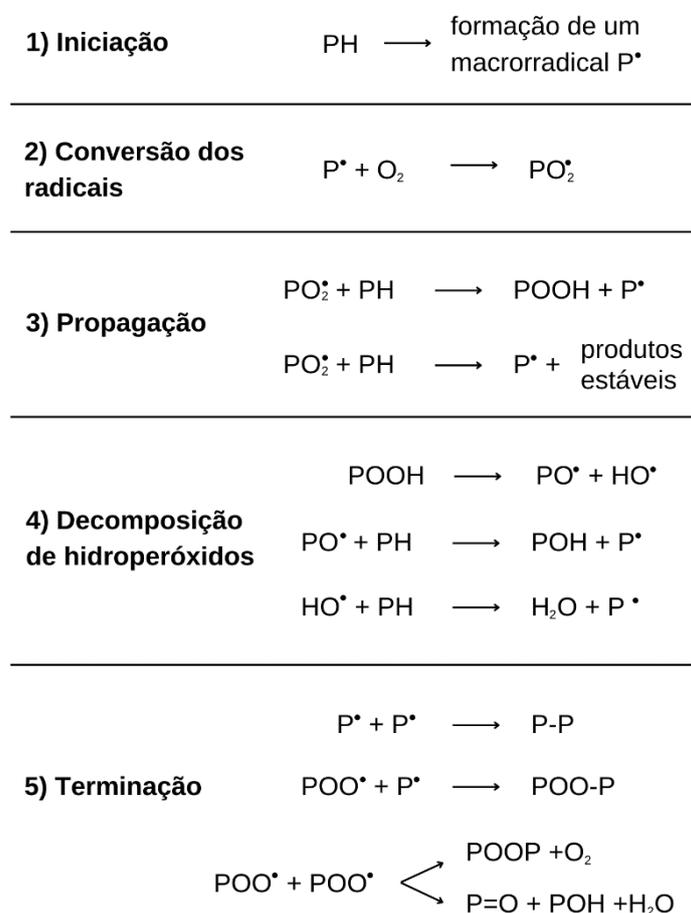
Entretanto, o intemperismo, e, conseqüentemente, a degradação sofrida pelos resíduos poliméricos é diferente se estes estiverem presentes na areia da praia, na superfície ou no fundo das águas. De acordo com Andrady (2011), devido ao baixo valor do calor específico da areia (664 J/kg.°C), os resíduos poliméricos presentes na areia podem chegar a temperaturas mais elevadas do que nas águas marinhas (3850 J/kg.°C), chegando a 40 °C ou mais, dependendo da cor do pigmento do polímero. Esse fenômeno auxilia a aceleração da degradação foto-oxidativa e, conseqüentemente, na geração de microfragmentos a partir de fragmentos maiores. As condições de temperaturas mais baixas, e menor disponibilidade de oxigênio no ambiente marinho, tornam o processo de foto-oxidação causado pelo ambiente marinho mais brando. Entretanto, nas praias os fragmentos poliméricos possuem uma maior disponibilidade de oxigênio e exposição direta à radiação UV, fazendo com que sua fotodegradação nesse ambiente seja potencializada, causando fragilização, fissuras e amarelecimento nas amostras poliméricas (Andrady, 2011; Barnes *et al.*, 2009; Moore, 2008).

A partir da perda de integridade estrutural, os polímeros se tornam ainda mais suscetíveis à fragmentação por abrasão, ações das ondas e turbulências (Barnes, *et al.*, 2009; Browne, Galloway e Thompson, 2007). Esse processo é constante, fazendo com que os fragmentos poliméricos se tornem cada vez menores, atingindo à escala micro (Fendall e Sewell, 2009; Rios, Moore e Jones, 2007; Ryan *et al.*, 2009). Além disso, no ano de 2016, Gigault *et al.* (2016), apresentou o primeiro estudo comprovando a presença de nanopartículas poliméricas na água, geradas a partir da degradação foto-oxidativa.

3.3.2.1. Degradação e geração de microplásticos de polipropileno

Um dos principais tipos de degradação do polipropileno é a fotodegradação, ou foto-oxidação. Isso porque essa ocorre durante a

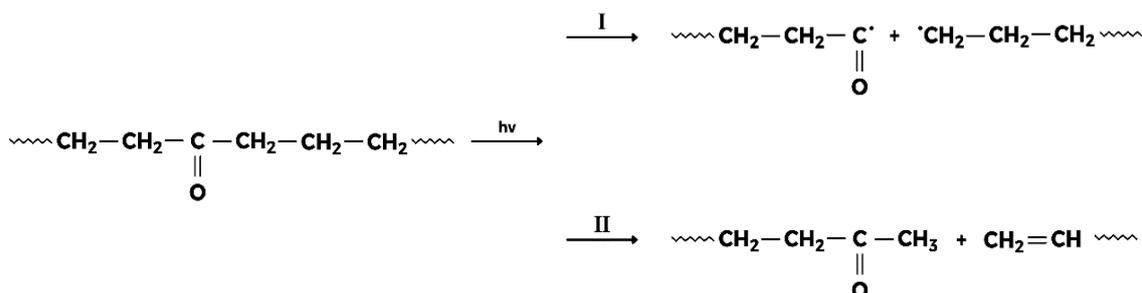
exposição do material à radiação ultravioleta, em um ambiente com a presença de oxigênio. O processo de fotodegradação é um processo considerado autocatalítico, apresentando três etapas: iniciação, propagação e terminação (De Paoli, 2008). A etapa de iniciação do processo de fotodegradação ocorre a partir de falhas nas cadeias poliméricas ou possíveis contaminações geradas a partir do processo de polimerização do polímero. Nessa etapa, as cadeias poliméricas do PP reagem com o oxigênio presente no ambiente, e essa reação acarreta, no primeiro momento, na geração de radicais livres. Esses radicais se combinam com as moléculas de oxigênio no ambiente, gerando novos radicais livres altamente reativos, as peroxilas. Os radicais peroxilas podem ser formados tanto no meio quanto nas extremidades das cadeias, e esses reagem com outras moléculas na cadeia polimérica, abstraindo átomos de hidrogênio, formando hidroperóxidos e novos macroradicais alquila. Os hidroperóxidos, por sua vez, podem se decompor, gerando novos radicais livres altamente reativos, as alcoxilas e hidroxilas. O radical alcoxila pode reagir com outra molécula da cadeia do polímero, formando um novo radical alquila e um grupo álcool, enquanto o radical hidroxila também pode reagir com uma molécula da cadeia polimérica, gerando um radical alquila e água (De Paoli, 2008). A terminação desse ciclo, chamado de auto-oxidação, ocorre, principalmente, quando dois radicais se recombinam. As etapas do processo de fotodegradação de poliolefinas estão apresentadas na Figura 4.

Figura 4: Etapas do processo de fotodegradação de poliolefinas

Fonte: Adaptado de Agnelli e Chinelatto (1992)

Durante o processo de fotodegradação, originam-se principalmente grupos contendo a ligação dupla $\text{C}=\text{O}$, conhecida como carbonila (Grause *et al.*, 2020). Ao longo da exposição aos raios ultravioletas, essas carbonilas podem sofrer reações de Norrish do tipo I e II, apresentadas na Figura 5, que podem acarretar no processo de cisão de cadeia do polipropileno (De Paoli, 2008). A cisão de cadeia é favorecida no caso do polipropileno, por esse apresentar carbonos terciários a cada unidade repetitiva de sua estrutura, visto que esses apresentam ligações C-H com energias de ligação mais baixa do que nos átomos de carbono secundários. Esse processo de cisão de cadeia acarreta, principalmente, uma redução na massa molar do polímero.

Figura 5: Reações de Norrish do tipo I e II



Essa redução da massa molar do polipropileno, decorrente principalmente de sua exposição à radiação UV, propicia a formação de micropartículas. De acordo com o estudo de Song *et al.* (2017), o polipropileno torna-se suscetível à geração de micropartículas quando exposto preliminarmente à radiação UV e em seguida à abrasão mecânica. Huber *et al.* (2022) avaliaram a formação de microplásticos a partir da exposição de filmes de polipropileno à radiação UV e constatou que, dependendo da intensidade da radiação solar e temperatura, essas partículas podem começar a ser geradas em um período entre 9 e 38,4 meses.

3.3.3. Coleta e identificação de microplásticos em ambientes costeiros

Grande parte das pesquisas que envolvem avaliar a poluição por microplásticos é realizada a partir da coleta e identificação desses em ambientes costeiros porque são, em geral, os seus principais destinos. Para isso, é necessário, primeiramente, fazer a escolha dos locais de amostragem. De acordo com Besley *et al.* (2017), em seu artigo de revisão, o principal local de coleta de microplásticos na costa das praias são as linhas de maré alta, as quais se encontram na intersecção do terreno com a superfície da água na altura máxima atingida por uma maré crescente, normalmente apresentando algas e outros materiais orgânicos em sua extensão. Outro local também onde

são coletados microplásticos em estudos é a zona entre-marés, que é uma zona exposta ao ar durante a maré baixa e submersa durante a maré alta (Besley *et al.*, 2017).

Após a ação de coleta, é necessária a realização da extração dos microplásticos, e essa ocorre principalmente de duas formas distintas: por peneiramento ou por flotação, separando-se os sedimentos das partículas poliméricas pelas suas diferenças de densidade (Besley *et al.*, 2017). Esse segundo processo é o mais comum e envolve a utilização de soluções para efetuar a separação. Essas soluções podem ser soluções salinas saturadas. O método mais utilizado é o de separação por densidades utilizando-se, normalmente, soluções saturadas de cloreto de sódio ($1,2 \text{ g/cm}^3$), devido ao seu baixo custo, é uma solução ambientalmente segura e prontamente disponível (Jung *et al.*, 2021). Entretanto, segundo os mesmos autores, outras soluções com sais tais como politungstato ($1,4 \text{ g/cm}^3$), iodeto de sódio ($1,6\text{-}1,8 \text{ g/cm}^3$) e cloreto de zinco ($1,5\text{-}1,7 \text{ g/cm}^3$) também podem ser utilizadas.

Após a separação por densidade, os microplásticos são coletados no sobrenadante das soluções e realiza-se um processo de filtração. Devido aos ambientes de coleta, é comum a existência de material orgânico aderido aos microplásticos, ou presente no sobrenadante das soluções, sendo capturados também no processo de filtração (Al-azzawi *et al.*, 2020). Dessa forma, os autores sugerem a remoção desse material orgânico. Para isso, existem diversos métodos que podem ser utilizados: digestão oxidativa utilizando-se peróxido de hidrogênio, reação de Fenton, tratamentos alcalinos ou ácidos, entre outros. De acordo com Al-azzawi *et al.* (2020), a reação de Fenton é uma alternativa viável porque é eficiente na remoção do material orgânico, necessitando-se menos tempo de reação em relação ao uso exclusivo do peróxido de hidrogênio, e causa impactos mínimos aos microplásticos, diferentemente dos tratamentos alcalinos e ácidos.

A partir dessa etapa, apesar de ainda existirem pequenas partículas de areia e/ou sal na amostra, é possível identificar alguns microplásticos em um

estereoscópio binocular. Entretanto, a fim de se quantificar as partículas poliméricas de maneira mais precisa, os estudos mais recentes têm utilizado microscopia de fluorescência (Meyers *et al.*, 2022; Scircle *et al.*, 2020; Shruti *et al.*, 2022), que a partir da qual são evidenciadas as micropartículas, mesmo as que seriam mais difíceis de se enxergar com o estereoscópio binocular. Os diferentes microplásticos fluorescem ou não, dependendo, principalmente, do seu tipo e do comprimento de onda da luz incidida sobre eles (Prata *et al.*, 2019). Entretanto, é possível utilizar um fluoróforo para marcar microplásticos, e assim otimizar a sua quantificação na microscopia de fluorescência, reduzindo subnotificações. O Vermelho de Nilo é um fluoróforo muito utilizado para a detecção de lipídios e proteínas, mas, recentemente, ele tem sido muito utilizado na marcação de polímeros também, visto que ele tem apresentado resultados muito satisfatórios em estudos de quantificação de microplásticos (Shruti *et al.*, 2022).

3.3.4. Toxicidade de micro e nanoplásticos

A toxicidade causada por partículas poliméricas a organismos vivos é uma área que tem sido bastante explorada na pesquisa atualmente por estar diretamente atrelada à descoberta da presença de micro e nanoplásticos em diversos ambientes (Davranche *et al.*, 2020; Materic *et al.*, 2020; Wahl *et al.*, 2021).

Devido a diversos fatores, tais como suas dimensões, micro e nanoplásticos podem ser ingeridos, acidentalmente, por diversos organismos, tais como peixes, mamíferos, répteis, crustáceos, entre outros, causando diversos efeitos toxicológicos (Barnes *et al.*, 2009; Halle, Ter *et al.*, 2017; Mueller *et al.*, 2020). Além disso, esses efeitos podem ser potencializados devido a adesão de componentes, tais como metais pesados e componentes orgânicos de alto peso molecular, a esses polímeros (Teuten *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2020).

A toxicidade de micro e nanoplásticos ocorre tanto em organismos mais simples como em organismos mais complexos. Machado *et al.* (2020) aponta que micro e nanopartículas de PE causaram alterações na viabilidade e morfologia de células de cianobactérias. Li *et al.*, (2020) e Lin *et al.* (2020) em seus estudos verificaram, dentre outros efeitos, a alteração da comunidade microbiana e de suas funções, como por exemplo na taxa de redução de poluentes orgânicos, quando exposta a microplásticos. Gomes, Almeida e Georgantzopoulou (2020) apontaram a ocorrência da alteração de células viáveis, concentração de clorofila, estresse oxidativo, entre outros efeitos quando algas foram expostas a nanopartículas de poliestireno. Zhu *et al.* (2020) também avaliaram a toxicidade de polímeros em algas e apontaram que micropartículas de PVC causaram inibição do crescimento desses organismos. Baeza *et al.* (2020) expuseram vermes a micropartículas de PET, PE, PP e PS e observaram a ocorrência de danos físicos, alteração na mucosa, queimaduras e lesões no corpo, entre outros efeitos. Donovan *et al.* (2020) apontaram a ocorrência de danos ao DNA, alteração em atividades antioxidantes, neurotoxicidade, estresse oxidativo, entre outros efeitos em moluscos quando expostos a micropartículas de PE. Xu *et al.* (2020) expuseram uma espécie de artrópode a nanopartículas de PS e verificaram que essas causaram mortalidade, bem como alteração na quantidade de recém-nascidos, alteração no tamanho do corpo e na frequência cardíaca. No estudo de Shi *et al.* (2020) e no estudo de Guimarães *et al.* (2021), peixes expostos a micropartículas de PS apresentaram alterações no metabolismo bem como a ocorrência de neurotoxicidade. De acordo com Araújo *et al.* (2020), micropartículas de PE apresentaram alterações na locomoção e na resposta anti-predador de rãs. Tan *et al.* (2020) verificaram a redução de viabilidade e danos na membrana celular e dano lisossomal em ratos quanto expostos à nanoplásticos de PS. Por fim, em humanos, Wang *et al.* (2020) apontaram que a exposição de células humanas a micropartículas de PS podem sofrer reduções da viabilidade celular, estresse oxidativo e despolarização da membrana celular.

Com o intuito de compreender os principais efeitos toxicológicos causados por micro e nanoplásticos a diferentes organismos, bem como avaliar a situação de contaminação plástica na costa do país, esse trabalho foi dividido em três volumes. O primeiro volume apresenta a realização de um estudo de revisão bibliográfica sistemática qualitativa avaliando-se os fatores envolvidos, tais como tamanho, tipo e fonte de geração das partículas expostas, classes de organismos teste bem como os efeitos toxicológicos causados a esses. O segundo volume apresenta a avaliação da contaminação por microplásticos de uma praia do litoral do Rio Grande do Sul. Por fim, o terceiro volume apresenta o desenvolvimento de uma metodologia para geração de micro e nanoplásticos de polipropileno (PP) a partir de um material comercial bem como a avaliação da sua toxicidade quando em contato com embriões de *zebrafish*.

3.4. Zebrafish (*Danio rerio*)

O *zebrafish* (*Danio rerio*) é um peixe de água doce, com diversas homologias em relação a outras espécies de vertebrados em termos de genoma, padrões cerebrais e estrutura e função dos sistemas neurais e fisiológicos (Chen et al., 2017). Esses organismos têm tempos de geração curtos de aproximadamente 3 a 5 meses e se desenvolvem rapidamente, sendo que um embrião de um dia de vida já apresenta todos os tecidos e muitos precursores de órgãos formados, como por exemplo, coração pulsante, sangue circulante, sistema nervoso, olhos e ouvidos (Sumanas et. al, 2004).

Spitsbergen & Kent (2003) apontam que outras vantagens de se utilizar o *zebrafish* como organismo modelo são os baixos custos de criação e a fertilização e desenvolvimento externos, facilitando o acesso para observação e manipulação de embriões em desenvolvimento. Isso porque as larvas não necessitam de alimentação nos primeiros sete dias visto que essas obtém os nutrientes necessários a partir do saco vitelino, tornando possível uma abordagem mais econômica para estudar os efeitos potencialmente tóxicos de

contaminantes ambientais durante o seu desenvolvimento inicial (Bhagat et al., 2020). Além disso, a transparência dos embriões e larvas oferece uma enorme vantagem para visualização e avaliação da sua interação com MPs/NPs com marcação fluorescente (Bhagat et al., 2020).

VOLUME I:

ESTUDO DE REVISÃO SOBRE TAMANHO, TIPO, FONTE DE GERAÇÃO E
DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE MICRO E NANOPLÁSTICOS EM
DIFERENTES ORGANISMOS

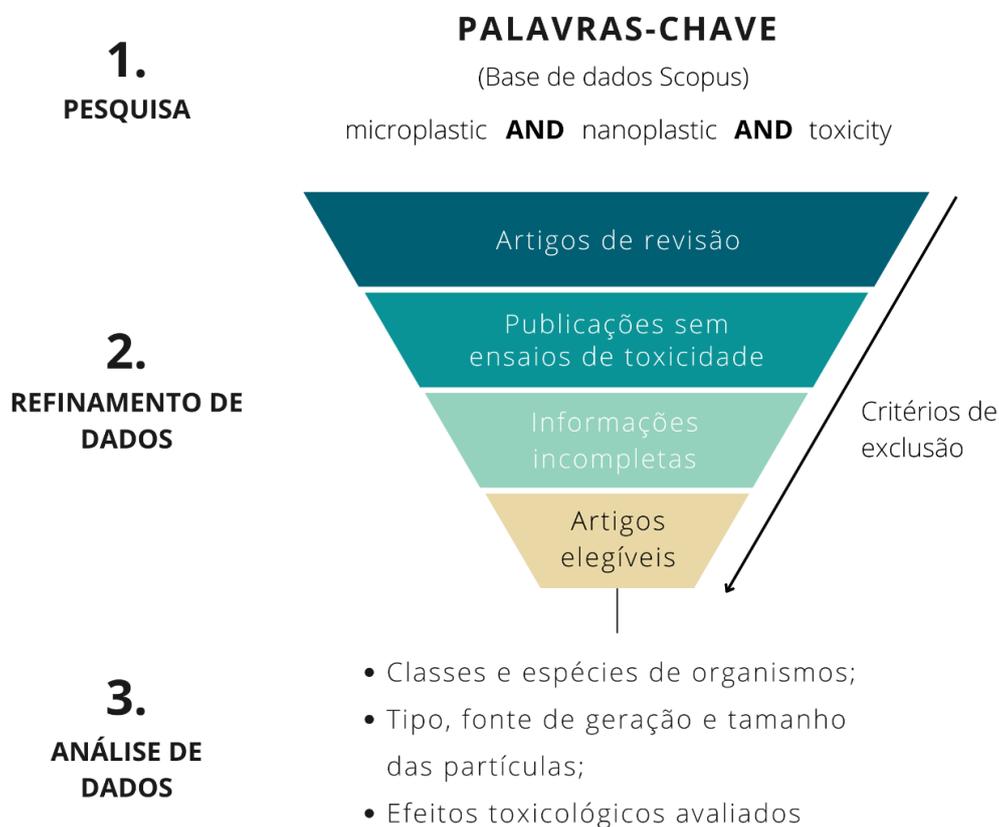
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO VOLUME I

- Desenvolver um estudo de revisão compilando informações a respeito da toxicidade causada a diferentes organismos expostos a micro e nanoplásticos;
- A partir de uma revisão da literatura, avaliar diferentes fatores na toxicidade causada a diferentes organismos, tais como tipo de plástico, fonte de geração e dimensão das partículas utilizadas, bem como as classes e organismos expostos;
- Avaliar os principais efeitos tóxicos e implicações causadas a organismos *zebrafish* (*Danio rerio*) quando expostos a micro e nanoplásticos.

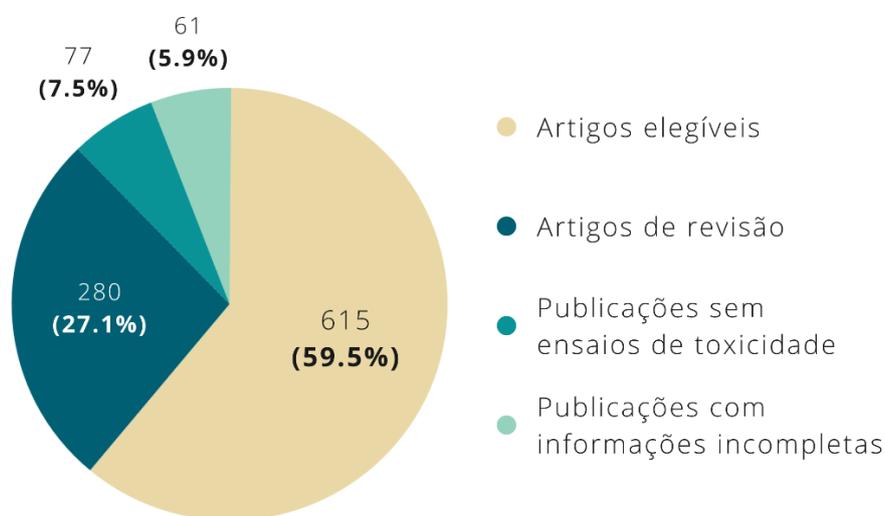
5. METODOLOGIA

Este estudo foi realizado com base nas buscas de artigos científicos na plataforma Scopus utilizando-se as palavras-chave "microplastics" OR "nanoplastics" AND "toxicity" publicados até 31 de dezembro de 2021. A busca retornou um total de 1033 artigos publicados, entretanto, para que as informações presentes nos artigos fossem coletadas de maneira padronizada, essa seleção foi filtrada para refinamento e padronização dos dados sob os seguintes critérios de exclusão: 1) artigos de revisão, por não realizarem testes de exposição; 2) publicações sem ensaios de toxicidade; 3) publicações com informações incompletas, incluindo o tipo de polímero utilizado, tamanho da partícula, fonte de obtenção da partícula ou organismo teste estudado. A Figura 6 apresenta um esquema com a metodologia aplicada para pesquisa, refinamento e análise de dados.

Figura 6: Metodologia aplicada para pesquisa, refinamento e análise de dados do estudo de revisão



A partir da aplicação dos critérios de exclusão foi possível filtrar as publicações, obtendo-se os artigos científicos elegíveis para avaliação. Dentre as 1033 publicações, 280 artigos (27,1%) foram enquadrados como artigos de revisão, 77 (7,5%) não realizaram ensaios de toxicidade e 61 (5,9%) apresentaram informações incompletas, totalizando 615 (59,5%) o número de artigos científicos elegíveis para avaliação (Figura 7).

Figura 7: Resultado do processo de aplicação dos critérios de exclusão dos artigos científicos

Visto que alguns desses estudos utilizaram mais do que um tipo e/ou escala de tamanhos de partículas e/ou organismos expostos, esses foram divididos em vários estudos, contabilizando cada condição de exposição de forma independente como apresenta o exemplo na Tabela 1. Nessa tabela apresenta-se um exemplo de como foram categorizados os parâmetros avaliados nessa etapa de revisão bibliográfica.

Tabela 1: Exemplo de categorização dos parâmetros avaliados na revisão bibliográfica

Nº	Nome artigo	Nome científico	Categoria do organismo	Escala	Tamanho	Tipo do polímero	Concentração	Tempo de exposição	Obtenção das partículas
1	Artigo Exemplo A	<i>Danio rerio</i>	Peixes	Nano	20 e 500nm	PS	3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 mg/L	96h	Comercial
2	Artigo Exemplo B	<i>Lumbricus terrestris</i>	Vermes	Micro	250um	PS	2,5; 5 e 7% w/w	48h	Moagem
3	Artigo Exemplo B	<i>Lumbricus terrestris</i>	Vermes	Micro	250um	PP	2,5; 5 e 7% w/w	48h	Moagem
4	Artigo Exemplo B	<i>Lumbricus terrestris</i>	Vermes	Micro	250um	PE	2,5; 5 e 7% w/w	48h	Moagem
5	Artigo Exemplo B	<i>Lumbricus terrestris</i>	Vermes	Micro	250um	PET	2,5; 5 e 7% w/w	48h	Moagem

A categorização do conjunto de dados foi realizada distribuindo os polímeros por tipo: polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), policloreto de vinila (PVC), polietileno tereftalato (PET) ou 'outros', que incluíam os demais polímeros, como PLA, PA, PHB, PU, entre outros não listados. Para o tamanho das partículas poliméricas, a nanoescala foi considerada entre 0 a 1000 nm (Gigault et al., 2018; Schwaferts et al., 2019) e a microescala entre 1 µm e 5 mm (Al Hamra e Patria, 2019; C. Wang et al., 2021). A fonte de geração das partículas foi diferenciada em 'comercial', sendo o caso de partículas obtidas comercialmente e expostas a organismos sem a necessidade de outros processos de redução de dimensões; 'lab', quando as partículas foram sintetizadas em laboratório, ou amostras comerciais que sofreram processos de transformação, como por exemplo moagem, cortes, abrasão, entre outros; e 'ambiente', situação em que as partículas expostas aos organismos são provenientes de coletas do meio ambiente, como por exemplo rios e mar. Quanto à avaliação da toxicidade, os organismos de teste foram separados pelas seguintes categorias: 'artrópodes', 'peixes', 'algas', 'moluscos', 'microrganismos', 'vermes', 'células humanas', 'mamíferos' e 'outros'. A categoria 'células humanas' foi separada da categoria 'mamíferos' principalmente porque refletia apenas protocolos *in vitro*.

Para avaliar a ampla gama de efeitos tóxicos causados ou não aos diferentes organismos após exposição a micro e nanoplásticos, foi gerada a Tabela 2, onde estão apresentadas as categorias dos efeitos avaliadas e suas respectivas descrições.

Tabela 2: Categorias dos efeitos avaliadas e suas respectivas descrições

Categorias	Descrição
Abiótico	alteração de parâmetros físicos do meio como pH e carbono dissolvido, tratamento de efluentes, produção de antibióticos, entre outros
Absorção/Bioacumulação	absorção, internalização, ingestão, acúmulo e distribuição nos tecidos e absorção de partículas
Comportamento	alterações comportamentais, locomoção, movimentos espontâneos, entre outros
Biomassa	massa corporal, peso, taxa de crescimento, curva de crescimento
Citotoxicidade/Morte celular	apoptose, autofagia, necrose celular, citotoxicidade
Desenvolvimento	alteração de fatores de desenvolvimento do organismo, como eclosão, batimento cardíaco, muda, entre outros
Alimentação	mudança no consumo de água, alimentos e nutrição
Genotoxicidade	Mecanismos epigenéticos, danos no DNA
Hematologia	lesões e alterações no sistema hematológico, hemogramas bioquímicos
Histopatologia	alterações estruturais em tecidos/organelas, regeneração, calcificação/branqueamento
Inflamação/Imunidade	inflamação tecidual, resposta ou efeito imune/imune, alteração nas defesas imunológicas
Metabolismo	respostas/vias metabólicas, metabólica, alterações mitocondriais, teor de proteínas/carboidratos, lipídios, teor de cálcio

Categorias	Descrição
Microbiota	diversidade, composição e estrutura bacteriana
Morfologia	alterações morfológicas, medidas morfométricas, medidas biométricas, malformações
Neurotoxicidade	neurodegeneração, alterações na AChE ⁽¹⁾
Estresse Oxidativo	defesas antioxidantes, alteração do balanço oxidativo, desequilíbrio redox, ROS ⁽²⁾
Reprodução/ Transgenerational	fertilidade, fecundação, descendência, contagem de esperma, qualidade do esperma, efeitos transgeracionais e múltiplas gerações
Sobrevivência/Letalidade	morte, EC50 ⁽³⁾ , LC50 ⁽⁴⁾
Transcriptoma/Proteoma	perfil de proteína, ontologia genética, sequenciamento de RNA
Xenobiótico	biotransformação de químicos/pesticida, estresse químico, biodisponibilidade de metais

(1) Acetilcolinesterase; (2) Espécies Reativas ao Oxigênio; (3) Concentração Efetiva Mediana; (4) Toxicidade Aguda.

A partir dessas informações foi possível realizar um compilado de resultados com o intuito de compreender os principais efeitos conhecidos causados por micro/nanoplásticos a diferentes organismos, e também quais os *gaps* de informações na literatura.

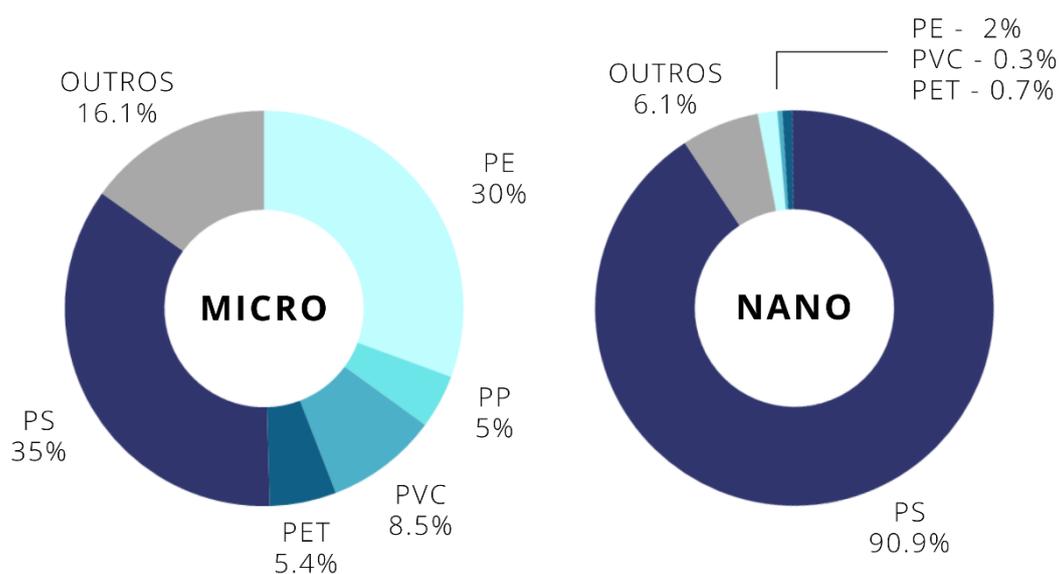
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Tipos de plásticos, dimensões e fontes de geração

Visto que algumas das publicações relataram a exposição de mais de um tipo/tamanho de partícula ou mais de um organismo, o total de 615 publicações resultou em 965 registros independentes de condições de exposição. Desses registros, cerca de 69% utilizaram partículas poliméricas em escala micrométrica durante os ensaios de exposição, enquanto 31% avaliaram a toxicidade de partículas nanométricas.

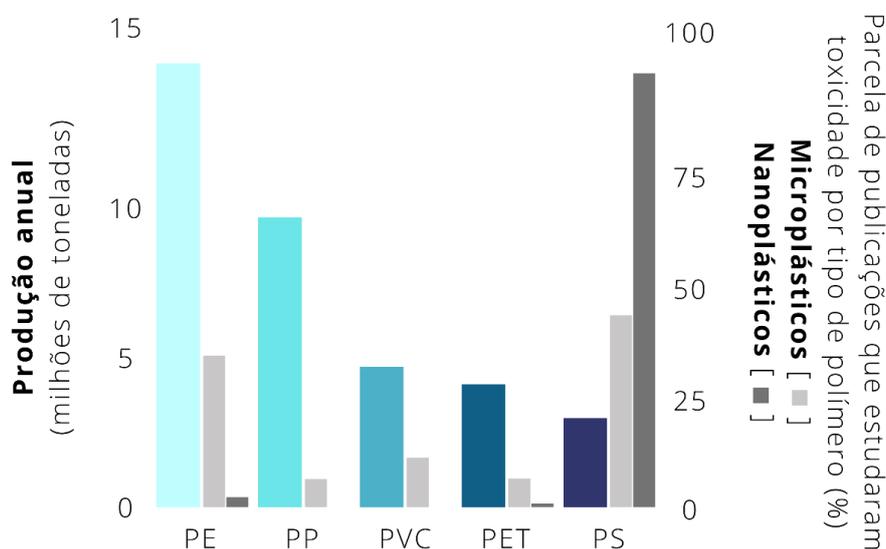
Em relação aos estudos que utilizaram microplásticos, o PS foi o polímero mais estudado, apresentado em 35% dos estudos, seguido de PE (30%), 'Outros' (16,1%), PVC (8,5%), PET (5,4 %) e PP (5%) (Figura 8). Em relação aos estudos com nanoplásticos, o PS foi novamente o principal polímero utilizado nos estudos, estando presente em 90,9% dos estudos avaliados, seguido por 'Outros' (6,1%), PE (12%), PET (0,7%) e PVC (0,3%) (Figura 8). Essa diferença significativa nos tipos de polímeros usados em micro e nanoescala pode estar relacionada principalmente à dificuldade em obter/produzir nanopartículas de certos polímeros versus outros polímeros, por exemplo, PS, que são mais fáceis de produzir em laboratório (Loos et al., 2014; Shen *et al.*, 2019). É notável a redução da porcentagem dos outros polímeros presentes nos estudos com nanopartículas, em relação aos estudos com micropartículas, chegando a ser nula a presença do PP nos estudos de escala nanométrica.

