



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS TRINDADE
CENTRO TÉCNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

Bianca Vicente Costa Oscar

Avaliação toxicológica da fração aquosa resultado da fotodegradação do Polietileno tereftalato (PET) em ambiente com simulação de luz solar

Florianópolis

2023

BIANCA VICENTE COSTA OSCAR

Avaliação toxicológica da fração aquosa resultado da fotodegradação do Polietileno tereftalato (PET) em ambiente com simulação de luz solar

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA COMO REQUISITO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA AMBIENTAL.

ORIENTADOR: PROF. DR. WILLIAM GERSON MATIAS,
CO-ORIENTADORA: PROF. DR. SILVIA PEDROSO MELEGARI.

FLORIANÓPOLIS
2023

Oscar, Bianca Vicente Costa

Avaliação toxicológica da fração aquosa resultado da fotodegradação do Polietileno tereftalato (PET) em ambiente com simulação de luz solar / Bianca Vicente Costa Oscar ; orientador, William Gerson Matias, coorientador, Sílvia Pedroso Melegari, 2023.

94 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Engenharia Ambiental. 2. Polietileno tereftalato (PET) . 3. Fotodegradação. 4. toxicologia . 5. Avaliação Toxicológica . I. Matias, William Gerson . II. Melegari, Sílvia Pedroso. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

Bianca Vicente Costa Oscar

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA FRAÇÃO AQUOSA RESULTADO DA
FOTODEGRADAÇÃO DO POLIETILENO TEREFALATO (PET) EM AMBIENTE
COM SIMULAÇÃO DE LUZ SOLAR**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Cristiane Funghetto Fuzinato, Dr(a)
Universidade Federal da Fronteira Sul

Prof.(a) Leticia Flohr, Dr(a)
Instituto Federal Catarinense – Campus Camboriú

Prof. Nelson Libardi Junior, Dr
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Engenharia Ambiental.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) William Gerson Matias, Dr.(a)
Orientador(a)

Florianópolis

2023

Dedico esse trabalho a minha avó, Maria Martins Vicente
e a todas as mulheres que, assim como ela, correram
boa parte da vida para que hoje nós pudéssemos andar.
As nossas conquistas são de vocês também.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria possível sem a colaboração de diversas pessoas e instituições.

Agradeço de todo coração:

À minha família e em especial aos meus pais por acreditarem na educação e por todo incentivo e ajuda ao longo dos anos.

Ao professor William Gerson Matias pela orientação, pelos conhecimentos repassados desde a graduação, pela confiança, oportunidade e por sempre acreditar em mim.

À minha coorientadora Silvia Pedroso Melegari pela paciência, disponibilidade, apoio, correções e conselhos para além da tese.

Aos membros da banca, professoras Cristiane Funghetto Fuzinato, Letícia Flohr e professor Nelson Libardi Junior pela disponibilidade e contribuições para a melhoria da tese.

À todos os colegas que fiz durante esses mais de 10 anos de Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX). Agradeço por toda ajuda e contribuições ao longo do meu desenvolvimento enquanto pesquisadora.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo fomento à pesquisa e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEA) pela oportunidade.

À todos os laboratórios parceiros que foram essenciais para a construção desse trabalho. Em especial a pesquisadora Eliana de Medeiros Oliveira do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) por toda ajuda, incentivo e amizade. Você é fora de sério,
Eli!

Ao meu esposo Leonardo Murilo Costa por toda paciência e ajuda. Obrigada pela ajuda na tese, por ouvir meus desabafos e me aconselhar, por entender as minhas ausências e, principalmente, pelo amor e todo cuidado.

“Você não percebeu que você é o
único representante do seu sonho
na face da terra? Se isso não
fizer você correr, chapa,
eu não sei o que vai!”

Emicida – Levanta e Anda

RESUMO

Devido a sua versatilidade e funcionalidade o plástico tornou-se um dos materiais mais bem sucedido na sociedade moderna. Essas características aliadas ao baixo custo de produção, faz com que a produção global de materiais plásticos cresça a cada ano, e como consequência desse consumo desenfreado temos a poluição gerada por seu descarte inadequado. A problemática ambiental desses materiais está ligada ao fato de a maioria dos tipos de plástico não ser biodegradável, levando séculos para sua completa degradação, se acumulando em aterros ou no ambiente natural. Após o despejo no meio ambiente o plástico está suscetível a ação de fatores abióticos e bióticos que podem provocar reações de degradação do material. Independente do método, a degradação dos materiais plásticos resulta em sua fragmentação em pedaços cada vez menores e a liberação de seus componentes químicos. A maioria das pesquisas científicas que consideram o envelhecimento das partículas plásticas devido a processos naturais de degradação tem por objetivo identificar as alterações nos materiais plásticos expostos a um sistema de degradação específico, observando as mudanças das características superficiais e estruturais desses resíduos após a exposição. Hoje em dia, sabe-se que essa exposição prolongada além de gerar dados aos materiais, gera alteração do potencial toxicológico. E estudos avaliando a toxicologia dessas partículas envelhecidas são recentes no meio científico. Por isso, o presente trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos tóxicos da fração aquosa resultado da degradação de fragmentos plásticos de Polietileno tereftalato (PET) expostos por até 24 h a um sistema de degradação que simula a radiação solar aos organismos *D. magna* e *A. fischeri*. Através das análises de microscopia de força atômica e de microscopia eletrônica de varredura verificou-se deterioração da superfície dos fragmentos plásticos devido a exposição a luz solar simulada. Além da modificação no material, foi identificado também a liberação de íons de antimônio através da espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e a liberação de carbono orgânico total, comprovando a degradação. Através da microscopia de confocal, foram identificadas partículas que possivelmente são PET, indicando que a fotodegradação ocasionou a liberação de fragmentos do material. As análises toxicológicas preliminares indicaram danos crônicos ao organismo *D. magna* sendo observados alterações microestruturais através da microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura. Ensaio de estresse oxidativo demonstraram efeito oxidativo nos organismos expostos e através da análise de filmagens, foi verificada alterações nos movimentos torácicos e cardíacos e no comportamento natatório dos organismos. Não foram observados efeitos toxicológicos a bactéria marinha *A. fischeri*.

Palavras-chave: Polietileno tereftalato (PET), Degradação, Fotodegradação, *Daphnia magna*, *Aliivibrio fischeri*.

ABSTRACT

Due to its versatility and functionality, plastic has become one of the most successful materials in modern society. These characteristics, combined with the low production cost, mean that the global production of plastic materials grows every year, and as a consequence of this unrestrained consumption we have the pollution generated by their inadequate disposal. The environmental problems of these materials are linked to the fact that most types of plastic are not biodegradable, taking centuries to completely degrade, accumulating in landfills or in the natural environment. After being dumped into the environment, plastic is susceptible to the action of abiotic and biotic factors that can cause degradation reactions of the material. Regardless of the method, the degradation of plastic materials results in their fragmentation into increasingly smaller pieces and the release of their chemical components. Most scientific research that considers the aging of plastic particles due to natural degradation processes aims to identify changes in plastic materials exposed to a specific degradation system, observing changes in the surface and structural characteristics of these residues after exposure. Nowadays, it is known that this prolonged exposure, in addition to generating data on the materials, also generates changes in the toxicological potential. And studies evaluating the toxicology of these aged particles are recent in the scientific world. Therefore, the present work aims to evaluate the toxic effects of the aqueous fraction resulting from the degradation of polyethylene terephthalate (PET) plastic fragments exposed for up to 24 hours to a degradation system that simulates solar radiation on the organisms *D. magna* and *A. fischeri*. Through atomic force microscopy and scanning electron microscopy analyses, deterioration of the surface of the plastic fragments was observed due to exposure to simulated sunlight. In addition to the modification in the material, the release of antimony ions was also identified through inductively coupled plasma mass spectrometry and the release of total organic carbon, proving the degradation. Through confocal microscopy, particles that were possibly PET were identified, indicating that photodegradation caused the release of fragments of the material. Preliminary toxicological analyzes indicated chronic damage to the *D. magna* organism, with microstructural changes observed through transmission electron microscopy and scanning electron microscopy. Oxidative stress tests demonstrated an oxidative effect on exposed organisms and through film analysis, changes in thoracic and cardiac movements and in the swimming behavior of the organisms were verified. No toxicological effects were observed on the marine bacteria *A. fischeri*.

Keywords: Polyethylene terephthalate (PET), Degradation, Photodegradation, *Daphnia magna*, *Aliivibrio fischeri*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Tipos de plásticos e suas aplicações	24
Figura 2- Reação química que origina o PET.....	25
Figura 3 - Esquema metodológico da pesquisa.	34
Figura 4- Fragmentos plásticos utilizados na pesquisa.	34
Figura 5- Ambiente de degradação. Sendo estrutura externa (a), lâmpada e estrutura de madeira (b) e isolamento do sistema.	35
Figura 6 – Imagens de AFM nos tempos de 0,2, 8, 16 e 24 h de exposição a fotodegradação em UP.	44
Figura 7 - Imagens de AFM de fragmentos plásticos que não passaram pelo processo de fotodegradação (A) e após 24 h de fotodegradação em meio M4 (B), meio da Lemna (C) e meio da água do mar simulada.	46
Figura 8 – Imagens de MEV de fragmentos plásticos que não foram expostos a degradação - controle (A), fragmentos plásticos após 24 h de exposição a fotodegradação no meio M4 (B) e detalhe (C), meio da Lemna (D) e meio de água do mar reconstituída (E).	48
Figura 9- Quantificação de Sb nas amostras de água UP, meio M4, meio da Lemna e água do mar reconstituída empregadas nos ensaios de fotodegradação.	50
Figura 10 - Identificação de possíveis fragmentos de PET nos meios: UP (A – controle, B – após 24 h de fotodegradação), M4 (C – controle, D – após 24 h de fotodegradação), meio Lemna (E – controle, F – após 24 h de fotodegradação) e água do mar reconstituída (G – controle, H – após 24 h de fotodegradação).	52
Figura 11 – Percentual de aumento de COT da fração aquosa resultante da exposição à fotodegradação por 0, 2 e 24 h.	55
Figura 12 - Dia da primeira ninhada dos organismos utilizados no teste crônico com <i>Daphnia magna</i> nas concentrações controle, fração líquida resultado de 2h de fotodegradação (2 h) e fração líquida resultado de 24 h de fotodegradação (24 h) na geração parental (F0) e na terceira geração de filhotes (F3). (* indica significância estatística $p < 0,05$ comparado ao controle do teste)	56
Figura 13 - Micrografias de MET de <i>D. magna</i> do controle apresentando mitocôndrias (A) e tecido epitelial preservados (C) e Daphnias expostas a fração aquosa da degradação por 24 h do PET apresentando mitocôndrias inchadas (B), tecido epitelial danificado (D), vacúolos autofágicos (G), extravassamento celular (F – seta branca) e grande quantidade de mitocôndrias	

na superficial apical (F – seta preta) quando comparado ao controle (E) e rompimento da membrana mitocondrial (H).	60
Figura 14- Micrografias de MEV de <i>D. magna</i> apresentando os apêndices torácicos do controle (A), organismos expostos a fração aquosa de 2 h (B) e 24 h (C) de degradação e danos nos apêndices após exposição a fração aquosa de 24 h (D e E).....	63
Figura 15 - Atividade do membro torácico de <i>Daphnia magna</i> expostas ao controle e as frações aquosas de partículas plásticas fotodegradadas por 2 e 24 h. Os resultados são apresentados como média ± Desvio Padrão. (* indica significância estatística $p < 0,05$ comparado ao controle do teste)	63
Figura 16 – Frequência cardíaca de <i>Daphnia magna</i> expostas ao controle e as frações aquosas de partículas plásticas fotodegradadas por 2 e 24 h. Os resultados são apresentados como média ± Desvio Padrão. (* indica significância estatística $p < 0,05$ comparado ao controle do teste).	65
Figura 17 - Imagens de fluorescência de <i>D. magna</i> das gerações F0 (A, B e C) e F3 (B, E e F) indicadas por fluorescência verde brilhante no controle negativo (A e D) 2 h (B e E) e 24 h (C e F) de fotodegradação após 21 dias do teste crônico de exposição, para F0 e 21 dias de teste crônico de recuperação para F3.	66
Figura 18 - Quantificação da produção de EROs em <i>D. magna</i> exposta nas gerações F0 e F3 ao controle negativo, fração aquosa de 2 e 24 h de fotodegradação. a = significativamente diferente do controle da geração F0 ($p < 5$). b = significativamente diferente do controle da geração F3 ($p < 5$).	68
Figura 19 - Trajetórias médias de natação das Daphnias das gerações F0 e F3 após 0 h (controle negativo), 2 h e 24 h de fotodegradação após 21 dias de teste de exposição crônica para F0 e teste de recuperação crônica para F3.	69
Figura 20 - Distância média percorrida pelas Daphnias das gerações F0 e F3 após 0 h (controle negativo), 2 h e 24 h de fotodegradação após 21 dias de teste de exposição crônica para F0 e teste de recuperação crônica para F3. a = significativamente diferente do controle de geração F0 ($p < 5$). b = significativamente diferente da geração controle F3 ($p < 5$).	70
Figura 21 - Atividade dos membros torácicos (A) e frequências cardíacas (B) de <i>Daphnia magna</i> exposta no teste crônico com a geração parental (F0) e no teste de recuperação crônica para a geração F3 nas concentrações controle (0 h), 2 e 24 h de fotodegradação.	72
Figura 22- Curva resposta da taxa inibição de crescimento da planta após a exposição ao meio Lemna 0, 2 e 24 h de fotodegradação.	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1– Resultados do teste de toxicidade crônica com o organismo <i>D. magna</i> nos tempos de exposição de 2 e 24 horas na geração parental (F0) e teste de toxicidade crônica de recuperação na terceira geração (F3) . (* indica significância estatística $p < 0,05$ comparado ao controle do teste)	55
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATF	Ácido tereftálico purificado
ATD	Tereftalato de dimetilo
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
F0	Geração de <i>D. magna</i> que iniciaram o teste crônico
F3	Filhotes da terceira ninhada de <i>D. magna</i> utilizados no teste crônico de recuperação
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LABTOX	Laboratório de Toxicologia Ambiental
LABCEv	Laboratório de Biologia Celular Vegetal
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LOOSA	Laboratório de Optoeletrônica Orgânica e Sistemas Anisotrópicos
MP	Microplástico
NP	Nanoplástico
PET	Polietileno tereftalato
PE	Polietileno
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	JUSTIFICATIVA	17
2	HIPÓTESES.....	19
3	OBJETIVO.....	20
3.1	OBJETIVO GERAL.....	20
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	20
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
4.1	PLÁSTICO	21
4.1.1	Tipos de plásticos	22
4.1.1.1	<i>Polietileno tereftalato (PET)</i>	25
4.1.2	A problemática dos materiais plásticos	26
4.2	TOXICOLOGIA AMBIENTAL	28
4.2.1	Ensaio Toxicológicos	29
4.3	TOXICOLOGIA DE PLÁSTICOS	30
4.3.1	Partículas envelhecidas	31
5	MATERIAIS E MÉTODOS	32
5.1	PLÁSTICO UTILIZADO NA PESQUISA.....	34
5.2	AMBIENTE DE DEGRADAÇÃO	34
5.3	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS PLÁSTICAS.....	35
5.3.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	36
5.3.2	Microscopia de força atômica (AFM).....	36
5.4	CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO LÍQUIDA	36
5.4.1	Microscopia confocal.....	36
5.4.2	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) ...	37
5.4.3	Carbono Orgânico Total (COT).....	37
5.5	AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA	38

5.5.1	Teste de toxicidades aguda com <i>D. magna</i>	38
5.5.2	Teste de toxicidade crônica com <i>D. magna</i> (F0).....	38
5.5.3	Teste de crônico de recuperação com <i>D. magna</i> (F3)	39
5.5.4	Teste de toxicidade com a bactéria <i>A. fischeri</i>	39
5.5.5	Teste de toxicidade com a macrófita aquática <i>L. punctata</i>	40
5.6	ENSAIO DE NATAÇÃO.....	41
5.7	ATIVIDADE DOS MEMBROS TORÁCICOS E FREQUÊNCIA CARDÍACA	41
5.8	ESTRESSE OXIDATIVO.....	42
5.9	ANÁLISE ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	42
5.10	ANÁLISE ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	43
6	RESULTADOS	44
6.1	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS PLÁSTICAS.....	44
6.1.1	Força Atômica.....	44
6.1.2	MEV	47
6.2	CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO LÍQUIDA	49
6.2.1	Quantificação de antimônio	49
6.2.2	Microscopia Confocal.....	52
6.2.3	COT.....	54
6.3	AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA	55
6.3.1	Toxicidade aguda e crônica com <i>D. magna</i>	55
6.3.2	MET e MEV	60
6.3.3	Atividade dos membros torácicos e frequência cardíaca	63
6.3.4	EROs	66
6.3.5	Ensaio de natação	68
6.3.6	Atividade dos membros torácicos e frequência cardíaca	71
6.3.7	Toxicidade com bactéria luminescente <i>A. fischeri</i>	73

6.3.8	Toxicidade com macrófita <i>L. punctata</i>	73
7	CONCLUSÃO.....	75
8	REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos novos poluentes em todo o mundo envolve produtos químicos orgânicos produzidos pelo homem em decorrência do desenvolvimento humano (AKAN et al., 2021). E o plástico é um dos grandes exemplos desses poluentes pois, devido a sua versatilidade e funcionalidade, tornou-se um dos materiais mais bem sucedidos na sociedade moderna.

Segundo Sanclements (2014), centenas de diferentes tipos de plásticos podem ser fabricados variando a ligação e a estrutura de suas cadeias de polímero. E toda essa variabilidade, permite que esse material além dos inúmeros tipos, tenha as mais diferentes aplicações devido as suas características. Eles podem ajudar a manter os alimentos mais seguros e frescos quando utilizados como embalagens, podem compor artigos de segurança como capacetes, cadeiras de segurança infantil e airbags automotivos, quando utilizados como canos e conexões, possibilitam o abastecimento de água nas residências, compõem importantes meios de comunicação, como telefones celulares, originam cadeiras e mesas, copos e pratos, computadores, EPIs, instrumentos médicos, brinquedos, sacolas de supermercado, entre outros.

Com essas inúmeras possibilidades de uso, aliado ao baixo custo de produção, a produção global de materiais plásticos cresce a cada ano, sendo estimado que o mundo, em até 2050, tenha produzido 34 bilhões de toneladas de plástico (Abbing, 2019). Como consequência desse consumo desenfreado temos a poluição gerada por seu descarte inadequado. Segundo Geyer et al. (2017), 8,9 bilhões de toneladas de plásticos já foram fabricados desde meados do século passado, quando os plásticos começaram a ser produzidos em escala industrial. Desse valor, cerca de dois terços (6,3 bilhões de toneladas) viraram rejeito, enquanto 2,6 bilhões de toneladas ainda estão em uso. Hopewell et al. (2009) ainda salienta que cerca de metade dos plásticos produzidos são usados para aplicações descartáveis de uso único fortalecendo ainda mais a ideia de descarte em excesso desses materiais. Esse acúmulo inadequado de resíduos plásticos aliado a uma produção desenfreada, resulta em problemas ambientais.

A problemática ambiental desses materiais está ligada ao fato de a maioria dos tipos de plástico não ser biodegradável (ALI et al., 2021), levando séculos para sua completa degradação. Isso ocorre porque os monômeros comumente utilizados na síntese de polímeros plásticos geralmente derivam de hidrocarbonetos fósseis. Como resultado, os plásticos tendem a se acumular em vez de se decompor em aterros ou no ambiente natural (BARNES et al., 2009). Dessa forma, o lixo plástico descartado de forma inadequada entra no meio aquático e migra através de processo hidrodinâmico a longa distância, o que resulta em poluição mundial

(GEYER; JAMBECK; LAW, 2017). No ambiente marinho, por exemplo, o plástico é responsável por cerca de 60-80% do lixo marinho (LAW, 2017).

Após o despejo no meio ambiente o plástico está suscetível a ação de fatores abióticos e bióticos que podem provocar reações de degradação do material. Existem muitos tipos de degradação, incluindo degradação biológica, degradação física e degradação química (DU et al., 2021). Independente do método, a degradação dos materiais plásticos resulta em sua fragmentação em pedaços cada vez menores e a liberação de seus componentes químicos.

Muitos são os estudos toxicológicos relacionados a fragmentos desses materiais, incluindo partículas plásticas em tamanho micro e nanométrico. Isso por que as partículas em menor escala podem ser ingeridas direta e/ou indiretamente por espécies aquáticas mais prontamente do que partículas maiores, quando confundido com comida (Blair et. al, 2017). Porém, a maioria dos estudos avalia a toxicidade dos materiais plásticos através de ensaios pontuais, utilizando apenas partículas plásticas virgens (HORTON et al., 2017). Sabe-se que se envelhecida e contaminada, as partículas podem tem maior potencial para uma maior transferência química do que as partículas virgens (HORTON et al., 2017).

Ainda no seu estudo, Horton et al. (2017) verificou que a exposição a nanoplásticos (NP) de poliestireno envelhecido artificialmente causou efeitos de mortalidade, crescimento e reprodução ao organismo teste *Daphnia magna* ao longo de um período de 21 dias, enquanto as NP de poliestireno virgens não causaram efeitos significativos na mortalidade. Evidenciando ainda mais a necessidade de considerarmos a toxicidade das partículas nas diferentes escalas de tempo ambientais.

O politereftalato de etileno (PET) é o mais abundante plástico de poliéster fabricado no mundo (AUSTIN et al., 2018). Trata-se de um polímero termoplástico semicristalino (SARGENT et al., 2019) que desenvolvido em meados da década de 1940, constitui o termoplástico mais comumente fabricado devido às suas excelentes características mecânicas e térmicas (TANIGUCHI et al., 2019). O PET respondeu por aproximadamente 8,4% da demanda de materiais plásticos no mundo em 2020, totalizando 31 milhões de toneladas de uma produção total de plástico de 367 milhões de toneladas (PLASTICS EUROPE, 2021). Além disso, como mencionado anteriormente, o aumento da demanda ocasiona um aumento da produção e consequentemente do descarte desse material, fazendo com que o PET seja um dos grandes vilões da poluição ambiental na atualidade.

O Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX), parte integrante da estrutura de pesquisa do ENS / PPGA / UFSC se destaca por buscar sempre temas atuais, relevantes e

inovadores na pesquisa científica. Destacando-se em estudos com nanopartículas metálicas de óxido de cobre (NP CuO) sobre os organismos *Daphnia magna* e *Aliivibrio fischeri* (ROSSETTO et al., 2014), de óxido de cromo III (NP Cr₂O₃) sobre os organismos *D. magna* e *A. fischeri* (PUERARI et al., 2016) e sobre as algas verdes *Chlamydomonas reinhardtii* (COSTA et al., 2016) e óxido de prata sobre a lemnácia *Landoltia punctata* (LALAU et al., 2020). Recentemente, trabalhou com o desenvolvimento de uma membrana de filtração nanoestruturada juntamente com a avaliação toxicológica e testes de eficiência na remoção de contaminantes, possuindo uma dissertação (OLIVEIRA, 2016) e duas teses (GONÇALVES, 2018 e PUERARI, 2019) já concluídas. Atualmente, além de desenvolver pesquisas considerando misturas, o laboratório vem realizando estudos simulando a degradação de materiais plásticos afim de verificar a toxicidade desses materiais após o processo de envelhecimento, pesquisa essa exposta no presente trabalho.

1.1 JUSTIFICATIVA

A poluição relacionada aos resíduos plásticos se tornou tão relevante e urgente que atualmente existem esforços pela implementação de um tratado global negociado pelas Nações Unidas com o objetivo de controlar e reduzir esse problema. De dois em dois anos acontece uma assembleia formada pelos 193 países membros da ONU que se reúnem para avançar na governança ambiental global.

Na 5ª Assembleia das Nações Unidas para o Meio Ambiente que ocorreu em 2022, ministros e ministras do meio ambiente de todo o mundo concordaram em estabelecer um Comitê Intergovernamental de Negociação com o mandato de elaborar um acordo internacional juridicamente vinculante para acabar com a poluição plástica. O resultado dessa Assembleia é considerado o acordo multilateral sobre questões ambientais mais significativo desde o acordo de Paris em 2015 devido a situação preocupante que vivemos hoje com relação a esses resíduos. Durante sua fala, Amina J. Mohammed, Secretária-Geral Adjunta da ONU, afirmou que "Hoje, não há nenhuma área do planeta que não seja afetada pela poluição plástica, desde os sedimentos do mar profundo até o Monte Everest. O planeta merece uma solução multilateral que aborde a questão da fonte ao mar. Um acordo global juridicamente vinculante sobre poluição plástica será um primeiro passo verdadeiramente bem-vindo" (UNEP, 2022).

