UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências
Câmpus do Litoral Paulista

PROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS MARINHOS NA BIODEGRADAÇÃO DE MICROPLÁSTICO

ARTHUR PÉREZ AGUIAR

SÃO VICENTE – SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

PROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS MARINHOS NA BIODEGRADAÇÃO DE MICROPLÁSTICO

Arthur Pérez Aguiar

Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni

Profa. Dra. Milene Fornari

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros.

SÃO VICENTE – SP

2023

A282p

Aguiar, Arthur Pérez
Prospecção de fungos filamentosos marinhos na biodegradação de microplástico / Arthur Pérez Aguiar. -- São Vicente, 2023
57 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente
Orientadora: Cristiane Angélica Ottoni
Coorientadora: Milene Fornari

1. Biodiversidade. 2. Bioprospecção. 3. Biotecnologia. 4. Biodegradação. 5. Microbiologia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

DEDICATÓRIA

A meu avô, Augusto Silva Aguiar, uma de minhas principais referências de vida e exemplo a seguir, agradeço com imensas saudades por nestes últimos anos me permitir devolver todos os cuidados e retribuir o amor e a amizade que me proporcionou. Mas, principalmente, por reforçar a importância de valores como o respeito e humildade, os quais jamais esquecerei. O senhor estará para sempre presente comigo em meu coração e memória!

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pela dádiva da vida, pelas graças alcançadas, por ser base de minhas conquistas e sustento para ultrapassar todos os obstáculos.

A meus pais, Edinalvo e Ana Maria, que sempre, com muito esforço, me proporcionaram o melhor. Por serem exemplos de honestidade, força e a sempre lutar pelos objetivos. Por estarem sempre presentes em meus sucessos e fracassos. Pelo amor e, acima de tudo, pela confiança, incentivo e crença em mim e em todas as minhas escolhas e paixões.

A meu irmão, Raul, pela amizade, fraternidade e todo o amor e carinho durante esses anos. Por sempre me apoiar neste caminho de estudos e busca pela educação. Tenho muito orgulho da pessoa que se torna a cada dia!

Em especial, à minha orientadora, Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni, pela oportunidade de me orientar e a parceria de poder desenvolver esta pesquisa durante toda a jornada. Por toda compreensão, tempo dedicado, sugestões e construção de conhecimento. A valorização que deu a meu trabalho e me motivar a seguir a linha de pesquisa. E, pela amizade e por sempre me incentivar a crescer.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Milene Fornari, pela confiança, prontidão, partilha de conhecimentos e apoio essenciais que contribuíram para a concretização desta pesquisa.

Ao Laboratório de Micologia e Aplicações Biotecnológicas e Nanotecnológicas, ao Laboratório de Dinâmica Evolutiva e ao Instituto de Estudos Avançados do Mar pelo espaço e equipamentos cedidos indispensáveis para a elaboração desta pesquisa. A todos os colegas de laboratório com quem dividi momentos e por todo o auxílio prático, principalmente, a Marjorie Jasper, Letícia Fontes e Felipe Mello.

Ao Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro do Laboratório de Proteínas e Peptídeos Marinhos – IB/CLP/UNESP, aos Profs. Drs. Almir Oliveira Neto e Rodrigo Fernando Brambilla de Souza do Centro de Pesquisa Células a Combustível e Hidrogênio – IPEN e a Profa. Dra. Sara Isabel Cruz Silvério do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Portugal, pela colaboração na execução desta pesquisa.

A todos os docentes do programa de pós-graduação que contribuíram direta ou indiretamente para o êxito desta pesquisa. À Profa. Dra. Kátia Maria Gomes Machado, Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro e Profa. Dra. Patrícia Léo pelas sugestões feitas durante a Qualificação e Defesa de Dissertação, enriquecendo essa pesquisa com suas orientações.

Ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros do Instituto de Biociências do Câmpus do Litoral Paulista – UNESP, e todos os funcionários do câmpus.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo incentivo financeiro para a execução desta pesquisa.

A meus amigos, colegas acadêmicos e de profissão que conheci durante esses anos, por fazerem parte de minha evolução e aprendizado. Especialmente, aos que de alguma forma colaboraram, incentivaram e acompanharam o desenvolvimento desta pesquisa.

Por fim, a cada um que de alguma maneira me auxiliou e apoiou. Obrigado!

"*Plasticus maritimus* é uma 'espécie invasora', bem adaptada a todos os ambientes, que representa uma grande ameaça para as comunidades biológicas nativas e, por consequência, para o Homem."