Figura 8: Quantidade relativa de publicações para cada tipo de plástico em escala micro e nanométrica



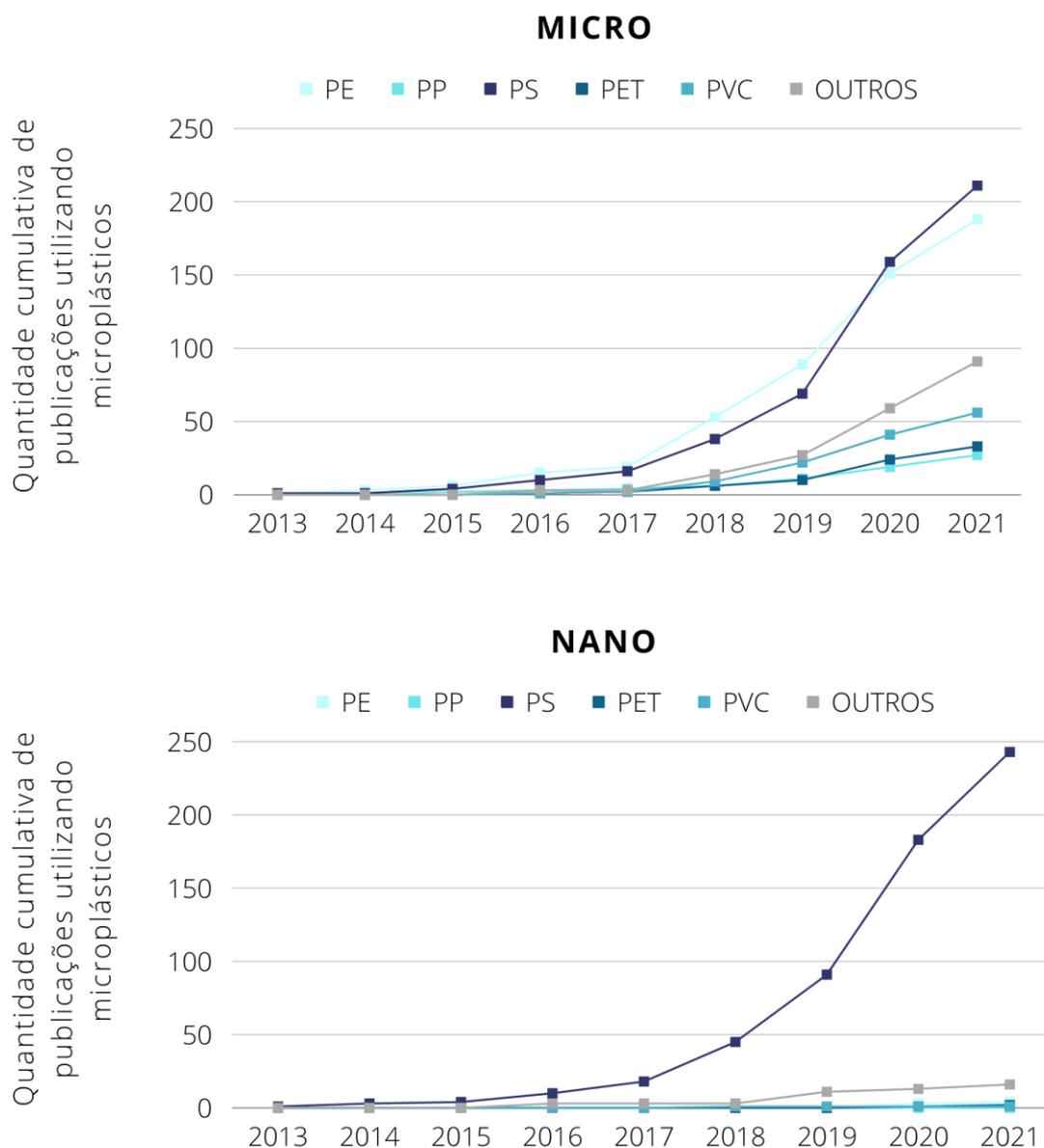
Colocando esses resultados em perspectiva e comparando-os com a produção mundial dos principais tipos de polímeros, como apresenta a Figura 9, foi possível observar que a presença dos polímeros utilizados nos artigos publicados não reflete, necessariamente, a porcentagem da sua produção mundial. Outro ponto a ser destacado é que, apesar do PP ser o segundo polímero mais produzido no mundo, é o que menos está presente nos estudos de toxicidade, em comparação com os outros quatro tipos de polímeros presentes no gráfico.

Figura 9: Relação entre a produção anual dos principais tipos de polímeros e a parcela de artigos que estudaram sua toxicidade



A Figura 10 apresenta a quantidade de publicações com micro e nanoplásticos divididos por tipo de plástico ao longo dos anos. Em relação aos estudos com micropartículas, o PE foi o tipo de polímero mais estudado até 2019, quando o poliestireno o ultrapassou devido a um grande aumento de estudos simultâneos empregando nanopartículas de PS, que muitas vezes também usam partículas micrométricas para fins comparativos. É possível apontar também que estudos com nanoplásticos utilizando-se a categoria 'outros' apresentou um ligeiro crescimento a partir de 2019. Entretanto os outros polímeros ditos mais convencionais, tais como PE, PP, PET e PVC ainda apresentam uma escassez de estudos na escala nanométrica.

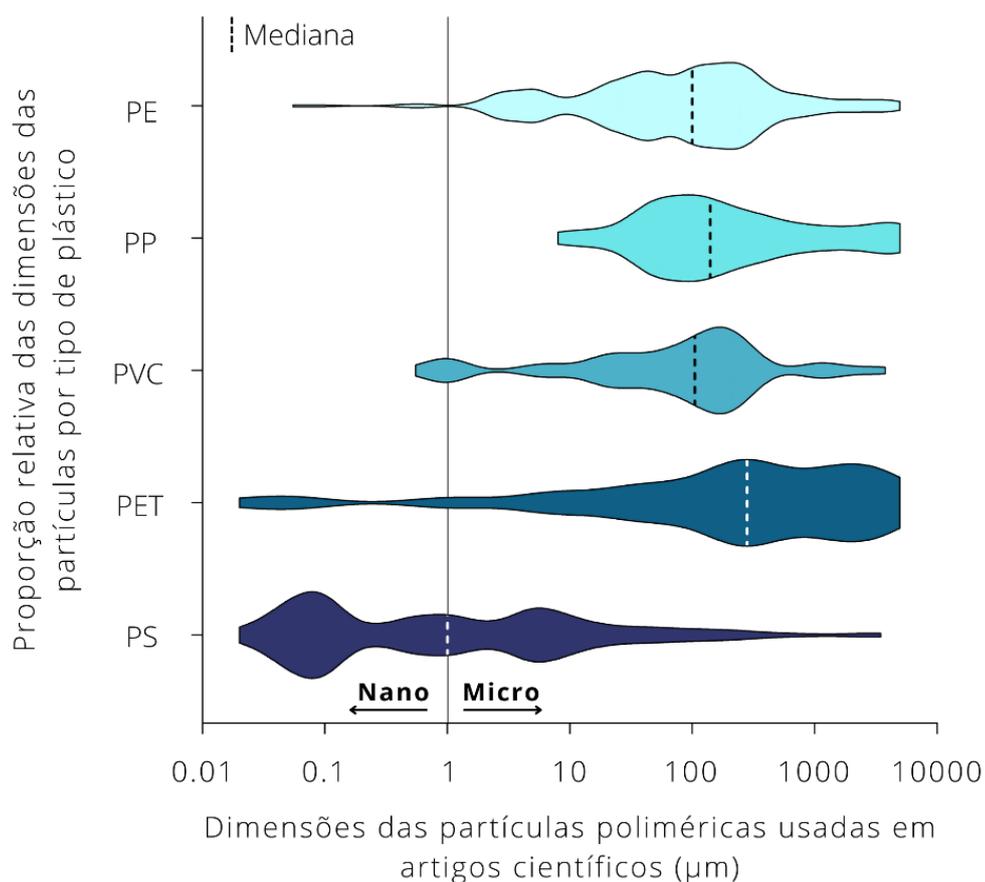
Figura 10: Quantidade absoluta de publicações com micro e nanoplásticos divididos por tipo de plástico ao longo dos anos



Em relação às dimensões das partículas utilizadas para cada tipo de plástico, é possível identificar que o PS é o tipo de plástico que apresentou a menor média em comparação aos outros tipos (Figura 11). A explicação mais provável para esse fato é a de que as partículas de PS são mais facilmente sintetizadas, em uma ampla gama de dimensões, incluindo a escala

nanométrica, e até mesmo com diferentes funcionalizações de superfície (Loos et al., 2014). Embora o PET e o PE tenham apresentado alguma dispersão na escala de tamanho ao longo dos estudos, seus tamanhos médios se aproximam dos outros dois polímeros estudados (PP e PVC), atingindo valores entre 100-300 μm . Também fica evidente que, com exceção do PS, todos os polímeros apresentam deficiência em estudos com partículas abaixo de 1 μm , e especificamente para PP, abaixo de 10 μm . Além disso, PE, PS e PVC têm menos publicações sobre partículas maiores, como acima de 1 mm (Figura 11).

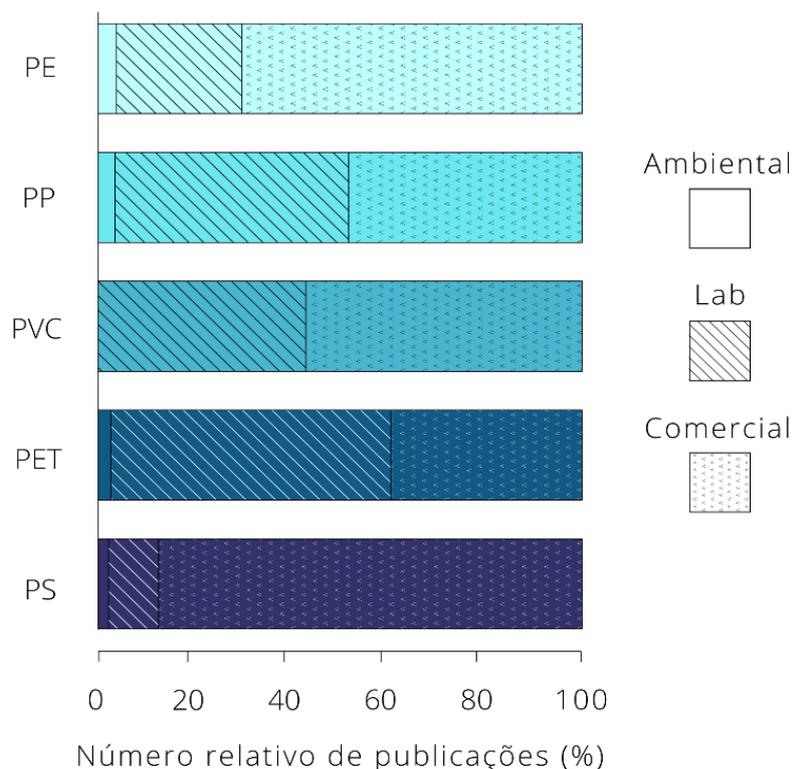
Figura 11: Proporção relativa das dimensões das partículas por tipo de plástico



A maioria dos polímeros empregados nos artigos científicos foi adquirida de fontes comerciais e, portanto, representam polímeros que podem ser adquiridos comercialmente como micro/nanopartículas, ou seja, sem processos de transformação posteriores para redução de tamanho. O PS, PE e PVC apresentaram uma maior parcela de estudos utilizando partículas comerciais (Figura 12). Entretanto, estudos com PET empregaram extensivamente partículas produzidas em laboratório, nas quais as partículas poliméricas foram adquiridas a partir da síntese ou obtidas comercialmente e depois submetidas a processos laboratoriais, visando reduzir suas dimensões, como moagem e/ou exposição UV. Interessantemente, O PP apresentou um empate entre as categorias 'comercial' e 'lab'. É importante destacar que a categoria 'ambiental' não foi predominante para nenhum tipo de plástico, e inclusive, não foi reportada para nenhum artigo utilizando-se PVC.

Os artigos incluídos na categoria 'comercial' geralmente empregavam formas esféricas com baixa dispersão de tamanhos, enquanto os artigos na categoria 'laboratório' usavam tipicamente fragmentos obtidos por moagem mecânica apresentando uma gama mais ampla de tamanhos de partículas. A maioria das publicações com PET apresentaram a obtenção de suas partículas a partir da moagem de pedaços de garrafas PET, metodologia que apresenta limitações na obtenção de partículas menores, sendo essa a razão mais provável para o tamanho médio das partículas de PET ser maior do que seus pares (Figura 12). Em se tratando da categoria 'ambiental', essa se refere a partículas poliméricas recuperadas de amostras ambientais, principalmente água, mas também solo ou mesmo dentro de organismos. Apesar de mais realistas, estudos com partículas coletadas no meio ambiente têm mais limitações comparativas, devido à grande variação de tamanhos de partículas, tipos de plásticos, contaminantes, entre outros fatores.

Figura 12: Quantidade relativa de publicações para cada forma de obtenção de partículas para cada tipo de plástico



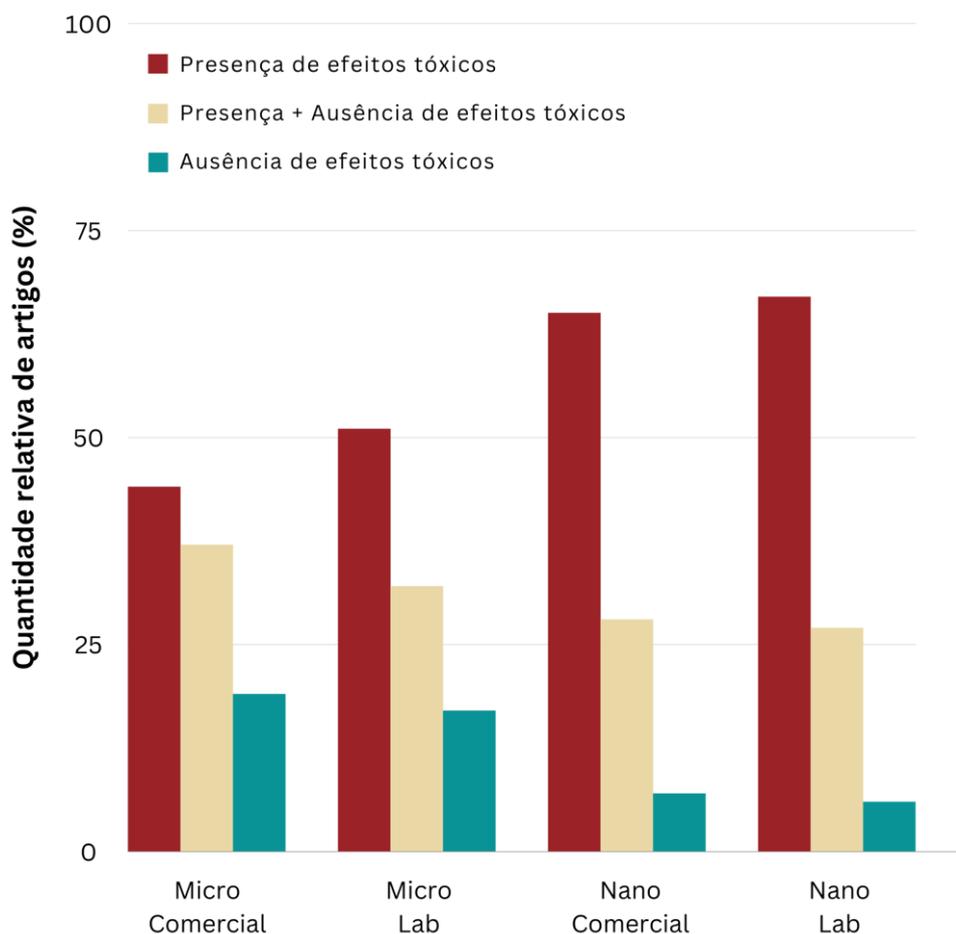
6.2. Organismos-teste e efeitos tóxicos causados por micro e nanoplásticos

A avaliação da toxicidade causada por partículas de plástico em diferentes organismos pode ser muito complexa. Isso porque ela pode ser influenciada por diversos fatores tais como formato, dimensões, tipo de plásticos, organismos expostos, concentração de partículas, entre outras condições de exposição (Jiang et al., 2023; Rodrigues et al., 2023; Xia et al., 2022).

Em se tratando dos formatos das partículas, microplásticos secundários, por exemplo, aquelas formadas principalmente a partir de processos degradativos no meio ambiente, normalmente apresentam superfícies irregulares (Xia et al., 2022). Formatos aleatórios de partículas plásticas

também são obtidos a partir de processos como moagem com moinhos de facas e bolas e moagem criogênica (Xu et al., 2022). No entanto, as partículas de fontes comerciais geralmente consistem em partículas esféricas de tamanho regular (Xu et al., 2022). Considerando relatos de que micropartículas não-esféricas e irregulares, como fragmentos e fibras, têm maior toxicidade em organismos (Jung et al., 2021), era esperado observar uma frequência maior da presença de toxicidade em estudos que utilizaram partículas produzidas em laboratório em comparação a partículas comerciais. No entanto, pelo menos sob um número relativo de publicações, não houve diferenças aparentes no relato da toxicidade de partículas poliméricas de partículas de origem 'comercial' e 'lab' (Figura 13).

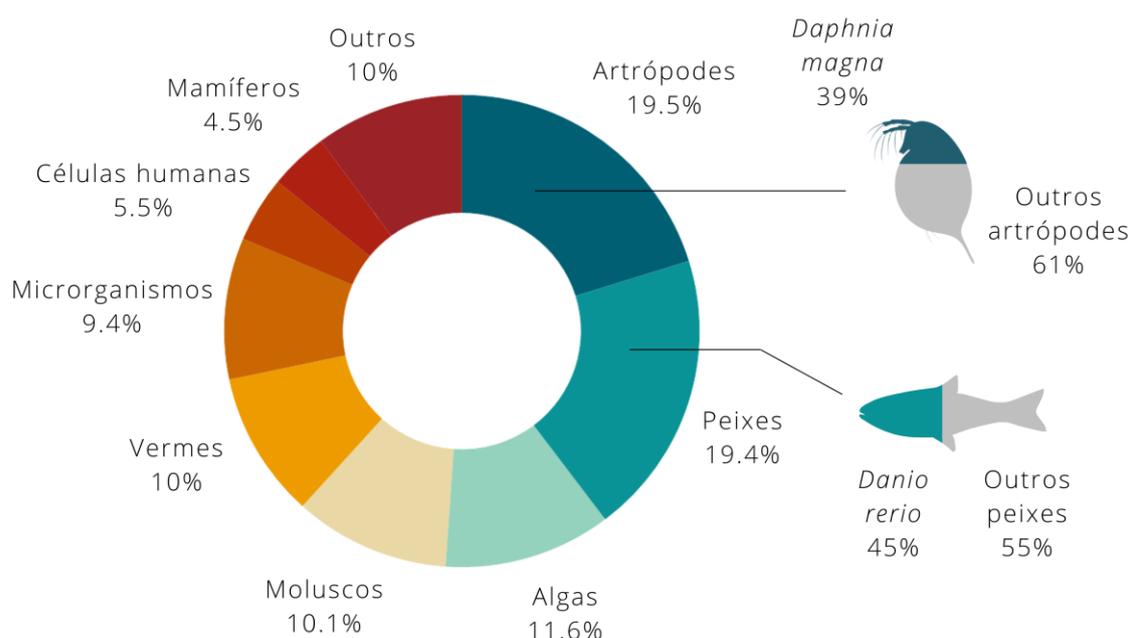
Figura 13: Comparação da toxicidade causada por diferentes dimensões e diferentes formas de obtenção das partículas poliméricas



Em relação aos organismos estudados (Figura 14), os Artrópodes (19,5%) foram os principais organismos-teste empregados para avaliar a toxicidade dos micro e nanoplásticos, seguidos por Peixes (19,4%), Algas (11,6%), Moluscos (10,1%), Vermes (10%), Microrganismos (9,4%), Células humanas (5,5%) e Mamíferos (4,5%). As demais publicações incluindo outros organismos tais como répteis, anfíbios, plantas, entre outros, que não alcançam mais de 3% individualmente constituem a categoria 'Outros'. Essa categoria representa 10% do conjunto total de dados analisados. Entre os artrópodes, a *Daphnia magna* é o organismo mais estudado em testes de

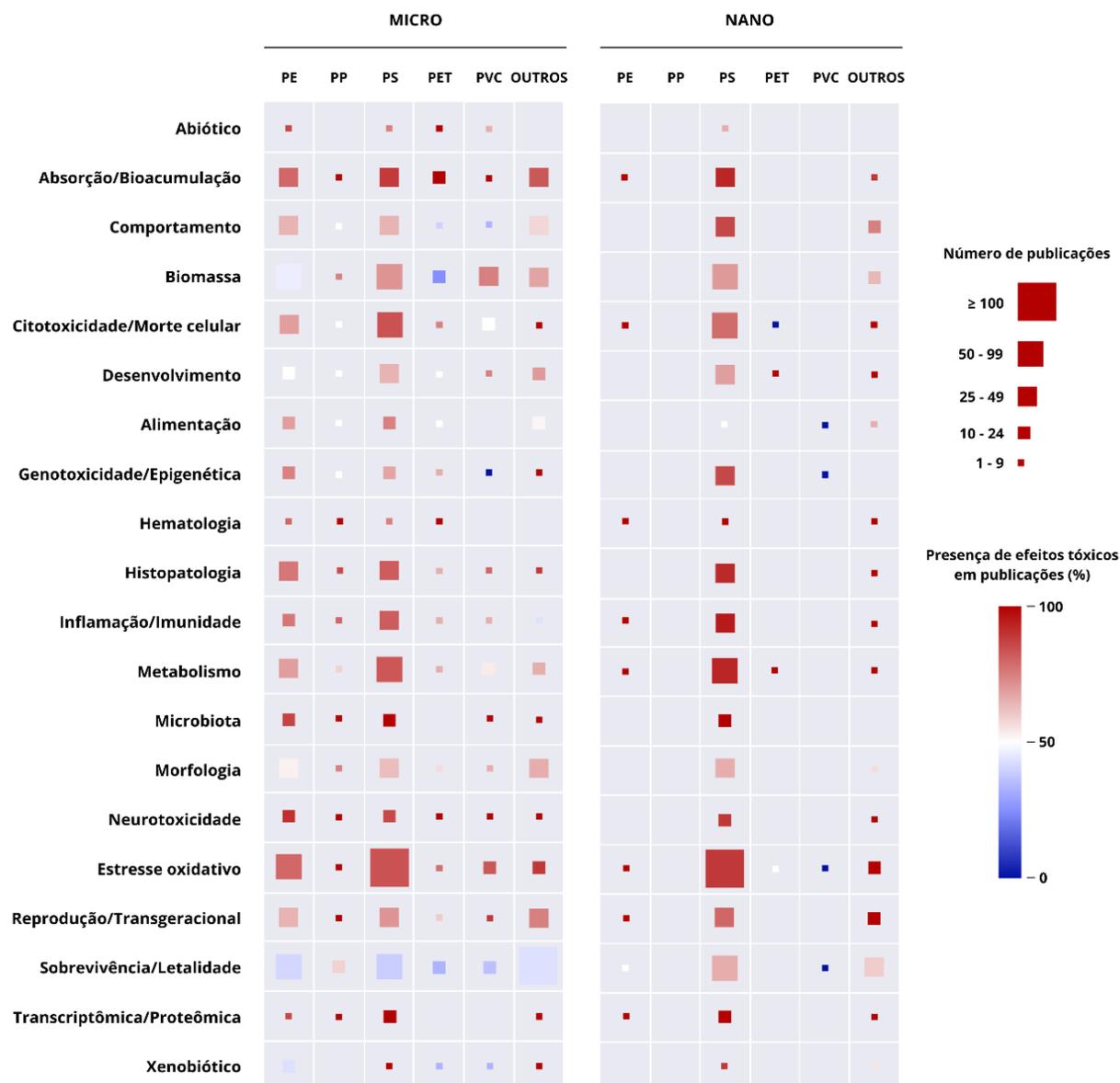
toxicidade visto que é considerado um organismo modelo para este tipo de pesquisa (Cunningham et al., 2022; Trotter et al., 2021). Essa espécie está presente em 73 estudos, representando $\approx 39\%$ dos relatos de artrópodes e 8% do total de publicações. Os peixes são o segundo grupo mais estudado, e o *zebrafish* (*Danio rerio*) é a principal espécie de todo o conjunto de dados. Este organismo está presente em 45% das publicações que utilizaram peixes como organismo de exposição e representa 9% do total de estudos, corroborando o peixe-zebra como organismo modelo para avaliação de toxicidade ambiental. Essa espécie é destaque em pesquisas de toxicidade visto que apresenta facilidade de cultivo, rápido crescimento populacional e alta sensibilidade. Kim et al., 2022). O *zebrafish* se desenvolve rapidamente, sendo que um embrião de um dia de vida já tem formado todos os tecidos e muitos precursores de órgãos, como por exemplo, coração pulsante, sangue circulante, sistema nervoso, olhos e ouvidos, sendo que todos podem ser observados prontamente sob um simples microscópio para dissecação (Sumanas, Lin e Lin, 2004).

Figura 14: Quantidade relativa de publicações para cada categoria de organismo



Além dos organismos-teste, o tipo e o tamanho das partículas plásticas são fatores que desempenham um papel na toxicidade (Verla et al., 2020; Jeong et al., 2016; Bobori et al., 2022). Com o objetivo de investigar os principais efeitos tóxicos relatados nas publicações de artigos científicos em relação às exposições a micro e nanoplásticos, foi desenvolvido um *heatmap* com base no número de publicações relatando a presença ou ausência de cada categoria de efeito tóxico presente na Tabela 2, para cada tipo de plástico em escala micro e nanométrica (Figura 15). A partir do *heatmap*, é possível notar uma grande diferença no número de estudos empregando os diferentes materiais. Apesar disso, há uma predominância da presença de efeitos tóxicos para partículas micrométricas e nanométricas na maioria das categorias de toxicidade. Também é possível observar uma limitação (e em alguns casos a inexistência) de dados combinando-se tipos de plástico com algumas categorias de toxicidade, especialmente com as partículas em escala nanométrica.

Figura 15: *Heatmap* do número de publicações e presença de efeitos toxicológicos em cada categoria



Algumas categorias, tais como 'Estresse oxidativo', 'Metabolismo' e 'Histopatologia', apresentaram, em geral, a presença de efeitos toxicológicos combinada com um grande número de publicações. Estudos que avaliaram a 'Sobrevivência/Letalidade' de organismos expostos a partículas poliméricas em escala micrométrica relataram principalmente baixa toxicidade, o que não foi

observado para partículas nanométricas. Entretanto, há uma limitação para uma comparação mais robusta entre os efeitos das partículas micro e nanométricas devido à diferença significativa no número de publicações. Ao analisar apenas o PS, polímero com um número semelhante de publicações para estudos micro (n=90) e nanométricos (n=68) é possível observar uma maior toxicidade das nanopartículas comparação às micropartículas na categoria 'Sobrevivência/Letalidade'. Esses dados estão de acordo com a sugestão de que as partículas na escala nanométrica são mais tóxicas do que as partículas na escala micrométrica (Bobori et al., 2022; Jeong et al., 2016). Além disso, os dados também corroboram que os diferentes tipos de polímeros podem diferir em sua predominância de toxicidade (Zhu et al., 2019; Zimmermann et al., 2020), conforme ilustrado em algumas categorias tais como 'Comportamento', 'Biomassa' e 'Xenobiótico' (Figura 15).

6.3. Polietileno (PE)

O polietileno (PE) é um polímero sintético com diversas aplicações tais como recipientes, frascos de distribuição, frascos de lavagem, tubos, sacolas plásticas para componentes de computador e equipamentos de laboratório. O PE é um dos polímeros mais produzidos no mundo e também o mais frequentemente identificado como poluente nos oceanos (Beiras et al., 2018; Muñoz-González et al., 2021) e em águas superficiais em geral (Barboza e outros, 2020). Partículas de PE são relevantes do ponto de vista de contaminação devido à sua hidrofobicidade (devido à presença de grupos -CH₂) e alto peso molecular, o que permite a adsorção de poluentes ambientais (Castro et al., 2020). Além disso, o PE é suscetível à foto-oxidação e, por isso, aditivos como estabilizadores de UV são frequentemente adicionados à sua formulação (Beiras et al., 2018).

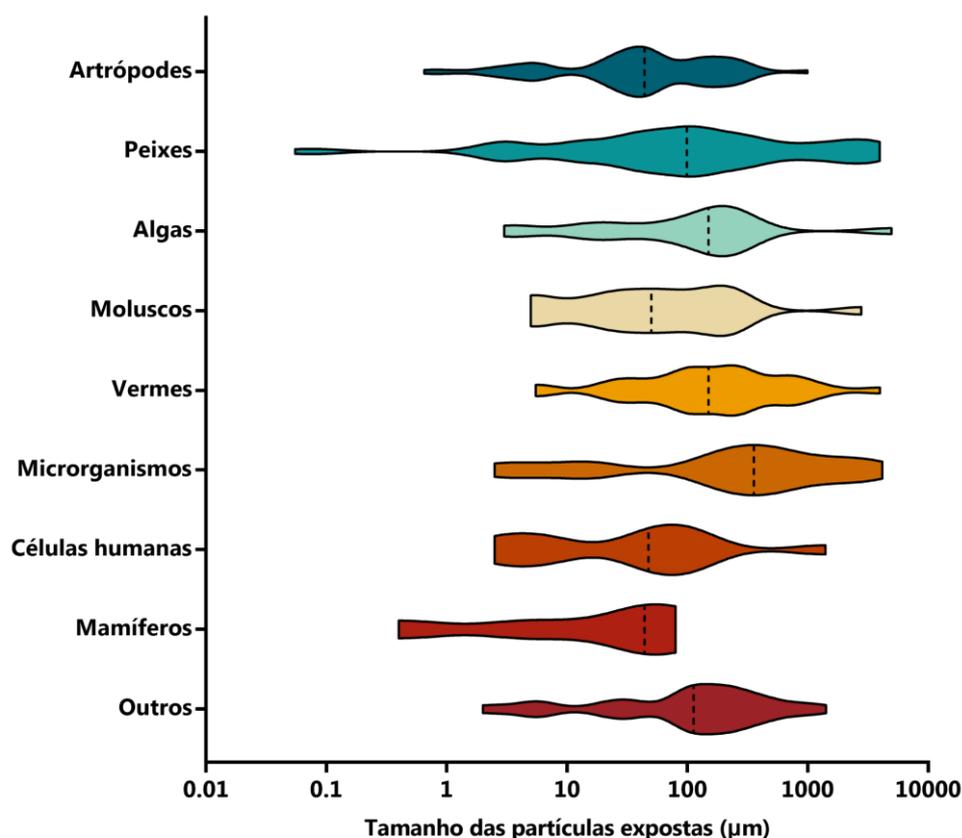
Apesar de ser o polímero mais produzido, o PE é o segundo plástico mais estudado em termos de toxicidade a organismos, totalizando 207

publicações. Partículas na escala micrométrica foram utilizadas em 97% dos artigos estudados, enquanto apenas 3% usaram partículas nanométricas. Além disso, os tamanhos de partícula mais usados (73%) nos testes de exposição foram entre 10–1000 μm . Os peixes foram os principais organismos de teste usados para testar a toxicidade do PE (22%), seguidos pelos artrópodes (20%). As categorias de organismos menos utilizadas foram mamíferos (apenas 2%) e células humanas (4%). A maioria dos estudos de PE empregou partículas disponíveis comercialmente (70,1%), enquanto as produzidas em laboratório representaram 25,8% e as partículas recuperadas no ambiente representaram apenas 4,1%.

A exposição e toxicidade causada por partículas de PE são amplamente difundidas na literatura, abrangendo todas as categorias de toxicidade deste estudo. A categoria de toxicidade mais estudada para ambas as PE MPs foi 'sobrevivência/letalidade' (n=71), o que resultou na presença de efeitos em apenas 41% das publicações, seguida por 'estresse oxidativo' (n=62) e 'biomassa' (n=59), que apresentaram 80% e 46% de presença de efeitos, respectivamente. Além de 'biomassa' e 'sobrevivência/letalidade', 'efeitos xenobióticos' é a única categoria que mostrou menos presença do que ausência de efeitos (43%, n=14). Todas as outras categorias de toxicidade apresentaram uma predominância na presença de efeitos toxicológicos.

A Figura 16 apresenta a dispersão da quantidade relativa de publicações para cada classe de organismos levando em consideração as dimensões das partículas de PE utilizadas nos estudos.

Figura 16: Dispersão da quantidade relativa de publicações para cada classe de organismos levando em consideração as dimensões das partículas de PE



A partir da Figura 16, é possível verificar alguns gaps de literatura no que diz respeito à utilização de partículas de PE em estudos de toxicidade. A grande maioria dos estudos para todas as categorias de organismos utilizou partículas, principalmente, nas faixas de tamanhos entre 10-1000 μm . Assim, há uma escassez de publicações que utilizem nanopartículas, e em algumas categorias de organismos, tais como mamíferos, algas, moluscos, vermes, células humanas e outros publicações com microplásticos com dimensões de 1000 μm ou maiores.

6.4. Polipropileno (PP)

O polipropileno (PP) é um dos polímeros sintéticos mais produzidos no mundo, principalmente devido às suas propriedades e variedade de aplicações. Ele pode ser utilizado em formato rígido, por injeção e sopro, ou ainda na forma de fibras, filmes, tecidos, chapas, entre outros (Maddah, 2016). Apesar de ser considerado um polímero durável e material persistente, o PP é muito suscetível à degradação quando exposto à radiação UV (Lestari et al., 2022). Essa degradação pode ser responsável por alterar suas propriedades físico-químicas, e o processo de intemperismo pode levar à modificação química da superfície do polímero (Jeon et al., 2021; B. Li et al., 2021; K. Zhu et al., 2020). Esse processo pode gerar grupos de ácidos carboxílicos que podem ter aumentado a afinidade de sua ligação a proteínas, o que pode afetar o comportamento biológico de organismos expostos a esses materiais (Pfleger et al., 2009).

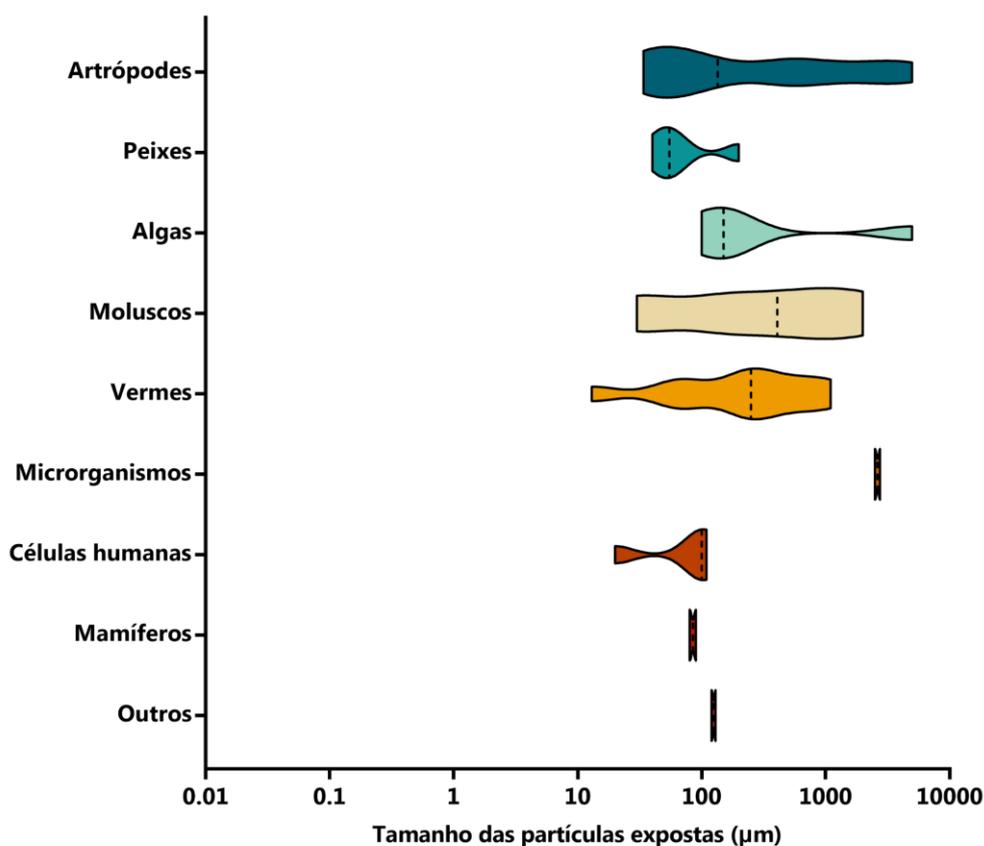
Embora o polipropileno seja o segundo polímero mais produzido e um dos micropoluentes mais prevalentes no ecossistema aquático, estudos de toxicidade em organismos aquáticos e terrestres ainda são escassos. Sob a abordagem metodológica deste trabalho, foram identificadas somente 33 publicações que avaliaram a toxicidade do PP em organismos. Assim como o PE, a maioria das partículas de PP usadas para exposição variou entre 10–1000 μm (80%). Não foram encontrados estudos de toxicidade com PP nanométrico entre os artigos elegíveis deste estudo. Em relação aos organismos-teste, artrópodes (30%), vermes (15%) e algas (15%) foram os principais grupos analisados, enquanto apenas um relato utilizando mamíferos e dois relatos utilizando moluscos e microrganismos foram identificados. Curiosamente, as categorias ‘comercial’ e ‘laboratorial’ como fontes de partículas de PP apresentaram um número equivalente de publicações (48,1% cada) e apenas 3,8% foram da categoria ‘meio ambiente’.