Esse interesse nos resíduos plásticos também se evidencia nas pesquisas científicas. Segundo o site *Science Direct*, uma das principais bases de dados de artigos científicos, em

2021, cerca de 80 mil artigos científicos foram publicados relacionados a plásticos. Em 2022, até o final de agosto, são relatados quase de 72 mil publicações sobre o tema. Dessas publicações existem pesquisas referente a reciclagem (ARMENISE et al., 2021; DA SILVA SPINACÉ; DE PAOLI, 2005) e valorização dos resíduos plásticos (CHANDRAN; TAMILKOLUNDU; MURUGESAN, 2020), identificação de plásticos no meio ambiente (KARAKOLIS et al., 2019; LV et al., 2019; MAI et al., 2018), análises de quantificação (ERNI-CASSOLA et al., 2017; LV et al., 2019; ZARFL, 2019), dos efeitos desses resíduos (BLAIR et al., 2017; RUMBAK, 2016; ZHANG et al., 2022) e tecnologias para solucionar a poluição plástica (SCHMALTZ et al., 2020). Uma linha de pesquisa que vem crescendo é a simulação do envelhecimento de partículas plásticas. Isso porque, ao estarem expostas a fatores bióticos ou abióticos os materiais plásticos se degradam, alterando as características iniciais do material. As pesquisas desenvolvidas, em sua maioria, têm por objetivo identificar as alterações nos materiais plásticos expostos a um sistema de degradação específico, observando características superficiais e estruturais desses resíduos.

O envelhecimento das partículas plásticas associado a toxicologia ambiental é muito pouco explorado na literatura, mesmo sendo relatado em muitos trabalhos que o envelhecimento altera o potencial toxicológico dos materiais. Das pesquisas publicadas, Cui et al. (2017) e Jiang et al. (2018) realizaram análises toxicológicas de partículas plásticas em microcrustáceos, Van Pomerén et al. (2017) em peixes e Wang et al. (2019) em minhocas. Porém, todos os trabalhos citados não relacionaram toxicologia ao envelhecimento, fazendo análises apenas com o material recém-sintetizado.

Assim, compreender de que forma partículas plásticas que sofrem ação de fatores externos atuam nos organismos é de extrema relevância no âmbito científico. No âmbito legal e social a relevância se mantém. A exposição a partículas plásticas aumenta com o aumento da produção e utilização desses materiais. Conseqüentemente, o conhecimento do potencial toxicológico desses resíduos poderá auxiliar no desenvolvimentos de leis de controle de geração e saúde ambiental.

A presente pesquisa está amparada pelo projeto “Estudo do mecanismo de ação tóxica de nanoplásticos em misturas com contaminantes emergentes.” - FAPESC / 202105338 .Edital de Chamada Pública Fapesc nº 12/2020 – Programa de Pesquisa Universal. Contribuindo com a formação de recursos humanos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEA) da UFSC a nível de doutorado.

2 HIPÓTESES

Considerando a problemática relacionada ao aumento do consumo de plástico, a destinação incorreta do resíduo e seu envelhecimento devido ação de agentes abióticos, formularam-se três hipóteses para essa pesquisa. Sendo elas:

1 – O envelhecimento de fragmentos de garrafa PET em meio aquoso devido a fotodegradação confere maior potencial tóxico em relação as partículas plásticas não envelhecidas aos organismos *D. magna*, *A. fischeri*, e *L. punctata*.

2 – Quanto maior o tempo de exposição a fotodegradação, maior serão as alterações no PET incluindo liberação de compostos e fragmentação.

3 – A toxicidade do envelhecimento pode ser associada a liberação de antimônio, principal catalisador utilizado na fabricação das embalagens PET.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos tóxicos da fração aquosa resultante da degradação de fragmentos plásticos de PET expostos a um sistema de degradação que simula a radiação solar por até 24 h aos organismos *D. magna* e *A. fischeri* e *L. punctata*.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar a fotodegradação de fragmentos de PET pela exposição a luz solar simulada num ambiente aquoso;
- Realizar a caracterização físico-química da fração líquida do sistema de fotodegradação, após a exposição dos fragmentos de PET;
- Avaliar os efeitos toxicológicos da fração líquida resultado da fotodegradação sobre o microcrustáceo *D. magna*;
- Verificar possíveis alterações morfofuncionais e ultraestruturais do microcrustáceo *D. magna* exposta à fração líquida do sistema de fotodegradação;
- Avaliar os efeitos toxicológicos da fração líquida resultado da fotodegradação empregando a bactéria luminescente *A. fischeri*;
- Determinar a toxicidade aguda da fração líquida resultado da fotodegradação sobre a macrófita *L. punctata*.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 PLÁSTICO

Segundo De Paula, (2016), plástico é um material orgânico polimérico sintético de constituição macromolecular derivado do petróleo. As palavras polímeros e plásticos são frequentemente utilizadas como sinônimos, mas tem significado distinto. Os polímeros são materiais puros resultado do processo de polimerização que possuem longa cadeia molecular (CRAWFORD; MARTIN, 2020). Podem ser naturais ou sintéticos. Por isso, é importante salientar que todos os plásticos são polímeros, mas nem todos os polímeros são plásticos. Strong (2005) define plásticos como materiais compostos principalmente por moléculas grandes (polímeros) que são feitas sinteticamente ou que ocorrem naturalmente com alto grau de modificação (raro).

Os plásticos oferecem vantagens como leveza, resiliência, resistência à corrosão, cor, transparência, facilidade de processamento etc., (CRAWFORD; MARTIN, 2020). O tamanho e a estrutura da molécula do polímero determinam as propriedades do material plástico, permitindo assim sua incorporação em uma ampla gama de aplicações (CHANDRAN; TAMILKOLUNDU; MURUGESAN, 2020) como é possível observar na Figura 1.

É comum pensar que o plástico é uma descoberta relativamente recente, mas, no século XIX eles já eram vistos como uma grande curiosidade química. Isso por que os polímeros naturais já conhecidos como seda, goma-laca, betume, borracha e celulose são recursos finitos. E por isso, nesse mesmo século deram início as tentativas para desenvolver um material polimérico sintético.

Alguns pesquisadores indicam que o plástico surgiu no ano de 1862 quando o britânico Alexander Parkes na Exposição Internacional de Londres apresentou o “Parkesine” (CHANDRAN; TAMILKOLUNDU; MURUGESAN, 2020; CRAWFORD; MARTIN, 2020; SANCLEMENTS, 2014). Tratava-se de um polímero, mas não totalmente sintético, pois era uma mistura do polímero orgânico celulose, ácido nítrico e um solvente. O produto foi apresentado como um novo material com numerosas aplicações como por exemplo; em medalhões, pentes, cabos de faca, caixas, canetas e porta-canetas. Com essa descoberta, “Parkesine” acabou conquistando a medalha de “Produto de excelência” na exposição Internacional e deu início a um grande avanço na ciência dos polímeros e uma grande mudança no papel que as pessoas viam para os polímeros na sociedade e indústria.

Na década de 1940, a Segunda Guerra Mundial desempenhou um papel significativo no estímulo ao avanço e desenvolvimento dos materiais plásticos (CRAWFORD; QUINN, 2017; SANCLEMENTS, 2014). Na época, a produção plástica era quase que restrita a plásticos de guerra, tendo uso principalmente no desenvolvimento de armas nucleares. Pessoas fora da área militar não usavam realmente o material. Como resultado, o plástico chegou a todos os tipos de produtos, revelando seus muitos usos sofisticados, com a proporção e funcionalidade que tem hoje. Segundo Abbing (2019), se a produção global de plástico continuar crescendo na taxa atual, o mundo terá produzido 34 bilhões de toneladas até 2050.

4.1.1 Tipos de plásticos

Os plásticos são classificados em dois grupos de acordo com suas características de fusão ou derretimento. Uma classificação importante para os plásticos é quanto às características de fusibilidade, segundo a qual esses materiais podem ser divididos em termoplásticos e termorrígidos. São denominados termoplásticos aqueles materiais capazes de serem moldados várias vezes devido à sua característica de tornarem-se fluidos, sob ação da temperatura, e depois retornarem às características anteriores quando há um decréscimo de temperatura (CANGEMI; SANTOS; CLARO NETO, 2005). Ou seja, são sólidos à temperatura ambiente que podem ser derretidos ou amolecidos pelo aquecimento, colocados em um molde ou outro dispositivo de modelagem e resfriados para dar a forma desejada (BRENT, 2005). Como exemplo de termoplásticos temos o Polietileno tereftalato (PET), Polietileno de Alta Densidade (PEAD), Polietileno de Baixa Densidade (PEBD), polipropileno (PP), Poliestireno (OS), Polietileno (PE) e outros. Os termoplásticos representaram aproximadamente 90% da demanda total de plástico da Europa no ano de 2006 (ANDRADY; NEAL, 2009) e no Brasil, apesar da ampla variedade de termoplásticos, apenas cinco polímeros (PE, PP, PVC, PET e PS) já representam cerca de 90% do consumo nacional (DA SILVA SPINACÉ; DE PAOLI, 2005).

Por outro lado, muitos plásticos são maleáveis apenas no momento da fabricação do objeto, depois de pronto, não há como remodelá-los, já que as cadeias macromoleculares estão unidas entre si por ligações químicas (reticulação) (CANGEMI; SANTOS; CLARO NETO, 2005). Materiais que se comportam dessa maneira recebem o nome de termorrígidos. Os termorrígidos ou termofixos são aqueles que não derretem quando aquecidos, o que impossibilita a sua reutilização através dos processos convencionais de reciclagem. Como exemplo desse tipo de plástico temos o etileno acetato de vinila (EVA).

Literalmente, centenas de diferentes tipos de plásticos podem ser feitos variando a ligação e a estrutura de suas cadeias de polímero (SANCLEMENTS, 2014). Para facilitar a diferenciação desses polímeros, criou-se um código de identificação com numeração variando de 1 a 7 dentro de um triângulo de três setas e sob o mesmo uma abreviatura, cujo objetivo é indicar o tipo de plástico do qual o produto é feito. Esse sistema de numeração foi desenvolvido em 1988 pela American Society of the Plastics Industry (SPI), denominado Resin Identification Symbol System (RISS). No Brasil, o RISS serviu como base para a norma da ABNT NBR 13230/2008 – Simbologia indicativa de reciclabilidade e identificação de materiais plásticos. Esse código de identificação está impresso nas embalagens dos produtos e têm por objetivo facilitar a recuperação dos recipientes plásticos descartados com o resíduo sólido urbano, uma vez que auxiliam sua separação e posterior reciclagem e revalorização (COLTRO; GASPARINO; QUEIROZ, 2008).

De certa forma, o uso dessa simbologia acaba dando a impressão que todas as sete categorias de plástico são regularmente e facilmente reciclados. Porém, isso não é a realidade. Possuir um símbolo RISS não significa que o material pode ser reciclado (SANCLEMENTS, 2014). Apesar disso, a simbologia ajuda muito na gestão eficaz dos resíduos sólidos.

Figura 1- Tipos de plásticos e suas aplicações

 PET Polietileno Tereftalato		Embalagens: garradas e bandejas
 PEAD Polietileno de alta densidade		Embalagens de produtos químicos e tubos utilizados na Construção Civil
 PVC Policloreto de Vinila		Canos e conexões, calçados e canaletas para cabeamento elétrico
 PEBD Polietileno de Baixa Densidade		Filme envolvendo engradados de bebidas e sacos de lixo
 PP Polipropileno		Tampas de garrafa, cadeiras plásticas e brinquedos
 PS Poliestireno		Embalagens descartáveis
 Outros*		Cds, DVDs e componentes automotivos

Acrilonitrila-Butadieno-estireno (ABS), acetato-vinilo de etileno (EVA), outros.

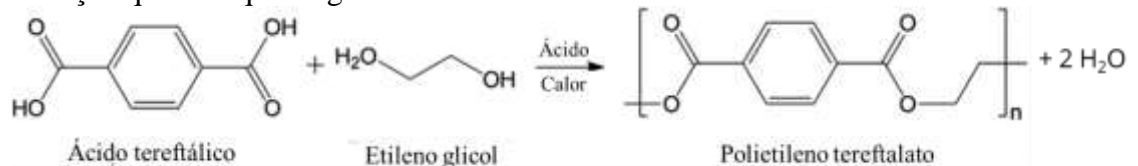
Fonte: A autora, 2020.

4.1.1.1 Polietileno tereftalato (PET)

Desde o seu patenteamento em 1941, o polietileno tereftalato (PET) tornou-se um material amplamente utilizado em uma série de ramos industriais, desde embalagens, têxteis e tecidos, filmes, automotivos, eletrônicos e muito mais (MALIK et al., 2017; SARGENT et al., 2019). Esse tipo de material apresenta um dos maiores índices de crescimento em consumo no país, acima de 2.200% na última década (Plástico Online, 2003 apud Da Silva Spinacé & De Paoli, 2005). Ele é amplamente utilizado na fabricação de recipientes para refrigerantes, água com e sem gás, para a produção de filmes plásticos e chapas plásticas (ARYAN; YADAV; SAMADDER, 2019). Além disso, é uma das fibras sintéticas mais utilizadas na indústria têxtil global, sendo conhecido como poliéster (PUDACK; STEPANSKI; FÄSSLER, 2020; VALH et al., 2020). Trata-se do material plástico de poliéster mais fabricado no mundo (AUSTIN et al., 2018).

O PET foi polimerizado pela primeira vez em 1941 pelos químicos Whinfield e Dickson que procuravam desenvolver materiais poliméricos para uso como fibras têxteis (ANDRADY; NEAL, 2009; PUDACK; STEPANSKI; FÄSSLER, 2020). De modo geral, ele é produzido a partir de monômeros de etileno glicol e ácido tereftálico purificado (ATF) ou tereftalato de dimetilo (ATD) (PANG et al., 2016) (Figura 2). A polimerização desses monômeros de petróleo acontece geralmente com o auxílio de catalisadores à base de antimônio, titânio ou germânio (WESTERHOFF et al., 2008). A produção industrial do PET pode ser realizada em duas ou três etapas, dependendo de sua aplicação.

Figura 2- Reação química que origina o PET.



Fonte: A autora (2020).

De modo geral, trata-se de um dos plásticos comerciais mais atraentes devido às suas excelentes propriedades como transparência, durabilidade, moldabilidade e pelo seu baixo custo (TANIGUCHI et al., 2019). Patenteado em 1973, garrafas e potes PET ganharam

aceitação do mercado e tem sido utilizado em todo o mundo como recipientes para bebidas (AUSTIN et al., 2018; TANIGUCHI et al., 2019). Uma vez que dos poucos polímeros potencialmente adequados para garrafas, o PET é o único plástico com um equilíbrio de propriedades como transparência (quase 100% de transmissão de luz em uma garrafa), brilho, peso leve, resistência à permeação de dióxido de carbono, resistência à água e sua ampla disponibilidade como plástico econômico e reciclável. (ANDRADY; NEAL, 2009; PANG et al., 2016; PUDACK; STEPANSKI; FÄSSLER, 2020). Todas essas propriedades resultaram na substituição quase que total do vidro na Europa para quase todas as aplicações, exceto as mais exigentes, que exigem barreira de oxigênio e resistência aos raios UV para proteger o conteúdo, por exemplo.

Os resíduos de garrafas PET podem ser reciclados para a fabricação de novas garrafas PET com a mesma finalidade ou podem ser convertidos em flocos de PET para a preparação de fibras descontínuas de poliéster, folhas de PET e fita adesiva (ARYAN; YADAV; SAMADDER, 2019). A reciclagem pode acontecer de modo mecânico, quando o objetivo é a obtenção de estruturas menores (fibras, flocos), e também de modo químico, quando se objetiva a reciclagem de garrafas em novas garrafas, envolvendo processos de degradação e repolimerização da cadeia. A reciclagem química pode ser realizada por hidrólise, glicólise, metanólise ou saponificação, formando assim diferentes produtos de degradação (PUDACK; STEPANSKI; FÄSSLER, 2020).

Embora seja um dos tipos de plástico mais economicamente viáveis para a reciclagem (PUDACK; STEPANSKI; FÄSSLER, 2020), uma parte substancial das embalagens acaba virando resíduo de plástico. Fazendo com que o plástico PET seja considerado o principal resíduo sólido a deteriorar o meio ambiente (UBAIDULLAH et al., 2020).

4.1.2 A problemática dos materiais plásticos

Os plásticos têm aplicação cada vez maior no mundo moderno. O uso desse material foi se intensificando devido as propriedades mais vantajosas quando comparados a materiais tradicionalmente usados como metal e cerâmica (KEDZIERSKI et al., 2020). Vantagens como sua baixa densidade garantindo produtos mais leves, baixo ponto de fusão o que facilita todo o seu processamento, alto poder de extensão, baixa condutividade térmica garantindo bom isolamento térmico, clareza óptica podendo dar origem a materiais claros e até mesmo transparentes e facilidade de obtenção de peças com cor e sensibilidade ao solvente (BRENT,

2005). Além disso, são materiais de baixo custo, facilmente moldável, hidrofóbico e bio-inerte (LEBRETON; ANDRADY, 2019).

A versatilidade e funcionalidade do plástico é o que o tornou tão bem-sucedido na sociedade que vivemos hoje. Toda essa variação de características permite que ele apareça em inúmeros produtos e sirva a muitos usos. De acordo com Andradý & Neal (2009) o uso do plástico garante benefícios a saúde, segurança, economia de energia e conservação de materiais.

Com todos os benefícios e aplicações indicadas anteriormente, desde o início de sua produção em larga escala na década de 1950, o rápido crescimento na produção de plástico tem sido surpreendente, superando a maioria dos materiais fabricados pelo homem (GEYER; JAMBECK; LAW, 2017). Essa produção em massa e o longo tempo de degradação dos plásticos resultou em preocupações ambientais elevadas. Isso porque polímeros sintéticos são mais duráveis, assim, demoram mais tempo para se decompor, em torno de 500 a 1000 anos, acumulando cada vez mais no meio ambiente (BARNES et al., 2009). Kedzierski et al. (2020) cita em sua pesquisa três fatores como os responsáveis pelo aumento do uso de materiais plásticos sendo eles; substituição de materiais de fabricação tradicionais por plástico, aumento e concentração de populações e acesso a uma sociedade de consumo.

Do que começou como um problema estético de lixo plástico nas cidades, campos, e margens de rios, logo se tornou causador de asfixia e emaranhamento da vida selvagem (BARNES et al., 2009). A quantidade de detritos plásticos que foram identificados no meio ambiente aumentou e na atual taxa de crescimento, estima-se que a produção de plásticos duplique nos próximos 20 anos (LEBRETON; ANDRADY, 2019). Em 2015, aproximadamente 6300 milhões de toneladas de resíduos plásticos foram gerados, cerca de 9% dos quais foram reciclados, 12% foram incinerados e 79% foram acumulados em aterros ou no ambiente natural. Se as tendências atuais de produção e gerenciamento de resíduos continuarem, cerca de 12.000 milhões de toneladas de resíduos plásticos estarão em aterros sanitários ou no ambiente natural até 2050 (GEYER; JAMBECK; LAW, 2017). Floyd (2016) afirma que a poluição plástica foi inicialmente encontrada no oceano na década de 1970, mas agora está se tornando uma questão tão prevalente que, se as tendências atuais continuarem, haverá mais plástico no oceano do que peixe até o ano 2050 em termos de peso.

Hoje os detritos plásticos se acumulam em ambientes terrestres, em mar aberto, nas costas das ilhas mais remotas e no fundo do mar (BARNES et al., 2009). Por poderem viajar por longas distâncias (PENG et al., 2020), fragmentos ou aditivos de plástico são encontrados

em áreas remotas, como florestas desabitadas (ALLEN et al., 2019) e incorporadas ao gelo ártico marinho após ser transportado por correntes oceânicas (OBBARD et al., 2014).

Após o despejo no meio ambiente o plástico está suscetível a ação de fatores abióticos e bióticos que podem provocar reações de degradação do material. Os macrolásticos (MA) (>5 mm) podem se degradar formando então os microplásticos (MP) (1 μ m a 5 mm), que por sua vez, ao se degradarem, dão origem aos nanoplásticos (NP) (< 100 nm). A fragmentação de MA e MP em NP aumenta a complexidade do problema global de resíduos plásticos (PRADEL et al., 2020) pois o tamanho das partículas é chave importante na sua toxicidade. Uma vez que partículas plásticas em menor escala podem ser ingeridas direta e/ou indiretamente por espécies aquáticas mais prontamente do que partículas maiores, quando confundido com comida (BLAIR et al., 2017). Embora sua densidade, de modo geral, seja mais leve que a água do mar, levando ao seu acúmulo inicial nas águas superficiais, a fragmentação dos detritos plásticos pode causar o afundamento nas colunas de água (PENG et al., 2020). Os fatores de afundamento incluem não apenas a densidade dos polímeros, mas também a bioincrustação que leva ao afundamento de quase todas as categorias de plásticos comerciais no fundo do mar (ENGLER, 2012). Com o tempo, conforme eles se separam em pedaços cada vez menores e ficam mais pesados devido a aderência das algas que se fixam a eles, esses plásticos afundam. Por causa disso, conforme você se afasta da costa, você se depara com menos plástico flutuante (Abbing, 2019).

Estudos científicos em água doce e salgada relatam impactos ecológicos ligados a asfixia, vias digestivas bloqueadas, danos aos órgãos, danos físicos e a morte de espécies que ingeriram direta ou indiretamente partículas MP ou NP (DERRAIK, 2002; EERKES-MEDRANO; THOMPSON; ALDRIDGE, 2015; HERMABESSIERE et al., 2018; LI et al., 2020; ROCHMAN et al., 2013). Além disso, bibliografias relatam também que esses materiais podem transportar poluentes orgânicos persistentes (MATO et al., 2001), espécies não endêmicas para novos locais (RUMBAK, 2016) e distribuir algas associadas com marés vermelhas (MASÓ et al., 2003). Há indícios também de bioacumulação e bioamplificação desses detritos plásticos podendo até mesmo atingir os seres humanos (BLAIR et al., 2017; FARRELL; NELSON, 2013).

4.2 TOXICOLOGIA AMBIENTAL

O aumento da exposição do meio ambiente a compostos provenientes da ação humana, tanto doméstica quanto industrial fez com que surgisse um novo ramo da toxicologia, a toxicologia ambiental. A toxicologia ambiental é definida como a ciência que preocupa-se com os efeitos de contaminantes em vários sistemas ecológicos (GERBA, 2019). Em outras palavras, trata-se do estudo dos impactos de poluentes sobre a estrutura e o funcionamento de sistemas ecológicos (do molecular ao ecossistema) (LANDIS; YU, 1995).

Os efeitos tóxicos são observados a partir dos ensaios toxicológicos. Através desses ensaios é possível estudar as interações tóxicas de substâncias químicas no ecossistema e sua capacidade de afetar a fisiologia normal de organismos vivos (CALDAS, 1999).

Na literatura ainda existe divergência com relação ao significado do termo “Toxicologia Ambiental” e “ecotoxicologia”. Matias (2005) define que a toxicologia tradicional trata dos efeitos tóxicos sobre organismos individualmente; já a ecotoxicologia estuda o impacto sobre as populações de organismos vivos ou sobre ecossistemas. Isso por que, o efeito sobre um indivíduo não necessariamente será o mesmo observado em sua população ou para o ecossistema em que vive. Isto ocorre principalmente devido a interações da substância tóxica, dos organismos e do ambiente, viabilizando uma série de reações como bioacumulação, degradabilidade, mobilidade das substâncias e bioamplificação. Dessa forma, podemos definir ecotoxicologia como a área especializada da toxicologia ambiental, baseada no estudo dos efeitos ocasionados por agentes químicos e físicos sobre a dinâmica das populações e comunidades integrantes de ecossistemas definidos (RONCO, 2004).

4.2.1 **Ensaio Toxicológicos**

Testes de toxicidade são ensaios realizados sob condições experimentais específicas e controladas, que tem como objetivo avaliar os efeitos nocivos das substâncias a serem analisadas, bem como o seu grau de toxicidade sobre os organismos vivos (COSTA et al., 2008; MULLER, 2011).

Esses ensaios tornam-se instrumentos importantes na avaliação do potencial de risco ambiental dos contaminantes uma vez que somente as análises físico-químicas não são suficientes. As análises físico-químicas desconsideram efeitos da mistura, tais como efeitos aditivos, sinérgicos e antagônicos.

Basicamente, os organismos vivos são expostos a diferentes concentrações das substâncias de interesse e analisam-se os efeitos adversos causados sobre estes organismos,

como por exemplo, imobilidade, morte, alterações físicas, morfológicas e funcionais, entre outros (MATIAS, 2009).

Fenske et al. (2006) afirmam que uma combinação de vários testes, utilizando organismos de diferentes níveis de complexidade, proporcionam resultados confiáveis para a avaliação da toxicidade em diversas partes do ecossistema. As diferentes características biológicas entre as espécies de organismos-teste refletem como estes organismos respondem a exposição de uma substância tóxica a uma dada concentração, apresentando níveis de sensibilidades diferentes (POSTHUMA et al., 2002).

4.3 TOXICOLOGIA DE PLÁSTICOS

Como contaminante ambiental emergente, o plástico apresenta possíveis riscos para o ecossistema aquático devido à sua ampla ocorrência e potenciais efeitos biológicos. Como a maioria das partículas plásticas é durável e flutuante, eles podem transportar e persistir no ambiente por longa duração, sendo levado para águas abertas remotas (MAI et al., 2018).