(Ana Pêgo)

RESUMO

O constante acúmulo de microplásticos, principalmente no meio ambiente, oferece potenciais danos aos ecossistemas e à saúde pública. Com a necessidade de investigar alternativas menos agressivas ao meio ambiente e de baixo custo, a utilização de microrganismos como biorremediadores se apresenta como promissora. Dentre os microrganismos mais referenciados, os fungos filamentosos são os que possuem maior destaque quanto a capacidade de biorremediar microplásticos, visto que, são descritos como organismos que exercem papel crucial de mineralização de diversos poluentes. Entretanto, até a presente data, poucos estudos foram desenvolvidos para selecionar linhagens fúngicas capazes de biodegradar este composto antropogênico, assim como, tentar compreender o mecanismo de ação destes microrganismos. Diante do exposto, neste estudo foram avaliados os fungos filamentosos MQ1A, MQ1B, MQ1C, MQ2A, AQ2A e AQ3A, oriundos de sedimentos de Manguezal e Apicum, quanto a capacidade de biodegradar microplásticos de polietileno. Os microplásticos de polietileno submetidos a biodegradação fúngica foram obtidos comercialmente e caracterizados, em processo anterior aos ensaios de biodegradação, quanto a seu tamanho e morfologia por meio de peneiramento em vibrador mecânico e observação em estereoscópio, respectivamente. Todas as linhagens foram identificadas a nível gênero por análise macroscópica e microscópica, sendo que as linhagens fúngicas consideradas como promissoras quanto a capacidade de biodegradar microplásticos de polietileno foram encaminhadas para identificação molecular. Os ensaios ocorreram em modo batelada utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL preenchidos com 50 mL de meio de crescimento mínimo, 5 discos de 5 mm de diâmetro do isolado fúngico, previamente crescido em ágar batata dextrose, e 0,05 g de microplásticos de polietileno. Os ensaios ocorreram a 30 °C, sob agitação de 150 rpm por um período de 28 dias. A cada 7 dias foram avaliados os parâmetros relacionados ao crescimento celular e microplásticos residuais. A linhagem mais promissora foi também avaliada quanto às alterações no pH e atividade da enzima lacase. Os ensaios foram realizados em duplicata. As classes granulométricas dos microplásticos de polietileno avaliados variaram entre 500 e <63 µm, de modo que o tamanho de 250 µm foi o mais representativo. Três morfologias de microplásticos de polietileno foram detectadas: microfibra, microfragmento e microesfera, sendo esta última a de maior predominância. Após análise macroscópica e microscópica, as linhagens foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Aspergillus* (MQ1C e AQ3A), *Penicillium* (MQ1A), *Rhizopus* (AQ2A) e *Trichoderma* (MQ1B e MQ2A). O fungo AQ3A apresentou uma taxa de redução de microplásticos de polietileno de 53,8% e formação de biomassa de 0,0865 $g \cdot mL^{-1}$. A linhagem MQ1B apresentou perfil médio de 38% de redução de microplásticos de polietileno e formação de biomassa de 0,0505 $g \cdot mL^{-1}$. Dentre as linhagens avaliadas, AQ3A apresentou os resultados mais promissores quanto a capacidade em biodegradar microplásticos de polietileno, sendo identificada por ITS como *Aspergillus niger*. Estudos complementares com *A. niger* destacaram a redução do pH durante o crescimento fúngico em contato com os microplásticos de polietileno. Em 28 dias, não foi identificada a presença de atividade da lacase no extrato extracelular, sugerindo a atividade de demais enzimas oxirredutases na biodegradação dos microplásticos de polietileno pela linhagem fúngica. Esses resultados indicam que isolados fúngicos podem contribuir ativamente para a biodegradação de microplástico em condições oligotróficas. No entanto, outras técnicas e parâmetros analíticos são necessários para comprovar a biodegradação efetiva, para que essas linhagens possam ser utilizadas em estudos futuros.

Palavras-chave: Manguezal; microplástico de polietileno; *Aspergillus niger*.