‘Sobrevivência/letalidade’, ‘estresse oxidativo’ e ‘biomassa’ foram as categorias de toxicidade mais estudadas nos testes de exposição com PP, e os efeitos toxicológicos estiveram presentes em 58%, 100% e 75% dos casos, respectivamente. No entanto, além de ‘sobrevivência/letalidade’ (n = 12),

nenhuma categoria apresentou pelo menos uma dúzia de estudos avaliando a toxicidade do PP. Isso indica uma limitação quantitativa em termos comparativos com outros tipos de polímeros quanto aos efeitos toxicológicos causados.

A Figura 17 apresenta a dispersão da quantidade relativa de publicações para cada classe de organismos levando em consideração as dimensões das partículas de PP utilizadas nos estudos.

Figura 17: Dispersão da quantidade relativa de publicações para cada classe de organismos levando em consideração as dimensões das partículas de PP



A partir da Figura 17, é possível verificar alguns gaps de literatura no que diz respeito à utilização de partículas de PP em estudos de toxicidade. Há uma escassez de publicações que utilizem partículas de PP abaixo de 10 µm.

Além disso, algumas categorias de organismos apresentam uma escassez de publicações para micro e nanoplásticos e maneiras geral, tais como peixes, microrganismos, células humanas, mamíferos e outros.

6.5. Politereftalato de etileno (PET)

O politereftalato de etileno (PET) é um polímero termoplástico da família do poliéster e é utilizado, principalmente, na produção de recipientes de líquidos, bandejas de alimentos, roupas, aplicações de termoformagem, entre outros (Palacios-Mateo et al., 2021; Sinha et al., 2010). É considerado um material inerte com excelentes propriedades mecânicas e termomecânicas (Damayanti et al., 2021), inclusive sendo uma barreira eficaz para gases como oxigênio e gás carbônico, sendo amplamente utilizado na fabricação de garrafas de refrigerantes (Sinha et al., al., 2010). No entanto, apesar de ser um material resistente às intempéries, o PET está sujeito a fragmentações causadas por degradação, tais como foto-oxidação e hidrólise (Gewert et al., 2015) que são muito comuns em ambientes aquáticos, o que resulta em rompimentos da cadeia polimérica, fenômeno que acarreta na geração de MPs (Arhant et al., 2019).

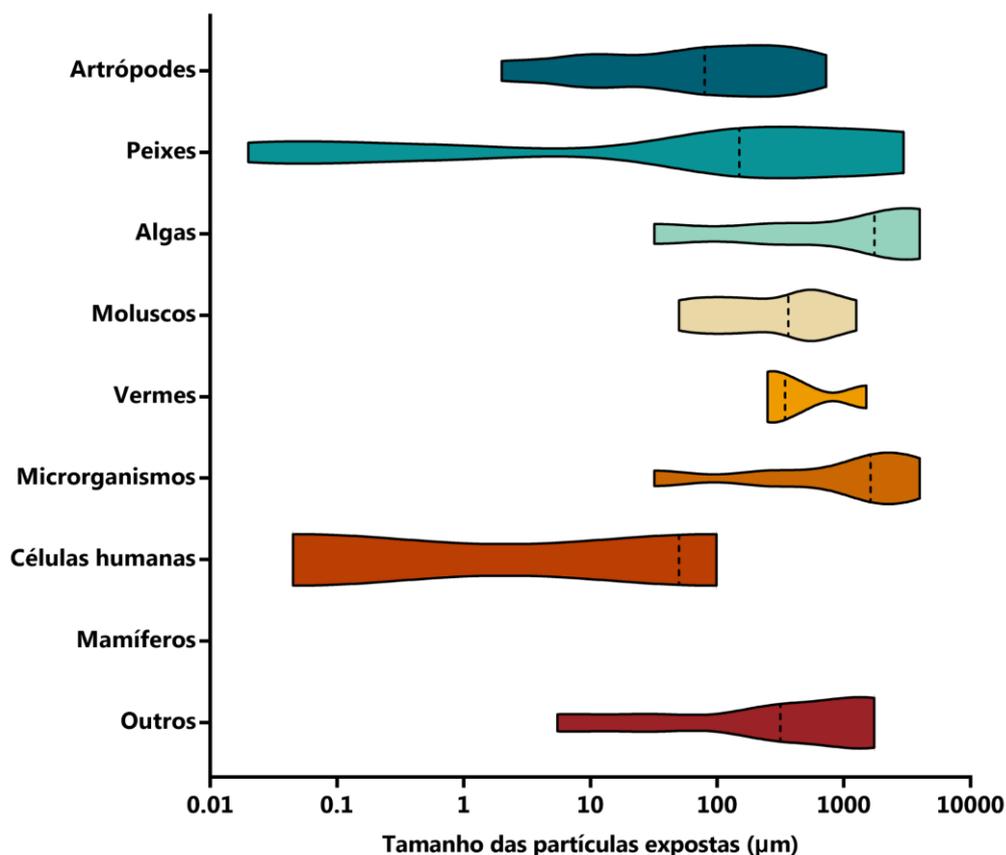
Em ambientes aquáticos, o PET é propenso a afundar devido à sua densidade de 1,37 a 1,45 g/cm³ (Parolini et al., 2020). Como esses polímeros são mais densos que a água do mar, são mais comumente encontrados em regiões bentônicas (Woodall et al., 2014), embora alguns estudos também mostrem a presença de micropartículas de PET na superfície da água (Hendrickson et al., 2018; Suaria et al., 2016; S. Wang et al., 2020). A área e a forma da superfície da partícula, a turbulência da água e a temperatura estão entre vários fatores que podem influenciar o comportamento do PET na água (Enders et al., 2015; Schwarz et al., 2019).

Assim como no caso do PP, estudos com PET são escassos em comparação com outros tipos de plásticos. Foram identificadas 38 publicações usando partículas de PET, das quais 95% usaram micropartículas e apenas 5% usaram nanopartículas. Um ponto interessante é que aproximadamente uma em cada três publicações usou partículas entre 1–5 mm, que são consideradas grandes MPs, e essas apresentaram, principalmente, origem laboratorial. Essa categoria de geração de partículas representou 57,6% dos estudos com PET ensaiadas e, geralmente, foram obtidas por trituração ou corte de garrafas plásticas. Os principais organismos-teste expostos ao PET foram artrópodes (24%) e peixes (18%) e não foram encontrados estudos com mamíferos.

Em relação às categorias de toxicidade avaliadas nos estudos de PET, a categoria 'biomassa' apresentou o maior número de publicações (n = 16) e a também a menor presença de efeitos (25% dos estudos). Em comparação com outros tipos de plásticos, esta é a menor taxa de toxicidade entre todos os materiais avaliados. No entanto, é impossível afirmar que o PET apresenta menor risco de alteração da biomassa, pois ainda há uma limitação no número de publicações, organismos expostos e concentrações e tamanhos de partículas em estudos de PET.

A Figura 18 apresenta a dispersão da quantidade relativa de publicações para cada classe de organismos levando em consideração as dimensões das partículas de PET utilizadas nos estudos.

Figura 18: Dispersão da quantidade relativa de publicações para cada classe de organismos levando em consideração as dimensões das partículas de PET



A partir da Figura 18, é possível verificar alguns gaps de literatura no que diz respeito à utilização de partículas de PET em estudos de toxicidade. Em comparação ao PE e PP, o PET apresenta uma maior robustez de publicações com partículas maiores. Entretanto, é possível observar que há uma grande dispersão das diferentes faixas de tamanhos estudadas para cada categoria de organismo, sendo que algumas delas apresentam, principalmente, estudos com partículas maiores, como por exemplo moluscos, vermes e algas, e outras categorias com partículas menores, como por exemplo células humanas. Além disso, verifica-se que a categoria de mamíferos não apresentou nenhum estudo com PET.

6.6. Policloreto de vinila (PVC)

O policloreto de vinila (PVC) é atualmente o terceiro polímero sintético de maior demanda mundial e sendo um termoplástico, o PVC pode ser fundido e remodelado diversas vezes. Suas características polares permitem a incorporação de vários aditivos, ampliando sua gama de aplicações, que inclui a fabricação de tubos, cabos, embalagens de alimentos, têxteis e aplicações médicas e industriais (Fernández-González et al., 2022; Patrick, 2004). Outros usos comuns para o PVC incluem materiais de construção e aplicações que requerem propriedades retardantes de chama (Engler, 2012; Levchik e Weil, 2005).

Ftalatos, compostos de chumbo, compostos de organoestanho e adipatos estão entre os principais aditivos na composição comercial do PVC (Fernández-González et al., 2022a; Patrick, 2004). Como consequência das altas taxas de aditivos presentes na composição de polímeros sintéticos, já foi relatada a lixiviação desses aditivos no meio ambiente por processos químicos e naturais (Chen et al., 2019; Dopico-Garcia et al., 2007; Meng et al., 2021), eventualmente atingindo organismos e resultando em efeitos tóxicos (Luo et al., 2022; Sridharan et al., 2022).

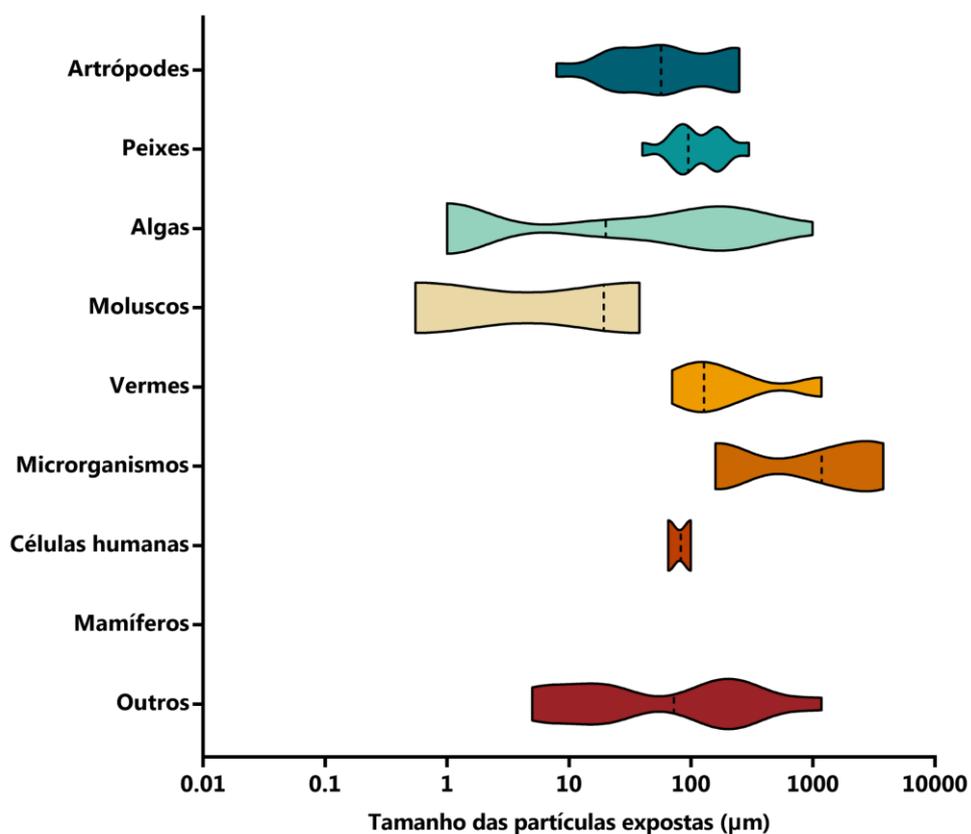
Xia et al. (2022) destacam que o PVC é facilmente fragmentado em comparação a outros termoplásticos e MPs de PVC já foram encontrados em diversos ambientes tais como solos de atividades agrícolas, bem como águas marinhas e doces (Ding et al., 2020; Huang et al., 2021; Savoca et al., 2019). Isso porque, apesar dos aditivos estabilizantes que podem retardar sua degradação, o PVC é extremamente suscetível à fotodegradação e suas MPs podem permanecer por períodos prolongados no ambiente (Fernández-González et al., 2022).

O PVC é o terceiro tipo de plástico mais produzido e o terceiro mais estudado em relação à toxicidade causada por suas partículas, totalizando 58 trabalhos. Dentre estes, apenas um estudo relatou o efeito de nanopartículas.

Assim como o PE e PP, a maioria dos estudos empregou partículas de PVC entre 10–1000 μ m (72%). Entretanto, diferentemente de outros plásticos, as algas (26%) foram os principais organismos de teste, seguidas por artrópodes (17%) e peixes (17%). Os organismos menos estudados foram moluscos (3%) e células humanas (3%), e nenhum estudo em mamíferos foi identificado com PVC. Em relação às fontes de partículas, 56,9% dos estudos de PVC utilizaram partículas disponíveis comercialmente, 43,1% utilizaram partículas geradas a partir de processos laboratoriais e, curiosamente, nenhum estudo utilizou partículas coletadas do meio ambiente. Tal como acontece com outros polímeros, a categoria mais estudada foi 'biomassa' (n = 26), que apresentou uma das maiores prevalências de efeitos tóxicos no conjunto de dados (73%), seguida por 'sobrevivência/letalidade' (36%).

A Figura 19 apresenta a dispersão da quantidade relativa de publicações para cada classe de organismos levando em consideração as dimensões das partículas de PVC utilizadas nos estudos.

Figura 19: Dispersão da quantidade relativa de publicações para cada classe de organismos levando em consideração as dimensões das partículas de PVC



A partir da Figura 19, é possível verificar alguns gaps de literatura no que diz respeito à utilização de partículas de PVC em estudos de toxicidade. Assim como o PET, o PVC apresentou uma dispersão de tamanhos de partículas utilizadas nos estudos, fazendo com que algumas categorias de organismos sejam mais estudadas em relação à toxicidade causada por microplásticos menores, como por exemplo moluscos, e outras por microplásticos maiores, como por exemplo, microrganismos. Além disso, verifica-se uma escassez de publicações utilizando nanopartículas e, também, assim como o PET, o PVC não apresentou estudos com mamíferos.

6.7. Poliestireno (PS)

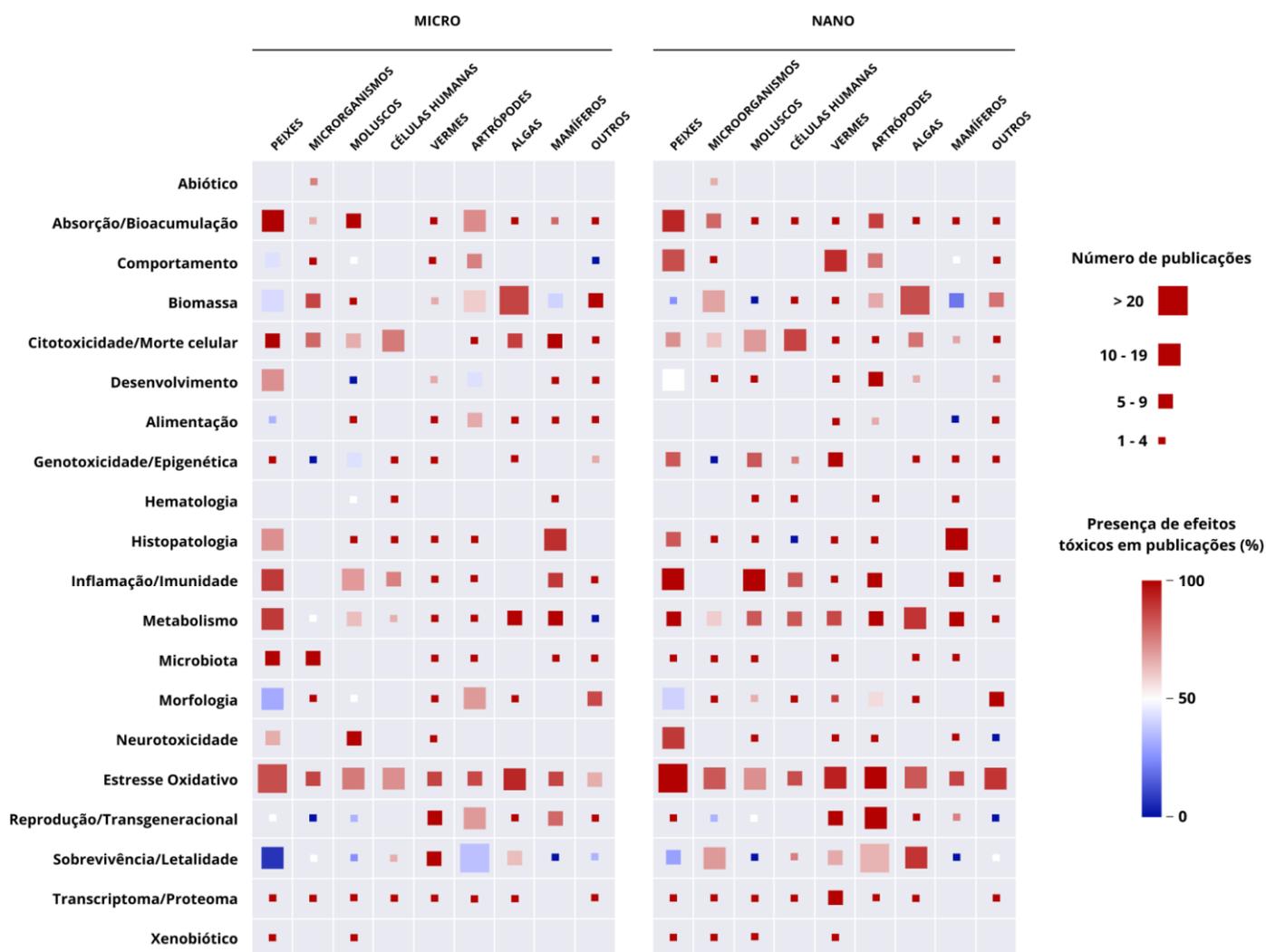
O poliestireno (PS) é comumente empregado em várias aplicações tais como recipientes de armazenamento de alimentos, espumas para embalagens, copos, pratos e talheres descartáveis, artigos de escritório e domésticos, como escovas de dente, brinquedos e clipes, produtos da aquicultura e setores marinhos, incluindo caixas de peixe, flutuadores de rede, docas flutuantes e coletes salva-vidas, entre outras aplicações incluindo em setores da construção civil e da indústria elétrica, eletrônica e automobilística (Ho et al., 2018; Kik et al., 2020; Turner, 2020; De-la-Torre et al., 2020).

O PS é quimicamente caracterizado por uma espinha dorsal de carbono com anéis aromáticos de benzeno (Schröter e Ventura, 2022). Este polímero sintético é um termoplástico amorfo (De-la-Torre et al., 2020) que pode ser expandido ou fundido (Kik et al., 2020) e apresenta baixa elasticidade, alta durabilidade e resistência à biodegradação (Schröter e Ventura, 2022). Este último ocorre em taxas extremamente baixas e, portanto, é considerado um polímero não biodegradável (Ho et al., 2018). Apesar de ser reciclável, o PS apresenta uma deficiência do ponto de vista econômico de sua reciclagem, visto que é um material muito leve e volumoso (Ho et al., 2018). Isso pode acarretar na existência de resíduos sólidos derivados do PS contaminando o meio ambiente, conforme aponta Turner, 2020.

Diante deste cenário, o PS foi o principal material empregado para testar a toxicidade de MNP, totalizando 502 publicações. Dentre os estudos com PS, as partículas de dimensões nanométricas representaram 53% das publicações, enquanto 47% dos estudos foram realizados utilizando-se partículas de dimensões micrométricas, dentre as quais apenas 16% utilizaram partículas maiores que 100 μm . Tanto na escala micrométrica quanto na nanométrica, os peixes foram os principais organismos-teste para avaliar a toxicidade do PS (20% em cada), onde *Danio rerio* foi a espécie mais estudada. Em relação à origem das partículas, 88% dos estudos de PS empregaram partículas disponíveis comercialmente, enquanto o PS sintetizado em laboratório e o PS recuperado no ambiente representaram apenas 10 e 2%, respectivamente.

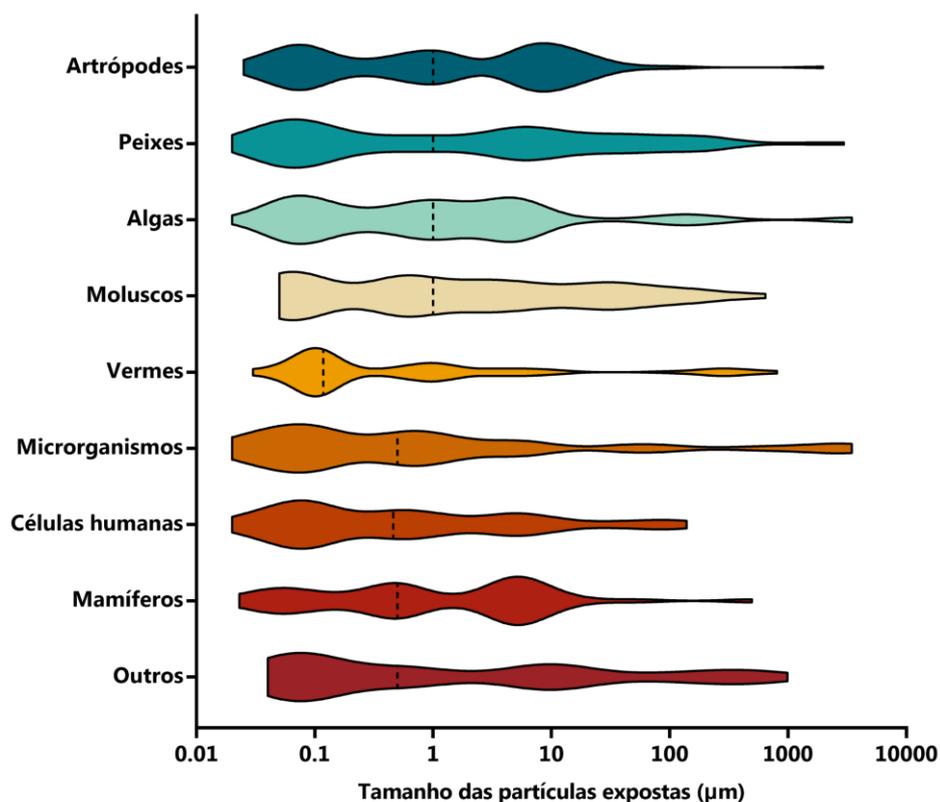
Devido ao maior número de estudos, o PS é o único material com dados disponíveis para todas as categorias de toxicidade analisadas em ambos os tamanhos de MNP (Figura 15), permitindo uma análise mais detalhada, considerando as distintas categorias de organismos-teste individualmente (Figura 20). De longe, a categoria de toxicidade mais estudada foi "estresse oxidativo" (n=237), na qual os efeitos tóxicos foram relatados em 83% dos estudos de MP e 89% nos estudos com NPs. Alterações de 'metabolismo' (n=121) e 'inflamação/imunidade' (n=90) também foram relatadas em >80% dos estudos utilizando MNPs. É importante ressaltar que a categoria 'sobrevivência/letalidade' é a única categoria com mais relatos de ausência (em vez de presença) de toxicidade, para o PS de dimensões micrométricas (61% dos estudos dessa categoria). Isso pode indicar que a exposição a PS MPs é principalmente não-letal, principalmente para peixes (93%) e artrópodes (67%) que são os organismos mais estudados. Apesar disso, é possível destacar que algumas classes de organismos são mais suscetíveis à exposição a partículas poliméricas do que outras (Figura 20). Isso também pode ser verdade para o tamanho das partículas, visto que a maioria dos estudos de nanopartículas de PS (45/68) relata letalidade.

Figura 20: Heatmap do número de publicações e presença de efeitos toxicológicos causados pelo PS em cada categoria de toxicidade para cada classe de organismo



A Figura 21 apresenta a dispersão da quantidade relativa de publicações para cada classe de organismos levando em consideração as dimensões das partículas de PS utilizadas nos estudos.

Figura 21: Dispersão da quantidade relativa de publicações para cada classe de organismos levando em consideração as dimensões das partículas de PS



Diferentemente dos outros polímeros, o PS apresentou, principalmente, estudos com partículas pequenas, incluindo as de escala nanométrica. Assim, as maiores lacunas de literatura para o PS estão localizadas nas faixas de tamanhos e microplásticos maiores, acima de 100 µm. Além disso, comparando-se diferentes categorias de organismos, pode-se verificar uma maior homogeneidade de faixas de tamanhos de partículas, em comparação aos outros polímeros.

6.8. Outros plásticos

Plásticos diferentes das categorias anteriores apresentaram uma frequência de estudos individuais muito menor, tais como PLA, PHB, PA, PU, borracha de pneu e misturas de polímeros (por exemplo, PE + PP). Das 126

publicações, apenas 14% usaram partículas nanométricas, enquanto 86% dos estudos empregaram partículas micrométricas, e a grande maioria (67%) encontra-se dentro da faixa de 10 a 1000 μm . As partículas foram obtidas principalmente de processos de transformação em laboratório (57%), como moagem e corte, seguidas de partículas comerciais (27%) e, finalmente, partículas coletadas no meio ambiente (16%). A maioria das publicações empregou artrópodes (21%) e peixes (17%) como organismos-teste, enquanto os menos estudados foram células humanas (3%) e mamíferos (sem estudos).

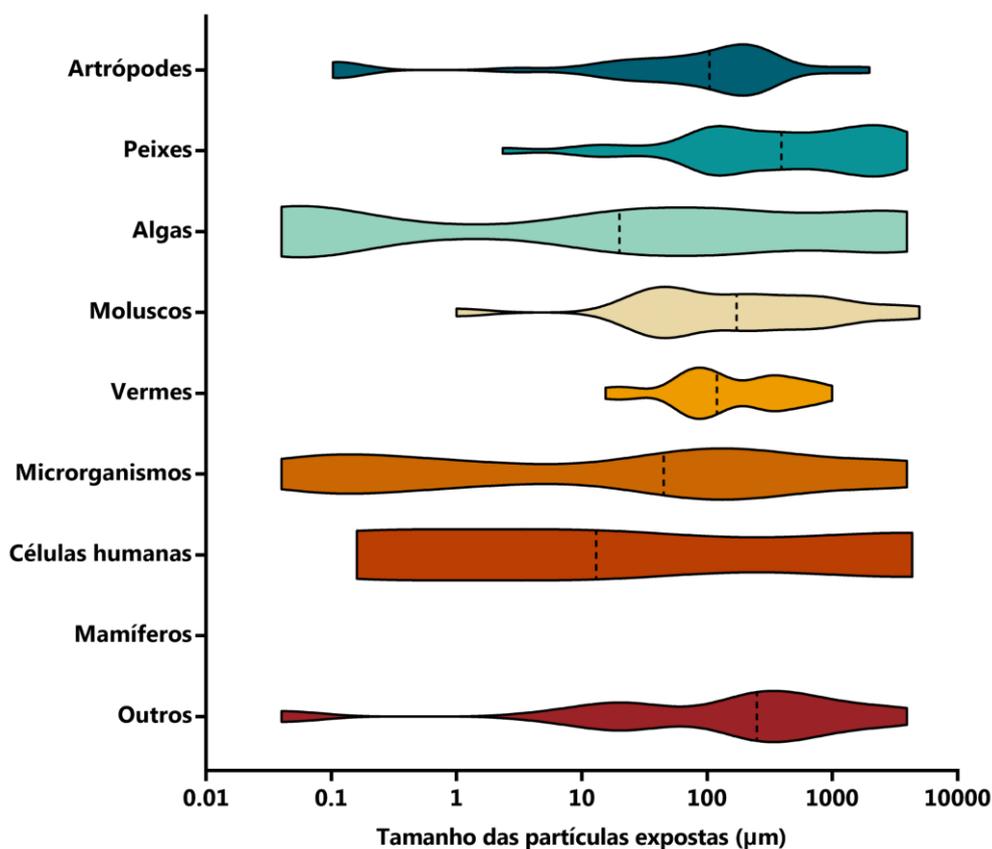
Dentro dessa categoria, as misturas de diferentes tipos de plástico tiveram o maior número de publicações ($n=23$), seguidas da poliamida (PA) ($n=15$) e do ácido polilático (PLA) ($n=13$), sendo este último um polímero biodegradável. Esta categoria inclui plásticos de fontes fósseis e renováveis, alguns são materiais não biodegradáveis (~72%), e outros são materiais biodegradáveis (~28%).

A utilização de polímeros biodegradáveis é uma das soluções propostas para conter o impacto da poluição por resíduos poliméricos (Filiciotto e Rothenberg, 2021; Rahman e Bhoi, 2021). Polímeros biodegradáveis fazem parte de um grupo maior, conhecido como bioplásticos, que podem ser gerados a partir de matéria-prima derivada da biomassa, como cana-de-açúcar e milho, mas também podem ser produzidos a partir de fontes fósseis (European Bioplastics, 2016). Esses materiais podem ser degradados quase completamente em 180 dias em lixeiras de compostagem (Anderson e Shenkar, 2021; European Bioplastics, 2016). No entanto, em outros ambientes, os bioplásticos podem desempenhar um papel semelhante aos polímeros derivados do petróleo (Anderson & Shenkar, 2021). Em termos de toxicidade, 'sobrevivência/letalidade' foi a principal categoria de toxicidade analisada ($n = 134$), relatando toxicidade em 43% das publicações com micropartículas ($n = 104$) e 60% com nanopartículas ($n = 30$). Outras categorias amplamente estudadas ($n \geq 35$) foram 'absorção/bioacumulação', 'biomassa', 'comportamento', 'morfologia', 'estresse oxidativo' e

'reprodução/transgeracional', e todas elas mostraram uma presença maior do que a ausência de efeitos. Outro ponto a ser destacado é que, apesar de apresentar a presença de biopolímeros, esta categoria não apresentou diferenças aparentes entre as categorias de polímeros convencionais no heatmap apresentado na Figura 15. No entanto, não é possível afirmar que haja ou não uma minimização dos efeitos por parte dos bioplásticos, pois há limitação no número de publicações com esses materiais.

A Figura 22 apresenta a dispersão da quantidade relativa de publicações para cada classe de organismos levando em consideração as dimensões das partículas de outros plásticos utilizadas nos estudos.

Figura 22: Dispersão da quantidade relativa de publicações para cada classe de organismos levando em consideração as dimensões das partículas de outros plásticos



A categoria “outros” apresentou certa dispersão de tamanhos na grande maioria dos organismos estudados, porém há uma escassez de publicações com a avaliação de toxicidade de nanoplásticos em peixes, moluscos e vermes. Além disso, assim como o PET e PVC, a categoria de outros plásticos não apresentou estudos com mamíferos.

6.9. Toxicidade de micro e nanoplásticos em *zebrafish*

A toxicidade causada por micro e nanoplásticos em *zebrafish* vem sendo muito estudada ao longo dos últimos anos. Por se tratar de uma área recente da pesquisa, tanto as metodologias quanto os resultados são bem heterogêneos entre os estudos. Assim, dentre os estudos selecionados na revisão, os que apresentaram o *zebrafish* como organismo de exposição na pesquisa foram separados e, a partir desses, foram quantificados os seus efeitos tóxicos presentes, ou seja, quando houve alterações no organismo, e seus efeitos tóxicos ausentes, ou seja, quando não houve alterações no organismo, decorrentes da exposição com micro e nanoplásticos. Os efeitos tóxicos foram divididos de acordo com as categorias listadas na Tabela 2.

As Figuras Figura **23** Figura 24 apresentam a quantidade absoluta de publicações que apresentam os efeitos toxicológicos presentes e ausentes causados aos *zebrafish* expostos a microplásticos e nanoplásticos, respectivamente.