A ingestão de partículas plástica foi relatada pela primeira vez na pesquisa de Carpenter & Smith (1972) (MAI et al., 2018). Onde os pesquisadores observaram fragmentos plásticos no interior de peixes. Desde então, o interesse na identificação desses materiais no meio ambiente e no interior dos organismos foi crescendo. Sendo identificados detritos plásticos em aves marinhas, tartarugas, mamíferos e peixes (BJORNDAL; BOLTEN; LAGUEUX, 1994; RYAN, 1987; TOURINHO; IVAR DO SUL; FILLMANN, 2010) devido a ingestão. Além disso, a primeira evidência de plástico na placenta de humanos foi recentemente relatada no trabalho de Ragusa et al. (2021) (DJAPOVIC et al., 2021).

De modo geral, partículas plásticas são ingeridas por uma série de organismos e há preocupações de que isso possa levar a danos toxicológicos (ROCHMAN et al., 2013), mas há controvérsia sobre a extensão desses efeitos (KOELMANS et al., 2013).

Em seu estudo, Merski et al. (2008) investigaram o efeito da exposição oral a partículas de PE e PET que foram moídos a partir de um tecido do polímero. Não foram observados efeitos toxicológicos após 13 semanas de exposição oral em ratos. Porém, no estudo não são reportados dados importantes como tamanho das partículas utilizadas e sua composição.

Pesquisas mais atuais empregando o PET, já relatam danos físicos como o bloqueio esofágico, imobilização de organismos (SILVA, 2016; TOURINHO; IVAR DO SUL;

FILLMANN, 2010), redução do estímulo alimentar (BJORNDAL; BOLTEN; LAGUEUX, 1994; RYAN, 1987), mortalidade (JEMEC et al., 2016), estresse hepático (ROCHMAN et al., 2013) e efeitos adversos no crescimento, vida útil, reprodução e sobrevivência da fauna do solo (Wang et al., 2021).

Especificamente em relação ao PET, é de extrema importância salientar outro possível causador de toxicidade. Além dos efeitos associados a ingestão da partícula plástica, espécies inorgânicas utilizadas como catalisadores e aditivos no processo de fabricação do PET podem ser liberadas como resíduos causando toxicidade ao meio ambiente. Destaca-se o trióxido de Antimônio (Sb_2O_3) que é o catalisador mais importante usado na síntese deste poliéster ((SWEDISH CHEMICALS INSPECTORATE, 2008), estando presente em mais de 90% do PET fabricado em todo o mundo (WESTERHOFF et al., 2008). Hoje, a poluição por antimônio (Sb) já representa uma grave ameaça ao ecossistema aquático (GU et al., 2022) sendo considerado o mais relevante elemento lixiviado de garrafas PET (BACH et al., 2012).

O Sb é encontrado naturalmente no meio ambiente devido a erupções vulcânicas, maresia, incêndios florestais e fontes biogênicas (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010), mas o aumento desse elemento no meio ambiente é fruto da ação antrópica, principalmente em atividades como a mineração (CEPA, 2016). Nas embalagens em PET, representam níveis na faixa de 190 e 300 mg/kg (DUH, 2002).

O metal é considerado um contaminante da água potável porque pode causar efeitos à saúde, como náusea, vômito e diarreia por períodos relativamente curtos. A longo prazo, pode levar ao aumento do colesterol no sangue e à diminuição do açúcar no sangue (WESTERHOFF et al., 2008). Gebel (1997) em sua pesquisa, indicou que o antimônio é um carcinógeno. Na toxicologia ambiental, ainda são citados efeitos como mortalidade de organismos (GEBEL, 1997; NAM; YANG; AN, 2009), estresse oxidativo e depleção de nutrientes (GU et al., 2022) e anormalidades no desenvolvimento dos organismos (NAM; YANG; AN, 2009).

4.3.1 Partículas envelhecidas

Após o despejo no meio ambiente o plástico está suscetível a ação de fatores abióticos e bióticos que podem provocar reações de degradação do material. Essas partículas que passaram por algum processo de degradação são chamadas de partículas envelhecidas. O processo de degradação é determinado tanto pelas condições ambientais quanto pelas

propriedades físico-químicas das substâncias poliméricas que o constituem. Propriedades físico-químicas como peso molecular, cristalinidade, estrutura, hidrofobicidade, resistência à oxidação, biodegradabilidade, propriedades de superfície, aditivos, grupos funcionais e técnicas de produção (ALI et al., 2021; ANDRADY, 2017). Com relação ao meio ambiente, a localização geográfica, condições climáticas, poluição e poluentes, entre outros, afetam os mecanismos e a taxa de degradação do plástico podem influenciar no tipo de degradação que o polímero sofrerá (ANDRADY; HAMID; TORIKAI, 2003).

Existem muitos tipos de degradação, incluindo degradação biológica, degradação física e degradação química (DU et al., 2021). Na degradação biológica, os microrganismos como fungos, bactérias e algas se envolvem em processos biológicos degradando o plástico por meio de hidrólise e catálise enzimática (YUAN et al., 2020). Como exemplo de degradação física tem-se a fotodegradação, degradação térmica e degradação mecânica, enquanto a degradação química inclui principalmente degradação por hidrólise e degradação por oxidação térmica (YUAN et al., 2020).

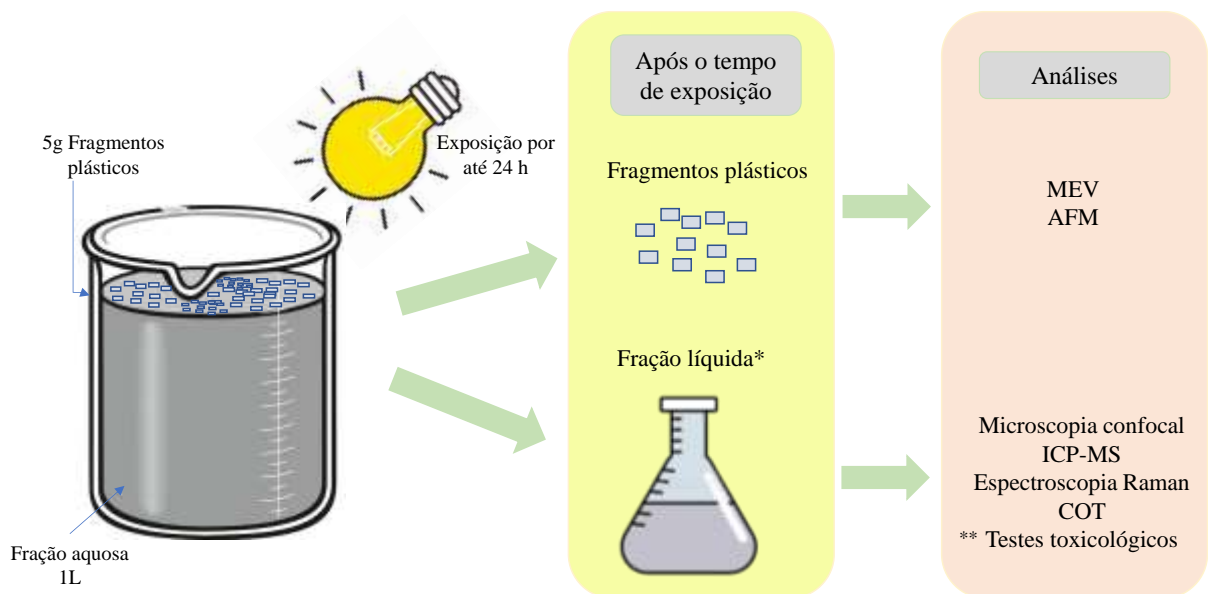
Independentemente do método, a degradação dos materiais plásticos resulta em sua fragmentação em pedaços cada vez menores e a liberação de seus componentes químicos. O potencial toxicológico de partículas envelhecidas ainda é pouco explorado na literatura. Recentemente, pesquisadores da área de nanotoxicologia reconheceram a necessidade de realizar experimentos com formas de NM ambientalmente envelhecidas (CHRISTIAN et al., 2008; LAHIVE et al., 2017). E essa necessidade é ampliada a todos os tamanhos de partícula já que ainda não são reportados muitos estudos sobre o tema. Sabe-se que com o envelhecimento as características da partícula são alteradas (GUIMARÃES; CHARLIE-SILVA; MALAFAIA, 2021; KALČÍKOVÁ et al., 2020), mas não se sabe ao certo de que forma o envelhecimento pode afetar sua toxicidade. Guimarães et al., (2021) verificaram efeitos como estresse oxidativo e a neurotoxicidade em peixes da espécie *Danio rerio*. Yaripour et al., (2022) verificou que ao expor peixes *Coregonus lavaretus* a NPs envelhecidas de poliestireno durante a fertilização, acarretou no aumento do comprimento do corpo da prole e na mortalidade precoce dos organismos, o que sugere efeitos transgeracionais.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

De modo geral, 5 g de fragmentos plásticos de PET virgens foram colocados em beckers contendo um ambiente aquoso (1 L) e dispostos num sistema de degradação. As análises desse estudo podem ser divididas em duas vertentes, sendo elas: a) análises para compreender o comportamento das partículas plásticas em água ultra pura (UP) - identificando as alterações na superfície, liberação de constituintes e fragmentação, e b) análises para avaliar o potencial toxicológico, sendo a degradação realizada nos meios específicos de cultura e exposição para cada organismo teste.

Os ensaios toxicológicos, a limpeza e fragmentação das garrafas de PET utilizadas nesse estudo foram realizados no Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX). A caracterização do PET antes e após sua fotodegradação foi realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) – UFSC e no Laboratório de Optoeletrônica Orgânica e Sistemas Anisotrópicos (LOOSA) do Departamento de Física da UFSC. A fração líquida utilizada no ambiente de fotodegradação foi analisada no LCME, na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC, no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) do Departamento de Biologia – UFSC e no laboratório Centro de Estudos do Mar (CEM) na UFPR. A preparação das amostras biológicas para análise em microscopia eletrônica foi realizada no Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEv) do Departamento de Biologia – UFSC e analisadas no LCME.

Um esquema metodológico é apresentado na imagem a seguir (Figura 3).



* UP ou nos meios específicos dos organismos.

** Utilizando somente a fração aquosa realizada com os meios específicos de cada organismo.

Figura 3 - Esquema metodológico da pesquisa.

Fonte: A autora, 2023

5.1 PLÁSTICO UTILIZADO NA PESQUISA

A degradação proposta nesse estudo foi realizada com garrafas de PET vendidas comercialmente como embalagem de refrigerante. Após o consumo do produto, as garrafas foram coletadas, lavadas com água ultra pura (UP), secas naturalmente e cortadas em pedaços menores de no máximo 1x1 cm. Para a análise, optou-se por utilizar embalagens do mesmo produto (mesmo tipo de refrigerante) e mesmo fabricante, de coloração incolor. Isso para evitar a variabilidade de constituição da garrafa analisada.

Figura 4- Fragmentos plásticos utilizados na pesquisa.



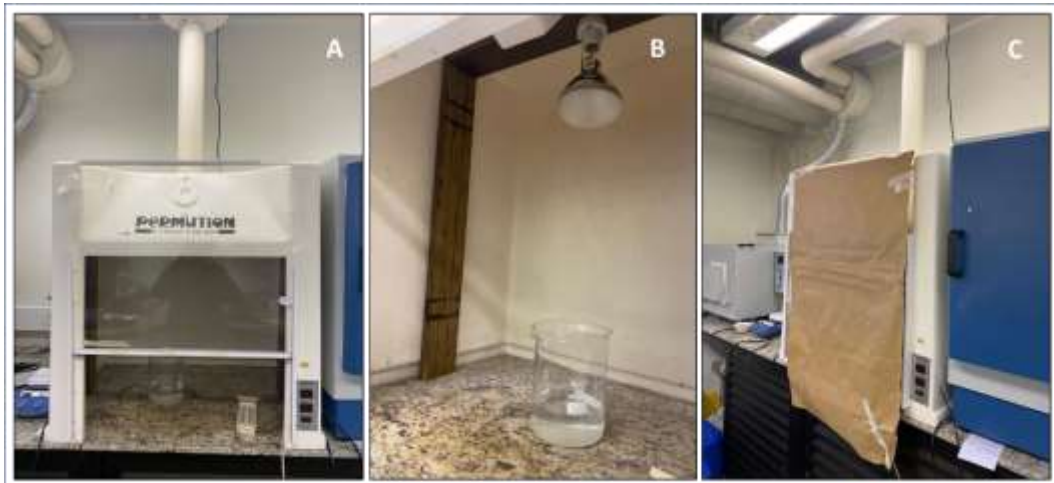
Fonte: A autora, 2021

5.2 AMBIENTE DE DEGRADAÇÃO

Os ensaios de fotodegradação foram realizados seguindo a metodologia de CAI et al., (2018) com algumas adaptações. O ambiente de fotodegradação foi montado nas dependências do LABTOX utilizando a estrutura externa de uma capela química (Figura 5). A fotodegradação acontece devido a exposição das partículas plásticas a lâmpada ULTRA-VITALUX 300 W, OSRAM (Munique, Alemanha) que emite radiação no comprimento de onda entre 315 e 400 nm (UVA) e entre 280 e 315 nm (UVB). Essa lâmpada é indicada nos estudos de fotodegradação por fornecer a melhor simulação possível da luz do sol na região crítica de

comprimento de onda curta de 365nm até 295 nm, tendo seu pico em 340 nm (ANDRADE et al., 2019). Apesar da capela possuir sistema iluminação, para suportar a lâmpada UVA 340 foi montado uma estrutura a parte de madeira com um bocal de cerâmica (Figura 5b), isso por que, além do tamanho (muito maior que uma lâmpada convencional), a lâmpada aquece durante o uso, sendo o bocal de cerâmica o mais indicado para suportar altas temperaturas.

Figura 5- Ambiente de degradação. Sendo estrutura externa (a), lâmpada e estrutura de madeira (b) e isolamento do sistema.



Fonte: A autora, 2020.

Durante a exposição, enquanto a lâmpada está acesa, o sistema permanece fechado com uma tripla camada de papel pardo na abertura frontal (Figura 5c) para proteger o sistema da entrada da luminosidade externa e também, para proteção dos circulantes do laboratório da radiação utilizada, uma vez que a luz gerada pela lâmpada ULTRA-VITALUX pode causar irritabilidade aos olhos, queimaduras solares e conjuntivite.

As amostras foram analisadas nos tempos 0 (sem exposição – controle negativo), 2, 8, 16 e 24 h de exposição ao sistema de fotodegradação em água ultra pura (UP) e 0 (sem exposição – controle negativo), 2 e 24 h nos meios específicos de cada organismo utilizado.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS PLÁSTICAS

Os fragmentos plásticos foram caracterizados antes e após o período de fotodegradação através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM).

5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O MEV é capaz de produzir imagens de alta resolução da superfície de uma amostra, possibilitando elevada profundidade no foco, gerando imagem com aparência tridimensional (DE ASSUMPCÃO PEREIRA-DA-SILVA; FERRI, 2015).

Nesta pesquisa foram analisados via MEV, fragmentos que passaram e que não passaram pelo processo de fotodegradação em água UP (tempos 0, 2, 8, 16 e 24 h) e fragmentos fotodegradados nos tempos 0, 2 e 24 h nos meios específicos de cada organismo utilizado. Esses fragmentos foram depositados sobre suportes metálicos (stubs) e em seguida revestido com ouro-paládio. As amostras foram examinadas e fotografadas no MEV JSM 6390 LV (JEOL Ltd., Tóquio, Japão, em 10 kV).

5.3.2 Microscopia de força atômica (AFM)

A AFM é uma técnica muito utilizada nos estudos da ciência dos materiais devido às propriedades e características que esta técnica oferece acerca da superfície de materiais em nível nanométrico. Trata-se de uma análise que possibilita conhecer a topografia da superfície de amostras através da formação de mapas topográficos.

Para essa análise, foram selecionados fragmentos plásticos planos fotodegradados nos tempos de 0, 2, 8, 16 e 24h para o meio UP e 0, 2 e 24h para os meios específico de cada organismo. Os fragmentos foram analisados através do microscópio de força atômica Nanosurf, EasyScan2. As análises foram conduzidas no Laboratório de Optoeletrônica Orgânica e Sistemas Anisotrópicos (LOOSA) do Departamento de Física da UFSC.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO LÍQUIDA

5.4.1 Microscopia confocal

A identificação de possíveis fragmentos plásticos resultado da degradação foi realizada no LAMEB através da análise de microscopia confocal. Para essa análise em específico, o meio aquoso, seja ele UP ou meio de cultivo foi filtrado em um filtro de seringa de PTFE de 0,22 µm para garantir que partículas existentes no meio não prejudiquem a possível identificação de

partículas plásticas. Apesar do plástico possuir luminescência, esta foi intensificada utilizando o corante vermelho do Nilo (NR). O corante adsorve em superfícies plásticas e as torna fluorescentes quando irradiadas com luz azul possibilitando assim a visualização dos fragmentos no microscópio de luz. A solução de NR foi preparada a 1 mg.mL^{-1} em acetona. 50 μL de estoque de NR foi acrescentada no meio aquoso e o sistema foi mantido em agitação a 100 rpm por 60 minutos. Após a agitação, foi retirado uma alíquota da fração líquida e analisada no microscópio confocal. O equipamento utilizado foi o Microscópio Confocal LEICA TCS SP5/DMI 6000, localizado no LAMEB seguindo a metodologia descrita por Maes et al. (2017) com modificações.

5.4.2 Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

A análise de ICP-MS foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC, no equipamento Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado ICP-MS, modelo NexION 300 D (Perkin Elmer, Sheltron, USA). Essa análise tem como objetivo quantificar o antimônio presente nas amostras líquidas, um dos aditivos utilizados na produção do PET e principal indicador da degradação do material devido a fotodegradação.

5.4.3 Carbono Orgânico Total (COT)

Os plásticos podem perder sua massa total durante a degradação e ser convertido em CO_2 ou CH_4 em diferentes condições ambientais. A perda de peso é comumente usada para indicar a degradação dos plásticos e pode ser refletida indiretamente por meio da medição de COT, sendo essa técnica uma boa indicadora da degradação do polímero (DOMÍNGUEZ-JAIMES et al., 2021). A perda de peso pode resultar não apenas da mineralização de plásticos, mas também da liberação de aditivos (ZHANG et al., 2021a). Desse modo, decorrente do processo de degradação do polímero, ocorre o aumento da quantidade do carbono orgânico no meio aquoso devido a dissolução no meio.

A determinação de COT foi realizada no equipamento Shimadzu modelo TOC-LCSH (Barueri, São Paulo, Brasil), com leitura em triplicata, seguindo a metodologia padrão ISO 8245 (1999). Esta análise determina o Carbono Total (CT) e o Carbono Inorgânico Total (CIT).

Sendo o COT a diferença entre o CT e CIT das amostras. A análise foi realizada no laboratório Centro de Estudos do Mar (CEM) na UFPR.

5.5 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

5.5.1 Teste de toxicidades aguda com *D. magna*

A metodologia para a realização dos testes de toxicidade aguda com *D. magna* seguiu orientações da NBR 12.713 (BRASILEIRA; NBR, 2006). Neonatos (2 até 26 horas de vida) foram expostos a fração líquida resultado da degradação dos fragmentos plásticos em meio ISO, por um curto intervalo de tempo (48 h). Os testes foram realizados em duplicata para cada diluição, sendo colocados 10 neonatos em cada réplica com 25 mL de volume final. Após as 48 h, foi avaliado o efeito sobre a mobilidade dos organismos expostos à amostra sendo contabilizados os organismos imóveis. O resultado foi avaliado através do método estatístico Trimmed Spearman Karber e expresso na concentração efetiva que causa imobilidade em 50% dos organismos expostos (CE₅₀).

Foram analisadas frações líquidas resultado da degradação do plástico nos tempos 0, 2, 8, 16 e 24 h.

5.5.2 Teste de toxicidade crônica com *D. magna* (F0)

No ensaio de toxicidade crônica, neonatos de *D. magna* foram expostos durante 21 dias a fração líquida resultado da degradação do plástico. Ao fim do período de exposição, foram observados os efeitos na reprodução, no crescimento e na longevidade desses organismos além do tempo da primeira prole. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através do método estatístico Dunnett, de modo a obtermos a concentração de efeito observado (CEO) e a concentração de efeito não observado (CENO). Sendo CEO a menor concentração da amostra que causa efeito significativo nos organismos e CENO a maior concentração da amostra que não causa efeito significativo nos organismos. Os testes foram mantidos em temperatura e luminosidade controlada de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz. A troca do meio foi realizada três vezes por semana e a cada troca foi disponibilizado uma nova quantidade de alimento. O teste foi realizado com a fração líquida resultado do período de exposição a fotodegradação nos tempos de 0, 2 e 24 h.

5.5.3 Teste de crônico de recuperação com *D. magna* (F3)

A terceira (F3) prole de F0 foi utilizada para avaliar se organismos nascidos de mães expostas a fração aquoso da fotodegradação apresentaram efeitos crônicos mesmo quando não expostas a mesma amostra.

Os neonatos da terceira geração nascidos de mães expostas ao controle, 2 e 24h de fotodegradação foram mantidos apenas em M4 durante os 21 dias de teste, não havendo exposição a fração aquosa fotodegradada. As condições de teste foram semelhantes às do teste crônico descrito em 5.5.2. Após os 21 dias, os organismos utilizados no crônicos de recuperação também foram analisados considerando os parâmetros longevidade, reprodução e crescimento, além de tempo para a primeira prole. Os resultados obtidos também foram tratados estatisticamente através do método estatístico Dunnett.

5.5.4 Teste de toxicidade com a bactéria *A. fischeri*

Os testes de toxicidade aguda com a bactéria *A. fischeri* foram realizados conforme as normas ISO 11.348 – 3 (2007) e ABNT NBR 15.411-3 (2021). O ensaio consistiu na exposição das bactérias a oito diluições da amostra, sendo a concentração de 80% a máxima. Por tratar-se de uma bactéria marinha, o parâmetro salinidade teve que ser corrido para 20 g/L para a manutenção da cepa da bactéria e evitar resultados falsos positivos de toxicidade. As diluições do ensaio foram mantidas a 15 °C e o reagente bacteriano a 3 °C, sendo essas temperaturas controladas pelo próprio equipamento. Para a validação do ensaio foi realizado um teste de sensibilidade com a solução de controle positivo sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) 100 mg/L. A sensibilidade estando entre 2 e 10 mg/L demonstra que as bactérias estão aptas a serem usadas nos ensaios. Caso contrário, o lote deve ser descartado. Todos os procedimentos realizados foram indicados e controlados pelo software 46 Microtox Omni 4.0 através do equipamento MICROTOX® 500. Como resultado determinou-se a $CE_{50,15 \text{ min}}$ que trata-se da concentração que causou efeito a 50% dos organismos expostos num tempo de 15 min. Foram realizados testes com amostras de 0, 2, 8, 16 e 24 h de degradação.

Por tratar-se de um organismo marinho, os fragmentos de PET foram degradados em meio sintético, simulando a água do mar. A produção dessa água do mar simulada seguia a

metodologia descrita por Cai et al. (2018) com a composição: 26.5 g/L NaCl + 24 g/L MgCl₂ + 0.73 g/L KCl + 3.3 g/L MgSO₄ + 0.2 g/L NaHCO₃ + 1.1 g/L CaCl₂ + 0.28 g/L NaBr.

5.5.5 Teste de toxicidade com a macrófita aquática *L. punctata*

A metodologia utilizada nesse estudo foi baseada na ISO/DIS 20079 (2004) e OECD (2002) com adaptações. De modo geral, a exposição do organismo teste ao agente tóxico tem duração de 7 dias sob condições de pH, luminosidade e temperatura controladas. Os resultados coletados se baseiam na taxa de inibição de crescimento devido a exposição ao agente tóxico.

O teste de toxicidade com a macrófita foi mantido em uma sala climatizada com temperatura controlada de 24°C (± 2°C), sob a luminosidade de lâmpadas fluorescentes de 25W totalizando uma radiação de aproximadamente 8.800 lux. O fotoperíodo foi ajustado para 12 h de luz.

Ao final dos 7 dias, foram contabilizadas todas as frondes e feito a medição das raízes. A taxa de crescimento foi calculada através dos procedimentos recomendados pela normatização da ISO/DIS 20079 (2004) utilizando a equação a seguir:

$$r_{(i-j)} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t_j - t_i} \quad \text{equação 1}$$

Onde:

$r_{(i-j)}$: Taxa média de crescimento específico do momento i para o j;

N_i : Número de frondes observados nas amostras teste ou controle ao início do teste;

N_j : Número de frondes observados nas amostras teste ou controle ao final do teste;

t_i : Tempo do momento do início do período de teste;

t_j : Tempo do momento do fim do período de teste.