ABSTRACT

The constant accumulation of microplastics, especially in the environment, offers potential damage to ecosystems and public health. With the need to investigate alternatives that are less aggressive to the environment and of low cost, the use of microorganisms as bioremediators shows promise. Among the most referenced microorganisms, filamentous fungi are the ones that have the greatest prominence regarding the ability to bioremediate microplastics, since they are described as organisms that play a crucial role in the mineralization of various pollutants. However, to date, few studies have been developed to select fungal strains capable of biodegrading this anthropogenic compound, as well as to try to understand the mechanism of action of these microorganisms. In view of the above, this study evaluated the filamentous fungi MQ1A, MQ1B, MQ1C, MQ2A, AQ2A and AQ3A from Mangrove and Apicum sediments regarding their ability to biodegrade polyethylene microplastics. The polyethylene microplastics submitted to fungal biodegradation were obtained commercially and characterized, in a process prior to the biodegradation tests, as to their size and morphology by means of sieving in a mechanical vibrator and observation in a stereoscope, respectively. All strains were identified at the genus level by macroscopic and microscopic analysis, and the fungal strains considered promising in terms of their ability to biodegrade polyethylene microplastics were referred for molecular identification. The assays were carried out in batch mode using 250 mL Erlenmeyer vials filled with 50 mL of minimum growth medium, 5 discs of 5 mm diameter of the fungal isolate, previously grown on potato dextrose agar, and 0.05 g of polyethylene microplastics. The assays took place at 30 °C, under agitation of 150 rpm for a period of 28 days. Every 7 days, parameters related to cell growth and residual microplastics were evaluated. The most promising strain was also evaluated for changes in pH and laccase enzyme activity. The trials were performed in duplicate. The granulometric grades of the polyethylene microplastics evaluated ranged from 500 to <63 µm, so that the size of 250 µm was the most representative. Three morphologies of polyethylene microplastics were detected: microfiber, microfragment and microsphere, the latter being the most predominant. After macroscopic and microscopic analysis, the strains were identified as belonging to the genera *Aspergillus* (MQ1C and AQ3A), *Penicillium* (MQ1A), *Rhizopus* (AQ2A) and *Trichoderma* (MQ1B and MQ2A). The fungus AQ3A showed a reduction rate of polyethylene microplastics of 53.8% and biomass formation of 0.0865 $g \cdot mL^{-1}$. The MQ1B strain presented an average profile of 38% reduction of polyethylene microplastics and biomass formation of 0.0505 $g \cdot mL^{-1}$. Among the strains evaluated, AQ3A presented the most promising results regarding the ability to biodegrade polyethylene microplastics, being identified by ITS as *Aspergillus niger.* Complementary studies with *A. niger* highlighted the reduction of pH during fungal growth in contact with polyethylene microplastics. In 28 days, the presence of laccase activity in the extracellular extract was not identified, suggesting the activity of other oxidoreductase enzymes in the biodegradation of polyethylene microplastics by the fungal strain. These results indicate that fungal isolates can actively contribute to the biodegradation of microplastics under oligotrophic conditions. However, other techniques and analytical parameters are necessary to prove effective biodegradation, so that these strains can be used in future studies.

Keywords: Mangrove; polyethylene microplastic; *Aspergillus niger*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. *Percursos de impacto percebidos dos microplásticos na segurança alimentar e na saúde do ecossistema (adaptado de Walkinshaw et al., 2019).....15*
Figura 2. *Estrutura molecular de PEAD e PEBD (adaptado de Ghatge et al., 2020).....16*
Figura 3. *Esquema da biodegradação de plástico por microrganismos (adaptado de Kumar et al., 2020).....21*
Figura 4. *Mapa da Estação Ecológica de Juréia-Itatins apontando região de coleta de sedimentos (adaptado de Santos et al., 2011). 28*
Figura 5. *Área de coleta de sedimentos a Beira do Rio Una Prelado, Peruíbe/SP (Google Earth, 2022).....29*
Figura 6. *Morfologia do microplásticos de polietileno observados.* ***A:*** *micropartículas gerais,* ***B:*** *microfibra,* ***C:*** *microfragmento e* ***D:*** *microesfera. 34*
Figura 7. *Macromorfologia e micromorfologia dos isolados fúngicos:* ***A:*** *MQ1A: Penicillum sp.,* ***B:*** *MQ1B: Trichoderma spp.,* ***C:*** *MQ1C: Aspergillus spp.,* ***D:*** *MQ2A: Trichoderma spp.* ***E:*** *AQ2A: Rhizopus sp. e* ***F:*** *Aspergillus spp. 36*
Figura 8. *Ensaio de biodegradação de microplásticos de polietileno pela linhagem A. niger durante 28 dias. 41*

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	-	Ácido 2,2’-azino-bis(3-etilbenzotriazolina-6-sulfônico)
CYP	-	Citocromo P450
Ff	-	Fungos filamentosos
Lcc	-	Lacase
MO	-	Microrganismo
MP	-	Microplástico
PCR	-	Reação em cadeia da polimerase
PDA	-	Ágar batata dextrose
PE	-	Polietileno
PEAD	-	Polietileno de alta densidade
PEBD	-	Polietileno de baixa densidade
PET	-	Tereftalato de polietileno
PP	-	Polipropileno
PS	-	Poliestireno
PU	-	Poliuretano
PVC	-	Cloreto de polivinila
UV	-	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 13
1.1 Plástico: propriedades, tipos e aplicações 13
1.1.1 Microplástico 14
1.2 Biodegradação microbiana de microplástico 17
1.2.1 Biodegradação de microplástico por fungos filamentosos 19
1.3 Mecanismos de biodegradação de microplástico 20
1.3.1 Biodeterioração 22
1.3.2 Biofragmentação 22
1.3.3 Assimilação 23
1.3.4 Mineralização 23
1.4 Fatores que afetam a biodegradação microbiana de microplástico 23
1.4.1 Características do polímero 24
1.4.2 Fatores ambientais 24
1.4.3 Reagentes químicos e aditivos 25
2 OBJETIVOS 26
2.1 Objetivos específicos 26
3 MATERIAL E MÉTODOS 27
3.1 Polietileno 27
3.2 Isolamento de fungos filamentosos de sedimentos de Manguezal e Apicum 27
3.3 Identificação dos isolados fúngicos 29
3.4 Seleção de linhagens fúngicas biodegradadoras de microplásticos de polietileno 31
3.5 Técnicas e parâmetros analíticos de biodegradação 32
3.5.1 Avaliação do crescimento de biomassa 32
3.5.2 Avaliação do microplástico residual 32
3.5.3 Mensuração de pH 32