Figura 23: Quantidade absoluta de publicações que apresentaram a presença e ausência de efeitos toxicológicos para cada categoria de toxicidade durante a exposição de *zebrafish* a microplásticos

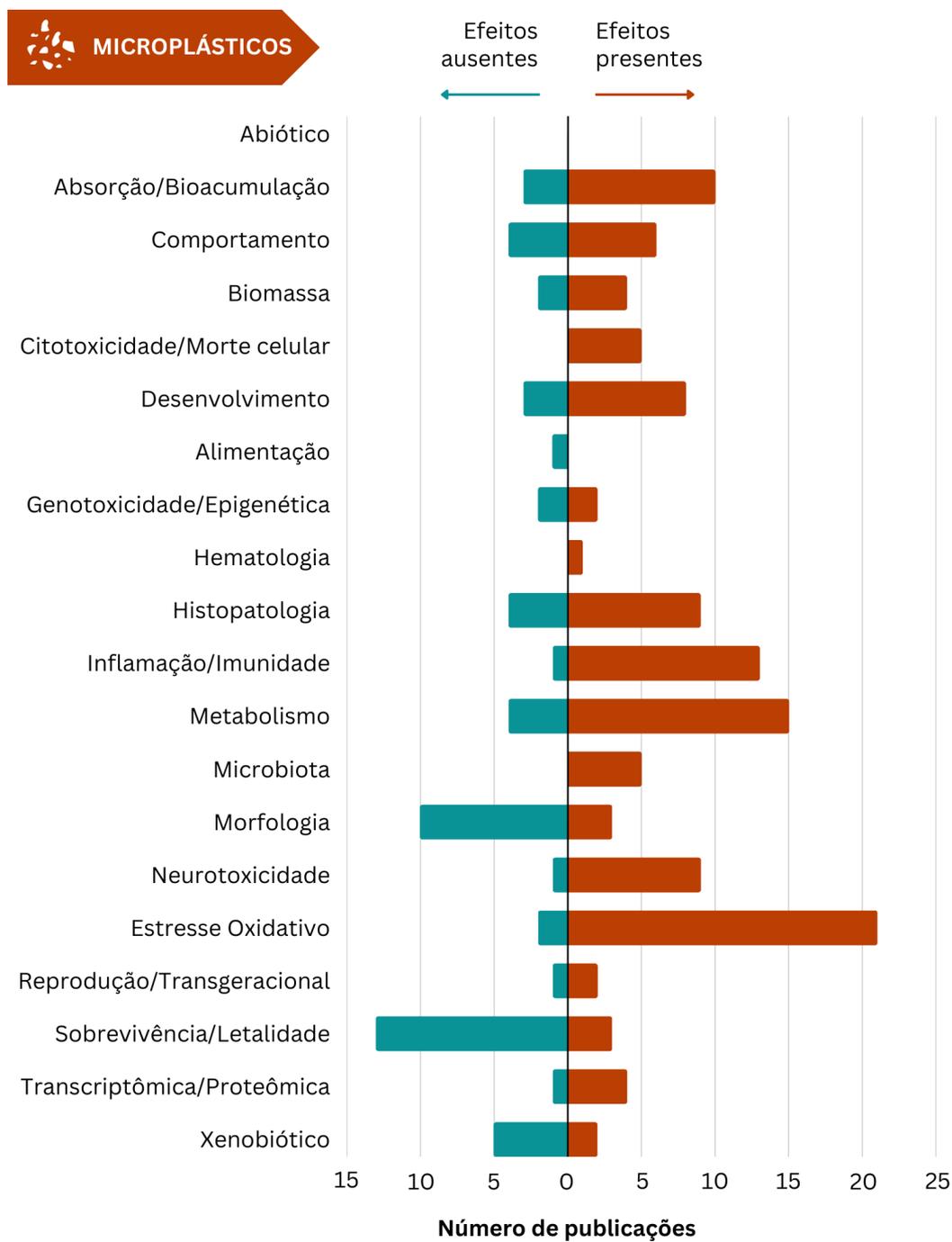
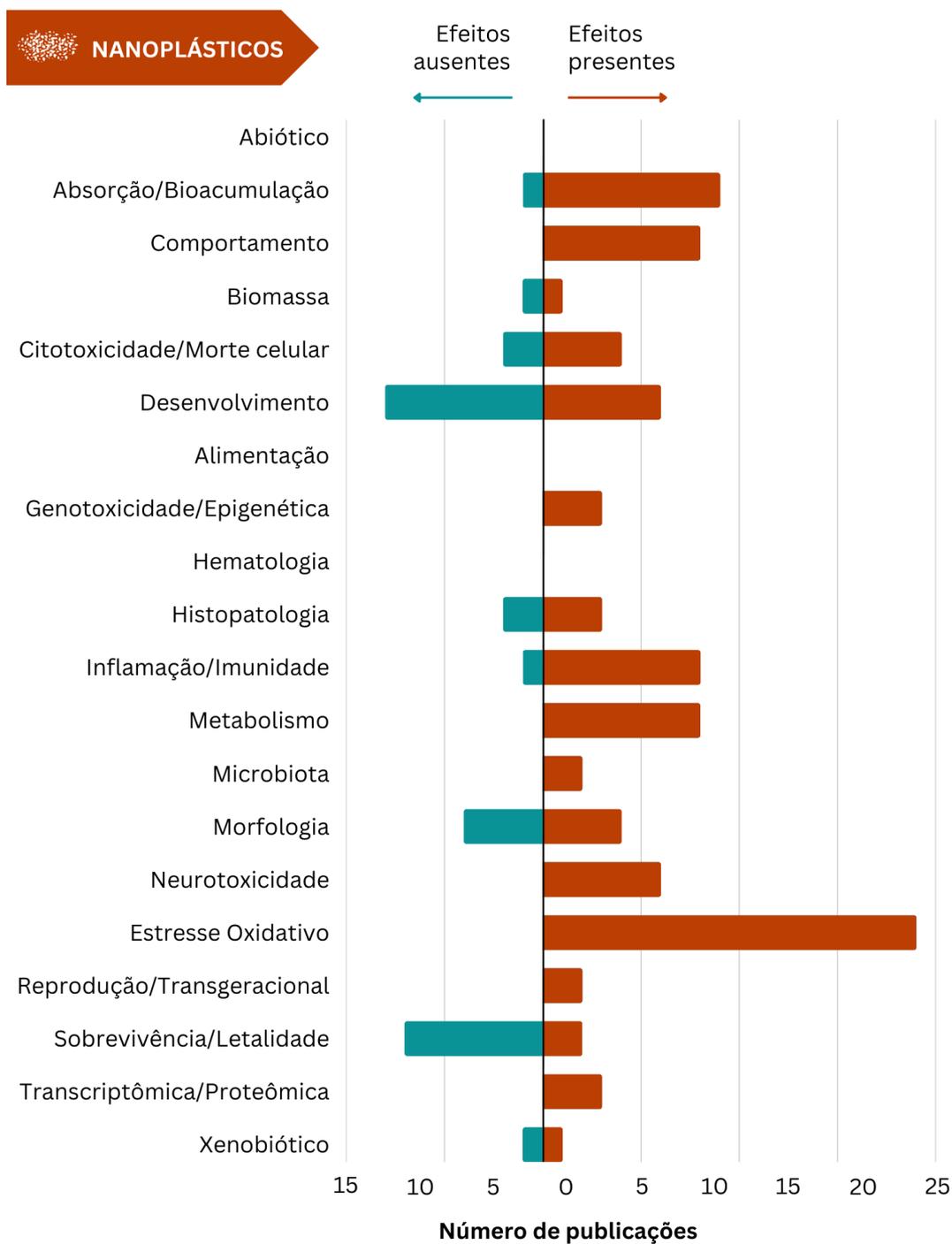


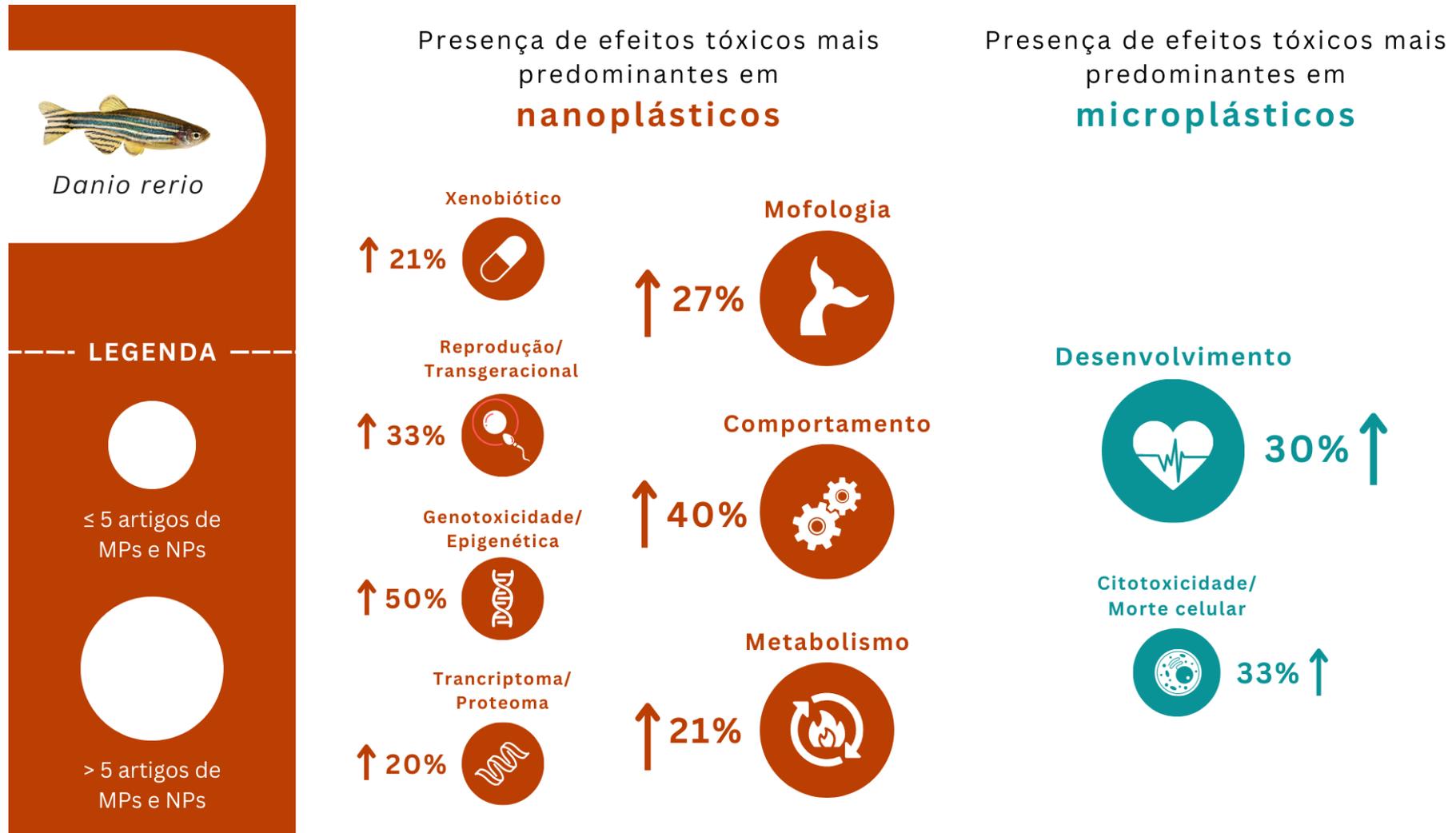
Figura 24: Quantidade absoluta de publicações que apresentaram a presença e ausência de efeitos toxicológicos para cada categoria de toxicidade durante a exposição de *zebrafish* a nanoplásticos



A partir das Figuras Figura 23 e Figura 24 é possível observar que, na maioria das categorias de toxicidade, há uma maior presença do que ausência de efeitos toxicológicos, com exceção das categorias 'Morfologia', 'Sobrevivência/Letalidade' e 'Xenobiótico' para microplásticos, e 'Desenvolvimento' e 'Sobrevivência/Letalidade' para nanoplásticos. Esses resultados de maior ausência de efeitos tóxicos para a categoria 'Sobrevivência/Letalidade' pode ser um indicativo de que as partículas poliméricas, independentemente de suas dimensões, apresentam principalmente somente efeitos subletais.

Outro ponto a se destacar é a diferença dos resultados de toxicidade em certas categorias ao se comparar os estudos que utilizaram microplásticos com os que utilizaram nanoplásticos. A Figura 25 apresenta uma comparação entre micro e nanoplásticos em relação à presença de efeitos tóxicos quando expostos ao *zebrafish*. Observa-se uma maior presença de efeitos tóxicos causados por nanoplásticos nas categorias: Xenobiótico, Reprodução/Transgeracional, Genotoxicidade, Transcriptoma/Proteoma, Morfologia, Comportamento e Metabolismo. Entretanto os efeitos tóxicos utilizando-se microplásticos estão mais presentes nas categorias: Desenvolvimento e Citotoxicidade/Morte celular. Apesar disso, não é possível assegurar uma significância desses resultados visto que a quantidade de estudos para cada categoria de toxicidade ainda é escassa, especialmente para as categorias Xenobiótico, Genotoxicidade, Reprodução/Transgeracional Transcriptoma/Proteoma e Citotoxicidade/Morte celular, que apresentaram somente cinco publicações ou menos para cada uma das categorias utilizando-se partículas micrométricas e/ou nanométricas. No entanto, é possível interpretar esses resultados como um possível indicativo de maior toxicidade causada por nanoplásticos em comparação a microplásticos.

Figura 25: Comparação da predominância de efeitos tóxicos entre micro e nanoplásticos em estudos com *zebrafish*



VOLUME II:

ESTUDO DA PRESENÇA E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPLÁSTICOS EM UMA
PRAIA DO MUNICÍPIO DE TORRES/RS

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS O VOLUME II

- Quantificar a presença de microplásticos ao longo da extensão da Praia Grande em Torres/RS;
- Caracterizar os tipos e os tamanhos dos microplásticos presentes nas amostras de areia coletadas na Praia Grande em Torres/RS.

8. METODOLOGIA

Com o intuito de atender ao objetivo de avaliar e quantificar a contaminação da praia de Torres por microplásticos, esse estudo do Volume II dessa tese apresenta o fluxograma dos processos da metodologia utilizada na Figura 26.

Figura 26: Fluxograma dos processos da avaliação da presença de microplásticos na praia de Torres/RS



8.1. Coleta de amostras

A coleta dos sedimentos foi realizada na Praia Grande (29°20'01.5"S 49°43'03.1"O), praia do município de Torres/RS no dia 12 de Janeiro/2020 durante o período da manhã. Essa área foi selecionada por ser uma das praias mais movimentadas do Rio Grande do Sul e por estar localizada ao lado do Rio Mampituba, o qual apresenta um potencial de poluição que pode ser transferido para o ambiente costeiro. Na praia, foram selecionados 30 pontos de coleta equidistantes como apresenta o mapa da Figura 27.

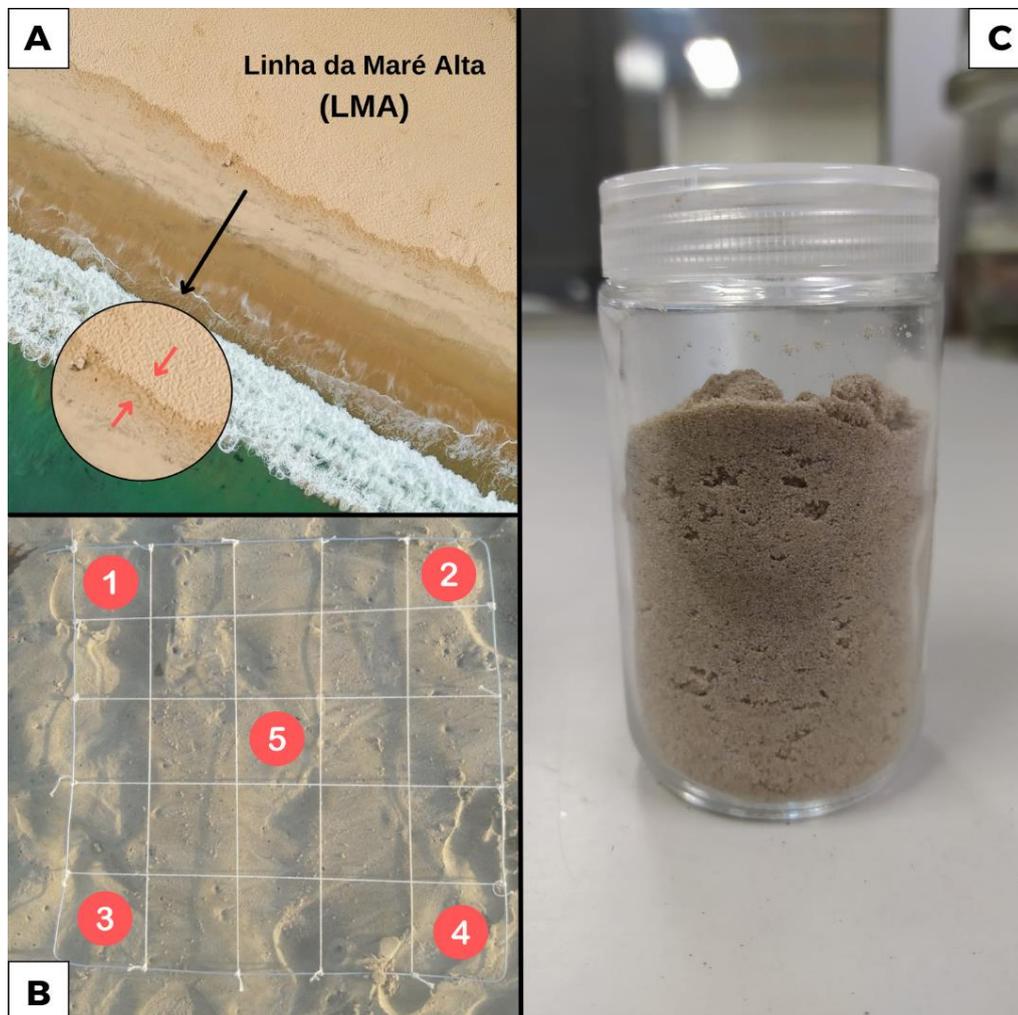
Figura 27: Mapa e pontos de coleta das amostras de areia na praia de Torres/RS



Em cada um dos pontos, aproximadamente 100g de areia foram coletadas com o auxílio de uma colher de aço inox na Linha da Maré Alta (LMA), assim como realizado por Dekiff *et al.* (2014), Jayasiri, Purushothaman e Vennila (2013) e Lefebvre *et al.* (2021). Essa Linha encontra-se na intersecção do terreno com a

superfície da água na altura máxima atingida por uma maré crescente, normalmente apresentando algas e outros materiais orgânicos em sua extensão, conforme apresenta a Figura 28A. Com o intuito de se garantir uma representatividade da amostra de areia em cada ponto, foi utilizada uma quadrícula de 1x1m, dividida em 25 quadrados de 20 cm cada, confeccionada com arames de alumínio e barbantes (Figura 28B). Essa quadrícula foi posicionada na superfície da areia em cada ponto durante o procedimento, e coletou-se cerca de 20g de areia até 5 cm de profundidade em cada um dos quatro cantos e no seu centro. Após a coleta, as amostras de areia foram armazenadas em potes de vidro, conforme apresenta a Figura 28C e foram encaminhadas para o laboratório para as etapas subsequentes.

Figura 28: Localização da Linha da Maré Alta (LMA) (A), pontos de coleta na quadrícula (B) e amostra de areia coletada (C)



8.2. Separação por densidades

Primeiramente, a etapa de separação consiste na preparação de uma solução salina saturada livre de impurezas com o intuito de separar os microplásticos dos sedimentos por meio de uma separação por densidade. A solução salina foi preparada dissolvendo-se 358,9 g sal de cozinha em 1L de água destilada em um béquer com agitação magnética a 600 rpm e uma temperatura de 60°C, conforme a

metodologia de Besley *et al.* (2017). Dessa solução, a parcela eventual com precipitado de sal foi descartada, e o sobrenadante foi acondicionado em outro béquer de 1L. Em seguida, a solução foi então filtrada a pressão reduzida em um funil de Buchner e kitasato utilizando-se um filtro de ésteres mistos de celulose com poros de 0,45um da marca Millipore com o auxílio de uma bomba a vácuo da marca Edwards modelo RV5. Essa filtração é importante porque remove possíveis impurezas, incluindo micropartículas poliméricas, presentes no sal comercial, como reporta Gündoğdu (2018), Iñiguez, Conesa e Fullana (2017) e Yang *et al.* (2015). Após a filtração, a solução permaneceu em repouso por 24h e coberta com uma folha de alumínio para evitar a contaminação de partículas em suspensão no ar.

Em seguida, a amostra de areia foi adicionada à solução salina com o auxílio de uma colher de aço inox. Após, a solução salina e areia foi agitada com um bastão de vidro durante dois minutos buscando desprender as partículas poliméricas das partículas de areia, conforme metodologia de Claessens *et al.* (2011). Depois, a solução permaneceu em repouso até que a água não estivesse mais turva, e todos os sedimentos estivessem presentes no fundo do béquer, fazendo com que as partículas poliméricas menos densas se mantivessem na camada sobrenadante da solução. Segundo Maes *et al.* (2017), 1h de repouso já é suficiente para fazer a separação, entretanto nesse estudo as soluções ficaram de 1-3h de repouso, visto que algumas amostras permaneceram um pouco turvas com apenas 1h de repouso.

Após o processo de repouso, a água localizada na parte sobrenadante do béquer foi coletada com o auxílio de uma pipeta de 3mL esterilizada, e filtrada sob pressão reduzida em um filtro de ésteres mistos de celulose com poros de 0,45um da marca Millipore com o auxílio de uma bomba a vácuo da marca Edwards modelo RV5. Após o processo de filtração, o filtro com as partículas foi disposto em uma placa de Petri de vidro ou de poliestireno previamente limpa com água destilada, e a solução salina foi adicionada novamente ao béquer contendo a areia para a realização de mais uma filtração seguindo os mesmos processos da primeira filtração. Essa segunda filtração foi realizada visto que algumas partículas poliméricas podem não serem coletadas durante a primeira filtração, como aponta Besley *et al.* (2017). Claessens *et al.* (2011) encontrou valores de eficiência de

extração de até 97,5% realizando o processo de filtração em duas etapas. Após essa segunda filtração, o filtro com as partículas poliméricas foi disposto em uma outra placa de Petri.

Em seguida, ambos os filtros com as partículas permaneceram em repouso para secar à temperatura ambiente durante 24h.

8.3. Digestão química

Após o repouso, as amostras presentes nos filtros foram submetidas a um processo de digestão dos possíveis contaminantes orgânicos, visto que esses podem comprometer as análises subsequentes. O processo de digestão utilizado foi a reação de Fenton, que consiste na destruição de compostos orgânicos, como por exemplo algas, a partir da reação de peróxido de hidrogênio com um catalisador de ferro (II). O catalisador de ferro foi obtido a partir de uma reação de sulfeto de ferro com ácido sulfúrico, conforme descrito por Masura *et al.* (2015). Para essa reação, foram adicionados 20 mL de catalisador de ferro e 20 mL de peróxido de hidrogênio em um béquer de 250 mL. Em seguida, os filtros com as amostras foram posicionados na parede interna do béquer e, com o auxílio de uma pipeta, o conteúdo do béquer foi utilizado para enxaguar a superfície dos filtros, fazendo com que todo o particulado fosse encaminhado para a solução. Ao perceber-se que o filtro estava visualmente limpo, esse era encaminhado para uma lupa para verificar se alguma partícula havia ficado retida. Caso fosse o caso, o filtro retornava para a parede do filtro e era enxaguado novamente. Esse processo se repetiu até que fosse evidenciado que todas as partículas fossem coletadas no béquer.

Com todas as partículas coletadas dentro da solução, o béquer foi colocado sobre um agitador magnético com aquecimento da marca Gehaka modelo AA-840, o qual foi aquecido até 70°C, dando início à reação. Assim, que a reação terminou de borbulhar, o béquer foi retirado do aquecimento e colocado ao lado, em uma capela de segurança para verificação da presença de matéria orgânica, e em seguida, o béquer retornou para o aquecimento por mais 30 minutos. Caso matéria orgânica ainda fosse visível, eram adicionados mais 20 mL de peróxido de hidrogênio e uma

nova reação ocorreria. Esse processo se repetiu até que não fosse mais visível a presença de material orgânico.

Após esfriar, a solução com as partículas foi filtrada sob pressão reduzida novamente em um filtro de ésteres mistos de celulose com poros de 0,45um da marca Millipore com o auxílio de uma bomba a vácuo da marca Edwards modelo RV5. Após esse processo, os filtros com as partículas foram posicionados em uma placa de Petri para ficarem em repouso *overnight* e secarem à temperatura ambiente.

8.4. Identificação e quantificação dos microplásticos

Após secos, os filtros com as partículas poliméricas foram encaminhados para um estereoscópio binocular da marca Olympus modelo SZ4045, e para um microscópio de fluorescência da marca Olympus modelo BX 53 para realizar a uma pré-identificação das partículas poliméricas. No estereoscópio binocular foram identificados mais facilmente fragmentos maiores e coloridos, enquanto no microscópio de fluorescência foram identificados fragmentos poliméricos menores e de difícil identificação, tais como filmes transparentes, e fibras, que possuem autofluorescência. As luzes utilizadas no microscópio de fluorescência foram a de coloração azul, de comprimento de onda 470 nm, com um filtro laranja, e a luz ultravioleta (350 nm). Algumas dessas partículas e fibras identificadas foram medidas e dispostas em uma fita dupla-face previamente colada em uma lâmina de microscopia e acondicionadas em uma nova placa de Petri para serem encaminhadas posteriormente à análise caracterização por μ Raman.

Após a separação dessa parcela de fragmentos e fibras para caracterização, foi realizada a etapa de quantificação, na qual foi realizada a contagem total de microplásticos em cada amostra de coleta. Essa etapa foi realizada, exclusivamente, no microscópio de fluorescência da marca Olympus modelo BX 53. Durante essa etapa, fez-se uso do fluoróforo *Nile Red* para a marcação das partículas remanescentes nos filtros, visto que muitas dessas não possuem autofluorescência, podendo apresentar uma subnotificação significativa. O *Nile Red* é um fluoróforo

muito utilizado para estudos de histologia, porém, ele tem sido muito utilizado para dar a característica de fluorescência em microplásticos coletados no meio ambiente, tornando possível e mais eficiente a quantificação desses em um microscópio de fluorescência (Meyers *et al.*, 2022). O procedimento de marcação foi realizado de acordo com o estudo de Prata *et al.* (2021), no qual os autores diluíram o *Nile Red* em etanol de grade de reagente em uma concentração de 0,01 mg/mL. Após a preparação, a solução com o fluoróforo foi pingada sobre os filtros com as partículas poliméricas, cobrindo-se toda a sua superfície. Após 5 minutos de repouso, e ainda no aparato de filtração, foi utilizada água destilada para lavar o filtro e remover o excesso de fluoróforo que não se aderiu aos microplásticos. Em seguida, o aparato de filtração foi ligado novamente para remover o excesso de umidade e o filtro foi retirado do aparato de filtração e colocado em repouso para secar dentro de uma placa de Petri por cinco minutos em temperatura ambiente.

Em sequência, as amostras foram encaminhadas para análise em um microscópio de fluorescência, a qual foi dividida em duas partes: a primeira varredura foi a varredura de fragmentos, onde a luz escolhida foi a de coloração azul, de comprimento de onda 470nm, com um filtro laranja, conforme apontado por Prata *et al.* (2019) como sendo a mais eficiente para a identificação da maioria dos polímeros. Nessa primeira varredura foram contabilizados somente os fragmentos acima de 50 μm que fluoresceram como sendo potenciais microplásticos. Isso porque fragmentos abaixo de 50 μm podem ser confundidos a algumas diatomáceas, que são microalgas de carapaça de silício, que podem não ter se dissolvido durante o processo de digestão e também possuem autofluorescência (Tang e Dobbs, 2007). Além disso, durante essa varredura, todos os fragmentos foram medidos com o auxílio do software CellSens do microscópio.

A segunda varredura foi necessária para identificação das microfibras, e a luz utilizada foi a ultravioleta, com comprimento de onda de 254 nm, conforme apresentado nos resultados de Prata *et al.* (2019) como sendo a mais eficiente para a identificação da maioria das microfibras. Entretanto, tanto as microfibras sintéticas quanto algumas fibras naturais, tais como celulose e algodão fluorescem sob a luz com esse comprimento de onda. Dessa forma, as microfibras, após serem

detectadas pela luz UV, passaram por uma segunda etapa de verificação, que consiste na verificação da morfologia superficial. A Tabela 3 apresenta alguns dos principais tipos de microfibras, bem como sua origem e suas características morfológicas.

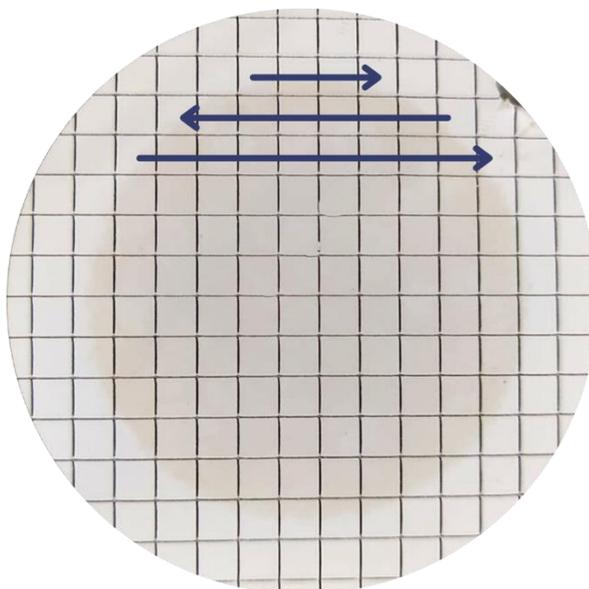
Tabela 3: Principais tipos de microfibras, sua origem e características morfológicas

Tipo da microfibra	Origem	Características morfológicas
Poliéster	Sintética	Tubular com pontos ou furos coloridos.
Poliamida	Sintética	Tubular com pontos ou furos coloridos.
PP	Sintética	Listras na superfície como cascas de árvores. As listras se apresentam paralelamente ao comprimento da fibra.
Acrílico	Sintética	Listras na superfície como cascas de árvores. As listras se apresentam paralelamente ao comprimento da fibra.
Celulósica	Natural	Tende a ser irregular. Possui lábios gordos nas bordas da fibra e é côncava para dentro, como um glóbulo vermelho desinflado.
Lã	Natural	Fibra segmentada. Os segmentos se apresentam perpendicularmente ao comprimento da fibra.
Seda	Natural	Semelhante às fibras celulósicas: irregulares e espirais. Podem ser um pouco tubulares.

Fonte: Adaptado de Zhu, 2019

Durante as quantificações de fragmentos e fibras nos filtros, as varreduras ocorreram conforme a Figura 29, de modo a utilizar as linhas horizontais e verticais do filtro para facilitar a trajetória da visualização e evitar falhas nas quantificações.

Figura 29: Indicação da trajetória da varredura no filtro durante a análise de microscopia



Fonte: O autor

Além disso, com o intuito de ter a informação visual e o comportamento de diferentes tipos de polímeros expostos às diferentes luzes (azul e UV) no microscópio de fluorescência e, com ou sem a adição do fluoróforo, foram realizados testes de fluorescência com polímeros comerciais conhecidos. Assim, neste teste foram utilizados os polímeros polietileno (PE), polipropileno (PP), politereftalato de etileno (PET), poliestireno (PS), poliestireno expandido (EPS), policloreto de vinila (PVC), poliamida (PA), acrílico e também as fibras de poliéster e viscose.

É importante ressaltar que os 100 g de areia coletados em cada ponto amostral representam um n amostral, ou seja, sabendo-se que a quantidade de pontos de coleta é de 30 pontos, o valor de n amostral total submetido à microscopia de fluorescência também é de 30.

8.5. Caracterização por μ Raman

As partículas que foram separadas e dispostas sobre uma fita dupla-face em lâmina de microscópio foram encaminhadas para a análise de μ Raman para a identificação do seu tipo de polímero. Essa análise ocorreu em um equipamento da marca Witec modelo Alpha300R utilizando-se um tempo de aquisição dos dados de 5 a 10s e cinco acumulações. Para a confirmação dos tipos dos polímeros, os espectros obtidos para cada amostra de microplástico foram comparados aos espectros do banco de dados *OpenSpecy*. Nessa biblioteca, o polímero com maior correspondência, atingindo um mínimo de 0,8 para o coeficiente de correlação de Pearson, foi identificado como sendo o tipo do polímero em questão. Essa metodologia foi adaptada de Vidyasakar *et al.* (2020). Quando a correspondência entre o polímero em questão e o banco de dados não superou o valor de 0,8 para o coeficiente de correlação de Pearson, buscou-se na literatura por diversos artigos que apresentassem o espectro avaliado para identificar a composição do polímero.

É importante destacar que, da amostra total, foram analisadas 60 amostras por μ Raman, das quais 42 foram possíveis de identificar.

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1. Quantificação dos microplásticos

Em relação aos diferentes polímeros utilizados como teste deste método, a Figura 30 apresenta a fluorescência dos diferentes tipos de polímeros, com e sem a marcação com o fluoróforo *Red Nile*, sob as luzes branca, UV e azul.

Figura 30: Fluorescência dos diferentes tipos de polímeros, com e sem a marcação com o fluoróforo *Red Nile*, sob as luzes branca, UV e azul

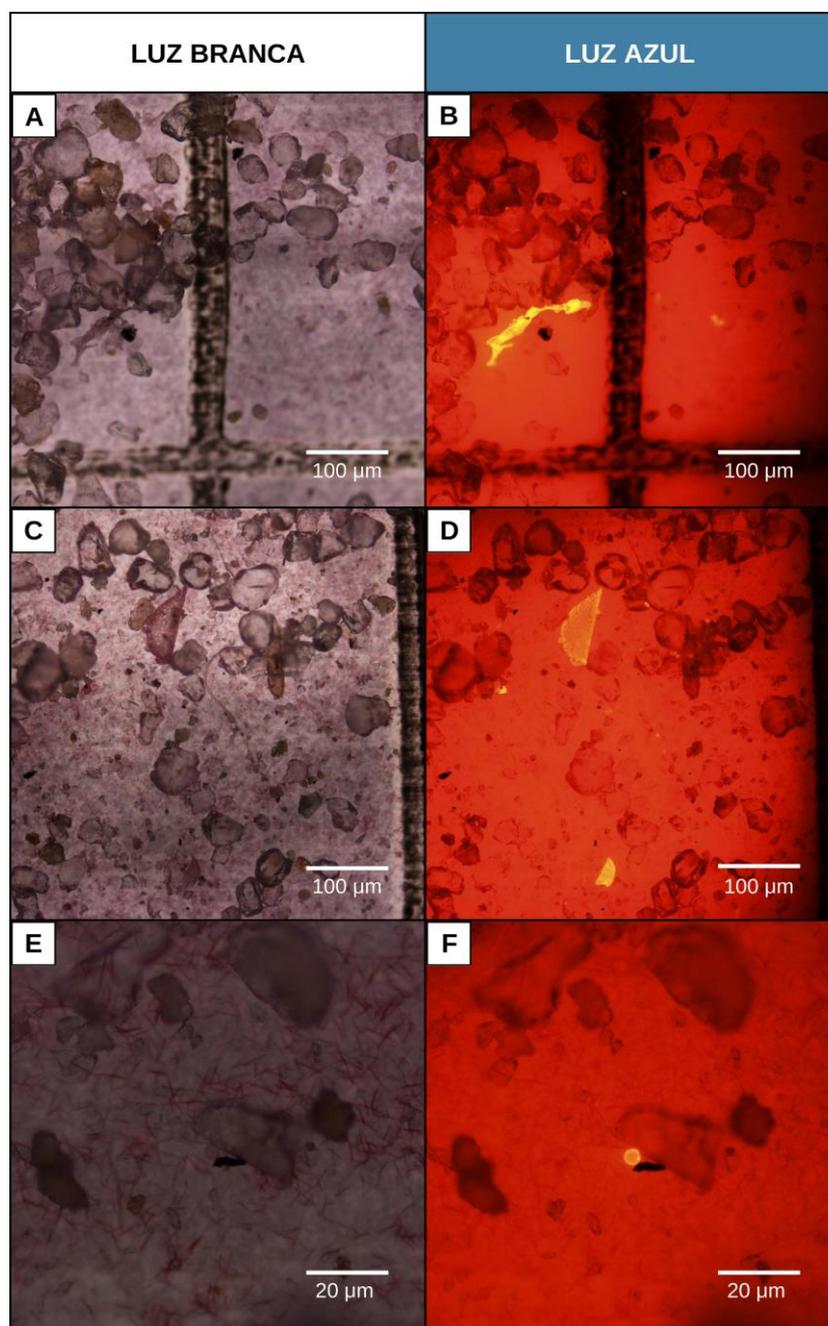
	Sem Vermelho de Nilo			Com Vermelho de Nilo		
	Luz Branca	Luz UV	Luz Azul	Luz Branca	Luz UV	Luz Azul
PE						
PP						
PET						
PS						
EPS						
PVC						
Nylon						
Acrílico						
Poliéster						
Viscose						

A partir da Figura 30 é possível notar que a presença do fluoróforo é significativa na fluorescência dos polímeros. Também é possível verificar que a luz

azul, na presença do fluoróforo é a combinação mais eficiente para a identificação dos polímeros, com exceção das fibras de acrílico, que são mais facilmente identificadas utilizando-se a luz UV.