A percentagem de inibição de crescimento das amostras testadas foi estimada pela taxa de crescimento média dos grupos controle e tratado. Esses valores foram inseridos na equação de inibição de crescimento (Equação 2), e com esses valores foi elaborado o gráfico de inibição de crescimento.

$$\% I_r = \frac{r_c - r_T}{r_c} \times 100 \quad \text{equação 2}$$

Onde:

$\% I_r$: Percentual de inibição da taxa média de crescimento;

r_c : Valor da média da taxa de crescimento da amostra controle;

r_r : Valor da média da taxa de crescimento dos organismos expostos ao tratamento.

Foram realizados ensaio com a fração aquosa referente a 0, 2 e 24 h de exposição a fotodegradação. Como resultado obteve-se a CE_{50} , concentração que causa efeito inibitório em 50% dos organismos expostos.

5.6 ENSAIO DE NATAÇÃO

A metodologia utilizada nesse ensaio foi baseada em Pikuda et al. (2019) com adaptações. O ensaio de natação foi realizado com os organismos expostos a fração líquida nos tempos 0, 2 e 24 h de fotodegradação do plástico após a exposição desses organismos ao crônico (F0) e teste crônico de recuperação (F3). De modo que, após o tempo determinado, os organismos foram colocados individualmente em uma placa de petri de 3,5 cm com 5 mL de solução ISO. Após 3 minutos de aclimatação, o padrão de natação dos organismos foi registrado por 1 min. O resultado obtido foi tratado e analisado usando o software Kinovea (<https://www.kinovea.org/>), sendo descoberto então o percurso de natação e a distância final. A geração de gráficos que representam as trajetórias percorridas pelas *Daphnias* foi realizada através do software *SigmaPlot*.

5.7 ATIVIDADE DOS MEMBROS TORÁDICOS E FREQUÊNCIA CARDÍACA

Tanto a atividade dos membros torácicos quanto a frequência cardíaca são parâmetros fisiológicos de movimentos de membros ou órgãos das *Daphnia*. E as alterações desses parâmetros quando comparados aos organismos controle, são indicativos de toxicidade (TKACZYK et al., 2021).

A análise da atividade torácica e a frequência cardíaca das *D. magna* foi realizada seguindo a metodologia descrita por Eghan; Lee e Kim (2022). Após os 21 dias de exposição, os organismos foram visualizados no estereomicroscópio de fluorescência (Olympus, SZX16) por um minuto cada. Usando o reprodutor de mídia do *Windows® media player*, a velocidade

do vídeo original foi ajustada para câmera lenta viabilizando a observação de cada batida e oscilação, possibilitando a contagem dos batimentos cardíacos e as contrações e oscilações torácicas. Os resultados foram registrados em batimentos por minuto (bpm) e analisados estatisticamente através do software SigmaPlot.

5.8 ESTRESSE OXIDATIVO

Um dos indicadores do sistema antioxidante dos organismos são as espécies reativas de oxigênio (EROs). A metodologia para quantificação da geração de EROs é baseada em Xie et al., (2006), com algumas modificações. Após 48 h de exposição, as *D. magna* (juvenis, entre 5 e 8 dias de vida) foram recolhidas e transferidas para 1 mL de reagente H2DCFDA com uma concentração final de 50 uM durante 4 h a 25 °C no escuro. Em seguida, as *D. magna* foram lavadas com água ultrapura, homogeneizadas por homogeneizador manual e centrifugadas a 6500 RPM durante 5 min. O sobrenadante recolhido foi analisado no leitor de fluorescência Multileitora Infinite M200 TECAN (Männedorf, Suíça) com excitação de 488 nm e emissão de 530 nm e as *D. magna* inteiras foram visualizadas em estereomicroscópio de fluorescência (Olympus, SZX16).

Foi quantificada a geração de EROs nos organismos expostos a fração aquosa resultado de 0, 2 e 24 h de exposição no teste de toxicidade crônica e no teste crônico de recuperação.

5.9 ANÁLISE ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para a realização da análise através de MET, os organismos precisam ser emblocados. Todo o processo de emblocamento foi realizado no LABCEv, localizado na UFSC seguindo a metodologia descrito por Bouzon et al. (2006) com adaptações. Inicialmente, os organismos foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,2) de 12 a 24 h. Em seguida, foram lavadas (3x) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M durante 30 min. As amostras foram então pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1 M de 2 a 4 h. Em seguida foram realizadas lavagens (3x) em tampão cacodilato de sódio 1% por 30 min cada. Após a lavagem, as amostras foram desidratadas em

uma série acetônica crescente (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), 10 min cada etapa. A última série, 100%, foi repetida 2 vezes. O material foi então infiltrado com resina Spurr em séries graduais durante 5 dias. E duas infiltrações em resina pura por 24 h cada. A amostra foi então polimerizada em estufa a 70 °C por 24 h. Os cortes ultrafinos foram realizados com auxílio de uma navalha de diamante e em seguida corados com citrato de chumbo 1%. Os cortes foram analisados no microscópio eletrônico de transmissão JEM 1011 (JEOL, Tóquio, Japão) do LCME - UFSC.

Foram emblocados e analisados os organismos expostos a CEO e ao controle negativo do ensaio crônico com organismo *D. magna*.

5.10 ANÁLISE ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os procedimentos relativos ao preparo das amostras do microcrustáceo *D. magna* foram realizados no LABCEv. Para este ensaio, foram utilizados organismos expostos a CEO e ao controle negativo do ensaio crônico. Inicialmente as *Daphnias* foram fixadas durante 1 dia, em solução de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,2). Em seguida, foram lavadas (3x) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M durante 30 min. As amostras foram então pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1 M de 3 h. Em seguida foram realizadas lavagens (3x) em tampão cacodilato de sódio 1% por 30 min cada. Após a lavagem, as amostras foram desidratadas em uma série crescente de etanol (30%, 50%, 70%, 90%), 10 min cada concentração. As amostras foram depositadas sobre suportes metálicos (stubs), revestidas com ouro-paládio e examinadas e fotografadas no MEV JSM 6390 LV (JEOL Ltd., Tóquio, Japão, em 10 kV) localizado no LCME -UFSC.

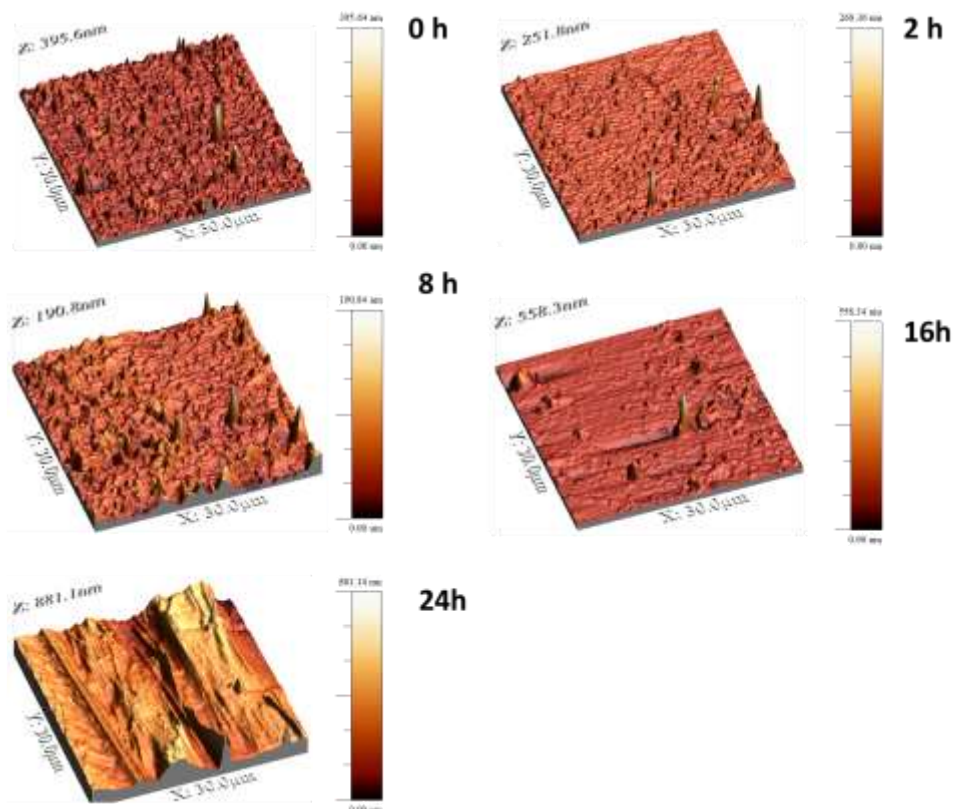
6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS PLÁSTICAS

6.1.1 Força Atômica

Os ensaios preliminares de força atômica demonstraram a degradação da superfície do material plástico onde é possível verificar a alteração superficial do material. Alterações que foram observadas através dos resultados de AFM (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

Figura 6 – Imagens de AFM nos tempos de 0,2, 8, 16 e 24 h de exposição a fotodegradação em UP.



Fonte: A Autora, 2023.

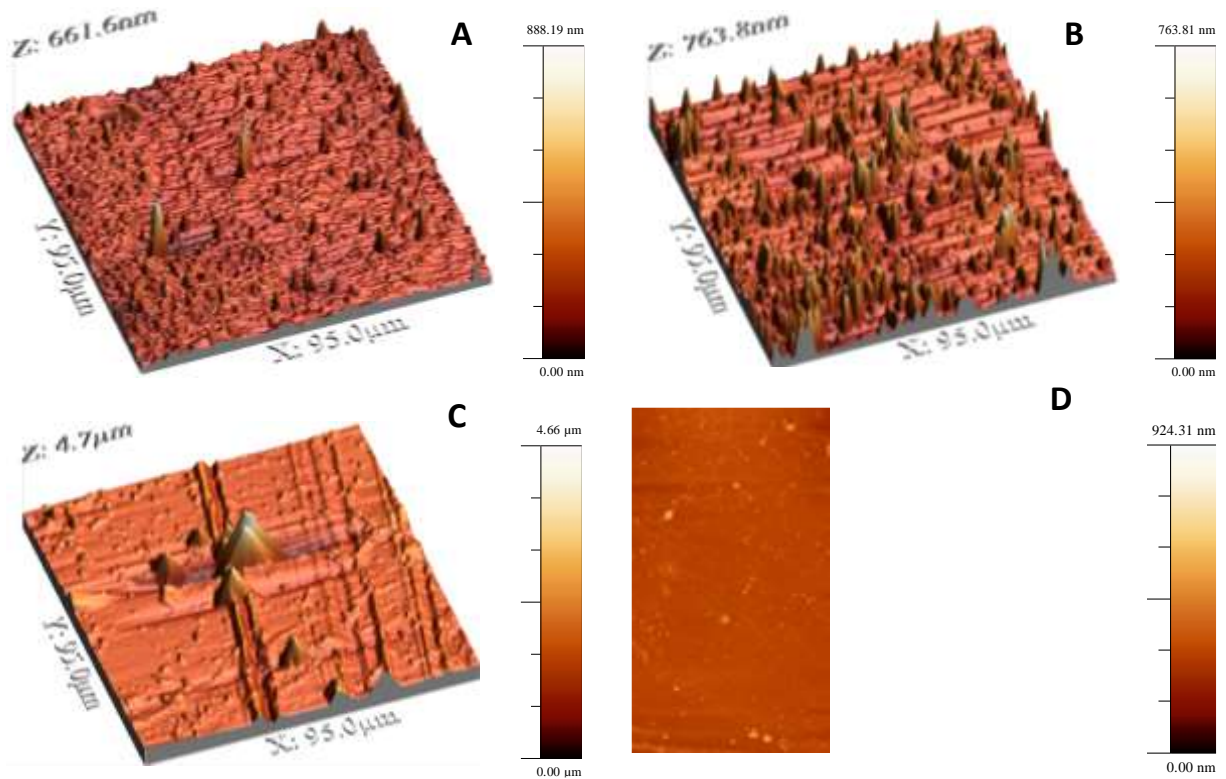
A superfície dos fragmentos plásticos de controle, conforme demonstrado na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** A mostrou uma topografia com pequenas elevações.

Apresentando altura máxima dos picos e cavidades de 395,64 nm. A amostra que passou pelo processo de degradação apresentou maior alteração superficial, tendo picos de 881,14 nm, **(Erro! Fonte de referência não encontrada.B)**.

De modo geral, toda superfície de polímeros apresenta elevações (BAJPAI; BHATT; KATARE, 2016), porém, estas tendem a ser mais homogêneas, como visualizado na **Erro! Fonte de referência não encontrada.A**. Na amostra controle é possível visualizar pequenas saliências e buracos rasos, enquanto cavidades profundas e significativas foram formadas nos fragmentos plásticos degradados. Resultado semelhante ao encontrado nas pesquisas de Taghavi et al. (2021) e Iñiguez et al. (2018), onde ambos analisaram alterações em materiais plásticos, um devido a ação de microrganismos e o outro a degradação devido a exposição a luz UV. A diferença de tonalidade indica áreas com propriedades mecânicas diferentes. Onde a cor mais escura nas imagens mostra as áreas de maior dureza em cada material, sendo essas áreas predominantes nos polímeros originais. A tendência do material é que, ao possuir áreas menos duras, ele se rompa.

A fotodegradação em meio UP foi realizada afim de entender como a degradação ocorria com o tempo de exposição. Como observado, quanto maior o tempo de exposição, maior a degradação do material. Por isso, fragmentos plásticos foram degradados por 24 h nos meios específicos dos organismos utilizados nos testes toxicológicos. Sendo o meio M4 referente ao teste com *D. magna*, meio de cultivo do organismo *L. punctata* e meio de água do mar reconstituída, meio da bactéria marinha *A. fischeri*.

Figura 7 - Imagens de AFM de fragmentos plásticos que não passaram pelo professor de fotodegradação (A) e após 24 h de fotodegradação em meio M4 (B), meio da Lemna (C) e meio da água do mar simulada. D.



Fonte: A Autora, 2023.

Conforme ilustrado tanto na Figura 6 quanto na Figura 7, o plástico apresenta superfície bastante homogênea antes do processo de fotodegradação. Em contrapartida, áreas com propriedades mecânicas diferentes apareceram nas amostras fotodegradadas. A cor mais escura nas imagens indica as áreas de maior dureza em cada material, e essas áreas são predominantes nos polímeros originais. A presença de áreas mais claras nas imagens, indica superfícies fragilizadas devido a exposição.

Dentre os resultados obtidos nos meios utilizados nos testes toxicológicos dessa pesquisa, destaca-se o fragmento plástico fotodegradado em água do mar reconstituída. Apesar de não possuir o maior pico, é a amostra que apresenta boa parte de sua composição com alturas elevadas quando comparada ao controle. Essa característica é possível identificar principalmente devido a coloração da imagem que em quase sua totalidade está mais clara que as demais.

A radiação devido a fotodegradação desempenha um papel importante na degradação do plástico através da fotooxidação. Durante o processo de fotodegradação diversas alterações poliméricas podem ser observadas como resultado do intemperismo químico: grupos funcionais

ricos em oxigênio são gerados e seu peso molecular diminui (IÑIGUEZ; CONESA; FULLANA, 2018). A taxa de fragmentação aumenta com temperaturas e níveis de oxigênio mais elevados (KERSHAW; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. GLOBAL PROGRAMME OF ACTION FOR THE PROTECTION OF THE MARINE ENVIRONMENT FROM LAND-BASED ACTIVITIES, 2015). A salinidade, o tempo de exposição, a fotodegradação e os níveis de exposição ao oxigênio foram fatores importantes que afetaram o grau de degradação da partícula plástica em meio salino.

Face aos resultados obtidos, é importante concluir que a maior parte dos plásticos extraídos do mar estão altamente degradados. Uma vez que alterações na superfície do material já foram identificadas com 24 h de fotodegradação nessa pesquisa. Horodytska, Valdés, Fullana (2018) afirmam que a reciclagem mecânica deve ser a opção número um para o tratamento de resíduos plásticos quando a qualidade do material reciclado é boa o suficiente para garantir uma elevada taxa de substituição de material virgem. Por esse motivo, a utilização de plásticos encontrados nos oceanos não é viável para o processo de reciclagem mecânica. Deverão assim ser utilizados outros processos de tratamento deste tipo de resíduos plásticos, como a recuperação energética.

A decomposição de partículas plástico nos oceanos pode levar centenas e até milhares de anos (BARNES et al., 2009). Durante este período, contaminantes químicos, contidos nos plásticos, como o antimônio, são lançados no mar. Além disso, a degradação contínua de plásticos maiores gera a liberação de plásticos em escalas menores, o que resulta num aumento anual na quantidade de MP no mar (ANDRADY, 2017).

6.1.2 MEV

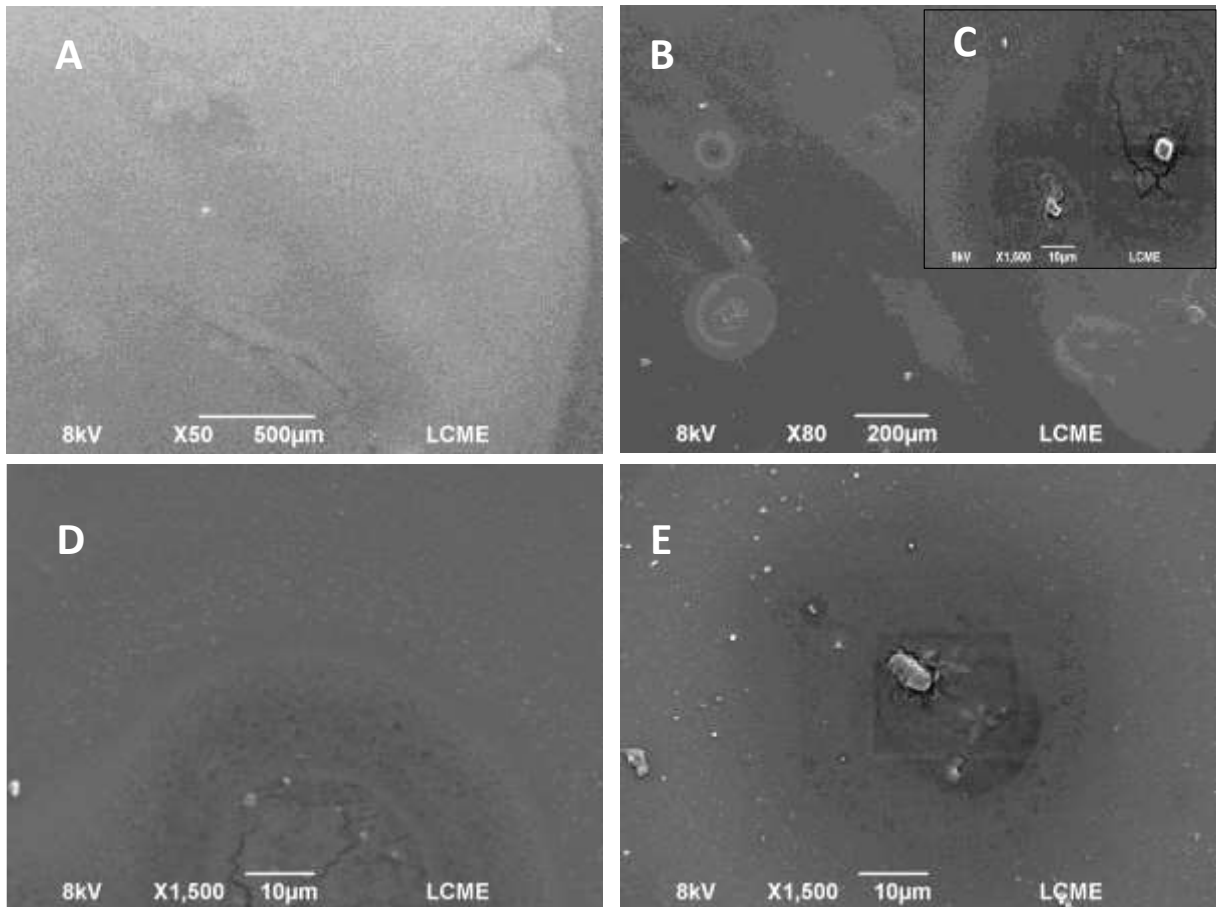
As micrografias mais representativas dos fragmentos plásticos fotodegradados por 24 h estão expostas na Figura 8. Na imagem da amostra controle (A) é possível verificar texturas relativamente homogêneas e compactas. Em contrapartida, os fragmentos fotodegradados (B, C, D e E) apresentam texturas superficiais relativamente ásperas. É possível observar também a oxidação granular e a formação de flocos na superfícies após a exposição. Além disso, nas micrografias dos fragmentos plásticos em meio M4 (Figura B e C) é possível identificar fissuras evidentes na superfície do material. Todas essas características (oxidação granular, lascas e rachaduras) constituem padrões de degradação (CAI et al., 2018).

Segundo Cai et al., (2018), a formação de fissuras é atribuída principalmente à degradação fotooxidativa contínua. No PET, esse tipo de degradação envolve a formação de

uma área de superfície quebradiça e fragilizada que posteriormente, desprendem-se da superfície do polímero. A fotoclivagem direta subsequente à fotooxidação dos grupos glicol, ocasionada pela exposição à luz solar, não é uniforme e ocorre especialmente na face exposta diretamente à luz ((KOSCHEVIC; RODRIGO; BITTENCOURT, 2016).

Cai et al., (2018) verificou degradação de pellets virgens de polietileno (PE), polipropileno (PP) e poliestireno (PS) em até 6,5 meses de exposição à radiação UV em três diferentes meios, água do mar simulada, água UP e ar. Apesar da exposição mais longa, os autores relatam que no menor tempo analisado, 1 mês, já é possível observar as alterações na superfície do material. No presente trabalho, já foram observados efeitos após 24 h de exposição.

Figura 8 – Imagens de MEV de fragmentos plásticos que não foram expostos a degradação - controle (A), fragmentos plásticos após 24 h de exposição a fotodegradação no meio M4 (B) e detalhe (C), meio da Lemna (D) e meio de água do mar reconstituída (E).



Fonte: A autora, 2023.

Ioakeimidis et al. (2016) afirmam que outro importante processo de degradação é hidrólise. Eles afirmam que o estágio inicial da degradação é a absorção da radiação, o que caracteriza a fotodegradação. A luz absorvida tem energia suficiente para quebrar as ligações químicas na cadeia polimérica principal. Então, o PET com propriedades de superfície alteradas afundam e iniciam a degradação hidrolítica. Situação que ocorre naturalmente nos oceanos. Esse afundamento dos fragmentos plásticos foi observado nas amostras expostas no meio de água do mar simulada em menos de 24 h de exposição.

Segundo Edge et al. (1991), o PET quando exposto à luz degrada-se rapidamente, levando à deterioração das propriedades físicas e mecânicas e desenvolve uma cor amarela intensa. A mudança da coloração do polímero não foi observada após as 24 h de degradação, mas em estudos iniciais, após um mês de fotodegradação os fragmentos começaram a mudar sua tonalidade.

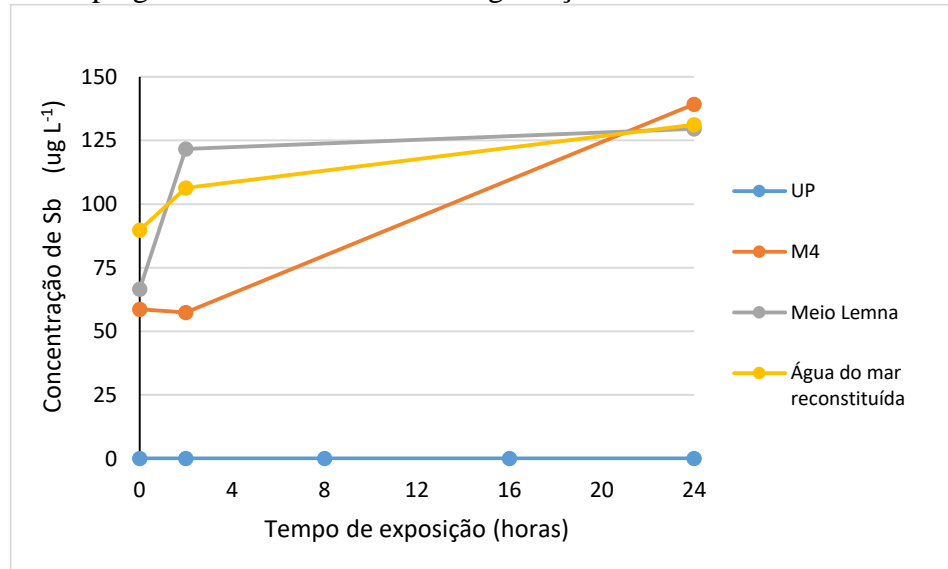
Não são apresentados imagens de detalhes das figuras D e E devido a uma limitação do equipamento em produzir imagens de qualidade com um aumento muito grande. Uma vez que, para a obtenção das duas micrografias foi necessário um aumento maior do que para as amostras expostas em M4 e para o controle, por exemplo. Em B e C as características que indicam a degradação ficam evidentes em aumentos menores.