3.5.4 Ensaio de atividade enzimática da lacase 33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 34
4.1 Tamanho e morfologia dos microplásticos de polietileno 34
4.2 Identificação macroscópica e microscópica dos isolados fúngicos 35
4.3 Seleção de linhagens fúngicas biodegradadoras de microplásticos de polietileno 37
4.4 Identificação molecular de linhagens fúngicas biodegradadoras de microplásticos de polietileno 40
4.5 Ensaio de biodegradação 40
4.5.1 Avaliação do crescimento de biomassa e microplástico residual 40
4.5.2 Mensuração de pH 42
4.5.3 Ensaio de atividade enzimática da lacase 43
5 CONCLUSÃO 44
REFERÊNCIAS 46

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Plástico: propriedades, tipos e aplicações

Durante a segunda metade do século XX, os materiais plásticos superaram os limites impostos por diversos materiais e tiveram grande expansão na vida cotidiana e em outros empreendimentos humanos (ANDRADY; NEAL, 2009; LINTSEN; HOLLESTELLE; HÖLSGENS, 2017). Estes materiais possuem um processo de fabricação de baixo custo, além de elevada resistência, durabilidade e versatilidade (CHAE; AN, 2018; MOHARIR; KUMAR, 2019; RAJMOHAN *et al*., 2019; MEYER *et al*., 2020).

O plástico é um material orgânico sintético composto por longas cadeias poliméricas oriundas de diferentes fontes de matéria-prima, como carvão, gás natural e petróleo (AMOBONYE *et al*., 2021). Sua síntese ocorre por duas vias de reação: polimerização de adição de ligações duplas de carbono na olefina inicial para formação de novas ligações simples de carbono ou reação de condensação entre um ácido carboxílico e um grupo álcool/amina (ALMA'ADEED; KRUPA, 2016; AKINDOYO *et al*., 2016).

Os polímeros plásticos são diferenciados conforme seus arranjos estruturais, propriedades físicas e aplicações, e, habitualmente, classificados em dois grupos principais, termoplásticos e termofixos (SÁNCHEZ, 2020; AMOBONYE *et al*., 2021). Os termoplásticos caracterizam-se por não alterarem sua composição química com reaquecimento, ou seja, podem ser remodelados após fusão, são recalcitrantes e resistentes à clivagem hidrolítica. Estão incluídos entre os termoplásticos: poliamida, polietileno (PE), poliestireno (PS), polipropileno (PP) e cloreto de polivinila (PVC) (MAKHLOUF *et al*., 2016; LI *et al*., 2019). Os termofixos, por sua vez, não são remodelados por fusão, uma vez que as alterações químicas geradas por calor são irreversíveis devido a ligações químicas cruzadas entre as cadeias poliméricas. São eles: poliéster, tereftalato de polietileno (PET), poliuretano (PU) e resinas acrílicas (RAY; COONEY, 2018).

O mercado global de plástico cresce exponencialmente. A saber, no ano de 2018, a produção de plásticos foi avaliada em 360 milhões de toneladas, enquanto seu valor comercial foi estimado em US $568,9 bilhões, em 2019 (GRAND REVIEW RESEARCH, 2020; PLASTIC EUROPE, 2020). Dentre os plásticos mais utilizados encontram-se PE, PS, PP, PVC, PET e PU, com PE e PP correspondendo a mais de 50% da produção mundial (MEYER *et al*., 2020; AMOBONYE, 2021). Entretanto, o descarte destes materiais tornou-se uma preocupação global, uma vez que 90% dos produtos são utilizados apenas uma vez e a sua

elevada recalcitrância no ambiente em condições naturais propicia a formação de pequenos resíduos, micropartículas e nanopartículas (SÁNCHEZ, 2020).

1.1.1 Microplástico

Os microplásticos (MPs) são partículas caracterizadas por apresentarem diâmetro entre 1 e 5.000 µm (FRIAS; NASH, 2019; HARTMANN *et al*., 2019). Entretanto, segundo Norma ISO/TR 21.960:2020, MPs são partículas plásticas sólidas insolúveis em água com dimensões entre 1 e 1.000 µm. Eles são classificados conforme sua origem em duas fontes: primários e secundários. O primeiro refere-se a MPs fabricados para aplicações domésticas e industriais cosmetológicas e farmacológicas (*pellets*, esférulas, grânulos e discos). Os secundários são aqueles gerados a partir da fragmentação de partículas maiores de plásticos por envelhecimento físico-químico, abrasão mecânica, fotodegradação e biodegradação (LAMBERT; SINCLAIR; BOXALL, 2014; IMO, 2015; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2015; ANDRADY, 2017).