Após esse teste de fluorescência realizado e a partir das etapas de coleta, separação e digestão, as micropartículas poliméricas foram marcadas com o fluoróforo *Red Nile* e foram encaminhadas para a microscopia de fluorescência onde essas foram quantificadas e tiveram as suas dimensões mensuradas. A Figura 31 apresenta algumas partículas encontradas durante a etapa de análise por microscopia de fluorescência.

Figura 31: Partículas encontradas durante a etapa de análise por microscopia de fluorescência em diferentes aumentos e sob diferentes luzes. (A) e (C) 100 μm e luz branca, (B) e (D) 100 μm e luz azul, (E) 20 μm e luz branca, (F) 20 μm e luz azul



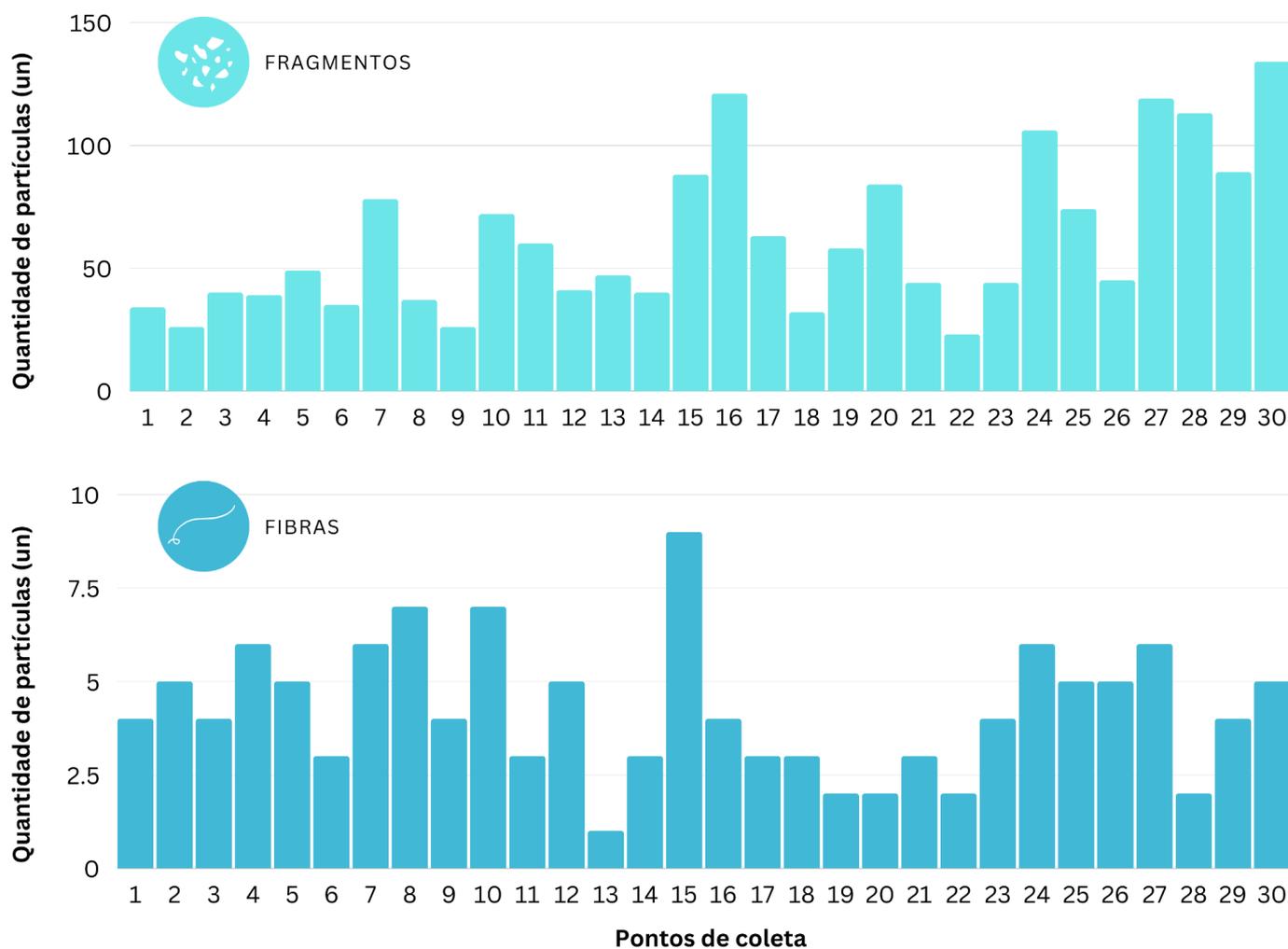
A partir da Figura 31 é possível observar os diferentes tamanhos e estruturas de alguns dos microplásticos encontrados. As Figuras 16B, D e F apresentam partículas poliméricas sob a luz azul do microscópio, evidenciando a sua presença a

partir da fluorescência, enquanto que as mesmas partículas sob luz branca, são apresentadas, respectivamente, nas Figura 16A, C e E.

As Figura 31C-D apresentam fragmentos rígidos, enquanto que o fragmento presente nas Figura 31A-B aparenta ser mais flexível, como um pedaço de sacola plástica. Todos esses são microplásticos gerados a partir de algum processo degradativo, portanto são considerados microplásticos secundários. Entretanto a partícula presente nas Figura 31E-F apresenta um formato esférico perfeito, o que indica que seja, provavelmente, um microplástico primário. Microesferas poliméricas, ou *microbeads*, são muito utilizadas em cosméticos, estando presente, principalmente, em esfoliantes (Hunt, Lin e Voulvoulis, 2021). Visto que a aplicação de esfoliantes, não ocorre normalmente na costa da praia, essa partícula provavelmente foi lixiviada sendo encaminhada para o esgoto, e eventualmente atingiu algum corpo hídrico. Assim nesse processo, o seu destino provável foi o oceano, o qual se encarregou de conduzir a partícula até a areia da praia. Apesar de serem encontrados nas amostras, os *microbeads* não foram contabilizados na etapa de quantificação devido à dificuldade de identificação, sendo essa etapa exclusiva para fragmentos e fibras. Porém, convém realizar o registro de que essas partículas foram encontradas nas amostras.

A partir da microscopia de fluorescência, foi possível realizar a quantificação das partículas coletadas nos pontos da Praia Grande em Torres/RS. A Figura 32 apresenta a quantidade de microplásticos encontrados em cada ponto amostral, diferenciando-os por fibras e fragmentos.

Figura 32: Quantidade total de microplásticos, diferenciando-os por fragmentos e fibras, encontrados em cada ponto amostral



A partir dos valores da quantificação total, foi desenvolvido um mapa com as concentrações dos microplásticos em cada um dos pontos amostrais (Figura 33).

Figura 33: Mapa com as concentrações de microplásticos em cada ponto amostral



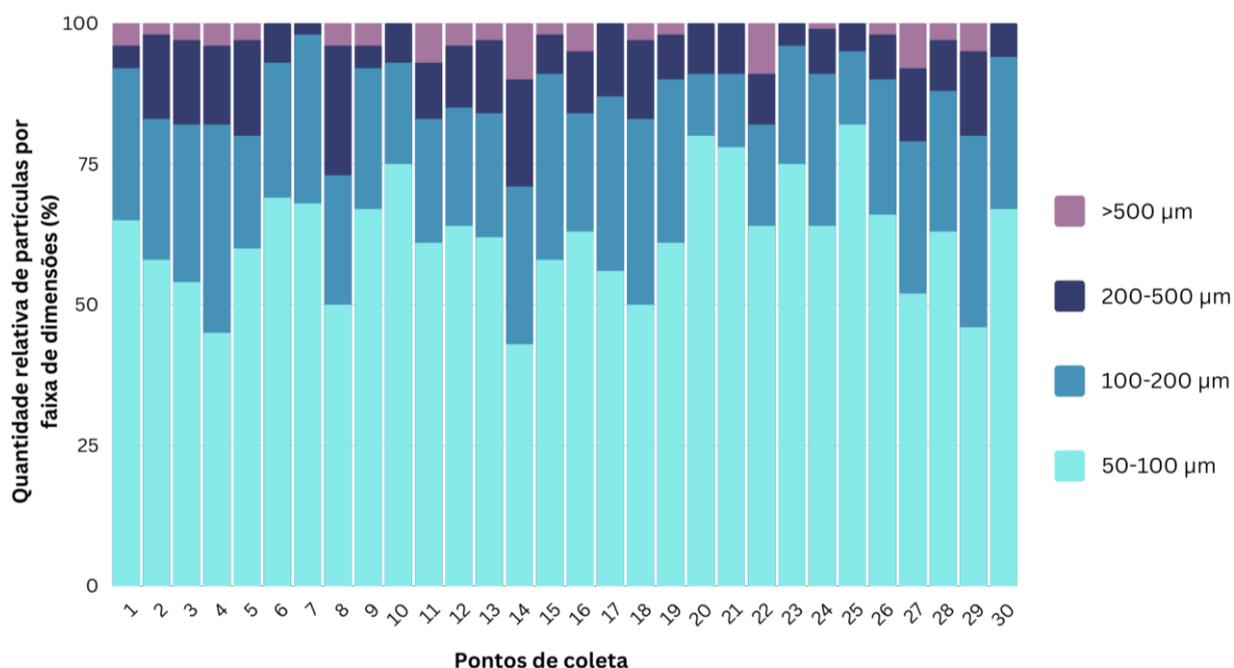
A partir dos resultados de quantificação dos microplásticos presentes na Figura 33, é possível verificar que ao longo da maior parcela da costa, entre o ponto mais ao sul e um pouco ao norte do meio da praia, não há uma correlação entre a posição os pontos de coleta com a quantidade de microplásticos. Ou seja, a dispersão desses contaminantes ocorre de forma, relativamente, homogênea na costa da praia. Esse resultado era esperado visto que, apesar de estes microplásticos serem gerados, principalmente, durante processos degradativos,

esses podem ser conduzidos, dispersos nas águas do mar e redistribuídos ao longo da costa.

Entretanto, na porção mais ao norte da costa, próximo ao Rio Mampituba, é possível verificar um aumento significativo na concentração de microplásticos

Além da medição da quantidade de microplásticos, as dimensões dos microfragmentos foram mensuradas e categorizadas entre: <50µm, 50-100µm, 101-500µm e >500µm, conforme apresenta a Figura 34.

Figura 34: Quantidade relativa de microplásticos por faixa de dimensões encontrados em cada ponto amostral



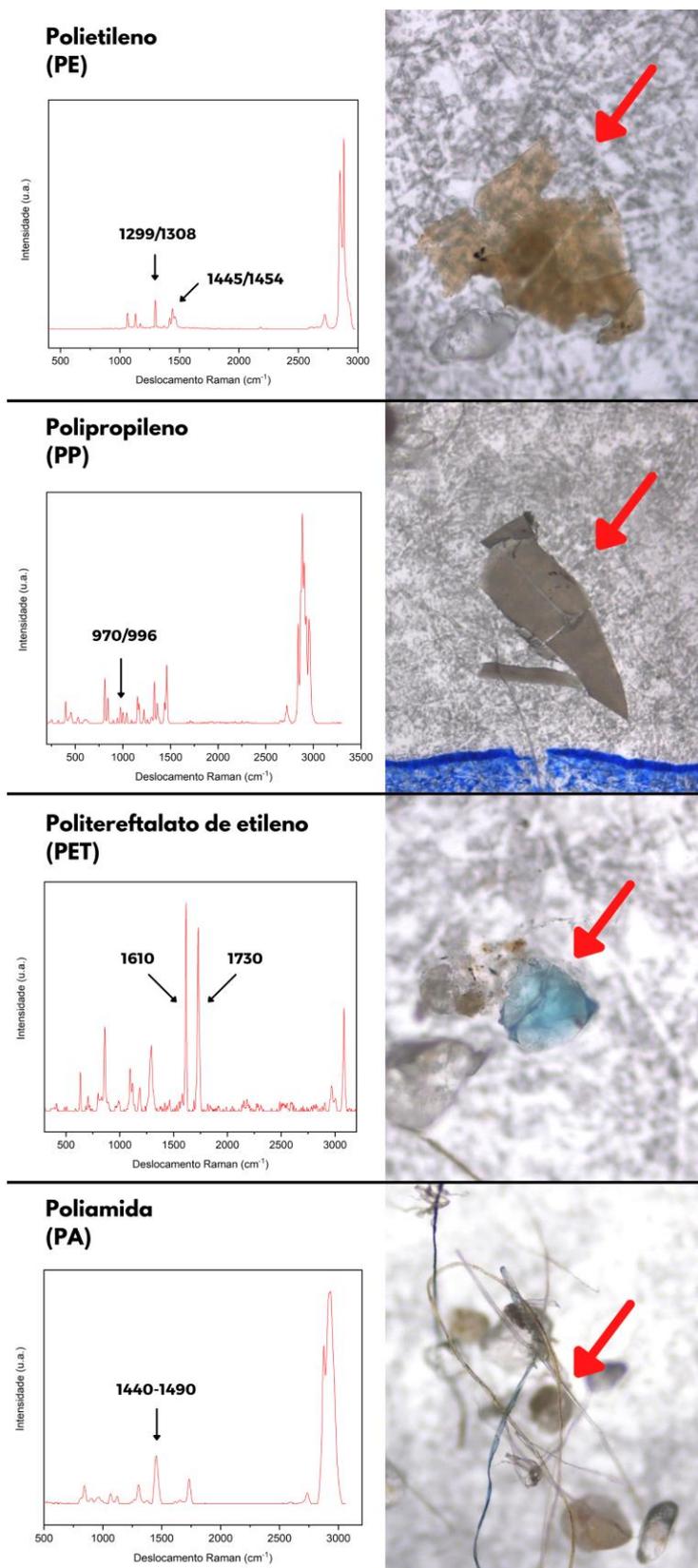
A partir da Figura 34, é possível observar que a maioria dos microplásticos encontrados nas amostras possuem entre 50-100µm. Isso pode ser explicado devido ao fato de que os polímeros, ao se degradarem geram partículas, e essas também se degradam gerando partículas menores, e assim por diante. Assim, ao longo de um processo degradativo de polímeros, dependendo do período de exposição, há uma maior tendência de se apresentar uma maior quantidade de partículas

pequenas do que partículas maiores, como apresenta o estudo de Song *et al.* (2017).

Além disso, a Figura 34 não apresentou tendências na alteração das dimensões em relação à sua posição no ponto amostral. Isso corrobora com a discussão de que os microplásticos podem ser conduzidos, dispersos nas águas do mar e redistribuídos ao longo da costa.

9.2. Identificação e caracterização dos microplásticos

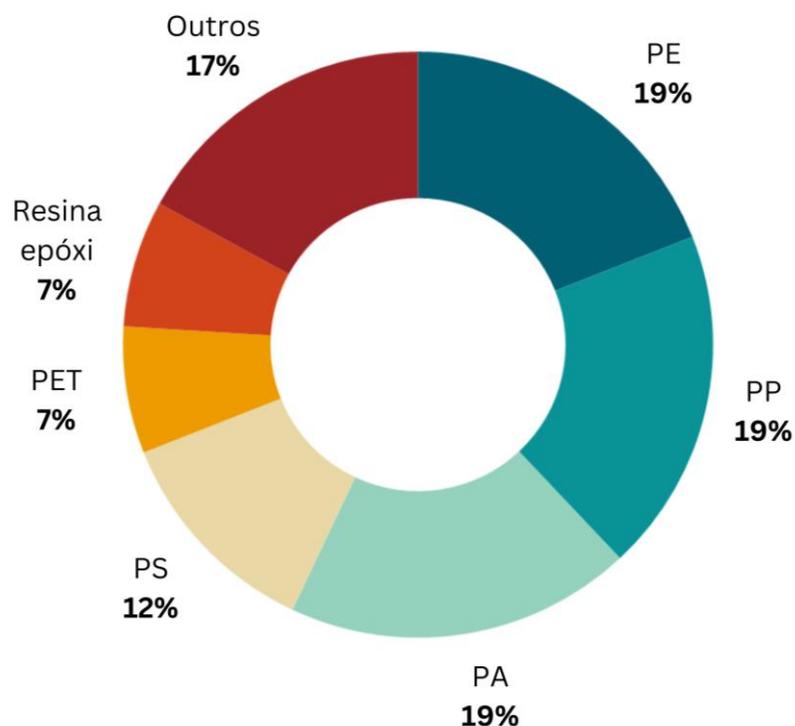
A partir da análise de uRaman, foi possível identificar os tipos dos polímeros das partículas presentes nas amostras. A Figura 35 apresenta as imagens de amostras de alguns microplásticos no microscópio bem como os seus respectivos espectros Raman.

Figura 35: Imagens de alguns microplásticos encontrados e seus respectivos espectros Raman

Em relação aos espectros de Raman, além da comparação dos espectros das partículas encontradas com os espectros do banco de dados *OpenSpecy*, foram identificadas as bandas características desses materiais, conforme apresenta a Figura 35. De acordo com Nochi, Ozaki e Sato (2021), uma das bandas características da poliamida é localizada entre 1440-1490 cm^{-1} , que representa a deformação nas ligações (OC)-N-H. Segundo Adarsh *et al.* (2022), duas bandas características do PET são 1730 cm^{-1} e 1610 cm^{-1} que representam, respectivamente, o estiramento das ligações do grupo carbonila C=O e das ligações duplas de anel aromático. Os mesmos autores também apontam a banda presente entre 1445-1454 cm^{-1} e 1299-1308 cm^{-1} como deformação e torção, respectivamente, das ligações C-H do grupo CH_2 , características do PE e as bandas de 970 e 996 cm^{-1} como deformação das ligações C-H do grupo CH_3 , características do PP.

A partir da análise de todas as micropartículas submetidas a técnica de uRaman, foi possível obter os dados da quantidade (%) de cada tipo de polímero em relação à amostra total. A Figura 36 apresenta os tipos dos polímeros das partículas, bem como sua frequência em relação à amostra total.

Figura 36: Tipos dos polímeros das partículas e sua frequência em relação à amostra total

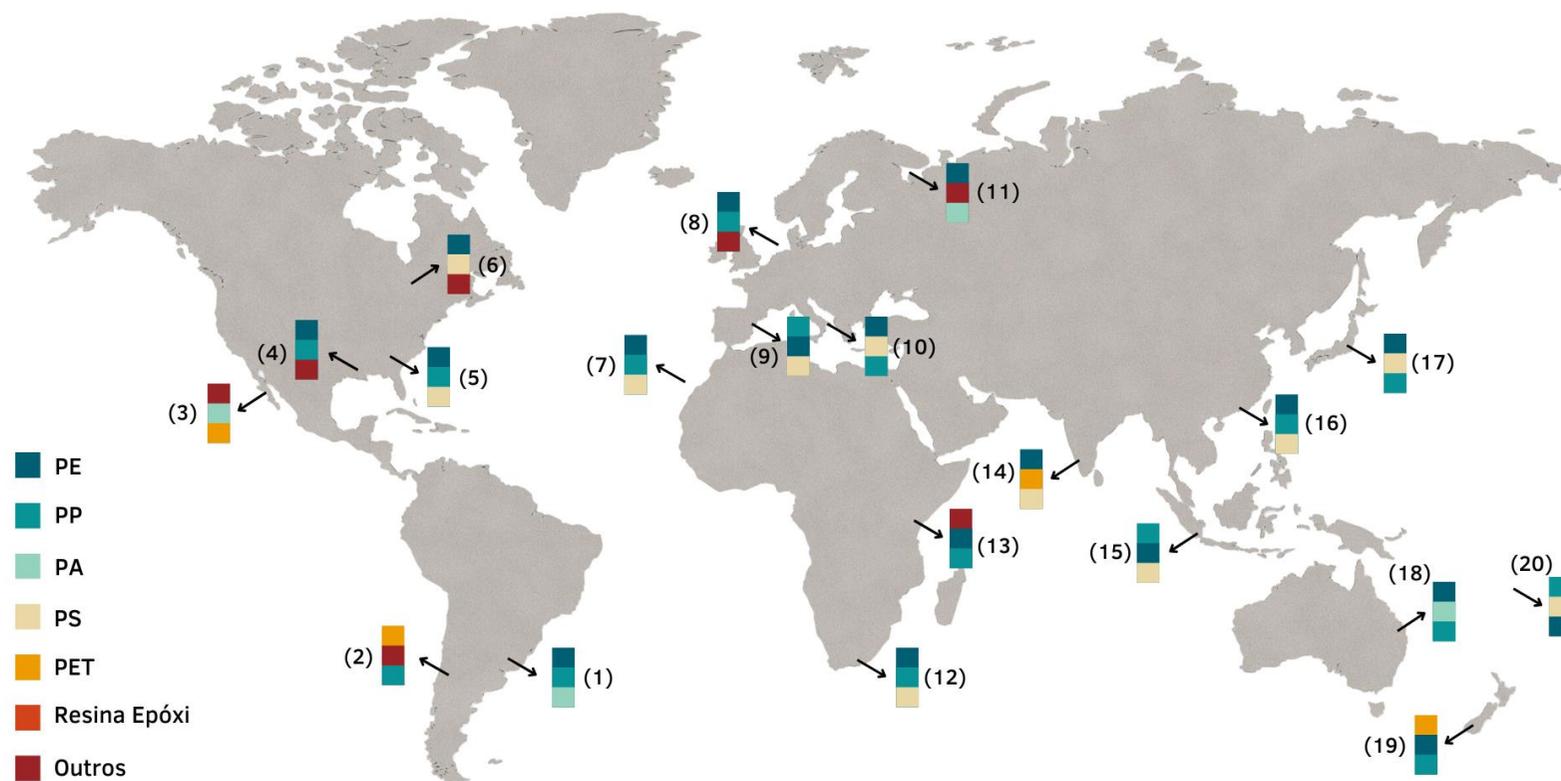


A partir da Figura 36, é possível observar que o polietileno (PE), o polipropileno (PP) e a poliamida (PA) são os tipos de plásticos mais encontrados nas amostras, com 19% da representação total das partículas encontradas. Na sequência, encontram-se o poliestireno (PS) (12%), o politereftalato de etileno (PET) (7%), Resina Epóxi (7%) e outros (17%), grupo que engloba outros tipos de plásticos que, individualmente, não apresentaram frequência significativa, tais como PMMA, silicone, PVC, entre outros. Esses resultados são esperados visto que o PE é o polímero mais produzido no mundo atualmente, seguido do PP. A poliamida, apesar de não ter uma produção tão expressiva quanto as poliolefinas, é um dos principais materiais das linhas de pesca, e isso pode explicar a sua frequência expressiva nas amostras. Em uma das praias do estudo de Vemkatranan (2022), na Índia, os principais tipos de polímeros encontrados também foram o PE, PP e poliamida.

Com o intuito de comparar os resultados das composições dos microplásticos deste com outros estudos, foi elaborada a Figura 37. Nessa figura estão apresentados os três principais tipos de plásticos encontrados na composição de

microplásticos presentes em regiões costeiras ou próximas de rios e lagos em diferentes localizações do mundo.

Figura 37: Mapa com os principais tipos de plásticos encontrados em regiões costeiras e próximas a ambientes aquáticos em diversas localizações do globo



- | | | | |
|---|---|--|--|
| (1) Brasil - Esse estudo | (6) Canadá - Ballent A. et al. (2016) | (11) Rússia - Zhdanov I. et al. (2022) | (16) China - Chai B. et al. (2022) |
| (2) Chile - Jorquera A. et al. (2022) | (7) Ilhas Canárias - Edo C. et al. (2019) | (12) África do Sul - Mbedzi R. et al. (2020) | (17) Japão - Kobayashi T. et al. (2021) |
| (3) México - Piñon-Colin T. J. et al. (2018). | (8) Mar do Norte - Cabernard L. et al. (2018) | (13) Quênia - Migwi F. K. et al. (2020) | (18) Austrália - He B. et al. (2020) |
| (4) Estados Unidos - Jiang X. et al. (2022) | (9) França - Constant M. et al. (2019) | (14) Índia - Tiwari M. et al. (2019) | (19) Nova Zelândia - Bridson J. H. et al. (2020) |
| (5) Estados Unidos - Wessel C. C. et al. (2016) | (10) Itália - Campanale C. et a. (2020) | (15) Indonésia - Azizi A. et al. (2021) | (20) Fiji - Nabhani K. A. et al. (2022) |

A partir da Figura 37 é possível observar que há uma predominância na presença do PE, PP e PS nas amostras da maioria dos países. Esse resultado é esperado visto que as poliolefinas são os polímeros mais produzidos no mundo (Figura 9), tendo como algumas das suas principais aplicações embalagens e sacolas plásticas, utilidades domésticas, frascos, entre outras. O PS tem como principais aplicações recipientes de armazenamento de alimentos, copos, pratos e talheres descartáveis, artigos de escritório e domésticos, entre outras aplicações, incluindo em setores da construção civil e da indústria elétrica, eletrônica e automobilística. A poliamida, também se mostrou relativamente presente em alguns locais, incluindo o deste estudo. É um material muito utilizado no setor de pesca, presente em produtos tais como linhas e também é utilizado na fabricação de roupas e outros tecidos. Outro plástico que apresentou relevante contaminação em alguns locais foi o PET. Isso pode ser em virtude de suas aplicações comuns, tais como recipientes de líquidos, bandejas de alimentos, roupas e garrafas de refrigerantes.

VOLUME III:

GERAÇÃO DE MICRO E NANOPLÁSTICOS DE POLIPROPILENO (PP) E
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS AO LONGO DO
DESENVOLVIMENTO DE ZEBRAFISH (*Danio Rerio*)

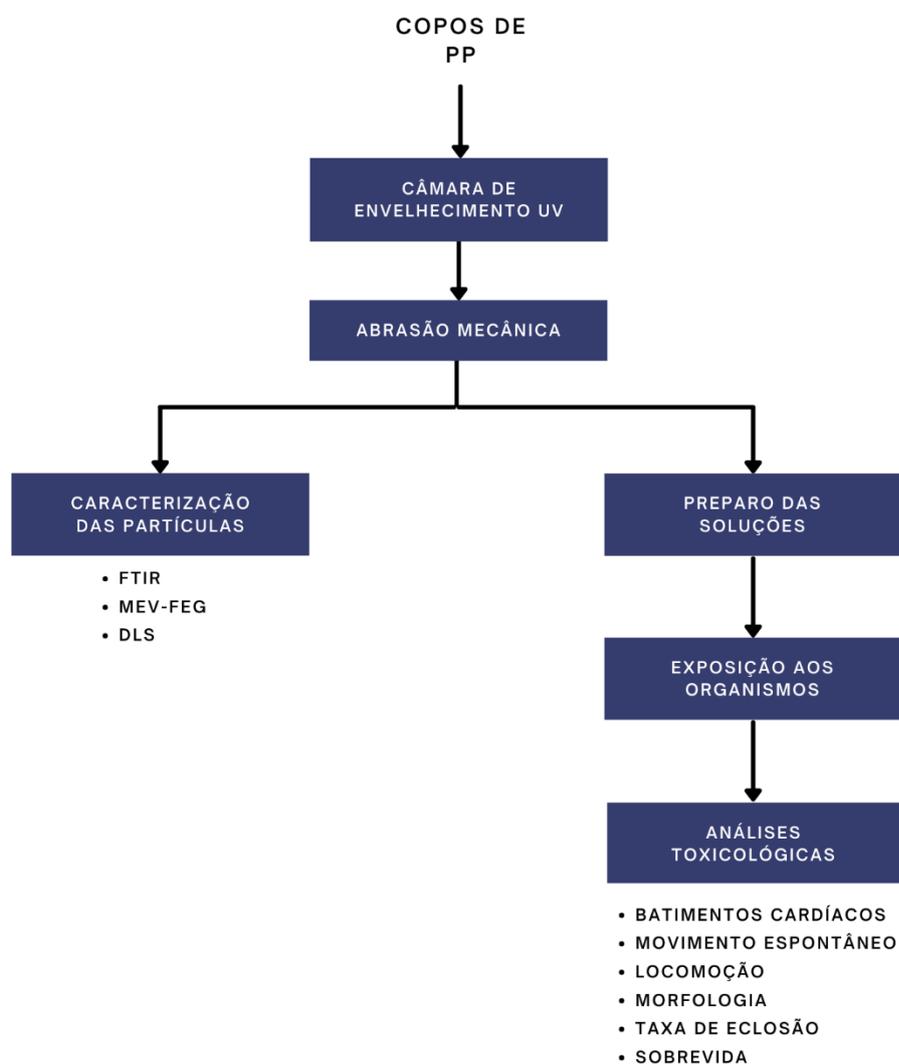
10. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO VOLUME III

- Gerar micro e nanopartículas de polipropileno a partir de um produto comercial;
- Caracterizar as micro e nanopartículas de PP geradas em função de suas características químicas por meio de análises de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e suas dimensões por meio de análises de Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG) e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS);
- Avaliar a toxicidade das micro e nanopartículas de PP geradas em organismos embriões de *zebrafish* (*Danio rerio*).

11. METODOLOGIA

A metodologia para a geração das micro/nanopartículas de PP, seguido da sua caracterização, preparo das suspensões, exposição ao *zebrafish* e suas análises toxicológicas estão descritas nos itens abaixo e seguem o fluxograma apresentado na Figura 38.

Figura 38: Fluxograma dos processos desta etapa de estudo de caracterização e avaliação da toxicidade de micro e nanopartículas



11.1. Geração das partículas

O produto comercial utilizado para a produção das partículas foi o copo plástico de polipropileno (PP). Para a geração das micro/nanopartículas poliméricas, foi utilizada a combinação de duas técnicas: a fotodegradação, por meio da exposição do material à uma câmara de envelhecimento acelerado; e degradação mecânica, por meio da abrasão entre dois vidros relógios; de maneira a simular o

que ocorre com resíduos poliméricos no meio ambiente, como aponta Gigault *et al.* (2021).

11.2. Exposição à Câmara de Envelhecimento Acelerado

Para que os materiais fossem expostos à câmara UV de maneira a evitar que se soltassem dos suportes, foram preparados novos suportes de folha alumínio, com um formato que coletasse possíveis fragmentos e partículas que se desprendessem da amostra, evitando a perda de material. Esses suportes confeccionados foram aderidos aos suportes já existentes na câmara de envelhecimento acelerado, visto que esses são necessários para manter a temperatura controlada dentro do ambiente interno da câmara, a qual é um dos requisitos da norma ASTM G154.

Copos comerciais de polipropileno foram cortados em fragmentos de, aproximadamente, 4x4 cm, com o auxílio de uma tesoura. Esses fragmentos foram fixados nos suportes de alumínio confeccionados e encaminhados para a exposição à câmara de envelhecimento.

As amostras ficaram expostas à radiação UV por um período de 30 dias, o qual foi avaliado previamente como sendo tempo suficiente para degradar a amostra a ponto de se gerar micro/nanopartículas a partir de sua maceração. Após esse período, as amostras expostas foram coletadas da câmara e acondicionadas em uma placa de Petri, e novas amostras de polipropileno recortadas foram expostas. Esse processo se repetiu ao longo de todos os experimentos a fim de se garantir a quantidade suficiente de amostras.

O processo de exposição à câmara de envelhecimento acelerado foi realizado em um equipamento da marca QLAB, modelo QUV/Spray de acordo com a norma ASTM G154 adaptada, prevendo o uso de lâmpadas do tipo UVA-340 com uma irradiância de 0,89 W/m². Ao longo da exposição à radiação UV, o polipropileno começa a apresentar sinais de degradação, tais como a geração de grupos oxigenados, fragilização da superfície, e o desenvolvimento de microfissuras, os

quais podem contribuir para a geração de micropartículas, principalmente, quando exposto à abrasão mecânica (Andrady, 2011; Song *et al.*, 2017).

11.3. Degradação mecânica por meio de abrasão

A partir da degradação foto-oxidativa causada pela radiação UV, os fragmentos de polipropileno tornaram-se frágeis o suficiente para serem reduzidos a micro/nanopartículas a partir da abrasão mecânica. Dessa forma, para se testar o potencial de geração de micro e nanopartículas, esses fragmentos foram submetidos a um processo de abrasão, onde os fragmentos foram posicionados entre dois vidros relógios e a partir disso, foram realizados movimentos mecânicos repetitivos para frente e para trás, permitindo que ocorresse um processo de abrasão. Foram testados diferentes tempos de exposição à abrasão, fazendo com que as partículas geradas tivessem os seus tamanhos medidos em um Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG), e o tempo otimizado foi a exposição por dois minutos, sendo que tempos menores do que dois minutos apresentaram tamanhos de partículas maiores, e tempos maiores não apresentaram diferenças nos tamanhos. Ao final do processo de abrasão, os dois vidros relógios junto com as partículas geradas foram encaminhadas para um banho ultrassônico com água destilada durante um período de cinco minutos. Após essa etapa foi possível obter as suspensões das partículas micro e nanométricas.

11.4. Caracterização das micro/nanopartículas de PP

As amostras de micro/nanopartículas de polipropileno foram caracterizadas a partir de suas propriedades químicas, térmicas, morfológicas e físico-químicas.

11.4.1. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas para avaliar possíveis alterações na estrutura química das micro/nanopartículas de PP geradas. Esta análise foi realizada em um equipamento da marca PerkinElmer, modelo Spectrum 3, no Laboratório de Espectroscopia da PUCRS. A região de comprimento de onda analisada foi de 400 a 4000 cm^{-1} acumulando-se 14 varreduras e o modo de aquisição utilizado foi o de Refletância Total Atenuada (ATR), sendo esse realizado diretamente na superfície das amostras.

11.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG)

A caracterização da morfologia das partículas foi realizada a partir da análise de Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV-FEG). O equipamento utilizado para as análises foi um microscópio da marca FEI, modelo Inspect F50, a uma tensão de aceleração de 20 kV no Laboratório Central de Microscopia e Microanálise da PUCRS. As amostras das suspensões contendo as micro e nanopartículas foram fixadas em *stubs* com auxílio de fita carbono, de cobre ou silício e após, foram secas em uma estufa a 60°C por duas horas. Em seguida, as amostras secas foram submetidas a metalização com ouro na sua superfície. Após essa etapa, as amostras foram então encaminhadas para a análise de MEV-FEG.