6.2 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO LÍQUIDA

6.2.1 Quantificação de antimônio

Os resultados da quantificação de Sb na fração líquida do ensaio de fotodegradação estão expressos na Figura 9. No gráfico é possível observar que os meios complexos utilizados nessa pesquisa apresentaram maior concentração de Sb após as 24 h de fotodegradação quando comparados ao controle. E dentre eles, o meio M4 foi o que apresentou maior concentração de antimônio ($39,2 \pm 7,6 \mu\text{g L}^{-1}$), seguido pelo meio de água do mar reconstituída ($131,2 \pm 8,7 \mu\text{g L}^{-1}$) e logo após, o meio de cultivo do organismo Lemna ($129,6 \pm 1,4 \mu\text{g L}^{-1}$). A fração líquida controle (meio UP) apresentou valores variando entre 0,008 e 0,048 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 9- Quantificação de Sb nas amostras de água UP, meio M4, meio da Lemna e água do mar reconstituída empregadas nos ensaios de fotodegradação.



Fonte: A autora, 2023.

O antimônio e seus compostos estão naturalmente presentes na crosta terrestre. Filella, Belzile e Chen (2002) relataram que as concentrações típicas de antimônio total dissolvido são geralmente inferiores a $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ em águas não poluídas. Valores acima dos relatados já foram encontrados na Coreia (faixa de $0,1 - 27 \mu\text{g L}^{-1}$) nos anos de 2004 a 2005 (AN; NAM; LEE, 2008). No Brasil, os limites de potabilidade indicam concentração $6 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sb (Portaria GM/MS 888/2021).

Na presente pesquisa, de modo geral, a concentração de Sb aumenta conforme o tempo de exposição a fotodegradação. Porém, na amostra controle os resultados encontrados apontam para uma lixiviação inicial relativamente rápida, seguida por uma estabilização e queda da concentração de Sb. Uma vez que a quantificação de Sb na amostra de água UP foi $0,008 \mu\text{g L}^{-1}$ para 0 h, $0,048 \mu\text{g L}^{-1}$ para 2 h, $0,047 \mu\text{g L}^{-1}$ para 8 h, $0,035 \mu\text{g L}^{-1}$ para 16 h e $0,026 \mu\text{g L}^{-1}$ para 24 h de fotodegradação.

Esse resultado se assemelha aos resultados descritos na literatura. Kerszter et al. (2009) observaram que a lixiviação de Sb de PET em águas engarrafadas aumentava rapidamente durante o primeiro período de armazenamento e então, alcançava um estado estacionário. Esses autores descreveram o aumento da concentração de antimônio em função do tempo de armazenamento com uma curva de saturação atingindo $0,7$ e $0,8 \text{ L}^{-1}$ num período de um ano, mas não superior a 1 mg L^{-1} mesmo após um período de três anos de tempo de armazenamento. Fan et al., (2014) também observaram que a liberação do Sb de garrafas PET tornou-se estável

a longo prazo de armazenamento. E em ambas as pesquisas, tanto Keresztes et al., (2009) quanto Fan et al., (2014) observaram que as concentrações lixiviadas representam uma porcentagem muito pequena do antimônio total presente no PET de uma garrafa.

A liberação de íons e moléculas de polímeros normalmente ocorre por difusão (NAKASHIMA et al., 2016), mas muito pouco foi estudado a respeito da liberação de Sb de plásticos em meio marinho ou outros meios complexos. Devido a preocupações com a saúde humana, na literatura existem muitos trabalhos que avaliam a migração de Sb do PET em contato com alimentos e bebidas. Liberação já comprovada nas pesquisas de Fan et al., (2014), Haldimann et al. (2013), Keresztes et al. (2009) e Westerhoff et al. (2008), por exemplo. Haldimann et al. (2013) e Westerhoff et al. (2008) indicam que a difusão de Sb em alimentos e bebidas depende da natureza física e química das espécies ou compostos migrantes, das propriedades do plástico, incluindo cristalinidade, polaridade e peso molecular, da relação entre a área superficial do plástico e o volume da solução, e a presença de quaisquer outros aditivos no plástico que pode retardar ou facilitar o processo de difusão como a adsorção, por exemplo.

Com relação a liberação de compostos do plástico em diferentes meios, James e Turner (2020) afirmam que as interações entre constituintes aquosos e os constituintes do PET influenciam na migração do metaloide. Os resultados obtidos nessa pesquisa comprovam essa afirmação, uma vez que a complexidade do meio influenciou na liberação do Sb. De modo que, em meios complexos como o meio M4, meio Lemna e água do mar reconstituída, a concentração de Sb quantificado foi muito maior.

A forma em que o antimônio está presente no PET pode desempenhar um papel na difusão do elemento dentro do polímero e, conseqüentemente, sua possível liberação na água. A difusividade do Sb no polímero irá ser diferente dependendo se ele está presente como SbIII, glicolato de antimônio livre de tamanho micro ou nano ou ligado ao polímero (FILELLA, 2020). O fato da concentração quantificada representar uma porcentagem muito baixa com relação ao valor total da garrafa PET, segundo Filella (2020), indica uma difusividade muito pequena do elemento no polímero à temperatura ambiente a longo prazo. Rungchang et al., (2013) determinaram os coeficientes de difusão de Sb em amostras de PET em temperaturas variando de 25 a 70 °C. O modelo previsto para a migração de Sb sugere que as condições de armazenamento de todas as bebidas acondicionadas em garrafas PET devem ser abaixo de 70 °C por no máximo 72 dias para evitar níveis de Sb acima do valor recomendado de 5 µg/L estabelecido pela Comunidade Européia. Valor recomendado também no Brasil na CONAMA 357/2005. Segundo Westerhoff et al., (2008) o armazenamento em temperaturas mais altas

mostrou um efeito significativo na liberação de Sb dependente do tempo. Logo, tanto o resultado encontrado na pesquisa como os encontrados na bibliografia (JO et al., 2018), indicam que a radiação possui pequena influência sobre a lixiviação do antimônio. Em contrapartida, altas temperaturas favorecem a lixiviação de Sb de garrafas PET e, semelhante ao que acontece na fotodegradação, as taxas de liberação também diminuem com o tempo de armazenamento (FAN et al., 2014; RUNGCHANG et al., 2013; WESTERHOFF et al., 2008). Além disso, estudos na literatura demonstram que garrafas com volumes maiores liberam níveis mais baixos de Sb (KERESZTES et al., 2009; WELLE; FRANZ, 2011).

Além da baixa lixiviação de Sb, é possível observar a diminuição do valor quantificado com o passar do tempo. Esse efeito pode estar relacionado à estabilidade térmica do PET (Holland e Hay, 2002). Os produtos de degradação do PET podem ter grupos funcionais que podem reabsorver o antimônio da água (Awaja e Pavel, 2005, Li et al., 2014). (CHAPAMARTÍNEZ et al., 2016).

6.2.2 Microscopia Confocal

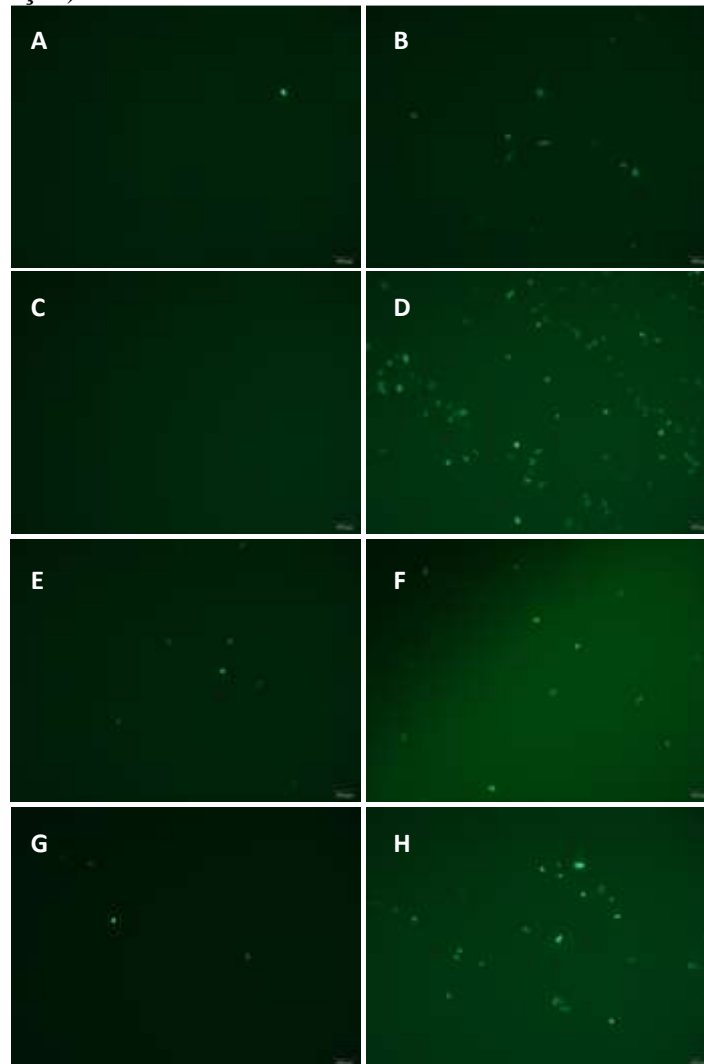
Os resultados da identificação de partículas plásticas em meio aquoso via microscopia confocal estão expostos na

Figura 10.

Os polímeros plásticos naturalmente possuem fluorescência. Porém, para facilitar a identificação de fragmentos em escalas menores, geralmente as partículas são coradas com algum tipo de corante artificial. O corante Nilo Red apesar de muito utilizado para a identificação desses materiais, não apresenta bom desempenho quando são analisados fragmentos de PET (Erni-Cassola et al., 2017). Por isso, nessa pesquisa as imagens obtidas como resultado referem-se aos fragmentos sem a utilização de corante, ou seja, a fluorescência emitida naturalmente pelo PET.

Figura 10 - Identificação de possíveis fragmentos de PET nos meios: UP (A – controle, B – após 24 h de fotodegradação), M4 (C – controle, D – após 24 h de fotodegradação), meio Lemna

(E – controle, F – após 24 h de fotodegradação) e água do mar reconstituída (G – controle, H – após 24 h de fotodegradação).



Fonte: A autora, 2023.

Nos resultados obtidos, é possível observar um aumento da quantidade de fragmentos comparando os controles (A, C, E, G) dos meios que passaram pelo processo de fotodegradação por 24 h (B, D, F, H). Indicando então que o processo da fotodegradação resultou no aumento de partículas em todas as soluções.

Os fragmentos encontrados nessa pesquisa se assemelham aos encontrados por Karakolis et al. (2019) e Shim et al. (2016). Apesar da semelhança com trabalhos já publicados, os possíveis fragmentos encontrados através da análise de confocal não podem ser confirmados como fragmentos de PET. Isso por que, análises complementares como a espectroscopia Raman não puderem ser realizadas devido as limitações do equipamento com relação a amostra. Além disso, as estruturas identificadas após a fotodegradação também foram visualizadas no controle.

Caso essas estruturas sejam partículas plásticas, vale ressaltar que por mais que sejam utilizados meios adequados, todo o processo de fabricação tanto da água UP quanto da água de osmose passam por estruturas plásticas que podem ter liberado pequenos fragmentos de plástico para a água, caracterizando então a contaminação plástica. Em contrapartida, sabe-se que o plástico envelhecido ou exposto a algum intemperismo pode sofrer fragmentação. O aumento da quantidade de partículas quando comparados aos controles provavelmente foi por ação da fotodegradação do plástico.

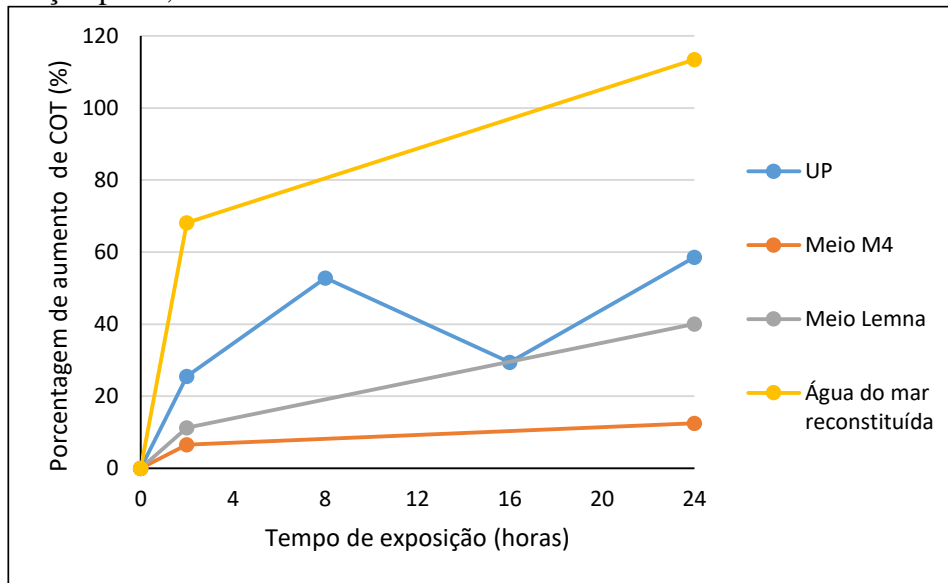
6.2.3 COT

Conforme mostrado na Figura 11, os valores encontrados para COT indicam um crescimento de 12 A 113,44% quando comparado aos controles negativos (0 h de exposição). Para o meio de água UP, a porcentagem de aumento após 24 h de exposição foi de 58,55%, para o meio M4 12,49%, meio Lemna 40,07% e para o meio água do mar reconstituída de 113,44%.

A degradação fotooxidativa é o processo de decomposição do material pela ação da luz, que é considerada como uma das principais fontes de danos exercidos sobre substratos poliméricos em condições ambientais (SINGH; SHARMA, 2008). A degradação do polímero via fotodegradação gera grupos terminais éster, aldeído e propil (NAGAI et al., 2005). As radiações UV têm energia suficiente para quebrar a ligação C-C e boa parte dos radicais livres se formaram como resultado da clivagem dessas ligações C-C e ligações C-H (SINGH; SHARMA, 2008). Além disso, alguns grupos cromóforos (por exemplo, vários monômeros que não reagiram (C=C), grupos carbonila (C=O) e grupos hidroperóxido (ROOH)) introduzidos na fabricação de plásticos também foram iniciados devido a exposição a irradiação UV (Singh e Sharma, 2008). Resultando na formação de mais radicais livres.

Logo, os valor de COT encontrados nesse estudo representam os intermediários de degradação que foram liberados para o meio aquoso. O aumento do percentual de COT para todos os meios analisados juntamente com os resultados de MEV, AFM e quantificação de Sb, comprovam que o sistema proposto possibilitou a degradação do material plástico.

Figura 11 – Percentual de aumento de COT da fração aquosa resultante da exposição à fotodegradação por 0, 2 e 24 h.



Fonte: A autora, 2023.

6.3 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

6.3.1 Toxicidade aguda e crônica com *D. magna*

Os testes de toxicidade aguda com *D. magna* empregando a fração líquida obtida da fotodegradação dos PET não identificaram efeito toxicológico ao organismo em nenhum dos tempos analisados (2, 8, 16 e 24 h). Permanecendo vivos todos os neonatos expostos até o final dos testes.

Já para os testes de toxicidade crônica foi possível identificar efeito na reprodução dos organismos expostos, conforme indicado no Quadro 1.

Quadro 1– Resultados do teste de toxicidade crônica com o organismo *D. magna* nos tempos de exposição de 2 e 24 horas na geração parental (F0) e teste de toxicidade crônica

recuperação na terceira geração (F3) . (* indica significância estatística $p < 0,05$ comparado ao controle do teste)

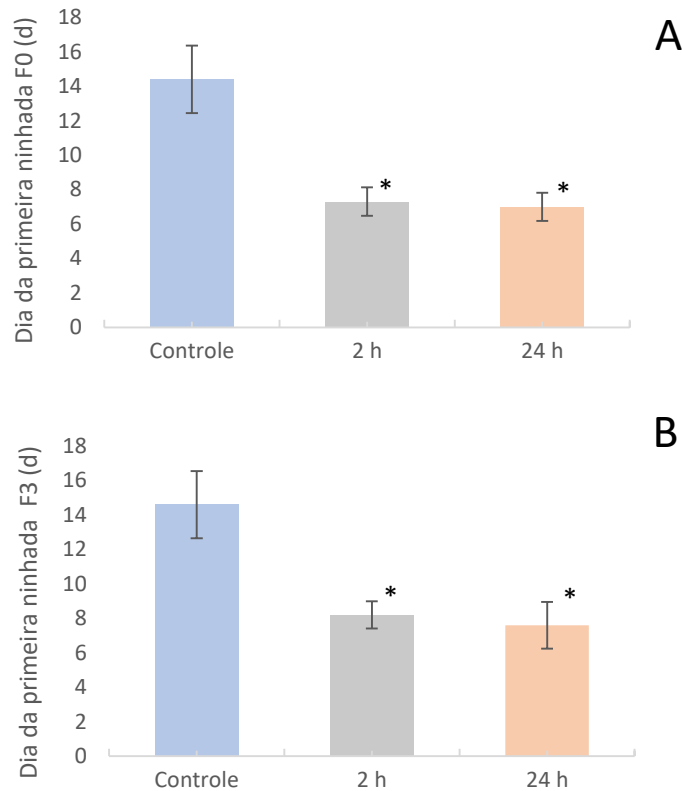
Geração	Amostra	Longevidade sobreviventes (%)	Reprodução (nascidos/prole)	Crescimento (mm)
Crônico de exposição a fração líquida da fotodegradação				
F0	Controle	10	8,04	4,52
	Tratado (2h)	10	7,88	4,97
	Tratado (24 h)	10	5,52*	4,5
Crônico de Recuperação - Meio M4				
F3	Controle	10	8,54	4,62
	Tratado (2h)	10	10,66	4,5
	Tratado (24 h)	10	11,81*	4,2

Fonte: A autora, 2022

Os organismos expostos a fração líquida extraída após 24 h de fotodegradação do PET apresentaram resultados de reprodução estatisticamente diferente do controle do teste. No ensaio foi observado uma menor geração de filhotes durante os 21 dias de exposição. Sendo essa redução observada tanto no número de posturas quanto no número de filhotes por postura. Além disso, a reprodução dos organismos expostos também foi alterado levando em consideração o início da postura das *Daphnias*. Organismos expostos aos tratamentos geraram filhotes em apenas 7 dias sendo uma média, $7,3 \pm 0,8232$ dias para organismos expostos a fração líquida resultado de 2 h de exposição e $7,00 \pm 0,8165$ dias para 24 h. Enquanto os organismos da amostra controle apenas em 14 dias ($14,4 \pm 0,9555$) (Figura 12A).

Figura 12 - Dia da primeira ninhada dos organismos utilizados no teste crônico com *Daphnia magna* nas concentrações controle, fração líquida resultado de 2h de fotodegradação (2 h) e fração líquida resultado de 24 h de fotodegradação (24 h) na geração parental (F0) e na terceira

geração de filhotes (F3). (* indica significância estatística $p < 0,05$ comparado ao controle do teste)



Fonte: A autora, 2023

A maturidade mais precoce das *Daphnias* observada no presente estudo resultou em um início mais precoce da reprodução e maior número de posturas porém, com número menor de descendentes a cada ninhada. Esse comportamento também foi observado a partir da terceira geração dos neonatos (F3) gerados durante o ensaio e expostos a 21 dias no meio de cultivo M4 (crônico de recuperação). Os organismos nascidos no 11º (dia da terceira ninhada gerada pela exposição a amostra de 24 h de fotodegradação) e 12º dia (dia da terceira ninhada gerada pela exposição a amostra de 2 h de fotodegradação), em 24 e 2h de exposição respectivamente, geraram seus primeiros descendentes a partir do 7º dia de exposição, conforme indicado na (Figura 12A). Sendo uma média de $14,6 \pm 1,9550$ dias para o controle, $8,20 \pm 0,7888$ dias para 2 h e $7,60 \pm 1,3499$ dias para 24 h. A variação no tempo de postura de neonatos devido á alguma situação estressante pode ser explicada pela aceleração do processo reprodutivo no início do

ciclo de vida, fazendo com que o organismo adiante a produção e a liberação da prole (MAURI; BARALDI; SIMONINI, 2003).

Na avaliação da F3, para os parâmetros longevidade e crescimento não foram observadas diferença estatística significativa entre os organismos do controle e os tratados. Porém, para o parâmetro reprodução, foi identificada diferença estatística entre o controle e os organismos cujas mães ficaram expostas a fração líquida resultado de 24 h de fotodegradação (Quadro 1). Esse resultado evidencia a capacidade dos danos causados a reprodução da geração parental serem repassados as gerações filiais. Onde mesmo quando os filhotes recém-nascidos foram retirados do meio contaminado e transferidos para o meio de cultivo M4, o efeito da exposição das mães foi observado nas filhas.

Comparado a F0, o número de nascimentos por prole da F3 aumentou, o que pode indicar uma recuperação das *Daphnias* filhas. Porém, essa hipótese não pode ser confirmada sem a análise da geração filial da F3.

Com relação ao número de nascidos/prole é possível identificar que na F3 aconteceu o inverso do que geralmente se espera em um teste toxicológico com xenobiótico, o organismo teve um dos seus parâmetros analisados estimulado. Esse estímulo é conhecido como efeito hormese (MATTSON, 2008) e é um termo utilizado para descrever um fenômeno de dose-resposta associado a compostos que, em baixas doses, mostram efeito estimulador ou benéfico ao organismo exposto e em altas doses mostram efeito inibitório ou tóxico. No teste crônico desse estudo, a exposição da geração parental (F0) causou danos a geração filial (F3) de modo que, além de estimular a reprodução adiantada, o número de filhotes/prole foi maior do que o do grupo controle do próprio ensaio. Mesmo estes organismos (F3) estarem expostos a um meio de cultivo apropriado e não as amostra tratadas. Esse efeito estimulatório também foi observado na pesquisa de Chang et al., (2023) que verificou que a exposição multigeracional ao MP de poliestireno em concentrações ambientalmente relevantes ($5 \mu\text{g.L}^{-1}$) causou efeitos horméticos ao organismo *D. magna*.

O efeito hormese é considerado como uma autoproteção dos organismos. Trata-se de uma resposta adaptativa a algum estímulo estressante. Apensar de ser algo relacionado a autoproteção do organismo, o efeito hormese pode ser considerado nocivo, uma vez que os indivíduos passam por uma situação de estresse, e tem seus metabolismos acelerados. O efeito desse estímulo na comunidade ou no ecossistema como um todo depende do papel das espécies estimuladas, suas interações com outras espécies, bem como nas reações de outras espécies

(inibição, estimulação ou falta de resposta) ao fator de baixa dose caso estes sejam expostos também (CUTLER et al., 2022).

De modo geral, no maior tempo de exposição a fotodegradação obtivemos a maior quantidade de Sb quantificado e um aumento significativo de fragmentos possivelmente plásticos.

O antimônio e muitos de seus compostos apresentam toxicidade aguda e crônica para uma variedade de organismos (GEBEL, 1997; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010; YANG; CHEN, 2018; ZHANG et al., 2021b). Em humanos, a exposição ao Sb tem sido relacionada a sintomas respiratórios, cardiovasculares e gastrointestinais e o trióxido de antimônio (Sb_2O_3) é classificado como possivelmente cancerígeno ((SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). Na literatura ainda são reportados efeitos tóxicos para os crustáceos planctônicos, peixes e as algas verdes (NAM; YANG; AN, 2009), peixe-zebra (*Danio rerio*) e no peixe-zebra (*Rhodeus ocellatus*) (YANG; CHEN, 2018). Para o organismo *D. magna*, os resultados de toxicidade dos diferentes compostos de antimônio encontrados na literatura são altamente variáveis. A $\text{CE}_{50,48\text{h}}$ de Sb_2O_3 para esse organismo foi de $3,01 \text{ mg.L}^{-1}$ (WAAIJERS et al., 2013) enquanto a $\text{CE}_{50,48\text{h}}$ de SbCl_3 foi de até $423,45 \text{ mg.L}^{-1}$ (KHANGAROT; RAY, 1989). Ao investigar a toxicidade associada ao Sb(OH)_6 , LI et al., (2024) encontrou valores de CE_{50} para neonatos de *D. magna* de 90,3 e $63,8 \text{ mg.L}^{-1}$ em 24 e 48 horas de exposição, respectivamente. Há uma escassez de estudos de toxicidade do Sb para *D. magna* (LI et al., 2024), o conhecimento das interações das células com o antimônio ainda é muito escasso (FILELLA; BELZILE; LETT, 2007).