A presença de MPs no ambiente, incluindo em locais remotos, cresce rapidamente. A onipresença desses materiais no mundo expande a medida em que diariamente são desenvolvidos novos produtos que utilizam plástico como matéria-prima e que posteriormente são reduzidos em tamanhos menores (CARUSO, 2015; DUIS; EERKES-MEDRANO; THOMPSON; ALDRIGE, 2015; COORS, 2016). Os MPs são comumente introduzidos no meio ambiente por liberação na atmosfera e sistemas de água por indústrias de plástico, emissão de sistemas de drenagem domésticos e industriais, estações de tratamento de águas residuais e fragmentação de resíduos em menor tamanho (AUTA; EMENIKE; FAUZIAH, 2017; AVIO; GORBI; REGOLI, 2017; BOUCHER; FRIOT, 2017; SUN *et al*., 2020; AMOBONYE *et al*., 2021).

O constante acúmulo de MPs no meio ambiente faz deles contaminantes emergentes, ou seja, objetos que ainda não são alvo de monitoramento ambiental por muitos países, mas que oferecem preocupação por seu potencial danoso a ecossistemas e a saúde pública (Figura 1). Os MPs contêm aditivos que podem adsorver contaminantes tóxicos na água, como metais pesados e poluentes orgânicos persistentes, e suas propriedades físico-químicas podem ocasionar em disfunções orgânicas em micro e nano escala (BARCELÓ; PICÓ, 2019; LIU *et al*., 2019; PEIPONEN *et al*., 2019; WANG *et al*., 2019). Estudos indicam que a ingestão de MPs por organismos ocasiona falsa saciedade, estresse patológico, perturbação do sistema

endócrino, redução da taxa de crescimento e alterações reprodutivas (GUO; WANG, 2019; PAÇO *et al*., 2019; JUNG *et al*., 2020).

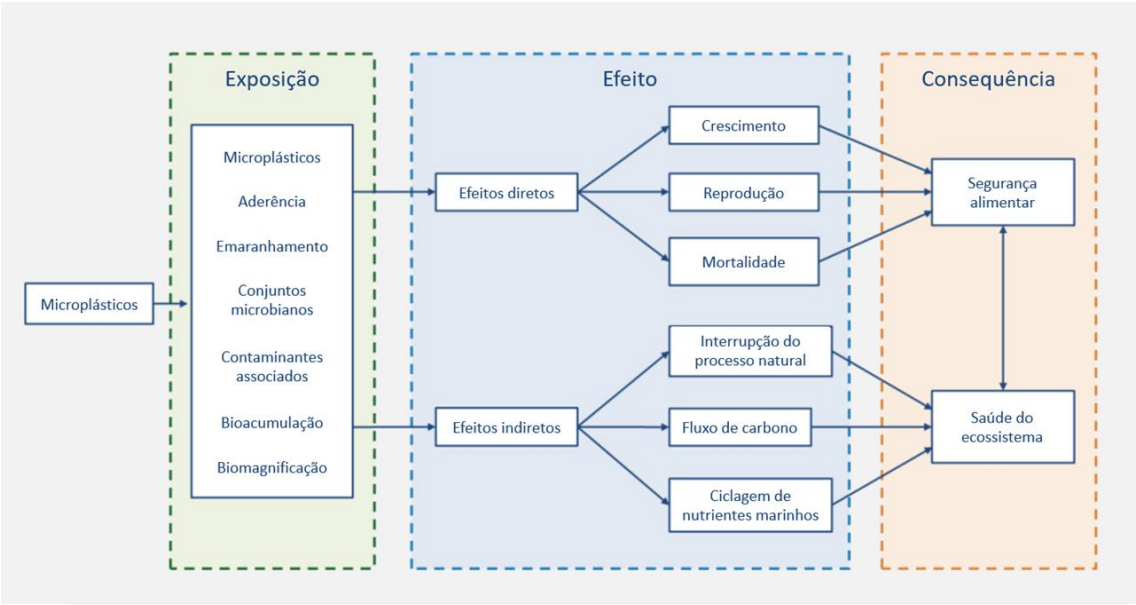

Figura 1. Percursos de impacto percebidos dos microplásticos na segurança alimentar e na saúde do ecossistema (adaptado de Walkinshaw *et al*., 2019).

Os ambientes marinhos são os mais afetados pela deposição de MPs devido a introdução direta em corpos d'água ou transferência de aterros sanitários por lixiviação. Atraídos pelo odor, coloração e adesão de algas à superfície, os MPs são facilmente ingeridos por diversos organismos marinhos (KUMAR *et al*., 2020). É referenciado que MPs foram extraídos de algas e trato digestivo de invertebrados (poliquetas, bivalves, gastrópodes e crustáceos), peixes comerciais, tartarugas-marinhas, aves e mamíferos marinhos (MEAZA; TOYODA; WISE, 2020; COLLARD; ASK, 2021; JI *et al*., 2021; KUKKOLA *et al*., 2021). A ingestão dessas partículas pode promover o fenômeno de bioacumulação em tecidos e órgãos (VON MOSS; BURKHARDT-HOLM; KÖHLER, 2012; SHARMA; CHATTERJEE, 2017). Como consequência, tornam-se biodisponíveis a demais organismos e ocasionam biomagnificação em diversas cadeias alimentares (COSTA *et al*., 2016; KUMAR *et al*., 2020). Eventualmente, podem ainda por meio da transferência trófica encontrar caminho para o corpo humano, apresentando desafios potenciais à saúde, como observado por Bai *et al*. (2022) e Yan *et al*. (2020) que identificaram a presença em diversos alimentos e fezes humanas.