11.4.3. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A análise de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) foi realizada com o intuito de medir os tamanhos das partículas poliméricas. Essa análise foi realizada em um equipamento Malvern modelo Zetasizer Nano ZS no Centro Interdisciplinar de Nanociência e Micro-Nanotecnologia (NanoPUCRS), na qual foi utilizada uma cubeta de quartzo. A amostra que foi submetida à análise foi uma suspensão de 1 mg/L de

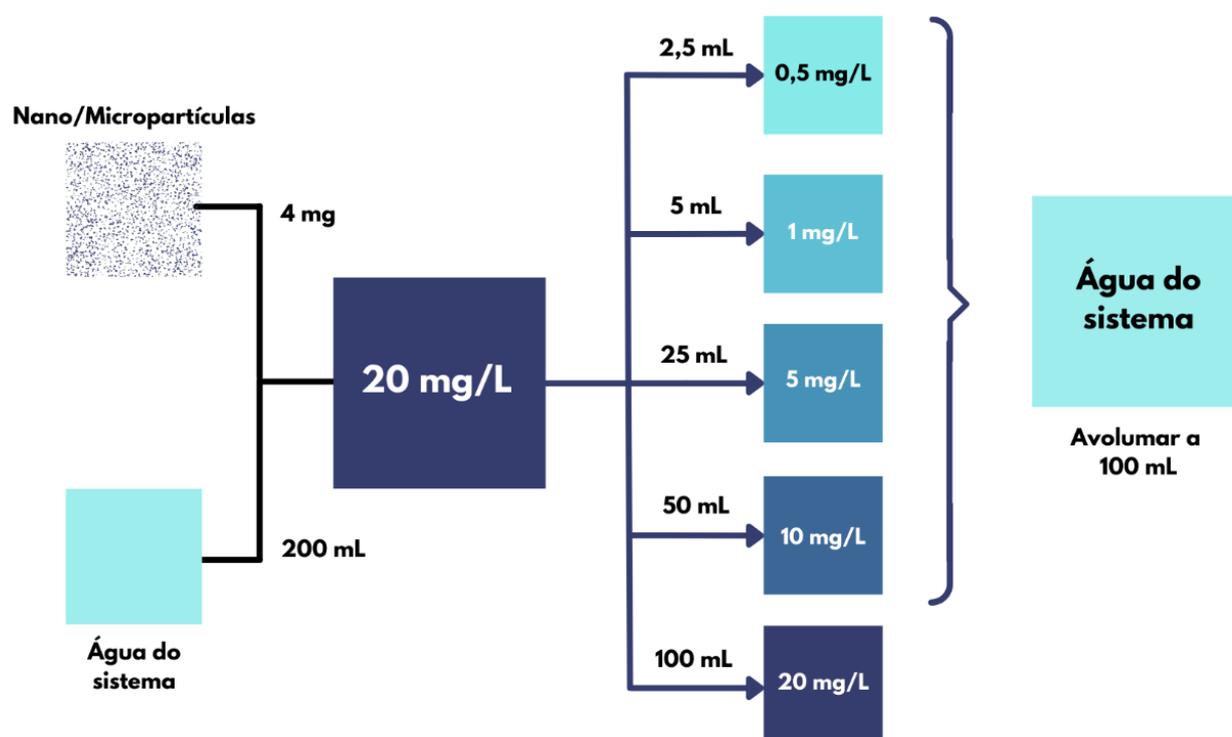
partículas de polipropileno preparada com água Milli-Q e o ensaio foi realizado em triplicata.

11.5. Preparação das suspensões para exposição dos organismos

Para a preparação das suspensões de exposição ao *zebrafish*, foi necessário a preparação de uma “suspensão-mãe”, a partir da qual foram realizadas diluições para obtenção das concentrações finais das partículas poliméricas para cada uma das suspensões. A suspensão-mãe foi preparada a partir de uma série de etapas, iniciando-se pela pesagem de 4 mg da amostra de polipropileno exposto à câmara de envelhecimento UV por 30 dias. Essa amostra foi então exposta ao protocolo de degradação mecânica por meio de abrasão, e por fim, as amostras foram encaminhadas para um banho ultrassônico em um béquer contendo 200 mL de água do sistema dos organismos (água de recirculação do sistema dos aquários das matrizes) durante um período de cinco minutos. Dessa forma, após o tempo do ultrassom, obteve-se a suspensão-mãe com uma concentração de partículas de 20 mg/L. A partir dessa suspensão, foram realizadas diluições para se obter as outras suspensões a serem expostas aos organismos com as seguintes concentrações: 0,5 mg/L; 1 mg/L; 5 mg/L; 10 mg/L, 20 mg/L. Essas concentrações foram escolhidas porque já foram utilizadas em outros estudos do grupo de pesquisa, porém utilizando-se outros polímeros.

A Figura 39 apresenta o esquema de diluição para a obtenção de cada uma das concentrações das suspensões utilizadas nesse estudo.

Figura 39: Esquema de diluição para a obtenção de cada uma das concentrações das suspensões utilizadas nesse estudo



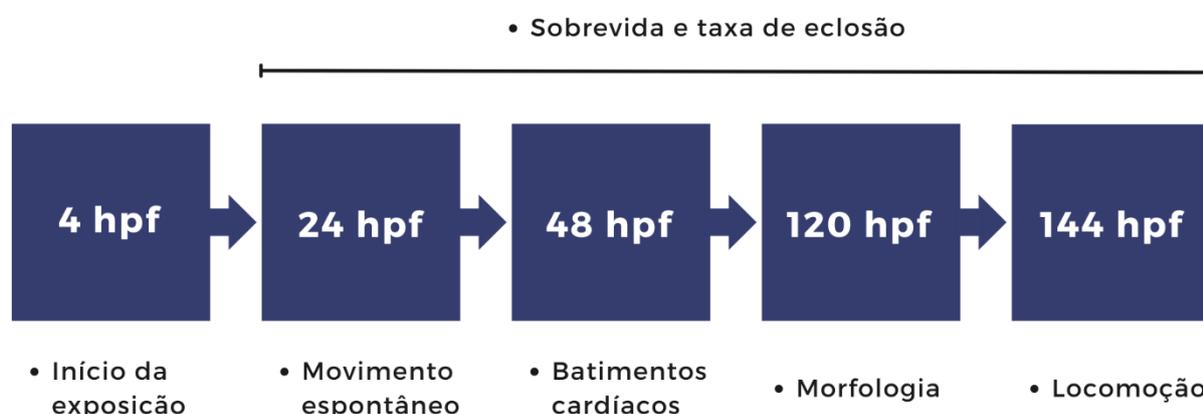
11.6. Manutenção dos organismos *zebrafish*, reprodução e coleta dos embriões

Matrizes de acasalamento, mantidas em sistema recirculante sob condições padrão no vivário do prédio 14 (CeMBE/PUCRS), foram reproduzidos na proporção de dois machos para uma fêmea, separados por barreira transparente removível *overnight*, e o acasalamento foi induzido no início da manhã seguinte. Os embriões provenientes do cruzamento foram coletados cerca de uma hora após a fecundação (hpf) e passaram por limpeza de *debris* para posterior exposição. A manipulação dos animais foi realizada por equipe treinada, supervisionada por membros experientes, seguindo as normas institucionais e legislação vigente. Além disso, esse projeto foi avaliado e teve aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (nº 9518) em relação à ética no uso dos animais.

11.7. Delineamento experimental

As exposições tiveram início até quatro horas após a fertilização (hpf), onde embriões saudáveis escolhidos aleatoriamente foram colocados em Placas de Petri de plástico. Para cada concentração e para o grupo controle foram utilizadas duas placas, sendo que em cada placa foram adicionados cem. Todas as placas foram mantidas em uma incubadora de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) com temperatura estável ($28,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) e luz controlada: ciclo escuro (14:10). Todas as suspensões de exposição foram substituídas a cada 24h até 144 hpf, para um protocolo de exposição de 6 dias, com base em estudo prévio (Pereira, T. C. B., Santos, *et al.*, 2020). Os parâmetros *in vivo* foram realizados em períodos específicos da fase de desenvolvimento do animal, onde: em 24 hpf foi mensurado o movimento espontâneo; em 48 hpf, batimentos cardíacos; em 72 hpf, morfologia; e em 144 hpf, o comportamento locomotor. Além disso, ao longo de todo o experimento serão contabilizados os organismos vivos e mortos a fim de se obter os valores de sobrevivência, e também a taxa de eclosão. O desenho experimental está resumido na Figura 40.

Figura 40: Desenho experimental da avaliação da toxicidade no zebrafish durante a exposição à micro e nanopartículas de PP



11.8. Movimento espontâneo

A análise do movimento espontâneo dos embriões de *zebrafish* foi realizada em 24 hpf, conforme protocolo de (Pereira, T. C. B., Santos, *et al.*, 2020). Os animais foram aclimatados por um minuto e os eventos de movimento espontâneo foram contabilizados no minuto seguinte através de um estereoscópio binocular da marca Olympus modelo SZ4045.

11.9. Batimentos cardíacos

A avaliação dos batimentos cardíacos dos embriões e das larvas de *zebrafish* foi realizada em 48 hpf, conforme protocolo de (Pereira, T. C. B., Santos, *et al.*, 2020). Os animais foram aclimatados por um minuto e os batimentos cardíacos foram contabilizados no minuto seguinte através de um estereoscópio binocular da marca Olympus modelo SZ4045.

11.10. Morfologia

A avaliação morfológica foi realizada em um microscópio invertido da marca Nikon, modelo SMZ 1500, com uma câmera digital acoplada, durante o período de 120 hpf. Durante esse experimento foram analisados os seguintes parâmetros: comprimento do corpo (mm), distância ocular (mm) e área total dos olhos (mm²), na vista dorsal conforme metodologia de (Pereira, T. C. B., Santos, *et al.*, 2020). Todos os parâmetros foram medidos utilizando-se imagens calibradas com o software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

11.11. Locomoção

As larvas de *zebrafish* foram testadas e analisadas em relação a sua atividade locomotora, no último dia de exposição (144 hpf). Utilizando-se o protocolo de Lutte *et. al* (2015), os animais foram dispostos em uma placa contendo vinte e seis poços,

sendo alocada uma larva por poço com água do sistema. Os animais foram aclimatados antes das filmagens por um período de um minuto, e após, foi registrado seu comportamento através de uma câmera digital de alta resolução (Logitech®) no período de cinco minutos. Os parâmetros analisados foram velocidade média (cm/s), distância total coberta (cm), tempo total na periferia da arena (s) e meander absoluto (°/cm), através de software especializado EthoVision XT (Noldus Information Technology bv, Wageningen - The Netherlands).

11.12. Taxa de eclosão e sobrevida

A análise de sobrevida foi realizada ao longo de todo o período de exposição dos animais. Durante as exposições, os animais foram monitorados nos tempos 24, 48, 72, 96 e 144 hpf através de um estereoscópio binocular da marca Olympus modelo SZ4045 e foi avaliada e documentada a toxicidade no desenvolvimento embrio/larval. Também foi avaliada a taxa de eclosão dos organismos ao longo do tempo de exposição.

11.13. Análise estatística

O teste de normalidade Shapiro-Wilk será realizado para todos os parâmetros testados. Nos resultados de sobrevida, será aplicado o teste de Mantel-Cox e para os resultados de taxa de eclosão será aplicado o teste de ANOVA Two Way seguido pelo teste pós-hoc de Tukey. Para análise de dados paramétricos, serão também utilizados testes de ANOVA One Way seguidos pelo teste pós-hoc de Tukey, enquanto para os resultados não paramétricos serão utilizados o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste pós-hoc de Dunn. $p \leq 0,05$ será considerado estatisticamente significativo.

12. RESULTADOS E DISCUSSÃO

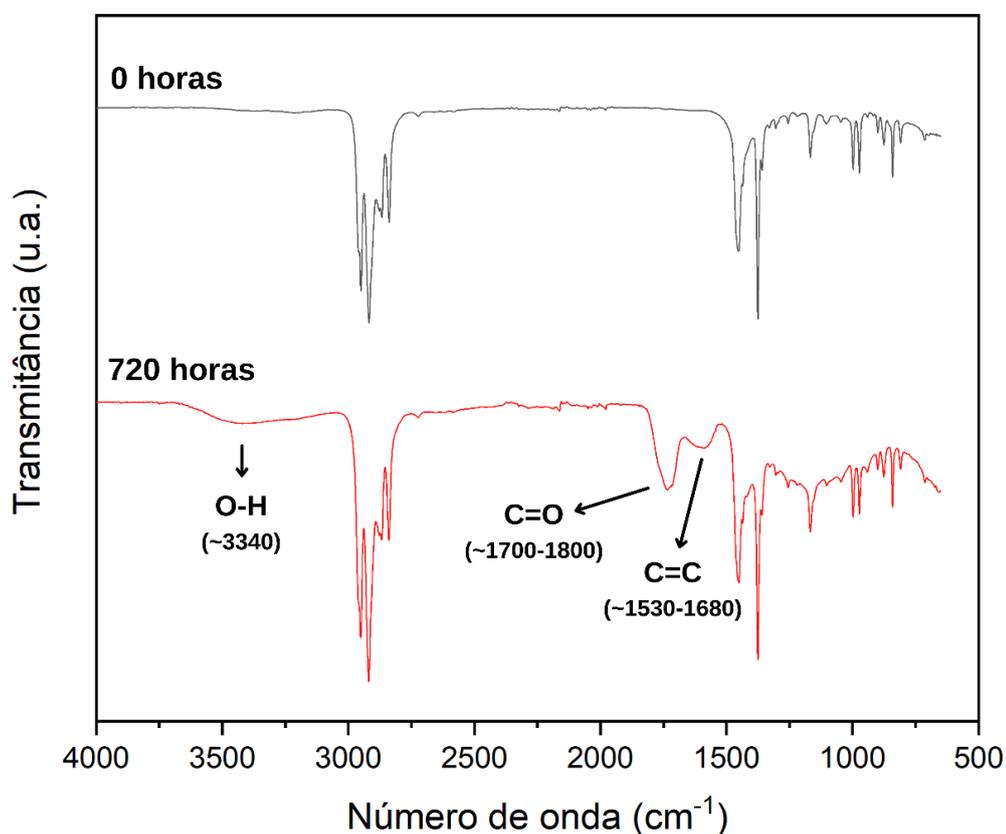
12.1. Caracterização das micro/nanopartículas de PP

As amostras de micro/nanopartículas de polipropileno foram caracterizadas pelas técnicas de FTIR, MEV-FEG e DLS, para a avaliação da alteração de estrutura química causada pelo processo de degradação, morfologia da superfície, tamanhos das partículas obtidas, entre outras características.

12.1.1. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi utilizada para identificar os grupos funcionais relacionados ao processo de degradação do polipropileno após sua exposição durante 720 horas à radiação UV (Figura 41).

Figura 41: Espectros de FTIR das amostras antes e após exposição à câmara de envelhecimento



A partir dos espectros de FTIR apresentados na Figura 41, é possível observar a aparecimento de alguns grupos funcionais do polipropileno após a sua exposição à câmara UV. A diferença mais evidente entre a amostra controle e a amostra exposta é o aparecimento do grupo carbonila na região próxima a 1740 cm⁻¹ (Grause, Chien e Inoue, 2020). O grupo carbonila na estrutura do polímero PP é produto oriundo da exposição do polímero à radiação ultravioleta em um ambiente com a presença de oxigênio. Nessa faixa entre 1700-1800 cm⁻¹ pode estar presente banda do grupo carbonila pertencente aos seguintes compostos orgânicos gerados a partir da foto-oxidação: lactonas (1780 cm⁻¹), ácidos carboxílicos e anidridos (1778 cm⁻¹), ésteres (1740 cm⁻¹), cetonas (1720 e 1712 cm⁻¹), entre outros grupos oxigenados (Grause, Chien e Inoue, 2020). Outra região que aponta a oxidação do

polipropileno é a região de 3340 cm^{-1} , na qual a banda mais alargada é indicativa do grupo hidroxila (Grause, Chien e Inoue, 2020).

Os grupos carbonila tornam a cadeia polimérica fotoquimicamente instável, tornando-a suscetível à iniciação de processos auto-catalíticos (De Paoli, 2008). Um desses processos é a reação fotoquímica Norrish tipo I (Figura 5, Item 3.3.2.1), que acarreta na cisão de cadeia, típica do polipropileno pela existência do seu carbono terciário (De Paoli, 2008). Essa cisão de cadeia reduz a massa molar do polímero, tornando-o mais frágil e suscetível à degradação mecânica.

Além disso, é possível notar uma banda na região entre $1530\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$, a qual representa a formação de grupos vinila (Lv *et al.*, 2015). Esses grupos podem ser formados a partir da degradação foto-oxidativa da cadeia segundo a reação de Norrish II, gerando ligações $\text{C}=\text{C}$ nas extremidades das cadeias (Figura 5, Item 3.3.2.1). A formação de grupos vinilas é uma indicação da ocorrência de cisão da cadeia polimérica.

Assim, a análise por FTIR indica que a amostra polimérica se encontra oxidada e fragilizada, facilitando a degradação por meio de abrasão mecânica, etapa posterior ao envelhecimento acelerado, e permitindo a geração de micro e nanopartículas de polipropileno para a consequente exposição aos organismos *zebrafish*.

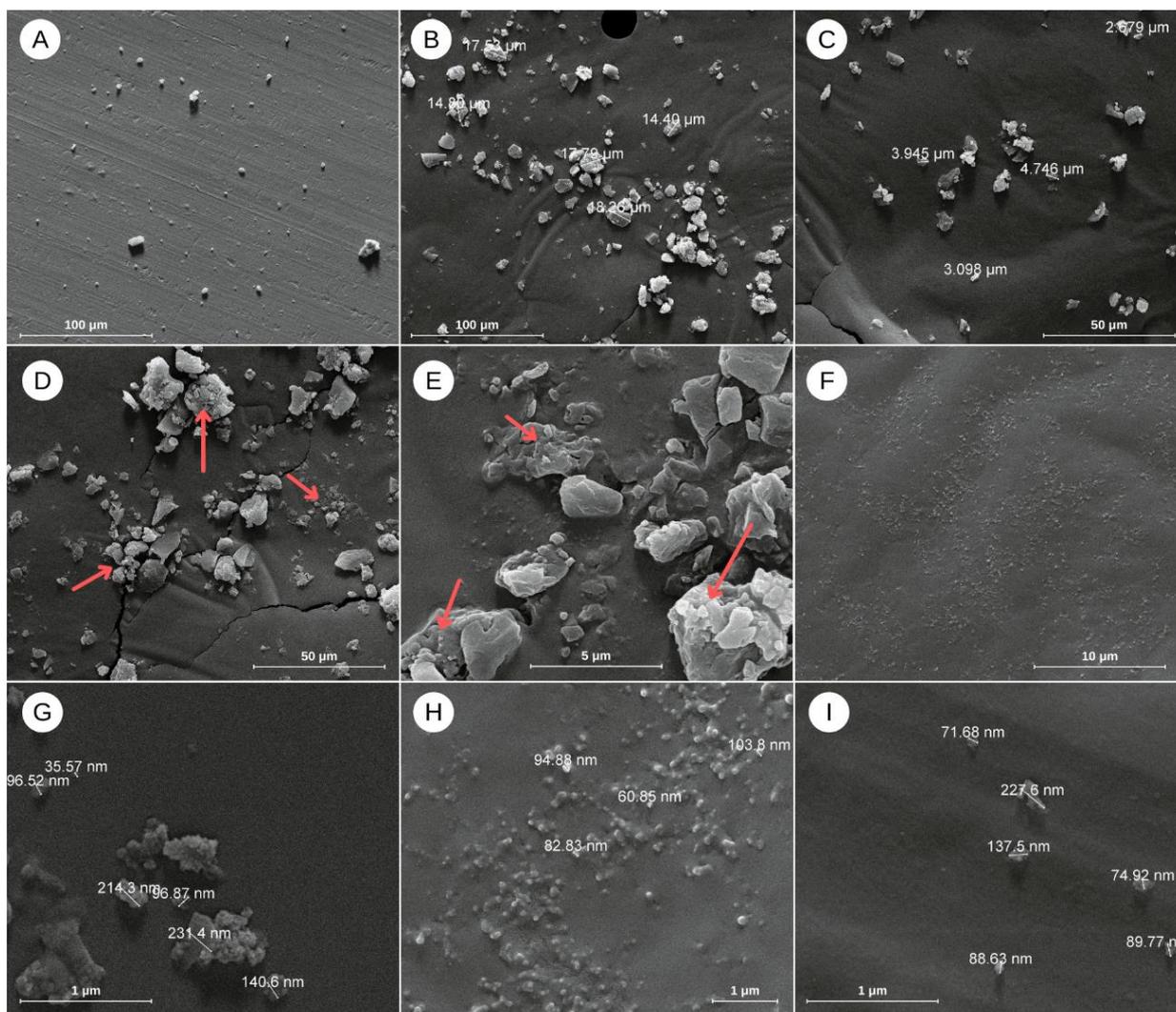
12.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG)

A partir das micrografias de MEV foi possível identificar as dimensões das partículas produzidas a partir da fotodegradação seguida da degradação mecânica. Na Figura 42 é possível observar a presença de partículas de diferentes escalas de tamanhos, sendo as partículas grandes de tamanhos entre $10\text{-}20\text{ }\mu\text{m}$ (Figura 42A-B), as intermediárias entre $1\text{-}5\text{ }\mu\text{m}$ (Figura 42C), ambas consideradas micropartículas poliméricas, ou “microplásticos”, de acordo com Hamra e Patria (2019, Wang *et al.* (2021), He *et al.* (2019) e Rillig e Lehmann, 2012). Entretanto, a grande maioria das

partículas dispersas se encontram na escala nanométrica, apresentando dimensões entre 50-100 nm (Figura 42F-I), as quais, de acordo com Costa *et al.* (2016), Gigault *et al.* (2018) e Schwaferts *et al.* (2019), podem ser considerados “nanoplásticos”. As medidas das partículas foram realizadas em pelo menos 20 partículas de cada faixa de dimensões e em três experimentos independentes de geração de partículas.

Além das dimensões das partículas, é possível observar o formato irregular das partículas, bem como a sua superfície fragilizada, característicos de ações de degradação (Figura 42D-E) (Grause, Chien e Inoue, 2020). Esse processo degradativo combinando-se a ação foto-oxidativa e mecânica acarretou em uma fragilização do material que, conseqüentemente, tornou possível a geração de micropartículas (Figura 42A-C) e nanopartículas de PP (Figura 42F-I), como sugerido por Song *et al.* (2017) e Koelmans, Besseling e Shim (2015).

Figura 42: Micrografias da superfície das amostras de PP após processo de fotodegradação e abrasão mecânica em diferentes aumentos. (A-B) 100 μm , (C-D) 50 μm , (E) 5 μm , (F) 10 μm , (G-I) 1 μm .



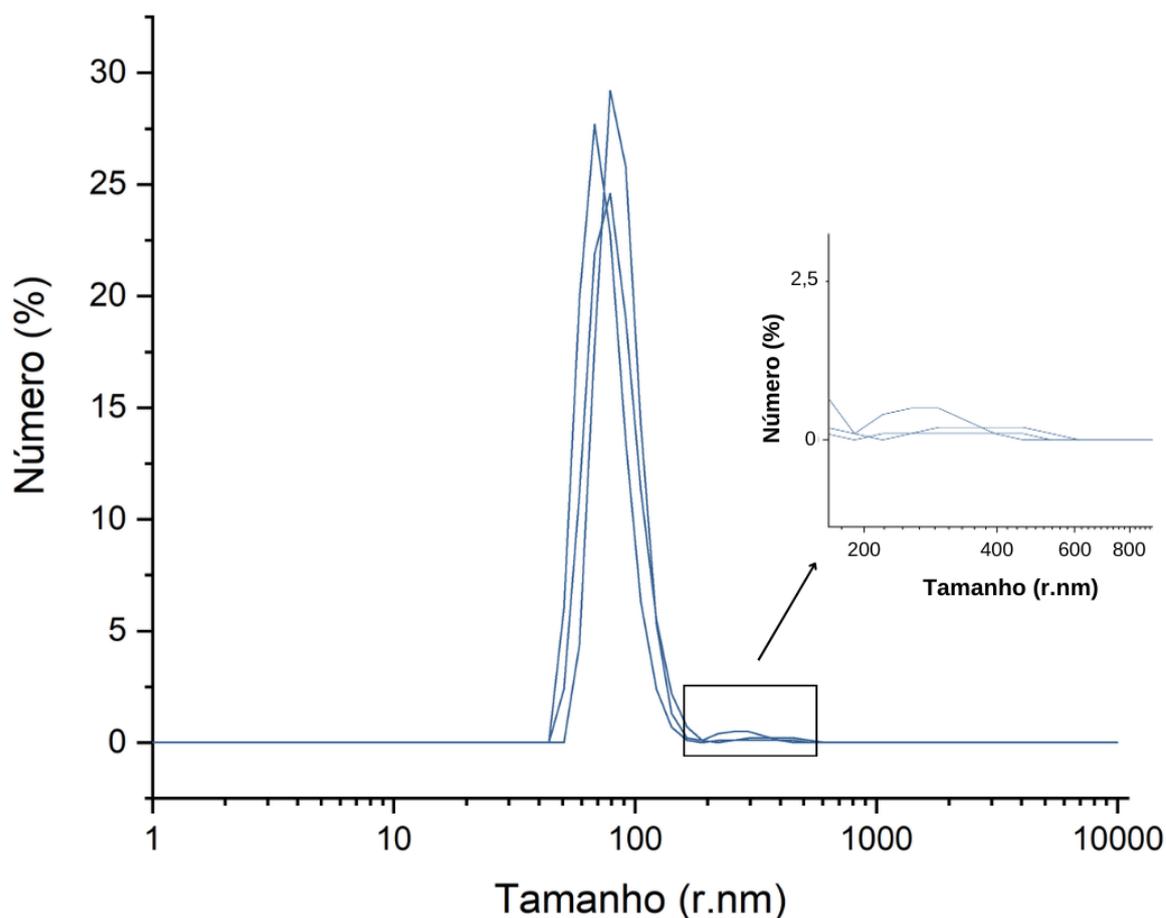
Koelmans, Besseling e Shim (2015) sugeriram um modelo matemático que estima o tempo necessário para que partículas <1 mm se transformem completamente em partículas na escala de 100 nm. Segundo os autores a oxidação/degradação das superfícies dos polímeros são os processos limitantes para essa transformação. Nas condições ideais de laboratório, os autores previram que o tempo necessário para que esse fenômeno ocorra é de 320 anos. Entretanto, em ambientes aquáticos, como por exemplo o marinho, a degradação dos materiais

poliméricos ocorre de maneira mais lenta, visto que há uma limitação de luz e oxigênio nesses ambientes. Dessa forma a geração de nanopartículas em ambientes marinhos pode levar um tempo ainda maior (Koelmans, Besseling e Shim, 2015). É importante destacar que o primeiro polímero sintético foi descoberto há pouco mais de 100 anos (Rasmussen, 2018).

12.1.3. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Com intuito de avaliar tanto os tamanhos das partículas geradas, quanto a sua ocorrência em diferentes faixas de tamanhos, foi realizado a análise de DLS. A partir dessa análise foi possível identificar as dimensões das partículas e sua frequência na amostra total, bem como seu tamanho médio. Um dos resultados dessa análise apontou que a maioria das partículas (>43% da amostra total) se encontra na faixa entre 68-91 nm. Esses valores são corroborados pela análise de MEV-FEG na Figura 42, onde estão apresentadas micrografias de diversas partículas próximas a essa faixa de dimensões. A Figura 43 apresenta a quantidade de partículas em relação à amostra total para cada dimensão de, de 1 nm a 10 um.

Figura 43: Distribuição do tamanho de partículas das amostras de micro/nanopartículas de PP obtida a partir da técnica de DLS



A partir da Figura 43 é possível observar que a grande maioria das partículas está localizada um pouco abaixo dos 100 nm, entretanto é possível verificar a existência de uma pequena curva de distribuição de tamanho na faixa entre 200-500 nm. Essas partículas nessa faixa de dimensões também são observadas na análise de MEV-FEG, na Figura 42G, e podem não ter sido reduzidas ainda mais de tamanho, por, possivelmente, serem parcelas mais internas das amostras que foram submetidas à câmara e não terem sofrido radiação direta, o que pode ter reduzido a sua taxa de degradação.

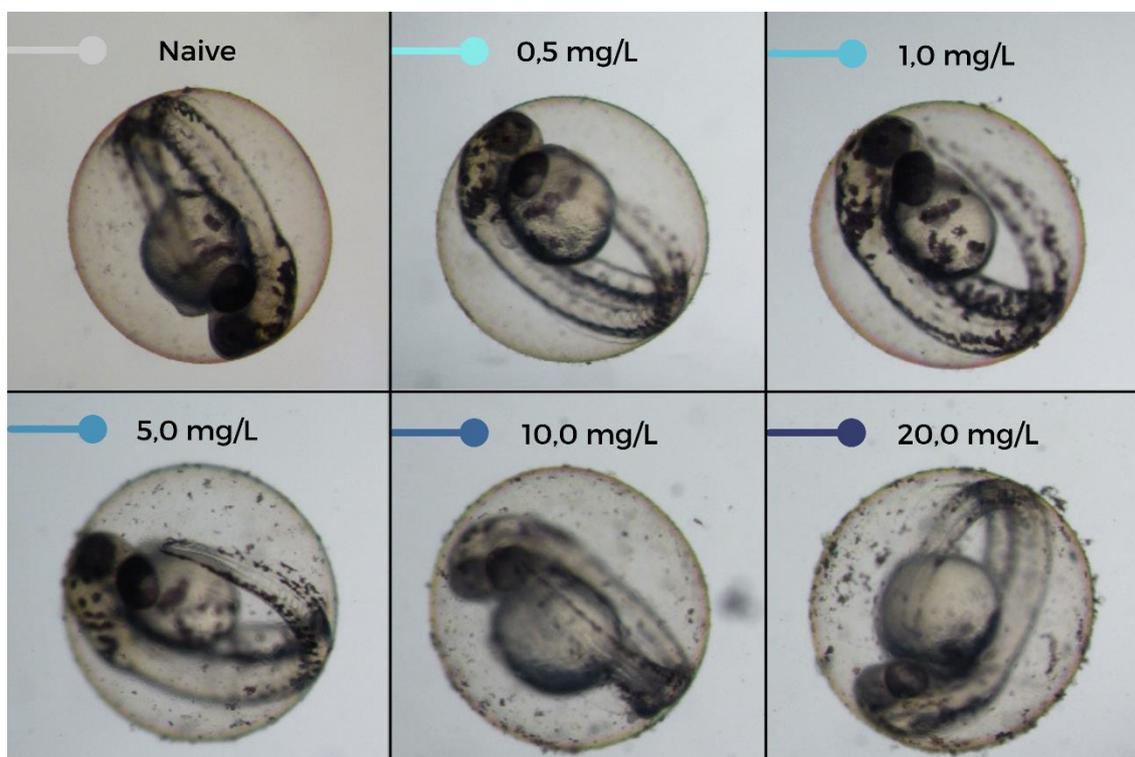
Cabe ressaltar que as partículas poliméricas apresentadas na análise de MEV-FEG na faixa de dimensões entre 1-5 μm (Figura 42C), se apresentaram em

uma quantidade muito menor em relação às partículas nanométricas, como é possível observar na Figura 43.

12.2. Avaliação da toxicidade das micro/nanopartículas de PP

Com o intuito de se verificar a interação entre as partículas e os organismos e a interação entre esses, foram realizados registros fotográficos utilizando-se uma câmera digital acoplada a um microscópio invertido da marca Nikon, modelo SMZ 1500 durante a exposição dos embriões às diferentes suspensões. A partir da Figura 44 é possível observar que as partículas aderiram à parte externa do córion dos organismos e conforme aumenta-se a concentração das suspensões, aumenta-se a presença dessas partículas também.

Figura 44: Fotografia dos embriões de peixe-zebra expostos às diferentes suspensões

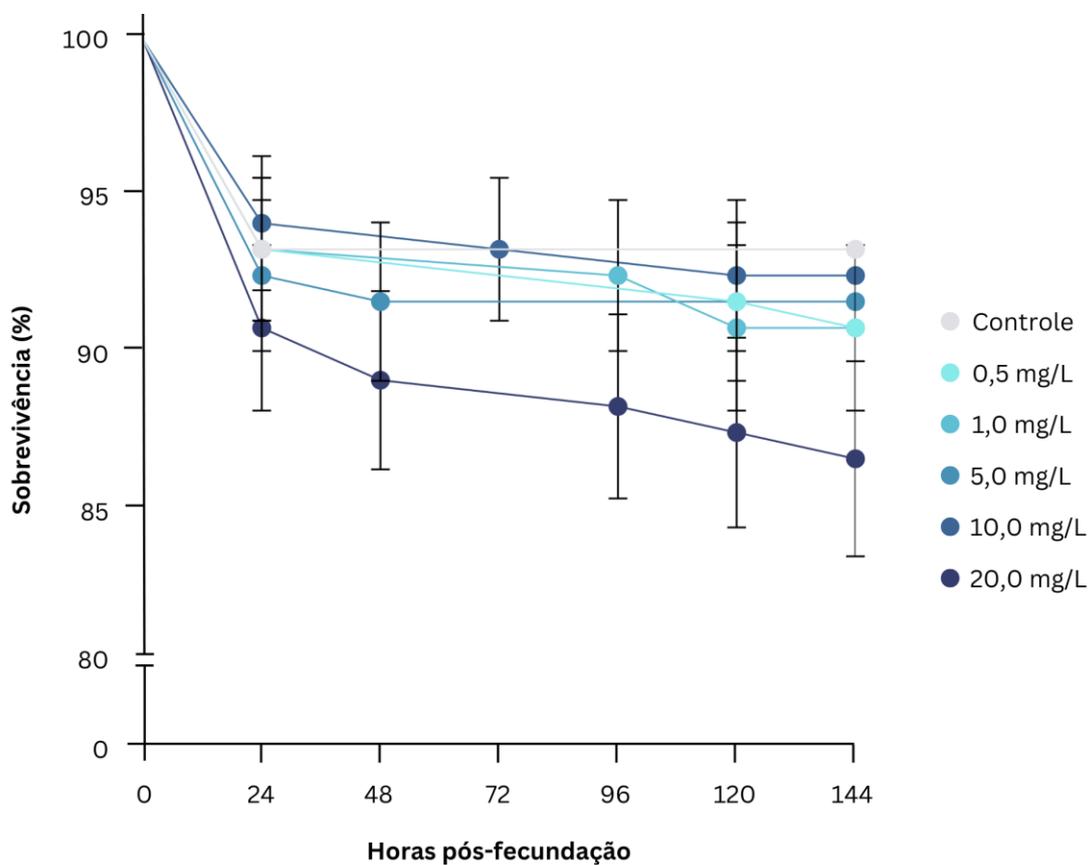


Sabendo-se que os poros dos córions do peixe-zebra possuem um diâmetro aproximado entre 0,5 e 0,7 μm (Li *et al.*, 2022), é esperado que as partículas nanométricas produzidas nesse estudo consigam penetrar o córion, podendo atingir o embrião durante o seu desenvolvimento embrionário. Entretanto, de acordo com Duan *et al.* (2020), devido a afinidade das partículas com os córions dos organismos, é possível que elas fiquem retidas na superfície do córion. No seu estudo, Duan *et al.* (2020) apontaram que partículas poliméricas de 100 nm não conseguiram adentrar o córion do zebrafish, mas elas foram ingeridas via oral e por absorção dérmica quando os organismos já haviam eclodido. Por outro lado, Lee e Jeong (2019) apontaram que nanopartículas de poliestireno de 50 nm podem adentrar o córion com certa facilidade. Os autores também testaram outros tamanhos de partículas e verificaram que nanopartículas de 200 nm e 500 nm também conseguiram penetrar no córion, porém com certa dificuldade, principalmente as partículas de 500 nm. Os autores apontaram também que os efeitos tóxicos causados aos organismos expostos às nanopartículas poliméricas têm correlação com o tempo de incubação dessas dentro do córion dos organismos, durante o seu desenvolvimento.

Em relação aos experimentos de Sobrevida, Taxa de eclosão, Movimento espontâneo, batimentos cardíacos, morfologia e locomoção para avaliação da toxicidade, é importante ressaltar que não foi possível obter um n suficiente para a realização de testes estatísticos até a conclusão deste trabalho, e, portanto, os resultados desses experimentos são preliminares.