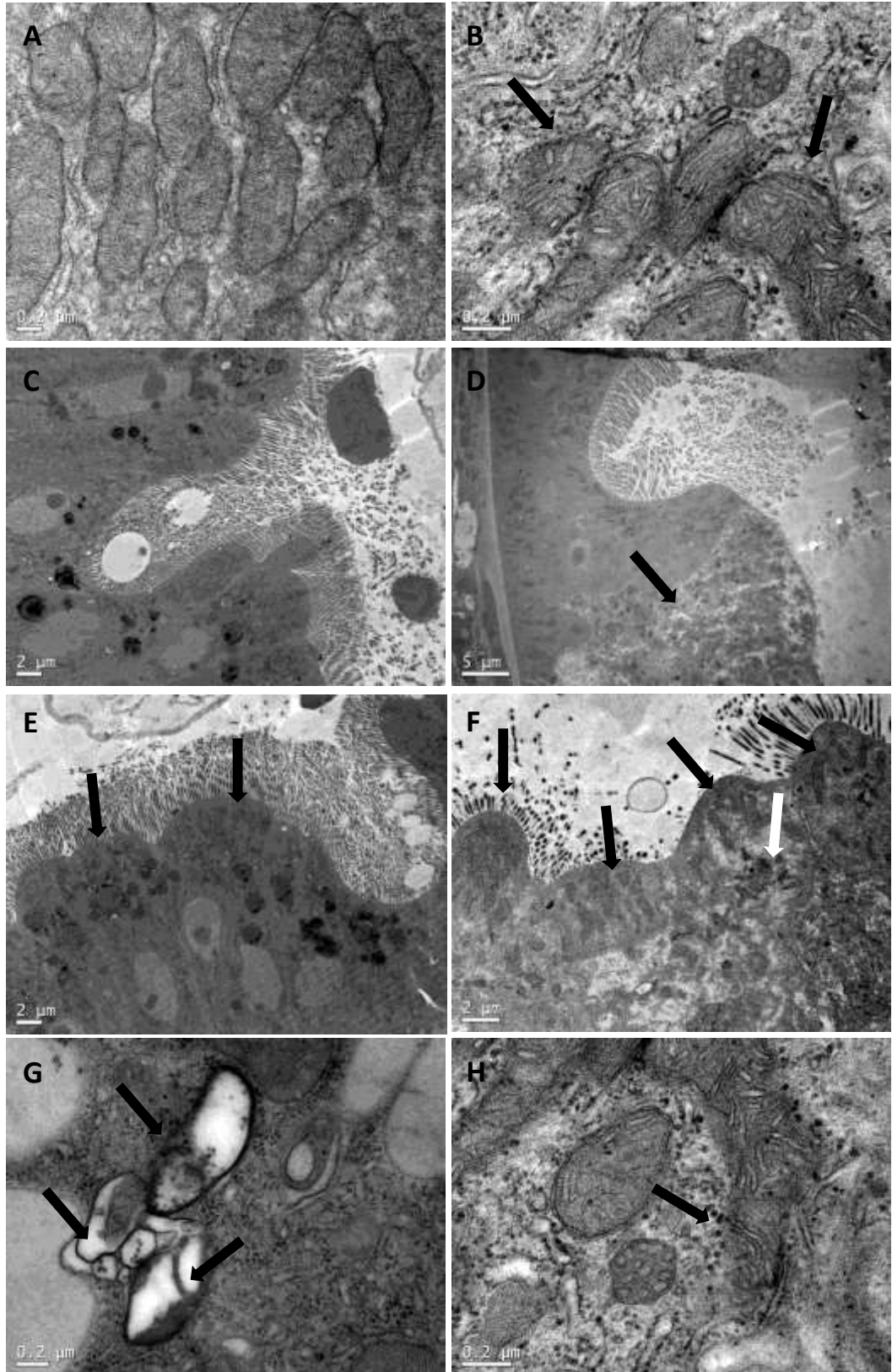
De Castro et al. (2023) avaliou a toxicidade de MP de PET secundários ($< 53 \mu\text{m}$) sobre o organismo *Daphnia similis* e, corroborando com os resultados obtidos nessa pesquisa, não observou toxicidade aguda. Com relação a exposição crônica, Jeong e Choi (2019) relatam que o aumento da mortalidade, maior intervalo entre reproduções e menor número de neonatos foram relatados como efeito após 21 dias de exposição do organismo *D. magna* a MP. Para o organismo *D. similis*, De Castro et al. (2023) observaram uma redução no número da prole total e um atraso na primeira reprodução durante a exposição crônica. A ausência de efeito agudo e presença de efeito crônico servem como um alerta para a interpretação de resultados com experimentos de curto prazo, já que no meio ambiente as espécies estão sujeitas a exposição crônica.

6.3.2 MET e MEV

Além da alteração na reprodução, através das micrografias de MET e MEV, é possível identificar alterações ultraestruturais nos organismos expostos. Nas micrografias de MET (

Figura 13) é possível identificar mitocôndrias inchadas (B), indicando alguma alteração na permeabilidade seletiva da organela, permitindo que o fluido intercelular entrasse. O inchaço mitocondrial inicia com mudanças na homeostase iônica dentro da organela, o que induz um desequilíbrio osmótico entre o citosol e a matriz mitocondrial (JAVADOV; CHAPA-DUBOCQ; MAKAROV, 2018). Como resultado, o aumento da pressão osmótica aumenta o influxo de água, levando ao inchaço da matriz. As mudanças no volume da matriz têm um papel importante na regulação da função mitocondrial e do metabolismo em condições fisiológicas. No entanto, um aumento extensivo do volume da matriz ou inchaço da matriz compromete a função mitocondrial e inicia a morte celular mediada pelas mitocôndrias (JAVADOV; CHAPA-DUBOCQ; MAKAROV, 2018). Ainda segundo Javadov, Chapa-Dubocq e Makarov (2018), o inchaço mitocondrial está associado ao estresse oxidativo.

Figura 13 - Micrografias de MET de *D. magna* do controle apresentando mitocôndrias (A) e tecido epitelial preservados (C) e Daphnias expostas a fração aquosa da degradação por 24 h do PET apresentando mitocôndrias inchadas (B), tecido epitelial danificado (D), vacúolos autofágicos (G), extravassamento celular (F – seta branca) e grande quantidade de mitocôndrias na superficial apical (F – seta preta) quando comparado ao controle (E) e rompimento da membrana mitocondrial (H).



Fonte: A autora, 2022.

Nas micrografias é possível identificar também a presença de vacúolos autofágicos (Figura 13G). A presença dessas estruturas é natural nas células porém, quando numerosas e

grandes indica uma degradação aumentada de componentes intracelulares (BODAR; VAN DONSELAAR; HERWIG, 1990). Indicando alguma desregulação celular. Chiramel, Brady, Bartenschlager (2013) e Moore et al. (2015) relataram que a indução da autofagia é desencadeada por uma variedade de estímulos de estresse, incluindo privação de nutrientes, estresse do retículo endoplasmático, padrões, hipóxia, produção de espécies reativas de oxigênio e dano mitocondrial. Logo, a maior incidência de estruturas autofágicas nos organismos expostos a fração líquida após 24h de fotodegradação indica uma condição de estresse.

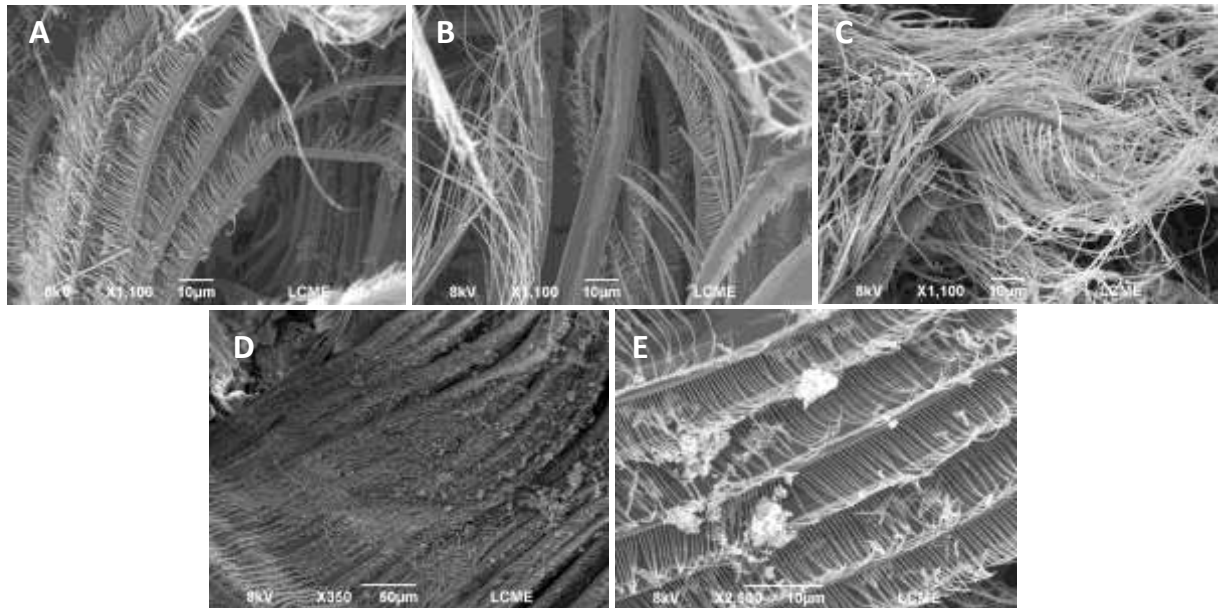
Nas micrografias de MEV é possível identificar danos nos membros torácicos dos organismos expostos ao tratamento ficando evidente a desorganização desses filamentos (Figura 14). A atividade dos membros torácicos é um parâmetro fisiológico vital porque as *Daphnias* são organismos filtradores e seus apêndices desempenham um papel essencial na alimentação e ventilação (EGHAN; LEE; KIM, 2022).

O alimento é filtrado da água ao redor pelo movimento dos membros torácicos gerando corrente de água pela qual as partículas do alimento são direcionadas para o aparelho de filtragem para ingestão (EBERT, 2005). A exposição a substâncias tóxicas podem causar perda de coordenação ou paralisia de apêndices e, como resultado, a taxa de filtração é reduzida.

Nas micrografias de MEV, além da desorganização, foi possível identificar a presença de estruturas presas aos filamentos do apêndice (Figura 14D e E) dos organismos expostos a fração aquosa resultado de 24 h de degradação por 21 dias. Estruturas essas que aparentam estar prendendo os cílios de diferentes filamentos prejudicando o processo de filtração do organismo.

Além dos efeitos crônicos como mortalidade, retardo na geração da primeira prole e redução no número de filhotes, analisando o efeitos de MP de PET no crustáceo de água doce *D.similis*, De Castro et al., (2023) observou efeito físico visível da fixação de MP nos apêndices torácicos e antenas dos organismos expostos. Logo, a possibilidade das estruturas presentes aos filamentos dos apêndices torácicos podem ser as MP de PET geradas com a exposição a fotodegradação.

Figura 14- Micrografias de MEV de *D. magna* apresentando os apêndices torácicos do controle (A), organismos expostos a fração aquosa de 2 h (B) e 24 h (C) de degradação e danos nos apêndices após exposição a fração aquosa de 24 h (D e E).



Fonte: A autora, 2022.

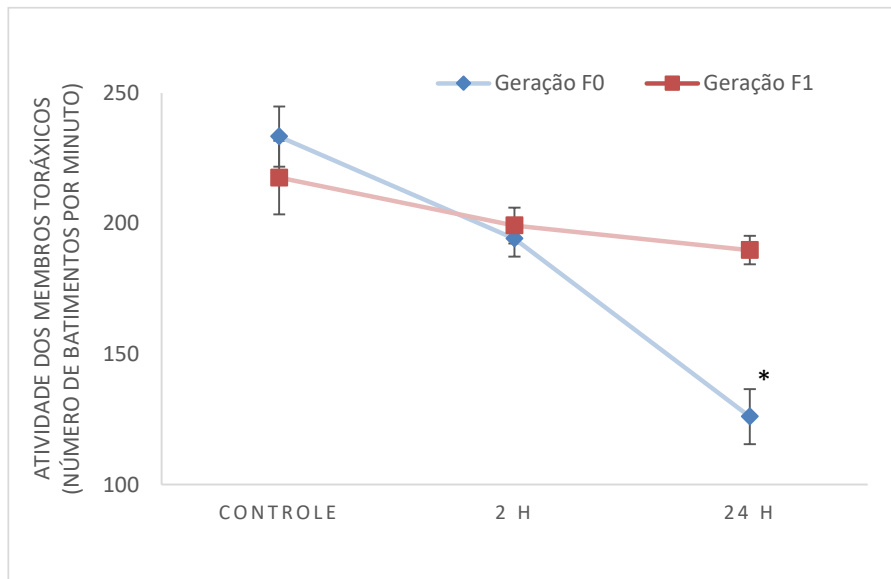
6.3.3 Atividade dos membros torácicos e frequência cardíaca

Daphnia são organismos incolores devido à carapaça quitinosa transparente que protege o tórax e o abdome (TKACZYK et al., 2021). Devido a sua transparência, é possível observar vários pares de membros com cerdas dentro delas. Esses membros móveis formam um aparelho para alimentação e respiração e geram uma corrente de água que direciona protozoários, algas, bactérias e detritos orgânicos diretamente para a boca e depois para a mandíbula onde o alimento é processado mecanicamente (EBERT, 2005).

Os organismos expostos aos tratamentos (fração aquosa de 2 h e 24 h de fotodegradação) apresentaram redução da atividade dos membros torácicos (Figura 15). Porém, estatisticamente, apenas no tratamento com a fração aquosa de 24 h de exposição a fotodegradação apresentou diferença estatística significativa.

Figura 15 - Atividade do membro torácico de *Daphnia magna* expostas ao controle e as frações aquosas de partículas plásticas fotodegradadas por 2 e 24 h. Os resultados são apresentados

como média \pm Desvio Padrão. (* indica significância estatística $p < 0,05$ comparado ao controle do teste)



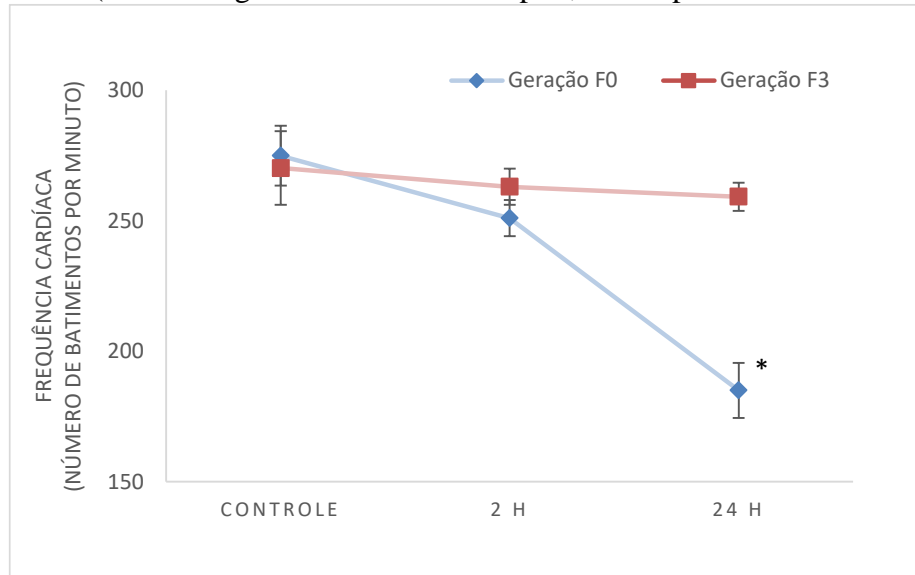
Fonte: A autora, 2023.

Os organismos controle da geração parental F0 apresentaram $233,3 \pm 11,48$ batimentos/min enquanto os tratamentos apresentaram $194,2 \pm 6,90$ e $126,0 \pm 10,50$ batimentos/min para 2 h e 24 h do tratamento. A geração filial F3 também apresentou danos no parâmetro analisado. Mesmo tratando-se de um crônico de recuperação onde os organismos ficaram expostos ao meio controle, a geração filial cujas mães foram expostas aos tratamentos apresentou redução da atividade torácica. Caracterizando que o dano no sistema nervoso ocasionado pela exposição das mães gerou alterações fisiológicas nas filhas.

Os apêndices batem ritmicamente para bombear a água através da câmara de filtragem (Pirow et al. 1999). Segundo Villarrol et al., 1999, a exposição a substâncias tóxicas pode causar danos ao sistema nervoso do organismo causando a perda de coordenação ou paralisia dos apêndices e, como resultado, a taxa de filtração é reduzida. A batida constante desses membros impulsiona as partículas de comida em direção o sulco alimentar da *Daphnia* enquanto ao mesmo tempo fornece propulsão para troca gasosa na superfície corporal (LARI; STEINKEY; PYLE, 2017). Dessa forma, o fornecimento de partículas de alimentos e o oxigênio é comprometido.

Como a alimentação é a única fonte de energia das *Daphnias*, tudo o que afeta a alimentação inevitavelmente afeta muitos aspectos vitais da vida do organismo, como por exemplo, crescimento e reprodução. Uma vez que as vias metabólicas do organismo foram alteradas, os parâmetros fisiológicos também são alterados.

Figura 16 – Frequência cardíaca de *Daphnia magna* expostas ao controle e as frações aquosas de partículas plásticas fotodegradadas por 2 e 24 h. Os resultados são apresentados como média \pm Desvio Padrão. (* indica significância estatística $p < 0,05$ comparado ao controle do teste)



Fonte: A autora, 2023.

A frequência cardíaca é um indicador comum e sensível da atividade cardíaca dos organismos (CAMPBELL; WANN; MATTHEWS, 2004). Nas análises desse parâmetro, os resultados demonstraram que a exposição dos organismos a fração aquosa resultado da fotodegradação induziu diminuição do número de batimentos por minuto dos organismos Figura 16.

Na geração parental (F0), os organismos expostos ao controle apresentaram em média $274,9 \pm 7,17$ batimentos/min. Nos tratamentos, para as amostras de 2 e 24 h de degradação, respectivamente, foram encontrados os valores de $251 \pm 9,94$ e $185 \pm 15,36$ batimentos/min. Logo, a redução dos batimentos cardíacos foi conforme o aumento do tempo de fotodegradação do PET (LONGNECKER; ROBSON, 1993).

A frequência cardíaca da *Daphnia* é facilmente alterada por fatores físicos e distúrbio químico e é um indicador fisiológico da taxa metabólica do organismo (LARI; STEINKEY; PYLE, 2017). Sendo então considerado um indicador direto do nível de estresse do organismo (KOTOV, 2017).

Wang et al., (2022) ao expor *D. magna* a MP com diferentes tamanhos de partícula ($20 \mu\text{m}$ e $30 \mu\text{m}$), além de ocasionar o acúmulo significativo de MP no intestino dos organismos,

reduziu significativamente a sobrevivência e a frequência cardíaca de *D. magna*. Os autores ainda afirmaram que a exposição induziu mudanças significativas entre 88 e 91 metabólitos diferentes. Diminuíram por exemplo, a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina, que afetaram principalmente o metabolismo dos fosfolipídios, e diminuíram especificamente os metabólitos dos aminoácidos l-glutamina, l-glutamato e ácido málico, que interferem principalmente no metabolismo energético.

Além de alterações dos metabólitos do organismos, na literatura ainda são citados como possíveis causadores da diminuição da frequência cardíaca a transmissão neuronal para o coração dafnídeo (inibição na transmissão de sinal dos nervos para o músculo cardíaco) ou dano oxidativo dos neurônios cardíacos (BOWNIK; JASIECZEK; KOSZTOWNY, 2020; LARI; STEINKEY; PYLE, 2017), alterações hematológicas e danos nos órgãos (PAN et al., 2017).

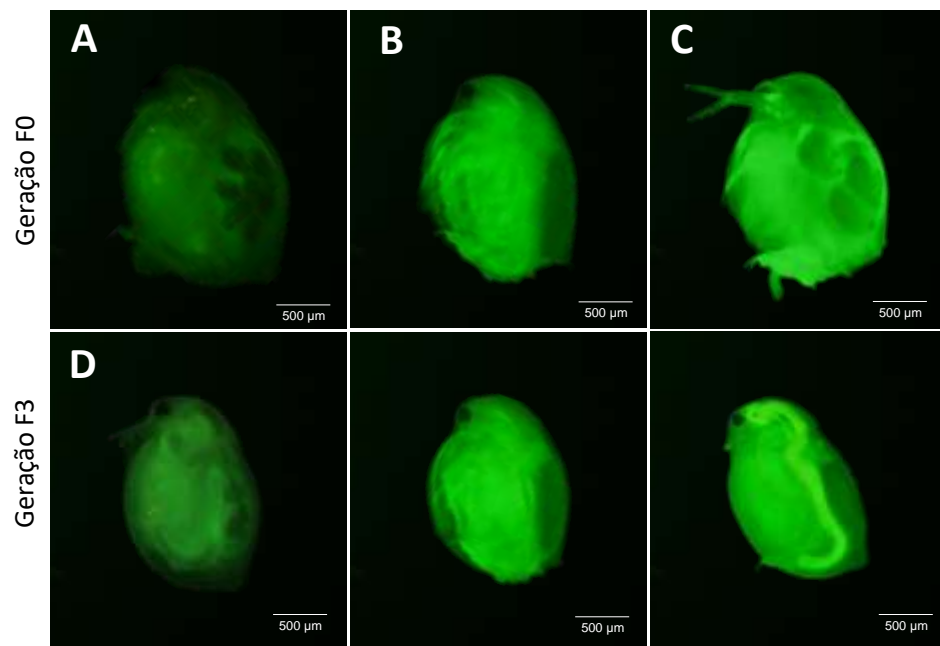
6.3.4 EROs

O sistema de enzimas antioxidantes é uma parte importante do sistema de defesa e manutenção do equilíbrio entre a geração e a eliminação de EROs em *D. magna*. Porém, após a exposição a um xenobiótico, a geração e a eliminação de EROs é prejudicada, causando um desequilíbrio que leva a danos celulares, aumentando os custos metabólicos, levando a prejuízos reprodutivos em *D. magna* (DU et al., 2020; SAEBELFELD et al., 2017).

Nos resultados obtidos nessa pesquisa é possível verificar que na geração parental, os organismos expostos a fração aquosa de 24 h de fotodegradação do PET apresentaram maior geração EROs. Chegando a valores de $239,06 \pm 11,54\%$ (Figura 18), correspondendo a um aumento significativo de 139,06% com relação ao controle. Já no crônico de recuperação com a geração filial F3, observamos que a maior geração de EROs ocorreu nos organismos oriundos de mães expostas a concentração de 24 h de degradação do PET (Figura 18), correspondendo a um aumento de 109% quando comparado ao controle. O aumento de EROs também fica evidente observando as imagens de fluorescência dos organismos expostos (Figura 17).

Figura 17 - Imagens de fluorescência de *D. magna* das gerações F0 (A, B e C) e F3 (B, E e F) indicadas por fluorescência verde brilhante no controle negativo (A e D) 2 h (B e E) e 24 h (C

e F) de fotodegradação após 21 dias do teste crônico de exposição, para F0 e 21 dias de teste crônico de recuperação para F3.

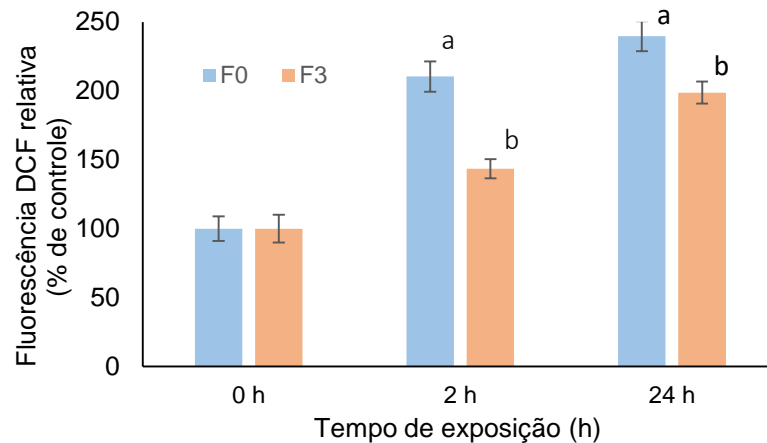


Fonte: A autora, 2023.

Como vários outros metais pesados e metaloides, o Sb é um potente indutor do acúmulo de EROs (FENG et al., 2009; ORTEGA et al., 2017). Como é possível verificar na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, a maior concentração de Sb no meio M4 ocorreu no maior tempo de exposição do PET a fotodegradação. Dessa forma, atribui-se a maior geração de EROs da geração parental a essa característica da fração aquosa. Na pesquisa de Gu et al., (2022) foi verificado que a exposição ao trióxido de antimônio de tamanho nanométrico e ao tartarato de antimônio e potássio induziram a formação de estresse oxidativo, aumentaram as atividades das enzimas antioxidantes, alteraram o metabolismo dos organismos e causaram danos ao sistema nervoso de *D. magna*. Além disso, um dos principais causadores dos efeitos toxicológicos em diversos organismos após a exposição a MP é a produção EROs (JEONG; CHOI, 2019). Muitas pesquisas científicas sugerem que o estresse oxidativo pode desempenhar um papel crucial na toxicidade induzida por MP para os organismos (DU et al., 2020). Geret et al., (2002) verificaram que com a exposição prolongada a MP, o aumento da produção de EROs destrói o sistema antioxidante e inibe a atividade da catalase que desempenha um papel fundamental na proteção de organismos contra danos oxidativos induzidos por EROs. Considerando que os fragmentos encontrados via microscopia confocal ilustrados na Figura 10 sejam fragmentos de PET, essa característica também contribuiria para a geração de EROs.