1.1.1.1 Polietileno

O PE corresponde a composição plástica mais abundante em sistemas de água e marinhos, principalmente, na forma de fibra e esfera (JI *et al*., 2021; KUKKOLA *et al*., 2021; BAI *et al*., 2022; ORORA-NÁVAR *et al*., 2022). No ano de 2019, a produção de PE correspondeu a cerca de 29,8% da produção mundial de plástico (PLASTIC EUROPE, 2020; TRESTRAIL *et al*., 2021). Deste modo, o PE é detectado frequentemente em águas costeiras (ORONA-NÁVAR *et al*., 2022).

Este polímero plástico é altamente recalcitrante e inerte a degradação ambiental. A recalcitrância do PE se deve a hidrofobicidade, cristalinidade e alto peso molecular de sua estrutura físico-química (RESTREPO-FLÓREZ *et al*., 2014, SEM; RAUT, 2015). No entanto, a condição recalcitrante é variável conforme essas propriedades mecânicas. O PE é formado por longas cadeias de hidrocarbonetos lineares saturados com diferentes ramificações, sendo classificado, principalmente, em: polietileno de baixa densidade (PEBD) e polietileno de alta densidade (PEAD) (GHATGE *et al*., 2020) (Figura 2). O PEBD possui um elevado grau de ramificações, responsável pela baixa densidade, formada por meio de polimerização de radicais livres em alta pressão. Esse tipo de PE é inerte à temperatura ambiental, porém é sujeito a agentes oxidantes e solventes (GHATGE *et al*., 2020). Já o PEAD é formado por processo catalítico e pouca ramificação lateral. Sua cristalinidade é responsável por oferecer forte resistência à tração e flexibilidade, bem como a durabilidade em altas temperaturas. Portanto, assim como os demais polímeros, o PE é moldado como material inerte com resistência a microrganismos (MOs) (ZHANG *et al*., 2020).

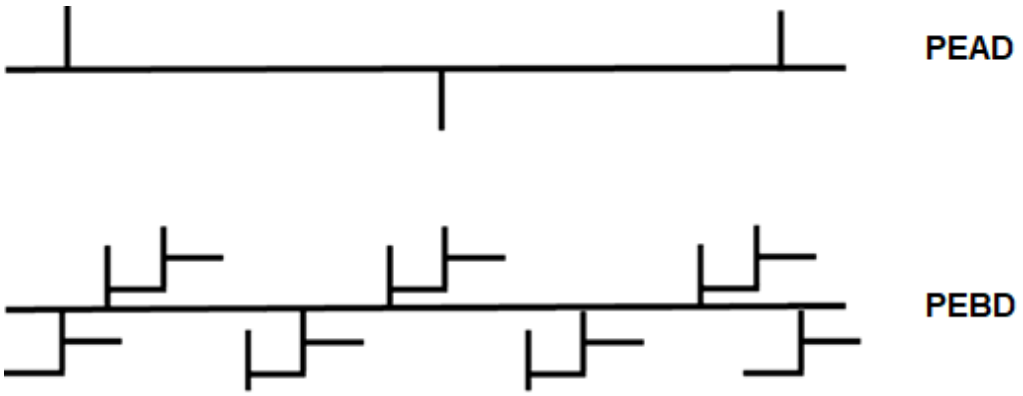

Figura 2. Estrutura molecular de PEAD e PEBD (adaptado de Ghatge *et al*., 2020).

Estudos recentes avaliaram os possíveis efeitos orgânicos de MPs de PE em invertebrados e peixes. Ziajahromi *et al*. (2018) observaram o impacto negativo na

sobrevivência, crescimento e emergência de dípteros após exposição a diferentes tamanhos de MPs de PE. Détréee e Gallardo-Escárte (2018) e Solomando *et al*. (2021) identificaram em mexilhões expostos a MPs de PE danos na homeostase e em processos relacionados ao estresse e sistema imunológico, assim como a indução de enzimas antioxidantes, danos oxidativos hepáticos e plasmáticos, elevações de níveis plasmáticos de lisozima e atividade de mieloperoxidase no plasma. O estresse oxidativo induzido em células cerebrais humanas expostas a PE por 24 h também foi relatado por Schirinzi *et al*. (2017).

Ainda que haja pesquisas avaliando efeitos adversos à biota, poucas são as que avaliam a biodegradação efetiva de PE e que buscam monitorar, principalmente, o crescimento de MOs, peso de MPs residuais, demanda bioquímica de oxigênio, produção de gás carbônico e alteração molecular em conjunto. Porém, mesmo com a carência de mais estudos, Souza *et al*. (2021) demonstraram a capacidade de um consórcio de espécies de *Aspergillus* em biodegradar o PE como única fonte de carbono e sem adição de compostos para facilitar o processo.