12.2.1. Sobrevida

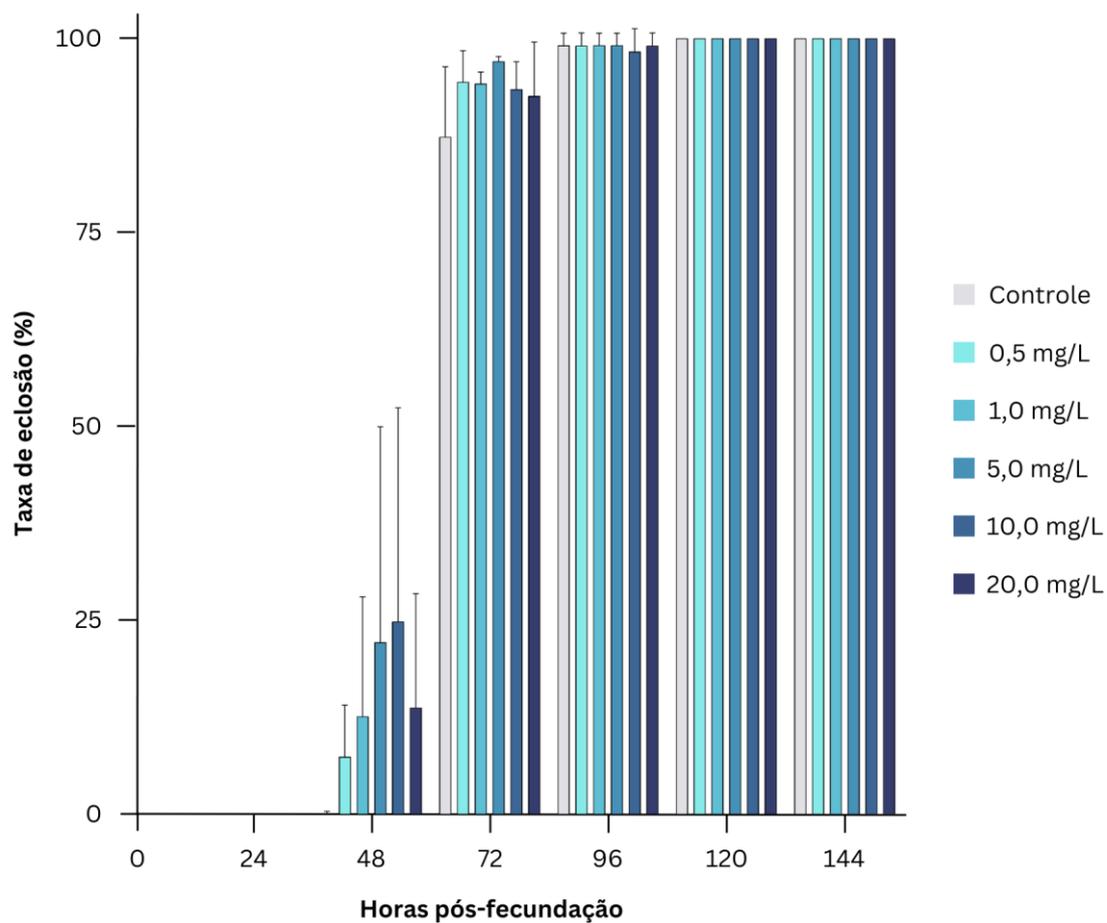
A Figura 45 apresenta os resultados preliminares de sobrevida dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos ao longo dos tempos dos experimentos.

Figura 45: Resultados preliminares da sobrevivência do *zebrafish* ao longo dos tempos dos experimentos

12.2.2. Taxa de eclosão

A Figura 46 apresenta os resultados preliminares da taxa de eclosão dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos ao longo dos tempos dos experimentos.

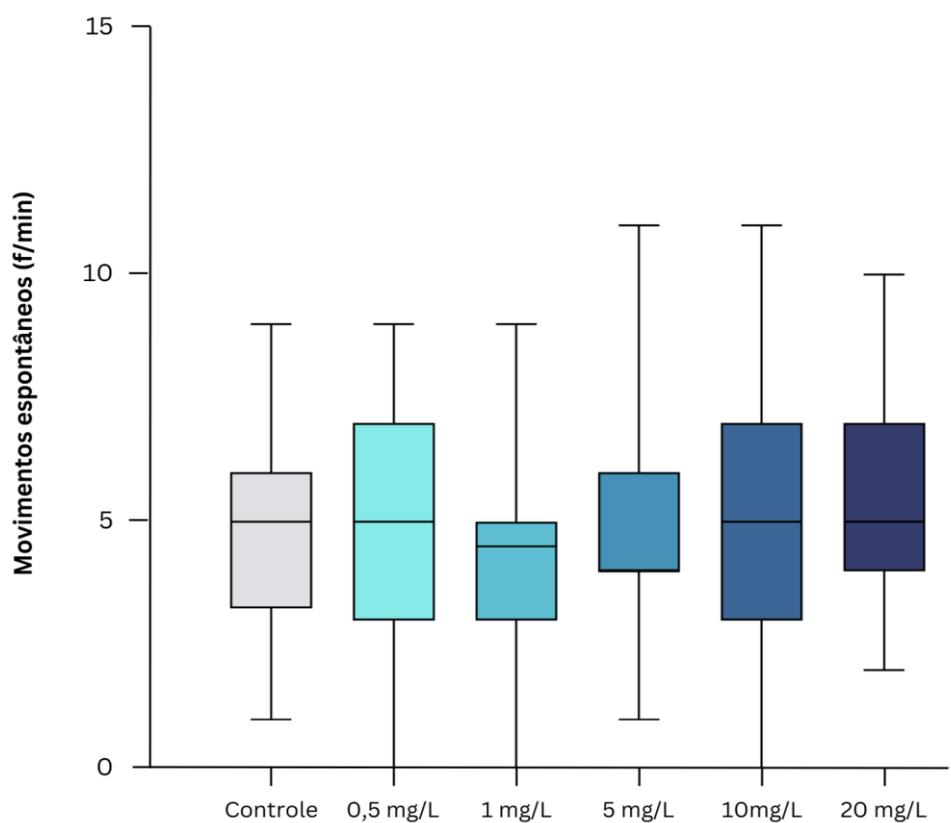
Figura 46: Resultados preliminares da taxa de eclosão dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos ao longo dos tempos dos experimentos



12.2.3. Movimento espontâneo

A Figura 47 apresenta os resultados preliminares da contagem dos movimentos espontâneos dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos.

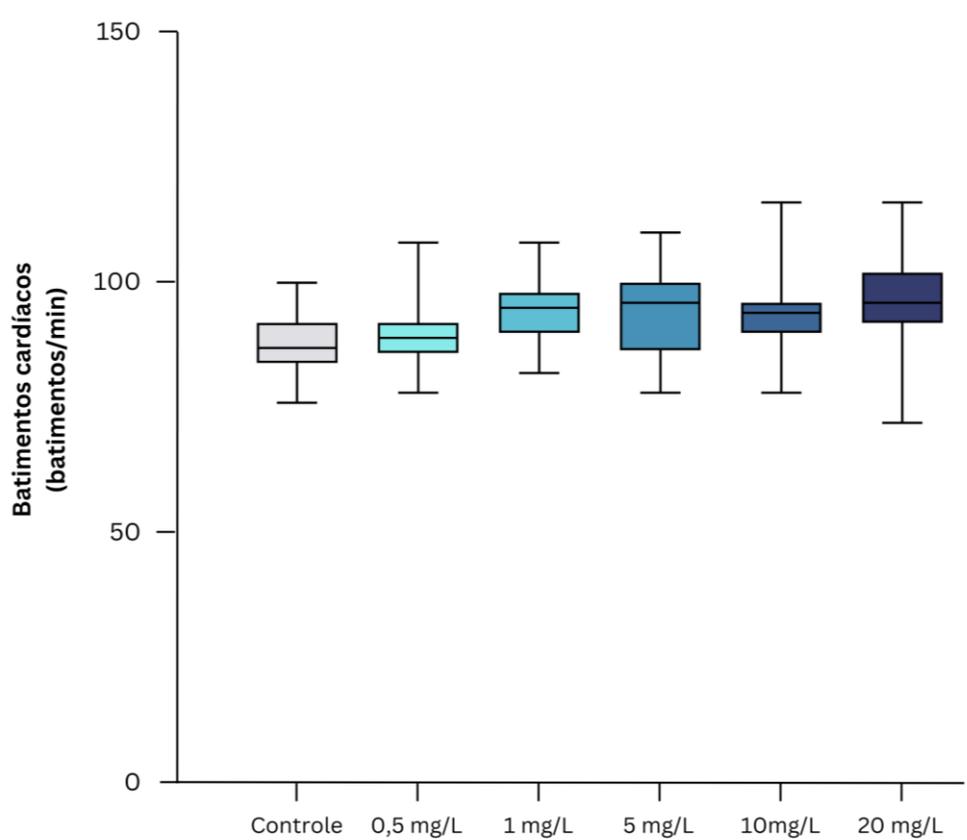
Figura 47: Resultados preliminares da contagem de movimentos espontâneos dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos



12.2.4. Batimentos cardíacos

A Figura 48 apresenta os resultados preliminares da frequência dos batimentos cardíacos dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos.

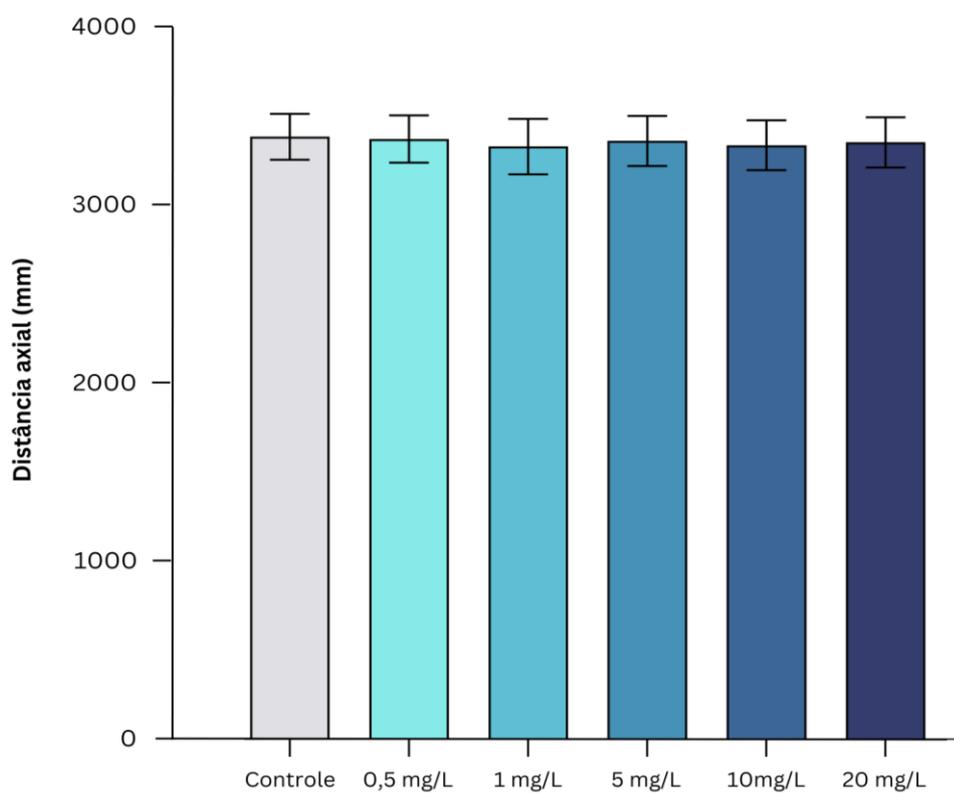
Figura 48: Resultados preliminares da frequência dos batimentos cardíacos dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos



12.2.5. Morfologia

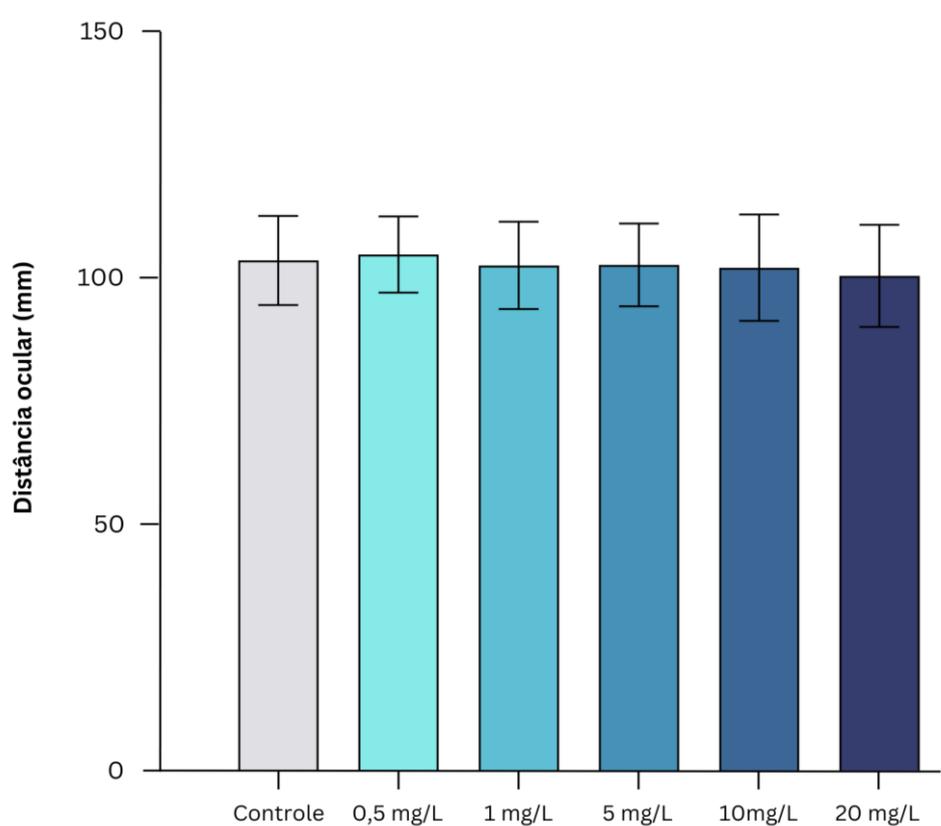
A Figura 49 apresenta os resultados preliminares da distância axial dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos.

Figura 49: Resultados preliminares da distância axial dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos



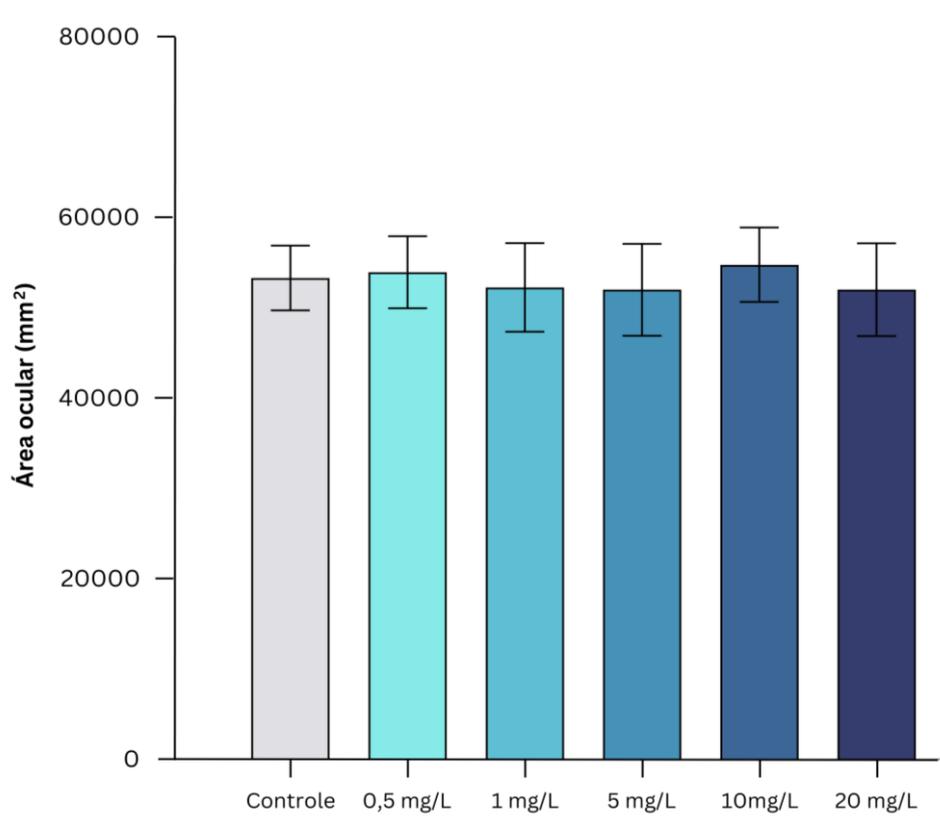
A Figura 50 apresenta os resultados preliminares da distância ocular dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos.

Figura 50: Resultados preliminares da distância ocular dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos



A Figura 51 apresenta os resultados preliminares da área ocular dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos.

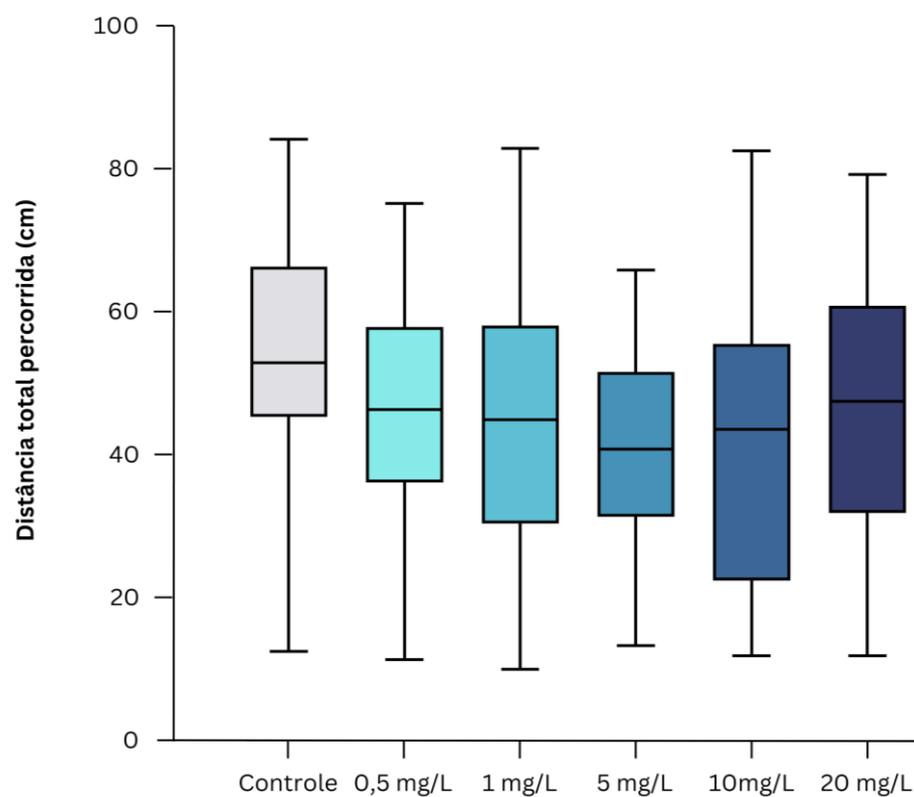
Figura 51: Resultados preliminares da área ocular dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos



12.2.6. Locomoção

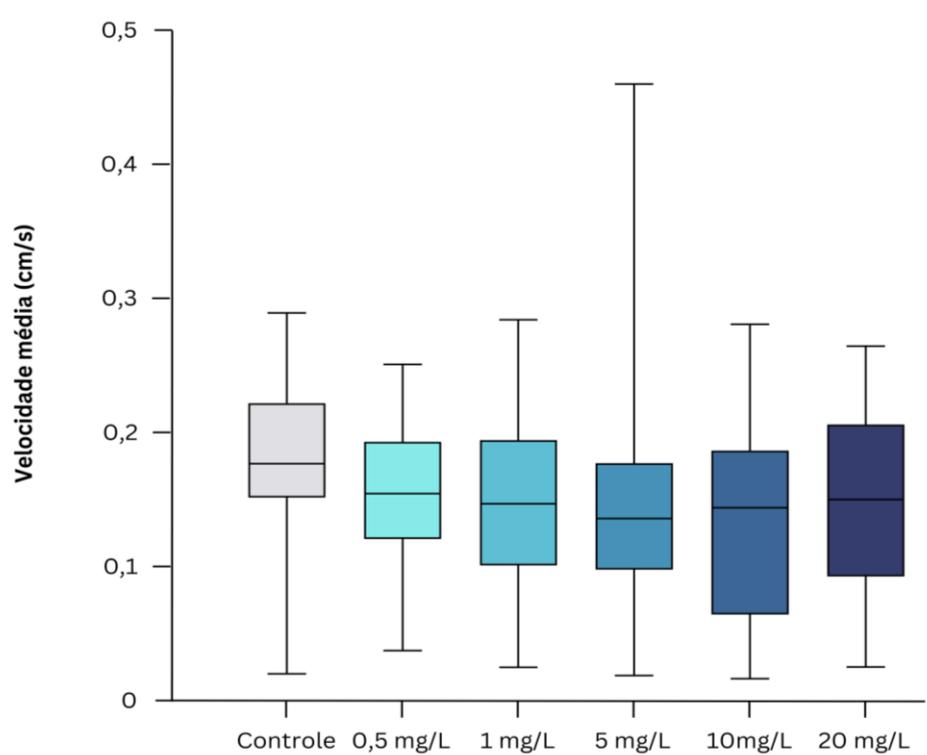
A Figura 52 apresenta os resultados preliminares da distância total percorrida pelos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos.

Figura 52: Resultados preliminares da distância total percorrida dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos



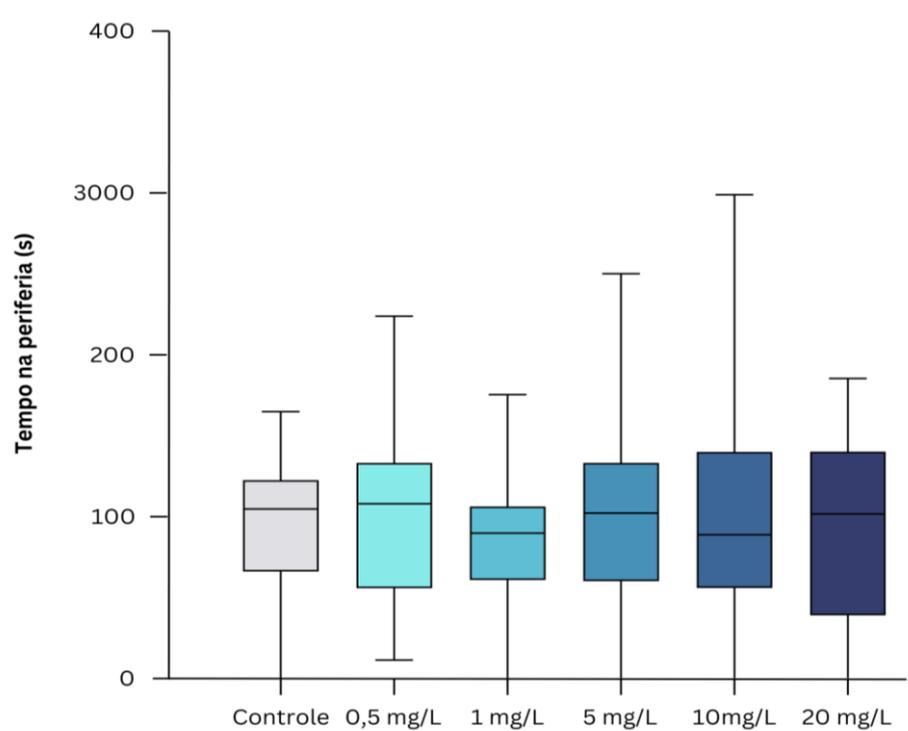
A Figura 53 apresenta os resultados preliminares da velocidade média dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos.

Figura 53: Resultados preliminares da velocidade média dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos



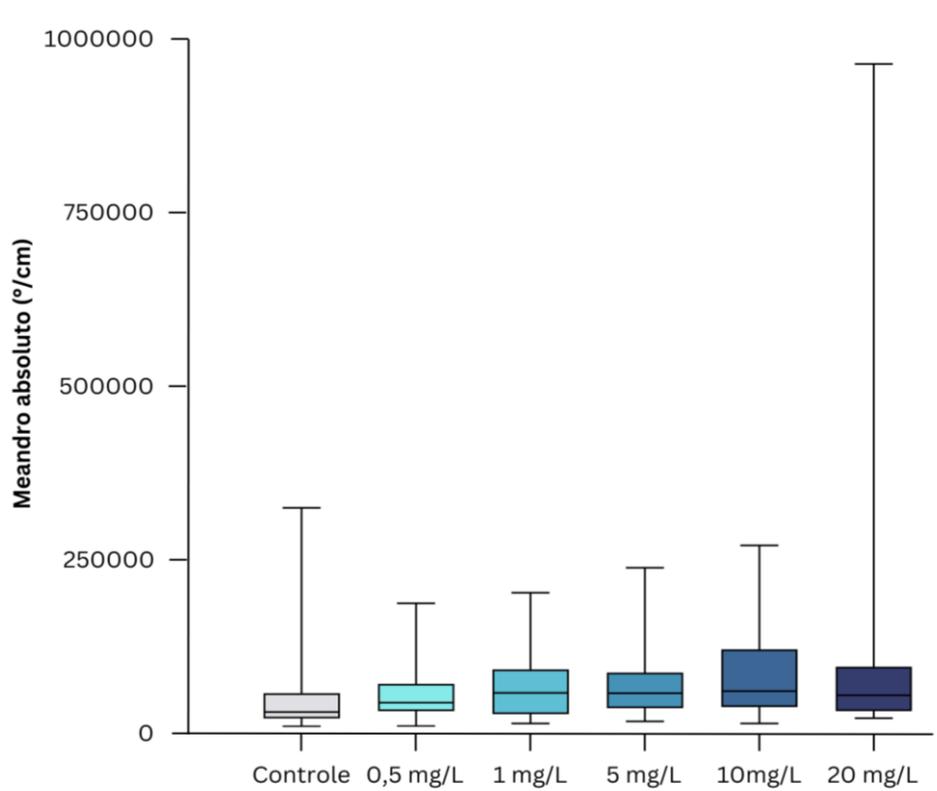
A Figura 54 apresenta os resultados preliminares do tempo de permanência na periferia dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos.

Figura 54: Resultados preliminares do tempo na periferia dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos



A Figura 55 apresenta os resultados preliminares do meandro absoluto dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos.

Figura 55: Resultados preliminares do meandro absoluto dos organismos expostos às diferentes concentrações de micro/nanoplásticos



13. CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos objetivos deste trabalho, foi possível desenvolver uma revisão compilando-se dados sobre efeitos toxicológicos causados por micro e nanoplásticos a diferentes organismos. Durante essa etapa do trabalho foi possível concluir que ainda há muitas lacunas a se explorar e pesquisar referente à diferentes combinações de organismos, tipos de plástico, dimensões de partículas, entre outras, em ensaios toxicológicos. Verificou-se também uma escassez de publicações com a utilização nanoplásticos para ensaios de toxicidade, que não seja o PS. Apesar disso, com os dados disponíveis, foi possível reforçar a hipótese de que há diferentes predominâncias de toxicidade quando utilizados diferentes organismos, diferentes tipos de plásticos, e, principalmente, diferentes dimensões de partículas plásticas. Outro ponto a ser destacado é a diferença da forma de obtenção das partículas a serem utilizadas nos estudos, onde, para a maioria dos tipos de plásticos, a forma e obtenção foi comercial sem a utilização de métodos ou processos de redução de dimensões, enquanto que para o PET a principal forma de obtenção foi por meio de moagem e cortes de produtos comerciais, tais como garrafas plásticas. Esses resultados se refletiram nas dimensões das partículas utilizadas, onde as dimensões das partículas de PET apresentaram uma mediana maior do que as medianas das dimensões dos outros tipos de plásticos, principalmente do PS, o qual apresentou a utilização de partículas significativamente menores do que todos os outros tipos de plásticos.

Além disso, revisando-se os efeitos causados ao organismo *Danio rerio*, o qual foi utilizado como modelo da pesquisa em outra etapa deste trabalho, apresentou uma maior predominância de efeitos toxicológicos quando exposto a

nanopartículas em comparação a micropartículas de plástico para a maioria das categorias de toxicidade avaliadas.

Sabendo-se que a poluição polimérica atinge principalmente os ambientes costeiros, este estudo também apresentou como objetivo a quantificação e caracterização dos microplásticos presentes em uma praia de município de Torres/RS. A partir desta etapa do estudo, foi possível quantificar tanto as fibras quanto os fragmentos de microplásticos presentes nos pontos de coleta. Os microfragmentos apresentaram quantidades muito superiores às fibras em todos os pontos de coleta e foi possível identificar uma tendência de aumento de suas concentrações nos últimos pontos de coleta, próximo ao Rio Mampituba. Dessa forma, pode-se concluir que há uma possibilidade de que resíduos plásticos das parcelas urbanas ou mesmo de outros municípios, incluindo do estado vizinho, são transportados pelo rio, podendo se acumular nos locais da costa mais próximos depositando micropartículas devido aos processos degradativos causados ao longo do trajeto e nos próprios pontos da costa. Esse resultado também reflete nos resultados de quantidade relativa de partículas por faixas de dimensões, onde a grande maioria das partículas coletadas encontra-se na faixa de dimensões entre 50-100 μm , que é um indicativo de que as partículas presentes no ambiente da praia possam estar sofrendo uma degradação foto-oxidativa constante, gerando-se um maior número de partículas cada vez menores. Foi possível identificar que os principais tipos de microplásticos contaminando essa praia foram o PE, o PP e o PA, onde os dois primeiros apresentam as maiores demandas do mercado de plásticos, e a poliamida é um polímero muito utilizado na confecção de materiais de pesca e roupas. Comparando-se esses resultados aos resultados encontrados por outros autores em outras regiões costeiras, verifica-se uma semelhança no que diz respeito aos principais tipos de plásticos contaminantes.

Por fim, o volume final deste trabalho teve como objetivo a produção e exposição de micro e nanopartículas de PP ao *zebrafish*. Durante esta etapa foi possível aplicar uma metodologia para a geração de micro e nanopartículas de PP a partir do plástico comercial, a qual pode ser replicada em novas pesquisas de toxicidade com esse material, que são escassas, de acordo os resultados obtidos no

Volume I deste trabalho. A combinação dos fatores de foto-oxidação causada pela exposição à câmara de envelhecimento e abrasão mecânica foi suficiente para reduzir os fragmentos de PP comerciais à escala nanométrica, como evidenciado pelas análises de MEV-FEG e DLS. Apesar da existência de microplásticos, a grande maioria das partículas geradas encontrou-se na faixa próxima a 80-90nm. Em relação à exposição aos organismos de *Danio rerio*, verificou-se uma adesão das partículas ao córion dos organismos, ocorrendo um aumento progressivo da presença das partículas com o aumento de sua concentração. Não foi possível concluir todos os testes de toxicidade com os organismos de *Danio rerio* para que houvesse um n amostral suficiente para realizar análises estatísticas, e portanto, não foi possível realizar uma discussão sobre os resultados dessa etapa.

14. PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS

- Desenvolver uma revisão sistemática dos efeitos toxicológicos causados por micro e nanoplásticos considerando outros fatores, tais como concentrações de partículas, ambiente (solo, água doce, água marinha), estágio de desenvolvimento dos organismos (embrião e adulto), entre outros;
- Aplicar a metodologia utilizada no Volume 2 para outras localidades do litoral do Brasil, incluindo também a segmentação dos pontos de coleta por atividade (turismo, pesca, comércio, entre outros).
- Desenvolver um atlas da poluição por microplásticos para o litoral do Brasil, incluindo informações tais como concentração, tipos e dimensões das partículas;
- Concluir os experimentos de exposição para avaliação da toxicidade das micro e nanopartículas de PP em embriões de *zebrafish*, testar a adsorção de outros químicos possivelmente nocivos aos organismos em partículas de PP, tais como defensivos agrícolas e avaliar a sua toxicidade.

15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADARSH, U. K. *et al.* Spectroscopy: A promising tool for plastic waste management. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 149, 2022.

AGNELLI, J. A. M.; CHINELATTO, M. A. Degradação de polipropileno: aspectos teóricos e recentes avanços em sua estabilização. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 2, n. 3, p. 27–31, 1992.

AL-AZZAWI, M. S. M. *et al.* Validation of sample preparation methods for microplastic analysis in wastewater matrices—Reproducibility and standardization. **Water**, v. 12, 2020.

ANAGNOSTI, L. *et al.* Worldwide actions against plastic pollution from microbeads and microplastics in cosmetics focusing on European policies. Has the issue been handled effectively? **Marine Pollution Bulletin**, v. 162, 2021.

ANDERSON, G.; SHENKAR, N. Potential effects of biodegradable single-use items in the sea: Polylactic acid (PLA) and solitary ascidians. **Environmental Pollution**, v. 268, 2021.

ANDRADY, A. L. Microplastics in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 8, p. 1596–1605, 2011.

ASHTON, K.; HOLMES, L.; TURNER, A. Association of metals with plastic production pellets in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 11, p. 2050–2055, 2010.

BADJI, C. *et al.* Influence of weathering on visual and surface aspect of wood plastic

composites: Correlation approach with mechanical properties and microstructure.

Polymer Degradation and Stability, 2017.

BAEZA, C. *et al.* Experimental Exposure of *Lumbricus terrestris* to Microplastics. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 231, 2020.

BALLENT, A. *et al.* Sources and sinks of microplastics in Canadian Lake Ontario nearshore, tributary and beach sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 110, p. 383–395, 2016.

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, n. 1526, p. 1985–1998, 2009.

BESLEY, A. *et al.* A standardized method for sampling and extraction methods for quantifying microplastics in beach sand. **Marine Pollution Bulletin**, v. 114, p. 77–83, 2017.

BETTS, K. Why small plastic particles may pose a big problem in the oceans. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 24, p. 8995, 2008.

BHAGAT, Jacky *et al.* Zebrafish: An emerging model to study microplastic and nanoplastic toxicity. **Science of The Total Environment**, v. 728, p. 138707, 2020.

BRIFFA, S. M.; NEIRA, M. Looking at the bigger picture — considering the hurdles in the struggle against nanoplastic Pollution. **Nanomaterials**, v. 11, 2021.

BROWNE, M. A.; GALLOWAY, T.; THOMPSON, R. Microplastic-an emerging contaminant of potential concern? **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 3, n. 4, p. 559–566, 2007.

CABERNARD, L. *et al.* Comparison of Raman and Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the quantification of microplastics in the aquatic environment. **Environmental Science & Technology**, v. 52, p. 13279–13288, 2018.

CHANG, X. *et al.* Potential health impact of environmental micro- and nanoplastics

pollution. **Journal of Applied Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 4–15, 2020.

CHAOCHANCHAIKUL, K. *et al.* Influence of lignin content on photodegradation in wood/HDPE composites under UV weathering. **BioResources**, v. 7, p. 38–55, 2012.

CHEN, Q. *et al.* Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity. **Science of the Total Environment**, v. 584–585, p. 1022–1031, 2017.

CHENG, H. *et al.* Toxicities of microplastic fibers and granules on the development of zebrafish embryos and their combined effects with cadmium. **Chemosphere**, v. 269, 2021.