No crônico de recuperação, a geração de EROs também foi maior nos organismos expostos a fração aquosa fruto da degradação do PET por 24 h. Com base nesse resultado, presume-se que a permanência do organismo num meio favorável a sua criação (meio de cultivo, no caso do teste crônico de recuperação) pode favorecer a eliminação do metal pesado. Nos organismos da F3 expostos a 2 h, a redução de EROs foi significativa (Figura 18), corroborando ainda mais com essa hipótese.

Figura 18 - Quantificação da produção de EROs em *D. magna* exposta nas gerações F0 e F3 ao controle negativo, fração aquosa de 2 e 24 h de fotodegradação. a = significativamente diferente do controle da geração F0 ($p < 5$). b = significativamente diferente do controle da geração F3 ($p < 5$).



Fonte: A autora, 2023.

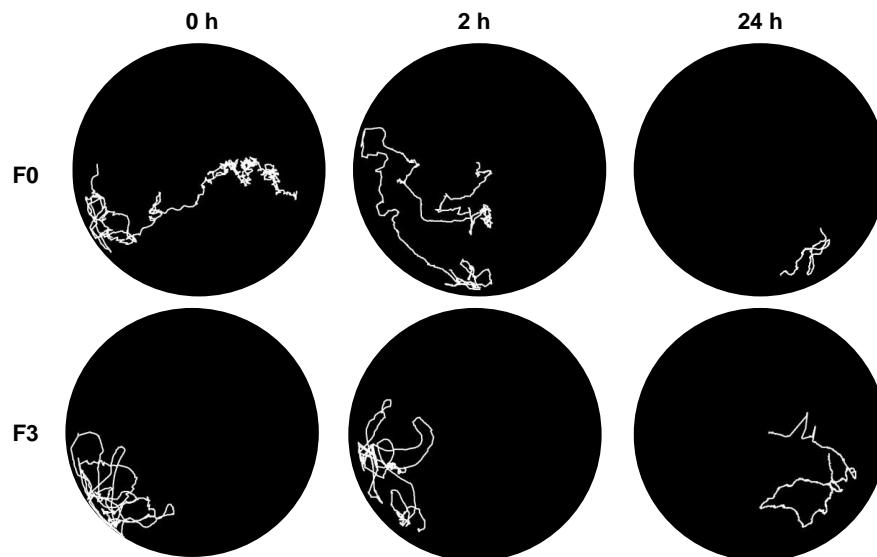
6.3.5 Ensaio de natação

Os resultados obtidos através do ensaio de natação estão expostos nas Figura 19 e Figura 20 a seguir. Nas figuras, é possível observar que a distância de natação dos dafnídeos diminuiu com a exposição à fração aquosa resultante da fotodegradação. Sendo essa redução maior na fração aquosa referente a 24 h de fotodegradação. Os valores de distância encontrados na geração F0 foram $33,59 \pm 2,66$ cm para o controle negativo, $24,65 \pm 2,40$ cm para 2 h e $7,38 \pm 1,05$ cm para 24 h de fotodegradação. Para F3, no teste de recuperação os valores de distância encontrados foram $31,60 \pm 2,10$ cm para o controle negativo, $23,75 \pm 3,25$ cm e $17,72 \pm 1,02$ cm para 2 e 24 h respectivamente. Ou seja, mesmo num ambiente adequado para seu

crescimento e desenvolvimento, a exposição das mães causou efeito na geração F3 no crônico de recuperação.

Embora a mortalidade e a imobilização sejam os principais parâmetros utilizados para determinação da toxicidade, a detecção de alterações sutis induzidas por alguns xenobióticos, especialmente em níveis mais baixos, podem exigir biomarcadores mais sensíveis. Alterações na trajetória das *Daphnias* podem sugerir distúrbios no sistema nervoso dos crustáceos manifestados por diversos sintomas, como perda de orientação (BOWNIK, 2017) .

Figura 19 - Trajetórias médias de natação das *Daphnias* das gerações F0 e F3 após 0 h (controle negativo), 2 h e 24 h de fotodegradação após 21 dias de teste de exposição crônica para F0 e teste de recuperação crônica para F3.

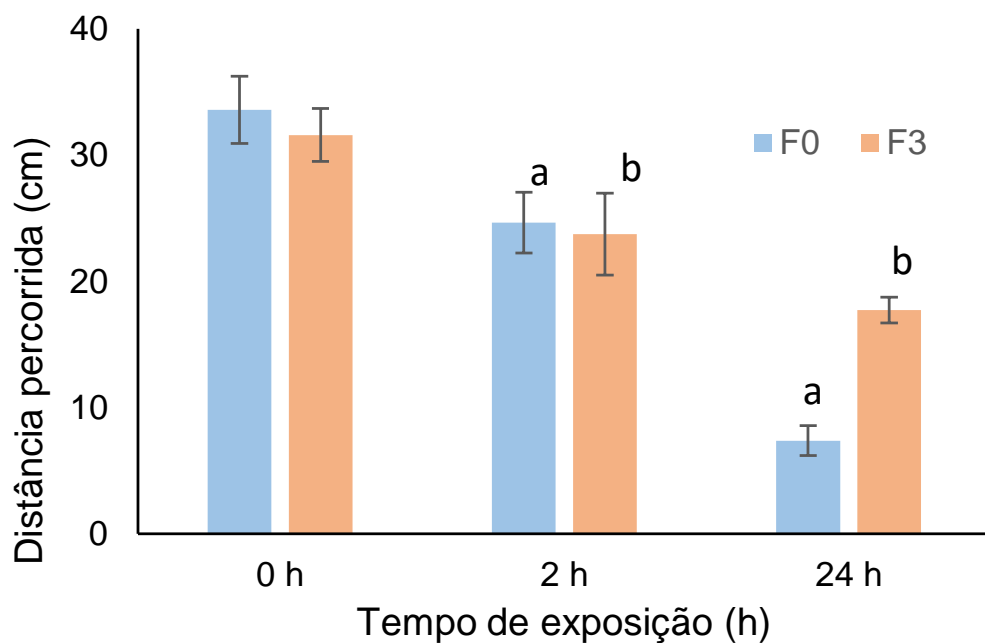


Fonte: A autora, 2023.

Xia et al., (2021) investigaram a neurotoxicidade do antimônio (0, 200, 400, 600 e 800 mg.L⁻¹) em embriões de peixe-zebra. Os resultados obtidos nos experimentos comportamentais indicaram que o Sb causou neurotoxicidade nos embriões, manifestada na diminuição da frequência de movimento espontâneo, atraso na resposta ao toque e redução da distância de movimento. Outro parâmetro que pode afetar a locomoção do organismo é citado por Gu et al., (2022). Em sua pesquisa foi verificado uma redução na taxa de ingestão de alimentos de *D. magna* com o aumento da contração de Sb. Por isso, os pesquisadores propõe que a deficiência de nutrientes causada pela exposição ao Sb também é responsável pela redução na locomoção dos organismos expostos.

Alterações no comportamento natatório de *D. magna* devido a exposição a MP e NP também é reportado na literatura. Magester et al., (2021) verificaram que as trajetórias de natação de Daphnias indicaram o estresse devido a exposição. Onde além da redução da capacidade natatória, os indivíduos deixaram de realizar trajetórias de natação verticais ou horizontais para movimentos de salto e afundamento. Nogueira et al., (2022) também verificaram alterações natatórias em *D. magna* devido a exposição a NP. Na pesquisa, a distância percorrida reduziu com o aumento da concentração de NP de poliestireno.

Figura 20 - Distância média percorrida pelas Daphnias das gerações F0 e F3 após 0 h (controle negativo), 2 h e 24 h de fotodegradação após 21 dias de teste de exposição crônica para F0 e teste de recuperação crônica para F3. a = significativamente diferente do controle de geração F0 ($p < 5$). b = significativamente diferente da geração controle F3 ($p < 5$).



Fonte: A autora, 2023.

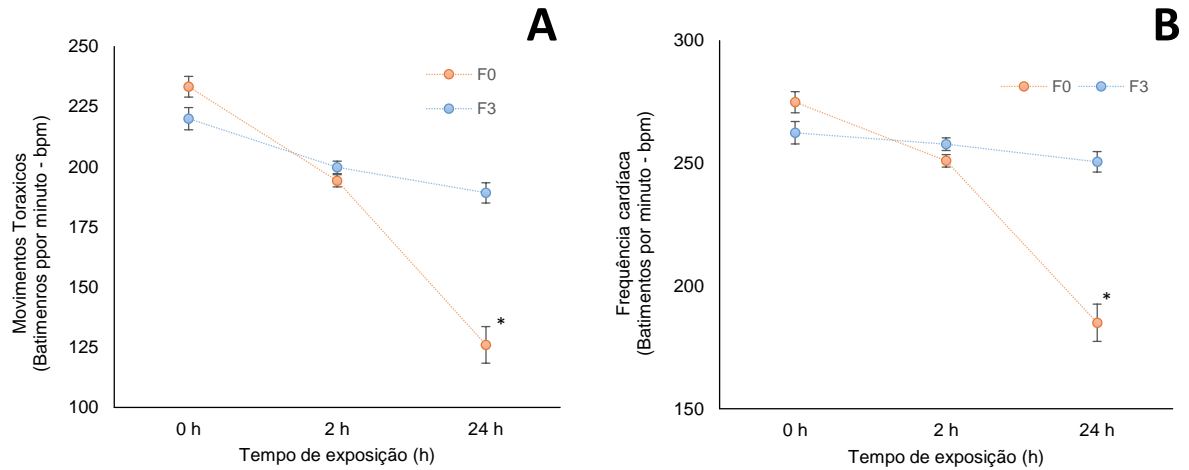
Com base nas literaturas apresentadas, os resultados obtidos nessa pesquisa sugerem que a redução da distância percorrida e a mudança no comportamento natatório dos organismos expostos está diretamente ligada ao aumento da exposição a fotodegradação e consequentemente ao aumento de Sb e de fragmentos possivelmente plásticos.

6.3.6 Atividade dos membros torácicos e frequência cardíaca

Os membros torácicos formam um importante mecanismo de alimentação e respiração, e geram uma corrente de água que direciona protozoários, algas, bactérias e detritos orgânicos diretamente para a boca e depois para a mandíbula onde o alimento é processado mecanicamente (EBERT, 2005). Organismos expostos à fração aquosa por 2 h e 24 h de fotodegradação apresentaram redução na atividade dos membros torácicos (Figura 21A). Porém, estatisticamente, apenas no tratamento com a fração aquosa de 24 h de exposição à fotodegradação apresentou diferença estatisticamente significativa. Os organismos controle F0 apresentaram $233,3 \pm 11,48$ bpm enquanto aqueles expostos à fração aquosa apresentaram $194,2 \pm 6,90$ e $126,0 \pm 10,50$ bpm para 2 h e 24 h de fotodegradação respectivamente. A geração F3 também apresentou prejuízo no parâmetro analisado. Mesmo sendo um teste de recuperação onde os organismos foram expostos ao meio controle, a geração F3 apresentou atividade torácica reduzida. Caracterizando que os danos ao sistema nervoso causados pela exposição das mães geraram alterações fisiológicas em suas filhas.

Segundo Villarroel et al. (1999), a exposição a substâncias tóxicas pode causar danos ao sistema nervoso do organismo, causando perda de coordenação ou paralisia dos apêndices e, conseqüentemente, a taxa de filtração é reduzida. A batida constante desses membros impulsiona as partículas de alimento em direção ao sulco alimentar da *Daphnia*, ao mesmo tempo que fornece propulsão para as trocas gasosas na superfície do corpo (LARI; STEINKEY; PYLE, 2017). Isso faz com que o fornecimento de partículas de alimentos e oxigênio seja comprometido. Como a alimentação é a única fonte de energia para *Daphnia*, qualquer coisa que afete a comida afeta inevitavelmente muitos aspectos vitais do organismo, como o crescimento e a reprodução.

Figura 21 - Atividade dos membros torácicos (A) e frequências cardíacas (B) de *Daphnia magna* exposta no teste crônico com a geração parental (F0) e no teste de recuperação crônica para a geração F3 nas concentrações controle (0 h), 2 e 24 h de fotodegradação.



Fonte: A autora, 2023.

A frequência cardíaca é um indicador comum e sensível da atividade cardíaca dos organismos (CAMPBELL; WANN; MATTHEWS, 2004). Na análise deste parâmetro, os resultados demonstraram que a exposição dos organismos à fração aquosa resultante da fotodegradação induziu uma diminuição no número de batimentos por minuto dos organismos (Figura 21B). Na geração F0, os organismos expostos ao controle apresentaram média de $274,9 \pm 7,17$ bpm. Para as amostras com 2 e 24 h de degradação, respectivamente, foram encontrados valores de $251 \pm 9,94$ e $185 \pm 15,36$ bpm.

A frequência cardíaca da *Daphnia* é facilmente alterada por fatores físicos e distúrbios químicos e é um indicador fisiológico da taxa metabólica do organismo (LARI; STEINKEY; PYLE, 2017). Portanto, é considerado um indicador direto do nível de estresse do organismo.

WANG et al. (2022a) analisaram os efeitos da exposição aguda a MP de polietileno com diferentes tamanhos (20 e 30 μm) sobre o organismo *D. magna*. Como resultado, além da redução na sobrevivência dos organismos, os pesquisadores observaram redução da frequência cardíaca. Gu et al., (2022) verificaram redução na frequência cardíaca com a exposição de *Daphnias* a nanopartículas de trióxido de antimônio.

Nessa pesquisa, tanto a frequência cardíaca quanto a atividade dos membros torácicos reduziu com o aumento do tempo de exposição a fotodegradação. Logo, conclui-se que a concentração de Sb e os fragmentos encontrados no meio M4 são possivelmente os causadores desse efeito.

Porém, tanto a atividade dos membros torácicos quanto a frequência cardíaca são parâmetros novos na investigação da toxicidade de compostos. Novas pesquisas devem ser realizadas a fim de entender melhor como funciona essa toxicidade.

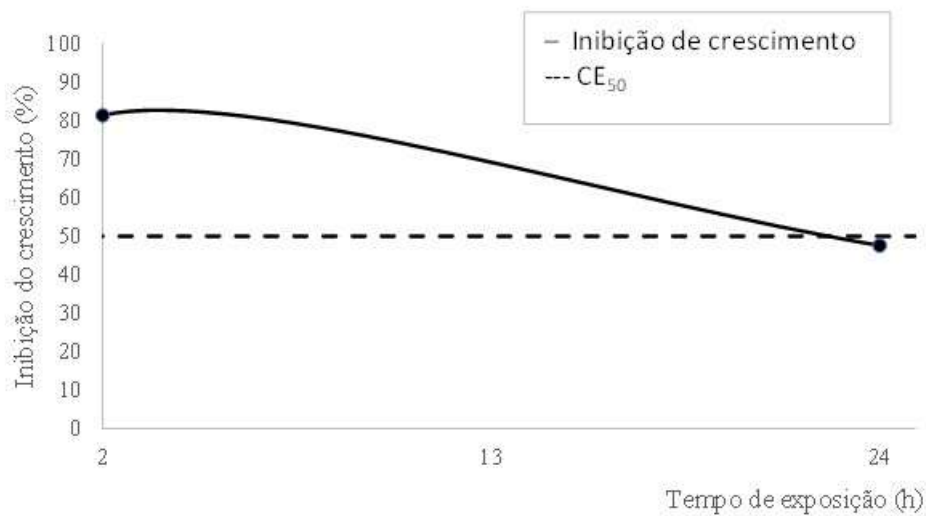
6.3.7 Toxicidade com bactéria luminescente *A. fischeri*

Não foram observados efeitos toxicológicos ao organismo *A. fischeri* devido a exposição a fração aquosa de fragmentos de PET expostos ao ambiente de degradação em água do mar reconstituída.

6.3.8 Toxicidade com macrófita *L. punctata*

Nos ensaios toxicológicos com a macrófita *L. punctata* apenas a amostra de 24 h de fotodegradação ocasionou efeito em 50% dos organismos expostos (Figura 22). Ou seja, apenas com a fração aquosa resultado da fotodegradação de PET por 24 h causou inibição no crescimento dos organismos expostos. Nas demais frações líquidas analisadas (0 e 2 h de exposição), não foram encontrados resultados inibitórios.

Figura 22- Curva resposta da taxa inibição de crescimento da planta após a exposição ao meio Lemna 0, 2 e 24 h de fotodegradação.



Fonte: A autora, 2023.

Embora os efeitos dos MP sobre o plâncton e os animais aquáticos em ecossistemas de água doce tenham recebido cada vez mais atenção, a toxicidade dos MPs para o metabolismo das plantas aquáticas permanece obscura (WANG et al., 2023). As plantas desempenham um papel duplo no ecossistema, tanto como produtores primários como local inicial de bioacumulação (GAO et al., 2019). Wang et al., (2023) analisaram a toxicidade de MP de PVC a planta aquática *Spirodela polyrhiza* e como resultado observaram alterações nas características funcionais e no metabolismo fisiológico da planta. Ivy et al. (2023) relatam que a absorção e a bioacumulação de MP podem ter efeitos prejudiciais em diferentes espécies de plantas. Lian et al. (2021) não encontraram impacto significativo do poliestireno (OS) no crescimento do trigo, enquanto Jiang et al., (2019) demonstraram uma redução significativa na biomassa vegetal devido à exposição ao PS em favas. Portanto, pode-se inferir que os efeitos dos MP em diferentes espécies de plantas podem variar.

Na literatura não são citadas pesquisas científicas a respeito do antimônio em plantas. De modo geral, em contraste com animais, as plantas parecem ser altamente tolerantes ao Sb (ORTEGA et al., 2017). E esse acúmulo assintomático de Sb nas plantas pode causar problemas como a alta exposição de humanos e bovinos através da ingestão inadvertida de Sb com alimentos ou rações. Os mecanismos de tolerância ao Sb nas plantas são pouco explorados (ORTEGA et al., 2017) e por isso não se sabe ao certo como o metaloide se comporta na planta.

7 CONCLUSÃO

A presente tese de doutorado avaliou os efeitos toxicológicos da fração aquosa resultado da fotodegradação de fragmentos plásticos de PET expostos a um sistema de degradação que simula a radiação solar por até 24 h aos organismos *D. magna* e *A. fischeri*. Além da avaliação toxicológica, foram analisadas alterações no polímero e na fração aquosa afim de comprovar a fotodegradação. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que:

- O sistema proposto para simular a exposição a luz solar foi eficiente;
- As alterações superficiais dos fragmentos plásticos indicadas pelas análises de MEV e AFM, além do aumento da concentração de Sb e do percentual de COT na fração líquida, confirmam que a exposição ao sistema de fotodegradação proposto ocasionou a degradação das partículas plásticas;
- A complexidade da fração aquosa interfere na intensidade da fotodegradação. Uma vez que nos meios com maior complexidade foram encontrados os maiores valores de Sb quantificado e COT;
- Não foram encontrados resultados de toxicidade aguda aos organismos *D. magna* e *A. fischeri*;
- A amostra de 24 h de fotodegradação ocasionou efeito em 50% dos organismos *L. punctata* expostos;
- A fração aquosa resultado de 24 h de fotodegradação causou toxicidade crônica ao organismo *D. magna* no parâmetro reprodução. Reduzindo o número de proles e alterando o dia da primeira geração de filhotes.
- Além dos danos reprodutivos, foram observados alterações ultraestruturais através de MEV e MET, geração de Eros, alterações na frequência cardíaca, na atividade dos membros torácicos e na atividade natatória;
- Através de um teste crônico de recuperação com a terceira geração de filhotes (F3) de mãe expostas a fração aquosa resultado da fotodegradação, foi verificado que os efeitos: redução do número de proles, alteração no dia da primeira geração de filhotes, atividade dos membros torácicos, frequência

cardíaca, atividade natatória e geração de Eros foram repassados a terceira geração filial (F3);

- A liberação de Sb e possivelmente de fragmentos de PET causaram a toxicidade aos organismos *D. magna*;

Relacionando os resultados obtidos com as hipóteses levantadas, tem-se que:

1 – O envelhecimento de fragmentos de garrafa PET em meio aquoso devido a fotodegradação confere maior potencial tóxico em relação as partículas plásticas não envelhecidas aos organismos *D. magna*, *A. fischeri*, e *L. punctata*.

A fotodegradação dos fragmentos de PET em meio aquoso conferiu toxicidade a fração aquosa a nível agudo para o organismo *L. punctata* e a nível crônico para o organismo *D. magna*. Não foram encontrados resultados toxicológicos com a exposição da bactéria marinha *A. fischeri*.

2 – Quanto maior o tempo de exposição a fotodegradação, maior serão as alterações no PET incluindo liberação de compostos e fragmentação.

Quanto maior o tempo de exposição a fotodegradação, maior foram as alterações nos fragmentos de PET e maior a quantificação de Sb e a presença de fragmentos de partículas possivelmente plásticas na fração aquosa nos meios M4, meio Lemna e água do mar simulada.

3 – A toxicidade do envelhecimento pode ser associada a liberação de antimônio, principal catalisador utilizado na fabricação das embalagens PET.

Os resultados toxicológicos encontrados podem ser associados a liberação de antimônio, uma vez que os resultados obtidos foram encontrados nas amostras com maior quantificação de Sb.

8 REFERÊNCIAS

AKAN, O. D. et al. Plastic waste: Status, degradation and microbial management options for Africa. **Journal of Environmental Management**, v. 292, n. April, p. 112758, 2021.

ALI, S. S. et al. Degradation of conventional plastic wastes in the environment: A review on current status of knowledge and future perspectives of disposal. **Science of the Total Environment**, v. 771, p. 144719, 2021.

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

AN, Y.-J.; NAM, S.-H.; LEE, J.-K. Expanding the substances of water quality standard for the protection of human health based on risk assessment. - Google Search. **Korean Journal of Limnology**, p. 34–42, jan. 2008.

ANDRADE, J. et al. A low-cost system to simulate environmental microplastic weathering. **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, n. July, 2019.

ANDRADY, A. L. The plastic in microplastics: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 119, n. 1, p. 12–22, 2017.

ANDRADY, A. L.; HAMID, H. S.; TORIKAI, A. Effects of climate change and UV-B on materials. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 68–72, 2003.

ANDRADY, A. L.; NEAL, M. A. Applications and societal benefits of plastics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 1977–1984, 2009.

ARMENISE, S. et al. Plastic waste recycling via pyrolysis: A bibliometric survey and literature review. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 158, p. 105265, 1 set. 2021.

ARYAN, Y.; YADAV, P.; SAMADDER, S. R. Life Cycle Assessment of the existing and proposed plastic waste management options in India: A case study. **Journal of Cleaner Production**, v. 211, p. 1268–1283, 2019.

AUSTIN, H. P. et al. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 19, p. E4350–E4357, 2018.

BACH, C. et al. Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: A source of controversy reviewed. **Water Research**, v. 46, n. 3, p. 571–583, 2012.

BAJPAI, A. K.; BHATT, R.; KATARE, R. Atomic force microscopy enabled roughness analysis of nanostructured poly (diaminonaphthalene) doped poly (vinyl alcohol) conducting polymer thin films. **Micron**, v. 90, p. 12–17, 1 nov. 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, 27 jul. 2009.

BJORNDAL, K. A.; BOLTEN, A. B.; LAGUEUX, C. J. Ingestion of marine debris by juvenile sea turtles in coastal Florida habitats. **Marine Pollution Bulletin**, v. 28, n. 3, p. 154–158, 1 mar. 1994.

BLAIR, R. M. et al. Micro- and Nanoplastic Pollution of Freshwater and Wastewater Treatment Systems. **Springer Science Reviews**, v. 5, n. 1–2, p. 19–30, 2017.

BODAR, C. W. M.; VAN DONSELAAR, E. G.; HERWIG, H. J. Cytopathological investigations of digestive tract and storage cells in *Daphnia magna* exposed to cadmium and tributyltin. **Aquatic Toxicology**, v. 17, n. 4, p. 325–337, 1990.

BOUZON, Z. L.; OURIQUES, L. C.; OLIVEIRA, E. C. Spore adhesion and cell wall formation in *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Gelidiales). **Journal of Applied Phycology**, v. 18, n. 3–5, p. 287–294, 2006.

BOWNIK, A. *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 601–602, p. 194–205, 2017.

BOWNIK, A.; JASIECZEK, M.; KOSZTOWNY, E. Ketoprofen affects swimming behavior and impairs physiological endpoints of *Daphnia magna*. **Science of the Total Environment**, v. 725, p. 138312, 2020.

BRASILEIRA, N.; NBR, A. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia ssp* (Cladocera, Crustacea)**. Rio de Janeiro, 2006.

BRENT, S. A. **Plastics: Materials and Processing**. 3rd ed. ed. New Jersey: Pearson Education Ltd., 2005.

CAI, L. et al. Observation of the degradation of three types of plastic pellets exposed to UV irradiation in three different environments. **Science of the Total Environment**, v. 628–629, p. 740–747, 2018.