1.2 Biodegradação microbiana de microplástico

Dados preliminares sobre degradação de MPs em ambientes aquáticos são limitados, porém, é sabido que sua remoção do ambiente é dificultosa devido ao seu tamanho, ampla distribuição e complexidade de composição (KUMAR *et al*., 2020). Além disso, outro obstáculo que propicia a bioacumulação dos MPs nos ecossistemas é justificado por apresentarem elevado peso molecular e cristalinidade, bem como, ausência de grupos funcionais que favorecem reações oxidativas (SANGEETHA *et al*., 2015).

São comuns estudos que investigam a distribuição de MPs e seus efeitos adversos nos ecossistemas marinhos, entretanto, são raros os que avaliam estratégias adequadas para eliminá-los do ambiente (KUMAR *et al*., 2020). As soluções propostas consistem em contenção, mitigações e remediação. O método de contenção tem como destaque a reciclagem e gestão adequada em aterros. As mitigações propõem a redução dos MPs por meio de regulamentos e medidas legislativas que incentivam, por exemplo, o uso de bioplásticos (ARPIA *et al*., 2021). Todavia, cada um desses métodos apresenta limitações. A reciclagem foi considerada ineficaz em termos de custos, uma vez que os materiais plásticos utilizados possuem menor funcionalidade e são mais caros na produção do que plásticos virgens (GRADUS *et al*., 2017; SILVA; GOUVEIA, 2020). Os bioplásticos, por sua vez, possuem

uma porcentagem de sua composição química não degradável e o custo de produção pode ser até três vezes maior que o plástico convencional.

A remediação, entretanto, tem o objetivo de lidar com os MPs já presentes no meio ambiente, visando diminuir a concentração por meio de degradação. Esse processo, quando no meio natural, pode ser realizado de maneira biótica ou abiótica. A degradação abiótica ocorre por meio de alterações nas propriedades físico-químicas dos compostos, influenciada pelas condições de temperatura, pH, umidade, salinidade e/ou exposição a luz (GUO; WANG, 2019; LIN *et al*., 2022). Enquanto a degradação biótica, ou biodegradação, se refere à utilização de organismos com capacidade de degradar compostos variados em estruturas mais simples por meio de reações bioquímicas (ALIMI *et al*., 2018; HO *et al*., 2018; BAHL *et al*., 2021).

Com a necessidade de investigar alternativas para manutenção do meio ambiente e explorar métodos para reduzir a poluição, os MOs demonstram serem capazes de atuar sobre a persistência ambiental e resistência à degradação dos MPs (DANSO; CHOW; STREIT, 2019; RAI *et al*., 2021). Dessa forma, a biodegradação microbiana é considerada uma abordagem ambientalmente segura para a eliminação ou redução dos MPs do meio ambiente. Esse processo é considerado uma tecnologia ecológica de baixo custo e promissora, que envolve processos naturais sem causar impactos adversos (SEN; RAUT, 2015; YUAN *et al*., 2020).

Os MOs desempenham um importante papel na manutenção de diversos processos ambientais uma vez que são oportunistas e capazes de se adaptarem a quase todos os ambientes (BROOKS *et al*., 2011; AUJOULAT *et al*., 2012; YUAN *et al*., 2020; AMOBONYE *et al*., 2021). Por enfrentarem uma diversidade de desafios ambientais, as comunidades microbianas sofrem modificações genômicas podendo sintetizar enzimas que possuem a capacidade de agir sobre substratos menos específicos e novas vias metabólicas. Ademais, tornaram-se capazes de bioacumular, biotransformar e biodegradar substâncias antropogênicas, incluindo MPs, consumindo e reciclando em compostos que podem ser neutralizados pela natureza e incorporados aos ciclos biogeoquímicos (MICHAUD *et al*., 2007; AMOBONYE *et al*., 2021).

Embora haja carência de estudos e elucidações de biodegradação, diferentes MOs (algas, bactérias e fungos) em variados ecossistemas têm sido investigados e demonstram elevado potencial para o processo de biodegradação convertendo MPs em moléculas simples (AMOBONYE *et al*., 2021). Os MOs interagem com os polímeros plásticos colonizando-os, aderindo à sua superfície e instigando a biodegradação ao excretarem enzimas extracelulares.

Utilizam, ainda, sistemas enzimáticos para assimilar metabólitos intermediários para posterior necessidade energética (EICH *et al*., 2015; SEKHAR *et al*., 2016; AMOBONYE *et al*., 2021). Nesse sentido, os fungos filamentosos (Ff) proporcionam uma maior aplicabilidade prática e promissora para biorremediar MPs de ambientes poluídos uma vez que podem penetrar por meio de hifas a superfície dos MPS e liberar enzimas degradadoras e polímeros extracelulares que atuam sobre diferentes substratos (ABRAHAM *et al*., 2017; SÁNCHEZ, 2020).