CHENG, Y. *et al.* Science of the Total Environment Combined effects of mulch fi lmerived microplastics and atrazine on oxidative stress and gene expression in earthworm (*Eisenia fetida*). **Science of the Total Environment**, v. 746, p. 141280, 2020.

CLAESSENS, M. *et al.* Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 10, p. 2199–2204, 2011.

COOPER, D. A.; CORCORAN, P. L. Effects of mechanical and chemical processes on the degradation of plastic beach debris on the island of Kauai, Hawaii. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, p. 650–654, 2010.

COSTA, J. P. *et al.* (Nano)plastics in the environment - Sources, fates and effects. **Science of the Total Environment**, p. 15–26, 2016.

CUNNINGHAM, B. *et al.* Toxicity of micro and nano tire particles and leachate for model freshwater organisms. **Journal of Hazardous Materials**, v. 429, 2022.

DAVRANCHE, M. *et al.* Nanoplastics on the coast exposed to the North Atlantic Gyre: Evidence and traceability. **NanoImpact**, v. 20, 2020.

DEKIFF, J. H. *et al.* Occurrence and spatial distribution of microplastics in sediments

from Norderney. **Environmental Pollution**, v. 186, p. 248–256, 2014.

DERRAIK, J. G. B. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 842–852, 2002.

DUAN, Z. *et al.* Barrier function of zebrafish embryonic chorions against microplastics and nanoplastics and its impact on embryo development. **Journal of Hazardous Materials**, v. 395, 2020.

EDO, C. *et al.* Occurrence and identification of microplastics along a beach in the Biosphere Reserve of Lanzarote. **Marine Pollution Bulletin**, v. 143, p. 220–227, 2019.

EGGER, M. *et al.* A spatially variable scarcity of floating microplastics in the eastern North Pacific Ocean. **Environmental Research Letters**, v. 15, 2020.

ERIKSEN, M. *et al.* Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–15, 2014.

ERIKSEN, M.; THIEL, M.; LEBRETON, L. Nature of Plastic Marine Pollution in the Subtropical Gyres. **Handbook of Environmental Chemistry**, p. 135–162, 2016.

EUROPEAN BIOPLASTICS. **Fact sheet: What are bioplastics?**, 2016.

FANG, C. *et al.* Microplastic contamination in benthic organisms from the arctic and sub-arctic regions. **Chemosphere**, 2018.

FENDALL, L. S.; SEWELL, M. A. Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 8, p. 1225–1228, 2009.

FILICIOTTO, L.; ROTHENBERG, G. Biodegradable Plastics: Standards, Policies, and Impacts. **ChemSusChem**, v. 14, p. 56–72, 2021.

GIGAULT, J. *et al.* Marine plastic litter: the unanalyzed nano-fraction. **Environmental**

Science: Nano, v. 3, n. 2, p. 346–350, 2016.

____. Nanoplastics are neither microplastics nor engineered nanoparticles. **Nature Nanotechnology**, v. 16, p. 501–507, 2021.

GIGAULT, J.; BAUDRIMONT, M.; PASCAL, P. Current opinion: What is a nanoplastic? **Environmental Pollution**, p. 1–5, 2018.

GOMES, T.; ALMEIDA, A. C.; GEORGANTZOPOULOU, A. Characterization of cell responses in *Rhodomonas baltica* exposed to PMMA nanoplastics. **Science of the Total Environment**, v. 726, 2020.

GRAUSE, G.; CHIEN, M.; INOUE, C. Changes during the weathering of polyolefins. **Polymer Degradation and Stability**, v. 181, 2020.

GUIMARÃES, A. T. B. *et al.* Toxicity of polystyrene nanoplastics in dragonfly larvae: An insight on how these pollutants can affect benthic macroinvertebrates. **Science of the Total Environment**, v. 752, 2021.

GÜNDOĞDU, S. Contamination of table salts from Turkey with microplastics. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, n. 5, p. 1006–1014, 2018.

GUZMAN, M. C.; CHUA, P. A. P.; SEDANO, F. S. Embryotoxic and teratogenic effects of polyethylene microbeads found in facial wash products in Zebrafish (*Danio rerio*) using the Fish Embryo Acute Toxicity Test. **bioRxiv**, 2020.

HALLE, A. TER *et al.* Nanoplastic in the North Atlantic Subtropical Gyre. 2017.

HAMRA, A. J. AL; PATRIA, M. P. Microplastic in Gonggong snails (*Laevistrombus turturella*) and sediment of Bintan Island, Kepulauan Riau Province, Indonesia. **International Conference on Science and Applied Science**, 2019.

HE, B. *et al.* Abundance, distribution patterns, and identification of microplastics in Brisbane River sediments, Australia. **Science of the Total Environment**, v. 700, 2020.

HE, P. *et al.* Municipal solid waste (MSW) landfill: A source of microplastics? - Evidence of microplastics in landfill leachate. **Water Research**, v. 159, p. 38–45, 2019.

HUBER, M. *et al.* Environmental degradation and formation of secondary microplastics from packaging material: A polypropylene film case study. **Polymer Degradation and Stability**, v. 195, 2022.

HUNT, C. F.; LIN, W. H.; VOULVOULIS, N. Evaluating alternatives to plastic microbeads in cosmetics. **Nature Sustainability**, v. 4, n. 4, p. 366–372, 2021.

IÑIGUEZ, M. E.; CONESA, J. A.; FULLANA, A. Microplastics in Spanish Table Salt. **Scientific Reports**, p. 1–7, 2017.

JAMBECK, J. R. *et al.* Plastic waste inputs from land into the ocean. **Science**, v. 347, n. 6223, p. 768–771, 2015.

JAYASIRI, H. B.; PURUSHOTHAMAN, C. S.; VENNILA, A. Quantitative analysis of plastic debris on recreational beaches in Mumbai, India. **Marine Pollution Bulletin**, v. 77, p. 107–112, 2013.

JEONG, J.; CHOI, J. Adverse outcome pathways potentially related to hazard identification of microplastics based on toxicity mechanisms. **Chemosphere**, v. 231, p. 249–255, 2019.

JUNG, S. *et al.* Progress in quantitative analysis of microplastics in the environment: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 422, 2021.

KOELMANS, A. A. .; BESSELING, E.; SHIM, W. J. Nanoplastics in the aquatic environment. Critical review. **Marine anthropogenic litter**, p. 325–340, 2015.

KÜPPER, L. *et al.* Attenuated total reflection infrared spectroscopy for micro-domain analysis of polyethylene samples after accelerated ageing within weathering chambers. **Vibrational Spectroscopy**, v. 34, n. 1, p. 63–72, jan. 2004.

LEBRETON, L. *et al.* Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly

accumulating plastic. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

LEBRETON, L. C. M. *et al.* River plastic emissions to the world's oceans. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.

LEBRETON, L.; EGGER, M.; SLAT, B. A global mass budget for positively buoyant macroplastic debris in the ocean. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

LEE, W. S. *et al.* Bioaccumulation of polystyrene nanoplastics and their effect on the toxicity of Au ions in zebrafish embryos. **Nanoscale**, v. 11, p. 3173–3185, 2019.

LEFEBVRE, C. *et al.* Stranded in the high tide line: Spatial and temporal variability of beached microplastics in a semi-enclosed embayment (Arcachon , France). **Science of the Total Environment**, v. 797, 2021.

LI, L. *et al.* Effect of microplastic on anaerobic digestion of wasted activated sludge. **Chemosphere**, v. 247, 2020.

LI, Y. *et al.* Polystyrene nanoplastics aggravated ecotoxicological effects of polychlorinated biphenyls in on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Geoscience Frontiers**, v. 13, n. 3, 2022.

LIN, X. *et al.* Influence of polyether sulfone microplastics and bisphenol A on anaerobic granular sludge: Performance evaluation and microbial community characterization. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 205, 2020.

LIU, Y. *et al.* Ecotoxicological effects on *Scenedesmus obliquus* and *Danio rerio* Co-exposed to polystyrene nano-plastic particles and natural acidic organic polymer. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 67, p. 21–28, 2019.

LIU, Y. *et al.* Effects of nanoplastics and butyl methoxydibenzoylmethane on early zebrafish embryos identified by single-cell RNA sequencing. **Environmental Science & Technology**, v. 55, p. 1885–1896, 2021.

LV, Y. *et al.* Outdoor and accelerated laboratory weathering of polypropylene: A comparison and correlation study. **Polymer Degradation and Stability**, v. 112, p.

145–159, 2015.

MACHADO, M. C. *et al.* The response of *Synechococcus* sp . PCC 7002 to micro- / nano polyethylene particles - Investigation of a key anthropogenic stressor. **PLoS ONE**, p. 1–14, 2020.

MAES, T. *et al.* A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. **Scientific Reports**, p. 1–10, 2017.

MALAFAIA, G. *et al.* Developmental toxicity in zebrafish exposed to polyethylene microplastics under static and semi-static aquatic systems. **Science of The Total Environment**, v. 700, 2020.

MASURA, J. *et al.* Laboratory Methods for the Analysis of Microplastics in the Marine Environment: Recommendations for quantifying synthetic particles in waters and sediments. **NOAA Technical Memorandum**, 2015.

MATERIC, D. *et al.* Micro and nanoplastics in alpine snow: A new method for chemical identification and (semi)quantification in the nanogram range. **Environmental Science & Technology**, v. 54, p. 2353–2359, 2020.

MEIJER, L. J. J. *et al.* More than 1000 rivers account for 80 % of global riverine plastic emissions into the ocean. **Science advances**, v. 7, p. 1–14, 2021.

MEYERS, N. *et al.* Microplastic detection and identification by Nile red staining: Towards a semi-automated, cost- and time-effective technique. **Science of the Total Environment**, v. 823, 2022.

MISSAWI, O. *et al.* Abundance and distribution of small microplastics ($\leq 3 \mu\text{m}$) in sediments and seaworms from the Southern Mediterranean coasts and characterisation of their potential harmful effects. **Environmental Pollution**, v. 263, 2020.

MUELLER, M. T. *et al.* Surface-Related Toxicity of Polystyrene Beads to Nematodes

and the Role of Food Availability. **Environmental Science and Technology**, v. 54, n. 3, p. 1790–1798, 2020.

NAKATANI, H.; KYAN, T.; MURAOKA, T. An Effect of Water Presence on Surface Exfoliation of Polypropylene Film Initiated by Photodegradation. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, n. 8, p. 2219–2226, 2020.

NG, K. L.; OBBARD, J. P. Prevalence of microplastics in Singapore's coastal marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 761–767, 2006.

NOCHI, M.; OZAKI, Y.; SATO, H. Water-induced conformational changes in the powder and film of e-poly (L)lysine studied by infrared and Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 260, 2021.

O'DONOVAN, S. O. *et al.* Effects of the UV filter, oxybenzone, adsorbed to microplastics in the clam *Scrobicularia plana*. **Science of the Total Environment**, v. 733, 2020.

PAOLI, M. DE. **Degradação e estabilização de polímeros**. [s.l.] Chemkeys, 2008.

PEDERSEN, A. F. *et al.* Nanoplastics impact the zebrafish (*Danio rerio*) transcriptome: Associated developmental and neurobehavioral consequences. **Environmental Pollution**, v. 266, 2020.

PEREIRA, A.; EMMANUELA, J.; *et al.* Toxicity and trophic transfer of polyethylene microplastics from *Poecilia reticulata* to *Danio rerio*. **Science of the Total Environment**, v. 742, 2020.

PEREIRA, T. C. B.; SANTOS, K. B.; *et al.* Acid mine drainage (AMD) treatment by neutralization: Evaluation of physical-chemical performance and ecotoxicological effects on zebrafish (*Danio rerio*) development. **Chemosphere**, v. 253, p. 1–9, 2020.

PLASTICS EUROPE. **Plastics - The Facts**, 2021.

PRATA, J. C. *et al.* A new approach for routine quantification of microplastics using

Nile Red and automated software (MP-VAT). **Science of the Total Environment**, v. 690, p. 1277–1283, 2019.

_____. Selection of microplastics by Nile Red staining increases environmental sample throughput by micro-Raman spectroscopy. **Science of the Total Environment**, v. 783, 2021.

RAHMAN, M. H.; BHOI, P. R. An overview of non-biodegradable bioplastics. **Journal of Cleaner Production**, v. 294, 2021.

RANJAN, V. P.; GOEL, S. Degradation of Low-Density Polyethylene Film Exposed to UV Radiation in Four Environments. **Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste**, v. 23, n. 4, p. 1–11, 2019.

RASMUSSEN, S. C. Revisiting the Early History of Synthetic Polymers: Critiques and New Insights. **Ambix**, p. 1–17, 2018.

RIBEIRO, F. *et al.* Accumulation and fate of nano- and micro-plastics and associated contaminants in organisms. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 111, p. 139–147, 2019.

RILLIG, B. M. C.; LEHMANN, A. Microplastic in terrestrial ecosystems. **Science**, v. 368, n. 6498, p. 1430–1431, 2020.

RIOS, L. M.; MOORE, C.; JONES, P. R. Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, n. 8, p. 1230–1237, 2007.

RIOS MENDOZA, L. M.; KARAPANAGIOTI, H.; ÁLVAREZ, N. R. Micro(nanoplastics) in the marine environment: Current knowledge and gaps. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 1, p. 47–51, 2018.

RITCHIE, H.; ROSER, M. Plastic Pollution. **Our World in Data**, 2018.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A. G. *et al.* 3D printer waste, a new source of nanoplastic pollutants. **Environmental Pollution**, v. 267, 2020.

RYAN, P. G. *et al.* Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 1999–2012, 2009.

SCHWAFERTS, C. *et al.* Methods for the analysis of submicrometer- and nanoplastic particles in the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 112, p. 52–65, 2019.

SCIRCLE, A. *et al.* Occurrence of Microplastic Pollution at Oyster Reefs and Other Coastal Sites in the Mississippi Sound, USA: Impacts of Freshwater Inflows from Flooding. **Toxics**, v. 8, n. 35, 2020.

SEBILLE, E. VAN *et al.* A global inventory of small floating plastic debris. **Environmental Research Letters**, v. 10, 2015.

SEBILLE, E. VAN; ENGLAND, M. H.; FROYLAND, G. Origin, dynamics and evolution of ocean garbage patches from observed surface drifters. **Environmental Research Letters**, v. 7, 2012.

SHEN, M. *et al.* Recent advances in toxicological research of nanoplastics in the environment: A review. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 511–521, 2019.

SHI, W. *et al.* Immunotoxicities of microplastics and sertraline , alone and in combination , to a bivalve species: size-dependent interaction and potential toxication mechanism. **Journal of Hazardous Materials**, v. 396, n. April, p. 122603, 2020.

SHRUTI, V. C. *et al.* Analyzing microplastics with Nile Red: Emerging trends, challenges, and prospects. **Journal of Hazardous Materials**, v. 423, 2022.

SHRUTI, V. C.; PÉREZ-GUEVARA, F.; KUTRALAM-MUNIASAMY, G. Metro station free drinking water fountain- A potential “microplastics hotspot” for human consumption. **Environmental Pollution**, v. 261, 2020.

SONG, Y. K. *et al.* Combined Effects of UV Exposure Duration and Mechanical

Abrasion on Microplastic Fragmentation by Polymer Type. **Environmental Science & Technology**, v. 51, 2017.

SPITSBERGEN, J. M.; KENT, M. L. The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research — Advantages and Current Limitations. **Toxicologic Pathology**, v. 31, p. 62–87, 2003.

STANTON, T. *et al.* It's the product not the polymer: Rethinking plastic pollution. **WIREs Water**, p. 1–12, 2021.

STRECKER, R. *et al.* Oxygen requirements of zebrafish (*Danio rerio*) embryos in embryo toxicity tests with environmental samples. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 153, n. 3, p. 318–327, 2011.

SUARIA, G. *et al.* Floating macro- and microplastics around the Southern Ocean: Results from the Antarctic Circumnavigation Expedition. **Environment International**, v. 136, 2020.

SUMANAS, S.; LIN, S.; LIN, S. Zebrafish as a model system for drug target screening and validation. **Drug Discovery Today: Targets**, v. 3, n. 3, p. 89–96, 2004.

TAN, Y. *et al.* Compromised Autophagic Effect of Polystyrene Nanoplastics Mediated by Protein Corona Was Recovered after Lysosomal Degradation of Corona. **Environmental Science & Technology**, v. 54, 2020.

TANG, Y. Z.; DOBBS, F. C. Green Autofluorescence in Dinoflagellates, Diatoms, and Other Microalgae and Its Implications for Vital Staining and Morphological Studies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 7, p. 2306–2313, 2007.

TAVARES, A. C. *et al.* The effect of accelerated aging on the surface mechanical properties of polyethylene. **Polymer Degradation and Stability**, v. 81, n. 2, p. 367–373, jan. 2003.

TEUTEN, E. L. *et al.* Potential for Plastics to Transport Hydrophobic Contaminants.

Environmental Science & Technology, v. 41, n. 22, p. 7759–7764, nov. 2007.

____. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 2027–2045, jul. 2009.

THOMPSON, R. C. Lost at Sea: Where Is All the Plastic? **Science.**, v. 304, n. 5672, p. 838, 2004.

TIWARI, M. *et al.* Distribution and characterization of microplastics in beach sand from three different Indian coastal environments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 140, p. 262–273, 2019.

TROTTER, B. *et al.* Long-term exposure of *Daphnia magna* to polystyrene microplastic (PS-MP) leads to alterations of the proteome, morphology and life-history. **Science of The Total Environment**, v. 795, 2021.

UMAR, A. H.; ZAINUDIN, E. S.; SAPUAN, S. M. Effect of accelerated weathering on tensile properties of kenaf reinforced high-density polyethylene composites. **Journal of Mechanical Engineering and Sciences**, v. 2, p. 198–205, 2012.

URBAN-MALINGA, B. *et al.* Microplastics on sandy beaches of the southern Baltic Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 155, 2020.

VIDYASAKAR, A. *et al.* Characterization and distribution of microplastics and plastic debris along Silver Beach, Southern India. **Marine Pollution Bulletin**, v. 158, 2020.

WAHL, A. *et al.* Nanoplastic occurrence in a soil amended with plastic debris. **Chemosphere**, v. 262, 2021.

WANG, L. *et al.* Environmental fate, toxicity and risk management strategies of nanoplastics in the environment: Current status and future perspectives. **Journal of Hazardous Materials**, v. 401, 2021.

WANG, X. *et al.* Photodegradation Elevated the Toxicity of Polystyrene Microplastics to Grouper (*Epinephelus moara*) through Disrupting Hepatic Lipid Homeostasis.

Environmental Science & Technology, v. 54, 2020.

WESSEL, C. C. *et al.* Abundance and characteristics of microplastics in beach sediments: Insights into microplastic accumulation in northern Gulf of Mexico estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, v. 109, p. 178–183, 2016.

XU, E. G. *et al.* Primary and Secondary Plastic Particles Exhibit Limited Acute Toxicity but Chronic Effects on *Daphnia magna*. **Environmental Science & Technology**, 2020.

YAKIMETS, I.; LAI, D.; GUIGON, M. Effect of photo-oxidation cracks on behaviour of thick polypropylene samples. **Polymer Degradation and Stability**, v. 86, 2004.

YANG, D. *et al.* Microplastic Pollution in Table Salts from China. **Environmental Science & Technology**, v. 49, p. 13622–13627, 2015.

ZAMAN, A.; NEWMAN, P. Plastics: are they part of the zero-waste agenda or the toxic-waste agenda? **Sustainable Earth**, v. 4, 2021.

ZHANG, R. *et al.* Combined toxicity of microplastics and cadmium on the zebrafish embryos (*Danio rerio*). **Science of the Total Environment**, v. 743, 2020.

ZHANG, X. *et al.* Microplastics in the endangered Indo-Pacific humpback dolphins (*Sousa chinensis*) from the Pearl River Estuary, China. **Environmental Pollution**, v. 270, p. 116057, fev. 2021.

ZHANG, Y. *et al.* Does microplastic ingestion dramatically decrease the biomass of protozoa grazers? A case study on the marine ciliate *Uronema marinum*. **Chemosphere**, v. 267, 2021.

ZHU, X. *et al.* Growth inhibition of the microalgae *Skeletonema costatum* under copper nanoparticles with microplastic exposure. **Marine Environmental Research**, v. 158, n. April, p. 105005, 2020.

APÊNDICES

As Figura 56, Figura 57, Figura 58 e Figura 59 apresentam os espectros Raman de partículas de PE, PP, PET e PA encontradas na praia de Torres.

Figura 56: Espectro Raman de uma partícula de PE encontrada na costa de Torres/RS

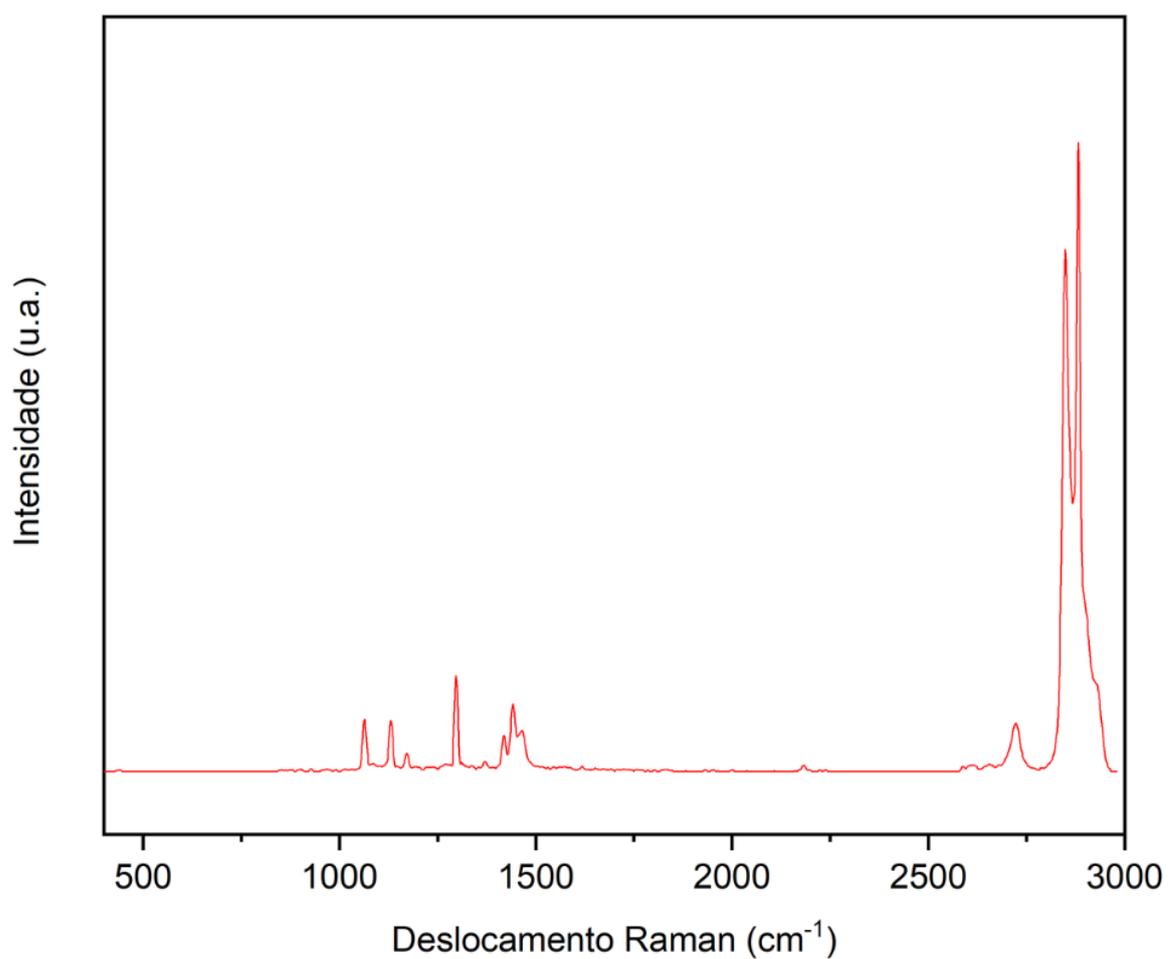


Figura 57: Espectro Raman de uma partícula de PP encontrada na costa de Torres/RS

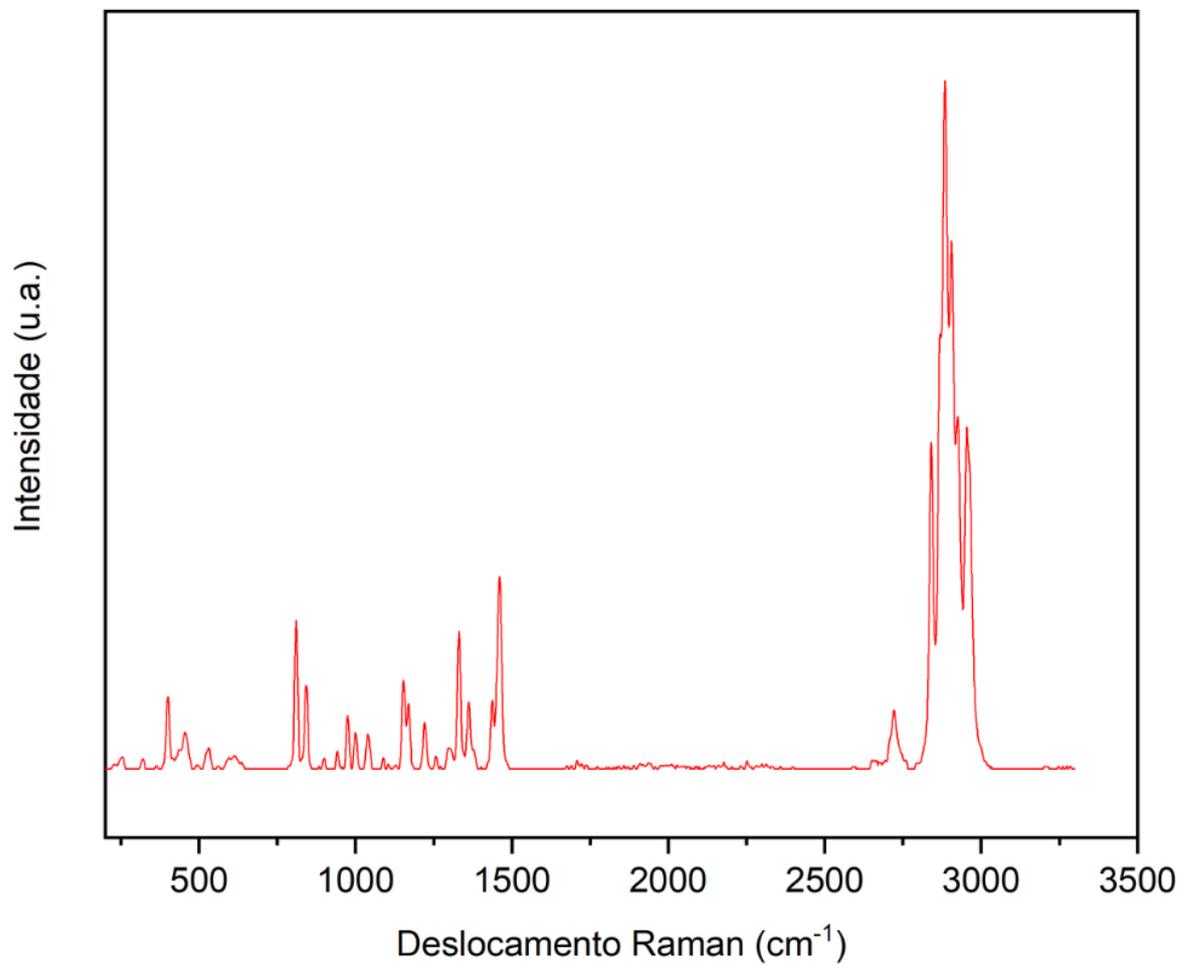


Figura 58: Espectro Raman de uma partícula de PET encontrada na costa de Torres/RS

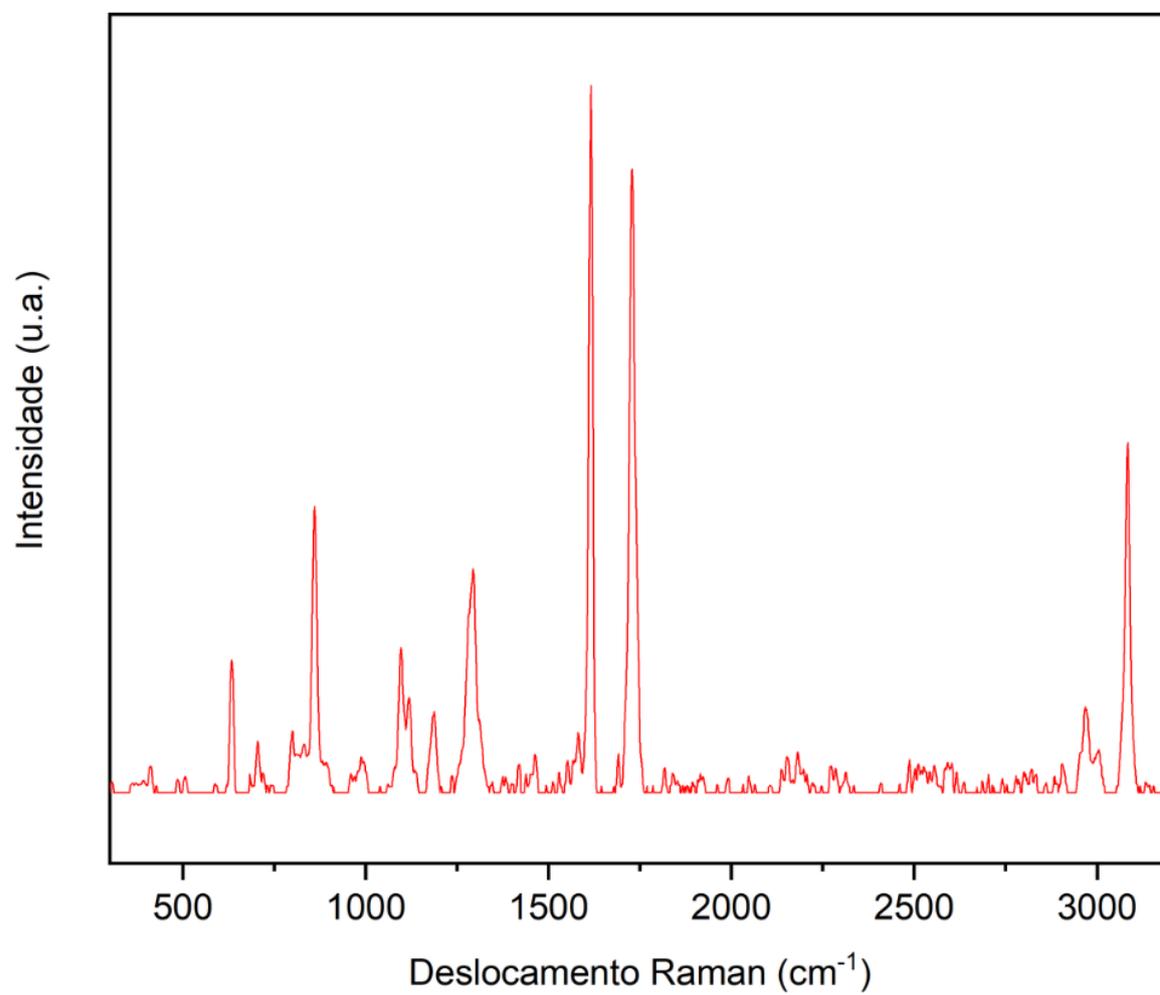
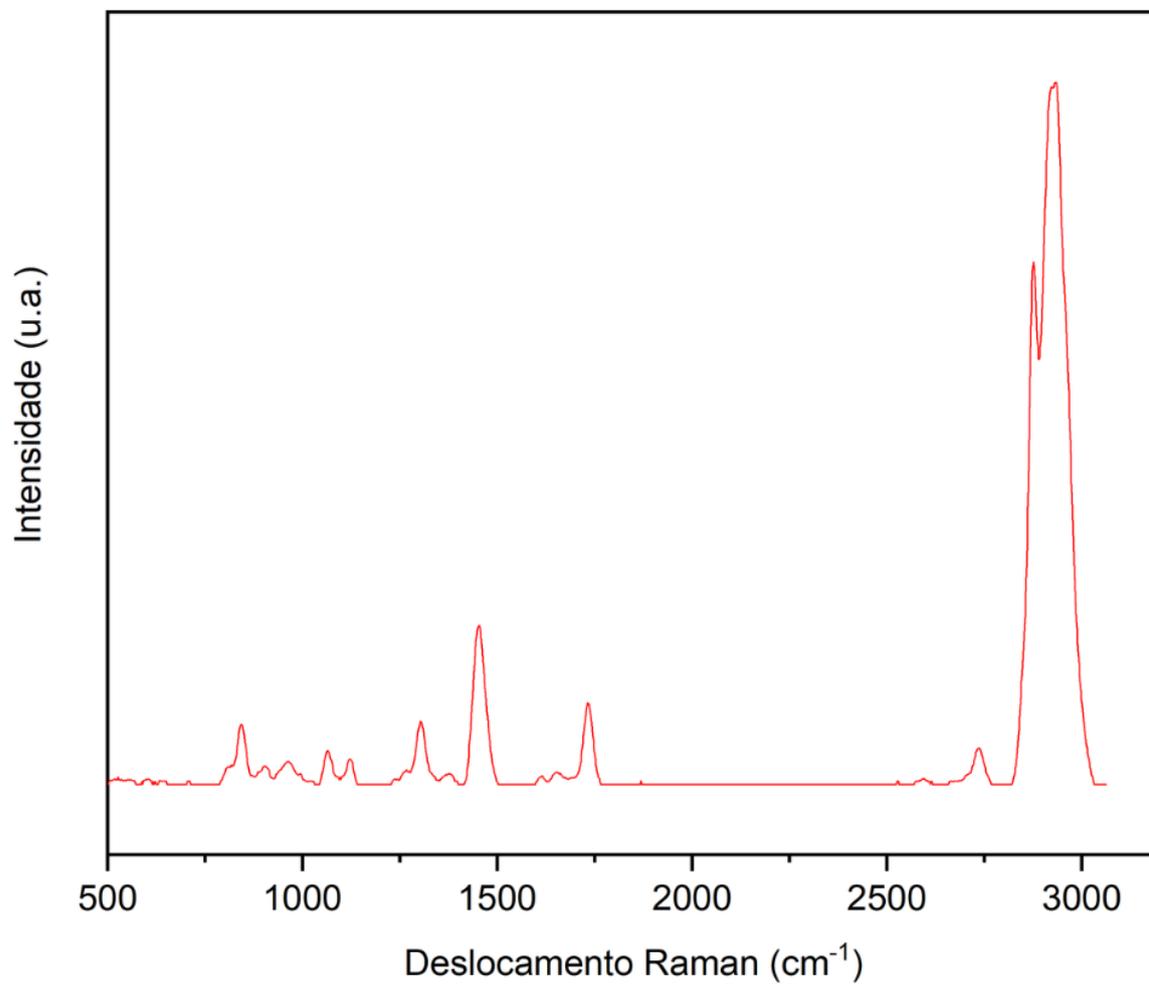


Figura 59: Espectro Raman de uma partícula de PA encontrada na costa de Torres/RS





Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Av. Ipiranga, 6681 – Prédio 1 – Térreo
Porto Alegre – RS – Brasil
Fone: (51) 3320-3513
E-mail: propesq@pucrs.br
Site: www.pucrs.br