CALDAS, L. Q. DE A. Risco potencial em toxicologia ambiental. **Gestão e Avaliação de Risco em Saúde Ambiental**, p. 93–117, 1999.

CAMPBELL, A. K.; WANN, K. T.; MATTHEWS, S. B. Lactose causes heart arrhythmia in the water flea *Daphnia pulex*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 139, n. 2, p. 225–234, 2004.

CANGEMI, M. J.; SANTOS, A. M. DOS; CLARO NETO, S. Biodegradação: Uma Alternativa para Minimizar os Impactos Decorrentes dos Resíduos Plásticos. **Química Nova na Escola**, v. 22, n. Figura 1, p. 17–21, 2005.

CARPENTER, E. J.; SMITH, K. L. Plastics on the Sargasso sea surface. **Science**, v. 175, n. 4027, p. 1240–1241, 1972.

CHANDRAN, M.; TAMILKOLUNDU, S.; MURUGESAN, C. Conversion of plastic waste to fuel. **Plastic Waste and Recycling**, v. 2, n. 3, p. 385–399, 2020.

CHANG, M. et al. Microplastics increases the heat tolerance of *Daphnia magna* under global warming via hormetic effects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 249, n. December 2022, p. 114416, 2023.

CHAPA-MARTÍNEZ, C. A. et al. An evaluation of the migration of antimony from

polyethylene terephthalate (PET) plastic used for bottled drinking water. **Science of the Total Environment**, v. 565, p. 511–518, 15 set. 2016.

CHIRAMEL, A. I.; BRADY, N. R.; BARTENSCHLAGER, R. Divergent roles of autophagy in virus infection. **Cells**, v. 2, n. 1, p. 83–104, 2013.

CHRISTIAN, P. et al. Nanoparticles: Structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 5, p. 326–343, 6 jul. 2008.

COLTRO, L.; GASPARINO, B. F.; QUEIROZ, G. D. C. Reciclagem de materiais plásticos: A importância da identificação correta. **Polimeros**, v. 18, n. 2, p. 119–125, 2008.

CRAWFORD, C. B.; QUINN, B. The contemporary history of plastics. **Microplastic Pollutants**, p. 19–37, 2017.

CRAWFORD, R. J.; MARTIN, P. J. **General properties of plastics**. [s.l: s.n.].

CUI, R.; KIM, S. W.; AN, Y. J. Polystyrene nanoplastics inhibit reproduction and induce abnormal embryonic development in the freshwater crustacean *Daphnia galeata*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

CUTLER, G. C. et al. Hormesis and insects: Effects and interactions in agroecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 825, 15 jun. 2022.

DA SILVA SPINACÉ, M. A.; DE PAOLI, M. A. The technology of polymer recycling. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 65–72, 2005.

DAKOTA, F. Plastic Oceans: A New Way in solving Our Plastic Pollution. **University of San Francisco**, p. 71, 2016.

DE ASSUMPCÃO PEREIRA-DA-SILVA, M.; FERRI, F. A. **Microscopia Eletrônica De Varredura**. [s.l: s.n.].

DE CASTRO, D. G. et al. Effects of PET microplastics on the freshwater crustacean *Daphnia similis* Claus, 1976. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 35, 2023.

DE PAULA, R. S. **Sheet produced from cards of plastic material**. , 2016.

DERRAIK, J. G. B. The pollution of the marine environment by plastic debris: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 9, p. 842–852, 2002.

DJAPOVIC, M. et al. Synthesis and characterization of polyethylene terephthalate (PET) precursors and potential degradation products: Toxicity study and application in discovery of novel PETases. **Chemosphere**, v. 275, 2021.

DOMÍNGUEZ-JAIMES, L. P. et al. Degradation of primary nanoplastics by photocatalysis using different anodized TiO₂ structures. **Journal of Hazardous Materials**, v. 413, n. November 2020, 2021.

DU, J. et al. A review of microplastics in the aquatic environmental: distribution, transport, ecotoxicology, and toxicological mechanisms. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 11, p. 11494–11505, 2020.

DU, S. et al. Environmental fate and impacts of microplastics in aquatic ecosystems: A review. **RSC Advances**, v. 11, n. 26, p. 15762–15784, 2021.

DUH, B. Effect of antimony catalyst on solid-state polycondensation of poly(ethylene terephthalate). **Polymer**, v. 43, n. 11, p. 3147–3154, 4 abr. 2002.

EBERT, D. **Ecology, Epidemiology and Evolution of Parasitism in**. [s.l.] National Center for Biotechnology Information (US), 2005. v. 3

EDGE, M. et al. Aspects of poly(ethylene terephthalate) degradation for archival life and environmental degradation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 32, n. 2, p. 131–153, 1991.

EERKES-MEDRANO, D.; THOMPSON, R. C.; ALDRIDGE, D. C. Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. **Water Research**, v. 75, p. 63–82, 2015.

EGHAN, K.; LEE, S.; KIM, W. K. Cardiotoxicity and neurobehavioral effects induced by acrylamide in *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 242, n. July, p. 113923, 2022.

ENGLER, R. E. The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 22, p. 12302–12315, 2012.

ERNI-CASSOLA, G. et al. Lost, but Found with Nile Red: A Novel Method for Detecting and Quantifying Small Microplastics (1 mm to 20 μm) in Environmental Samples. **Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 23, p. 13641–13648, 2017.

FAN, A. et al. Public Health Goal for ANTIMONY in Drinking Water. **Environmental Protection**, n. December, 1997.

FAN, Y. Y. et al. Effects of storage temperature and duration on release of antimony and bisphenol A from polyethylene terephthalate drinking water bottles of China. **Environmental Pollution**, v. 192, p. 113–120, 2014.

FARRELL, P.; NELSON, K. Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). **Environmental Pollution**, v. 177, p. 1–3, 2013.

FENG, R. et al. Antimony accumulation and antioxidative responses in four fern plants. **Plant and Soil**, v. 317, n. 1–2, p. 93–101, 2009.

FILELLA, M. Antimony and PET bottles: Checking facts. **Chemosphere**, v. 261, p. 127732, 2020.

FILELLA, M.; BELZILE, N.; CHEN, Y. W. Antimony in the environment: A review focused on natural waters I. Occurrence. **Earth-Science Reviews**, v. 57, n. 1–2, p. 125–176, 2002.

FILELLA, M.; BELZILE, N.; LETT, M. C. Antimony in the environment: A review focused on natural waters. III. Microbiota relevant interactions. **Earth-Science Reviews**, v. 80, n. 3–4, p. 195–217, 2007.

GAO, H. et al. Effects of plastic mulching and plastic residue on agricultural production: A meta-analysis. **Science of The Total Environment**, v. 651, p. 484–492, 15 fev.

2019.

GEBEL, T. Aresnic and antimony: Comparative approach on mechanistic toxicology. **Chemico-Biological Interactions**, v. 107, n. 3, p. 131–144, 1997.

GERBA, C. P. **Chapter 28 - Environmental Toxicology**. 3. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

GERET, F. et al. Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. **Biomarkers**, v. 7, n. 3, p. 242–256, 2002.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, p. 19–24, 2017.

GU, J. et al. Integrating transcriptome and physiological analysis to reveal the essential responses of *Daphnia magna* to antimony trioxide nanoparticle. **Journal of Hazardous Materials**, v. 437, n. May, p. 129303, 5 set. 2022.

GUIMARÃES, A. T. B.; CHARLIE-SILVA, I.; MALAFAIA, G. Toxic effects of naturally-aged microplastics on zebrafish juveniles: A more realistic approach to plastic pollution in freshwater ecosystems. **Journal of Hazardous Materials**, v. 407, p. 124833, 2021.

HALDIMANN, M. et al. Migration of antimony from PET trays into food simulant and food: Determination of Arrhenius parameters and comparison of predicted and measured migration data. **Food Additives and Contaminants - Part A**, v. 30, n. 3, p. 587–598, 2013.

HERMABESSIERE, L. et al. Optimization, performance, and application of a pyrolysis-GC/MS method for the identification of microplastics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 25, p. 6663–6676, 2018.

HOPEWELL, J.; DVORAK, R.; KOSIOR, E. Plastics recycling: Challenges and opportunities. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 2115–2126, 2009.

HORODYTSKA, O.; VALDÉS, F. J.; FULLANA, A. Plastic flexible films waste management – A state of art review. **Waste Management**, v. 77, p. 413–425, 2018.

HORTON, A. A. et al. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 127–141, 2017.

IÑIGUEZ, M. E.; CONESA, J. A.; FULLANA, A. Recyclability of four types of plastics exposed to UV irradiation in a marine environment. **Waste Management**, v. 79, p. 339–345, 2018.

IOAKEIMIDIS, C. et al. The degradation potential of PET bottles in the marine environment: An ATR-FTIR based approach. **Scientific Reports**, v. 6, n. October 2015, p. 1–8, 2016.

ISO. Water quality -- Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*) -- Duckweed growth inhibition test. v. 3, n. 1, p. 23, 2005.

IVY, N. et al. Effects of microplastics and arsenic on plants: Interactions, toxicity and environmental implications. **Chemosphere**, v. 338, 1 out. 2023.

JAMES, E.; TURNER, A. Mobilisation of antimony from microplastics added to coastal sediment. **Environmental Pollution**, v. 264, p. 114696, 2020.

JAVADOV, S.; CHAPA-DUBOCQ, X.; MAKAROV, V. Different approaches to modeling analysis of mitochondrial swelling. **Mitochondrion**, v. 38, p. 58–70, 2018.

JEMEC, A. et al. Uptake and effects of microplastic textile fibers on freshwater crustacean *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, v. 219, p. 201–209, 2016.

JEONG, J.; CHOI, J. Adverse outcome pathways potentially related to hazard identification of microplastics based on toxicity mechanisms. **Chemosphere**, v. 231, p. 249–255, 1 set. 2019.

JIANG, R. et al. Quantifying nanoplastic-bound chemicals accumulated in: *Daphnia magna* with a passive dosing method. **Environmental Science: Nano**, v. 5, n. 3, p. 776–781, 2018.

JIANG, X. et al. Ecotoxicity and genotoxicity of polystyrene microplastics on higher plant *Vicia faba*. **Environmental Pollution**, v. 250, p. 831–838, 1 jul. 2019.

JO, M. et al. A Comparison of Antimony in Natural Water with Leaching Concentration from Polyethylene Terephthalate (PET) Bottles. **International Journal of Environmental Pollution and Remediation**, v. 6, p. 25–31, 2018.

KALČÍKOVÁ, G. et al. An environmental concentration of aged microplastics with adsorbed silver significantly affects aquatic organisms. **Water Research**, v. 175, 2020.

KARAKOLIS, E. G. et al. Fluorescent Dyes for Visualizing Microplastic Particles and Fibers in Laboratory-Based Studies. **Environmental Science and Technology Letters**, v. 6, n. 6, p. 334–340, 2019.

KEDZIERSKI, M. et al. Why is there plastic packaging in the natural environment? Understanding the roots of our individual plastic waste management behaviours. **Science of the Total Environment**, v. 740, p. 139985, 2020.

KERESZTES, S. et al. Leaching of antimony from polyethylene terephthalate (PET) bottles into mineral water. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 16, p. 4731–4735, 2009.

KERSHAW, P. J.; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. GLOBAL PROGRAMME OF ACTION FOR THE PROTECTION OF THE MARINE ENVIRONMENT FROM LAND-BASED ACTIVITIES. **Biodegradable plastics & marine litter : misconceptions, concerns and impacts on marine environments**. [s.l: s.n.].

KHANGAROT, B. S.; RAY, P. K. Investigation of correlation between physicochemical properties of metals and their toxicity to the water flea *Daphnia magna* Straus. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 18, n. 2, p. 109–120, 1989.

KOELMANS, A. A. et al. Plastic as a carrier of POPs to aquatic organisms: A model analysis. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 14, p. 7812–7820, 16 jul. 2013.

KOSCHEVIC, M. T.; RODRIGO, P.; BITTENCOURT, S. Meio ambiente e materiais poliméricos: breves considerações com ênfase ao politereftalato de etileno (PET) e processos de degradação. **Revista Eletrônica Científica Inovação e Tecnologia**, v. 7, n. 16, p. 60–80, 2016.

KOTOV, A. A. **Notes on the Physiology of Embryogenesis**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

LABERGE, Y. **Review: Plastic Soup: An Atlas of Ocean Pollution**. Washington, DC: Island Press, 2020. v. 1

LAHIVE, E. et al. Sewage sludge treated with metal nanomaterials inhibits earthworm reproduction more strongly than sludge treated with metal metals in bulk/salt forms. **Environmental Science: Nano**, v. 4, n. 1, p. 78–88, 20 jan. 2017.

LANDIS, W. G.; YU, M. Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems. **Choice Reviews Online**, v. 33, n. 03, p. 33-1539-33–1539, 1995.

LARI, E.; STEINKEY, D.; PYLE, G. G. A novel apparatus for evaluating contaminant effects on feeding activity and heart rate in *Daphnia* spp. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, n. October 2016, p. 381–386, 2017.

LAW, K. L. Plastics in the Marine Environment. **Annual Review of Marine Science**, v. 9, n. 1, p. 205–229, 2017.

LEBRETON, L.; ANDRADY, A. Future scenarios of global plastic waste generation and disposal. **Palgrave Communications**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2019.

LI, B. et al. Microplastics in fishes and their living environments surrounding a plastic production area. **Science of the Total Environment**, v. 727, p. 138662, 2020.

LI, Y. et al. Toxicity of antimony to *Daphnia magna*: Influence of environmental factors, development of biotic ligand approach and biochemical response at environmental relevant concentrations. **Journal of Hazardous Materials**, v. 462, p. 132738, 15 jan. 2024.

LIAN, J. et al. Foliar-applied polystyrene nanoplastics (PSNPs) reduce the growth and nutritional quality of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Environmental Pollution**, v. 280, p. 116978, 1 jul. 2021.

LONGNECKER, N. E.; ROBSON, A. D. **Distribution and Transport of Zinc in Plants**. Perth, Australia: Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993.

LV, L. et al. A simple method for detecting and quantifying microplastics utilizing fluorescent dyes - Safranin T, fluorescein isophosphate, Nile red based on thermal expansion and contraction property. **Environmental Pollution**, v. 255, p. 113283, 2019.

MAES, T. et al. A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 1–10, 2017.

MAGESTER, S. et al. Vertical distribution of microplastics in water bodies causes sublethal effects and changes in *Daphnia magna* swimming behaviour. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 228, p. 113001, 2021.

MAI, L. et al. A review of methods for measuring microplastics in aquatic environments. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 12, p. 11319–11332, 2018.

MALIK, N. et al. An overview on PET waste recycling for application in packaging. **International Journal of Plastics Technology**, v. 21, n. 1, 2017.

MASÓ, M. et al. Los plásticos flotantes son potenciales vectores de dispersión de especies formadoras de proliferaciones algales nocivas. **Scientia Marina**, v. 67, n. 1, p. 107–111, 2003.

MATO, Y. et al. Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. **Environmental Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 318–324, 2001.

MATTSON, M. P. Hormesis defined. **Ageing Research Reviews**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2008.

MAURI, M.; BARALDI, E.; SIMONINI, R. Effects of zinc exposure on the polychaete *Dinophilus gyrociliatus*: A life-table response experiment. **Aquatic Toxicology**, v. 65, n. 1, p. 93–100, 2003.

MERSKI, J. A. et al. Oral toxicity and bacterial mutagenicity studies with a spunbond polyethylene and polyethylene terephthalate polymer fabric. **International Journal of Toxicology**, v. 27, n. 5, p. 387–395, 2008.

MOORE, M. N. et al. Anti-oxidative cellular protection effect of fasting-induced autophagy as a mechanism for hormesis. **Marine Environmental Research**, v. 107, p. 35–44, 2015.

NAGAI, Y. et al. Photodegradation mechanisms in poly(2,6-butylenenaphthalate-co-tetramethyleneglycol) (PBN-PTMG). I: Influence of the PTMG content. **Polymer Degradation and Stability**, v. 88, n. 2, p. 251–255, maio 2005.

NAKASHIMA, E. et al. The potential of oceanic transport and onshore leaching of additive-derived lead by marine macro-plastic debris. **Marine Pollution Bulletin**, v. 107, n. 1, p. 333–339, 2016.

NAM, S. H.; YANG, C. Y.; AN, Y. J. Effects of antimony on aquatic organisms (Larva and embryo of *Oryzias latipes*, *Moina macrocopa*, *Simocephalus mixtus*, and *Pseudokirchneriella subcapitata*). **Chemosphere**, v. 75, n. 7, p. 889–893, 1 maio 2009.

NOGUEIRA, D. J. et al. Individual and combined multigenerational effects induced by polystyrene nanoplastic and glyphosate in *Daphnia magna* (Strauss, 1820). **Science of the Total Environment**, v. 811, 2022.

OBBARD, R. W. et al. Who Where Why - wordpress blog - Community mapping examples. **Earth's Future**, v. 2, p. 315–320, 2014.

ORTEGA, A. et al. Effects of antimony on redox activities and antioxidant defence systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0183991, 1 set. 2017.

PAN, Y. et al. Lethal/sublethal responses of *Daphnia magna* to acute norfloxacin

contamination and changes in phytoplankton-zooplankton interactions induced by this antibiotic. **Scientific Reports**, v. 7, n. December 2016, p. 1–10, 12 jan. 2017.

PANG, J. et al. Synthesis of ethylene glycol and terephthalic acid from biomass for producing PET. **Green Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 342–359, 2016.

PENG, G. et al. The ocean's ultimate trashcan: Hadal trenches as major depositories for plastic pollution. **Water Research**, v. 168, p. 115121, 2020.

PIKUDA, O. et al. Toxicity Assessments of Micro- and Nanoplastics Can Be Confounded by Preservatives in Commercial Formulations. **Environmental Science and Technology Letters**, v. 6, n. 1, p. 21–25, 2019.

PLASTICS EUROPE. Plastics Europe - Enabling a sustainable future. **Plastics Europe Market Research Group (PEMRG) and Conversio Market & Strategy GmbH**, p. 1–34, 2021.

PRADEL, A. et al. Deposition of environmentally relevant nanoplastic models in sand during transport experiments. **Chemosphere**, v. 255, 2020.

PUDACK, C.; STEPANSKI, M.; FÄSSLER, P. PET Recycling – Contributions of Crystallization to Sustainability. **Chemie-Ingenieur-Technik**, v. 92, n. 4, p. 452–458, 2020.

RAGUSA, A. et al. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. **Environment International**, v. 146, 1 jan. 2021.

ROCHMAN, C. M. et al. Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1–7, 2013.

RONCO, A. E. **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas**. [s.l: s.n.].

RUMBAK, M. Riding the Roller Coaster of Fluid Resuscitation and Fluid De-escalation: A Lot to Learn Still. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 351, n. 6, p. 606, 2016.

RUNGCHANG, S. et al. Diffusion coefficient of antimony leaching from polyethylene terephthalate bottles into beverages. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 3, p. 322–329, 2013.

RYAN, P. G. The incidence and characteristics of plastic particles ingested by seabirds. **Marine Environmental Research**, v. 23, n. 3, p. 175–206, 1 jan. 1987.

SAEBELFELD, M. et al. Humic dissolved organic carbon drives oxidative stress and severe fitness impairments in Daphnia. **Aquatic Toxicology**, v. 182, p. 31–38, 2017.

SANCLEMENTS, M. **Plastic Purge -How to use less plastic, eat better, keep toxins out of body, and help save the sea turtles**. New York: St. Martin's Press, 2014. v. №3

SARGENT, B. et al. Heat set creases in polyethylene terephthalate (PET) sheets to enable origami-based applications. **Smart Materials and Structures**, v. 28, n. 11, 2019.

SCHMALTZ, E. et al. Plastic pollution solutions: emerging technologies to prevent

and collect marine plastic pollution. **Environment International**, v. 144, p. 106067, 1 nov. 2020.

Science-Based Solutions to Plastic Pollution. **One Earth**, v. 2, n. 1, p. 5–7, 24 jan. 2020.

SHIM, W. J. et al. Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. **Marine Pollution Bulletin**, v. 113, n. 1–2, p. 469–476, 2016.

SILVA, M. B. Percepção da população assistida sobre a inserção de estudantes de medicina na Unidade Básica de Saúde. **Trabalho de conclusão de curso**, v. 1, n. 9, p. 1–10, 2016.

SINGH, B.; SHARMA, N. Mechanistic implications of plastic degradation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, n. 3, p. 561–584, 2008.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony Toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 2010, Vol. 7, Pages 4267-4277, v. 7, n. 12, p. 4267–4277, 20 dez. 2010.

SWEDISH CHEMICALS INSPECTORATE. **European Union Risk Assessment Report: Diantimony Trioxide**. CAS No: 13 ed. Luxembourg: [s.n.].

TAGHAVI, N. et al. Degradation of plastic waste using stimulated and naturally occurring microbial strains. **Chemosphere**, v. 263, p. 127975, 2021.

TANIGUCHI, I. et al. Biodegradation of PET: Current Status and Application Aspects. **ACS Catalysis**, v. 9, n. 5, p. 4089–4105, 2019.

TKACZYK, A. et al. Daphnia magna model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. **Science of the Total Environment**, v. 763, p. 143038, 2021.

TOURINHO, P. S.; IVAR DO SUL, J. A.; FILLMANN, G. Is marine debris ingestion still a problem for the coastal marine biota of southern Brazil? **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 3, p. 396–401, 2010.

UBAIDULLAH, M. et al. Waste PET plastic derived ZnO@NMC nanocomposite via MOF-5 construction for hydrogen and oxygen evolution reactions. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 4, p. 2397–2405, 2020.

UNEP. **Assembleia ambiental da ONU termina com 14 resoluções para conter a poluição e proteger e restaurar a natureza**. Disponível em: <<https://www.unep.org/pt-br/noticias-e-reportagens/comunicado-de-imprensa/assembleia-ambiental-da-onu-termina-com-14-resolucoes>>. Acesso em: 27 ago. 2022.

VALH, J. V. et al. Conversion of polyethylene terephthalate to high-quality terephthalic acid by hydrothermal hydrolysis: the study of process parameters. **Textile Research Journal**, v. 90, n. 13–14, p. 1446–1461, 2020.

VAN POMEREN, M. et al. Exploring uptake and biodistribution of polystyrene (nano)particles in zebrafish embryos at different developmental stages. **Aquatic Toxicology**, v. 190, p. 40–45, 2017.

VILLARROEL, M. J. et al. Daphnia magna feeding behavior after exposure to

tetradifon and recovery from intoxication. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 44, n. 1, p. 40–46, 1999.

WAAIJERS, S. L. et al. Toxicity of new generation flame retardants to *Daphnia magna*. **Science of the Total Environment**, v. 463–464, p. 1042–1048, 2013.

WANG, J. et al. Negligible effects of microplastics on animal fitness and HOC bioaccumulation in earthworm *Eisenia fetida* in soil. **Environmental Pollution**, v. 249, p. 776–784, 2019.

WANG, P. et al. Metabolomics reveals the mechanism of polyethylene microplastic toxicity to *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 307, 2022a.

WANG, Q. et al. Interactions between microplastics and soil fauna: A critical review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 18, p. 3211–3243, 21 maio 2022b.

WANG, Y. et al. Phytotoxicity of microplastics to the floating plant *Spirodela polyrhiza* (L.): Plant functional traits and metabolomics. **Environmental Pollution**, v. 322, p. 121199, 1 abr. 2023.

WELLE, F.; FRANZ, R. Migration of antimony from PET bottles into beverages: Determination of the activation energy of diffusion and migration modelling compared with literature data. **Food Additives and Contaminants - Part A**, v. 28, n. 1, p. 115–126, 2011.

WESTERHOFF, P. et al. Antimony leaching from polyethylene terephthalate (PET) plastic used for bottled drinking water. **Water Research**, v. 42, n. 3, p. 551–556, 2008.

XIA, S. et al. Developmental neurotoxicity of antimony (Sb) in the early life stages of zebrafish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 218, n. February, p. 112308, 2021.

YANG, J. L.; CHEN, L. H. Toxicity of antimony, gallium, and indium toward a teleost model and a native fish species of semiconductor manufacturing districts of Taiwan. **Journal of Elementology**, v. 23, n. 1, p. 191–199, 2018.

YARIPOUR, S. et al. Exposure of gametes to aged nano-sized plastic particles during fertilization can influence early larval development in the European whitefish (*Coregonus lavaretus*). **Aquatic Toxicology**, v. 250, n. August, 2022.

YUAN, J. et al. Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics. **Science of the Total Environment**, v. 715, p. 136968, 2020.

ZARFL, C. Promising techniques and open challenges for microplastic identification and quantification in environmental matrices. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2019.

ZHANG, J. et al. Effects of plastic residues and microplastics on soil ecosystems: A global meta-analysis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 435, p. 129065, 5 ago. 2022.

ZHANG, K. et al. Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review. **Environmental Pollution**, v. 274, 2021a.

ZHANG, Y. et al. A review of the environmental chemical behavior, detection and treatment of antimony. **Environmental Technology and Innovation**, v. 24, 1 nov. 2021b.