1.2.1 Biodegradação de microplástico por fungos filamentosos

Os fungos compreendem um táxon vasto e diverso de organismos eucarióticos heterotróficos. Morfologicamente são classificados entre leveduras, Ff e fungos dimórficos. Esses organismos são encontrados em diferentes ecossistemas, incluindo ambientes extremófilos. Juntamente com as bactérias, compõem um grupo de MOs capaz de realizar a manutenção de ciclos biogeoquímicos e nutrientes essenciais nos ecossistemas, utilizando de diferentes substratos como principal fonte de carbono ou energia (CREŠNAR; PETRIČ, 2011; RAGHKUMAR, 2017; SÁNCHEZ, 2020; AMOBONYE *et al*., 2021).

Os Ff são frequentemente descritos quanto à reconhecida capacidade de dispersarem em substratos à procura de nutrientes por meio de sua rede micelial, explorando e conquistando ambientes de difícil acesso para outros organismos (SÁNCHEZ, 2020). Devido a esta característica, os Ff desenvolveram tolerância a diferentes tipos de poluentes ambientais, sendo capazes de decompô-los ou mineralizá-los, disponibilizando os componentes químicos ao meio em que estão inseridos (CREŠNAR; PETRIČ, 2011). Em decorrência, os Ff constituem um grupo promissor na biodegradação de MPs, de modo que aqueles oriundos de ambientes extremófilos possuem destaque, uma vez que vivem em condições de alta pressão, temperaturas extremas, alta salinidade, nutrientes oligotróficos, ácidos, entre outros (BARONE *et al*., 2019).

A extensa distribuição e potencial de penetração de hifas fúngicas foram observadas como agente fundamental em colonização inicial anterior ao processo de despolimerização de substratos (SÁNCHEZ, 2020; AMOBONYE *et al*., 2021). A liberação de enzimas extracelulares, especialmente, despolimerases e hidrofobinas, viabilizam a clivagem de macromoléculas e moléculas orgânicas em compostos menores, liberando água e dióxido de carbono, quando ocorre mineralização (PATHAK; NAVNEET, 2017).

A maquinaria fúngica, dotada de enzimas inespecíficas que atuam em diferentes substratos, é capaz de catalisar variados mecanismos de reação convenientes para a

degradação de poluentes por meio da combinação dos sistemas enzimáticos intracelulares e extracelulares. Esses sistemas enzimáticos são mediados pelo grupo do citocromo P450 (CYP), epoxidases (enzimas da Fase I) e transferases (enzimas da Fase II). O CYP é uma família com diversas enzimas e monooxigenases que catalisam reações com moléculas alifáticas, alicíclicas e aromáticas, produzindo epoxidação, desaminação, desalogenação, desalquilação, dessulfuração, hidroxilação, sulfoxidação e redução de N-óxido dos substratos (SHIN *et al*., 2018). Já as enzimas da Fase I e II envolvem reações de oxidação e conjugação, respectivamente (SCHWARTZ *et al*., 2018). Portanto, as estratégias fúngicas utilizadas para neutralizar compostos complexos, como poluentes e substâncias tóxicas, permitem sua adsorção e produção de biossurfactantes (OLICÓN-HERNÁNDEZ *et al*., 2017).

Estudos recentes indicam que diversas espécies de Ff isoladas de diferentes ambientes, possuem a capacidade de biodegradar MPs (YUAN *et al*., 2020). Contudo, o isolamento de novas linhagens, assim como, a otimização de parâmetros operacionais para o efetivo processo de biodegradação de MPs ainda são escassos e necessitam refinamento (PAÇO *et al*., 2017; YUAN *et al*., 2020). Dentre os estudos publicados, o gênero *Aspergillus* é o mais descrito quanto a capacidade de biodegradar MPs, principalmente, as espécies *A. flavus* e *A. niger* (ABRAHAM *et al*., 2017; DAS; KUMAR; DAS, 2018; MUHONJA *et al*., 2018; KUNLERE; FAGADE; NWADIKE, 2019; SAÉNZ *et al*., 2019; SANGALE; SHAHNAWAZ; ADE, 2019; ZHANG *et al*., 2020; EL-SAYED; RABIE; HAMED, 2021; JAYASHREE; VANMATHI, 2021; ROJAS *et al*., 2021; SOUZA *et al*., 2021; TAGHAVI *et al*., 2021). Outros gêneros de Ff estudados quando biodegradabilidade de MPs de PE incluem *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Rhizopus* (AWASTHI *et al*., 2017; OJHA *et al*., 2017; DAS; KUMAR; DAS, 2018; MUNIR *et al*., 2018; HIKMAH; SETYANINGSIH; PANGASTUTI, 2018; SANGALE; SHAHNAWAZ; ADE, 2019; JAYASHREE; VANMATHI, 2021; TAGHAVI *et al*., 2021).

1.3 Mecanismos de biodegradação de microplástico

Os MPs, quando inseridos no meio ambiente, estão suscetíveis a variados mecanismos de degradação biótica e abiótica. Na degradação biótica, os MOs são capazes de decompor diferentes compostos em estruturas mais simples por meio de reações bioquímicas (HO *et al*., 2018). Essas reações microbianas compõem um mecanismo numeroso de sistemas enzimáticos para biodegradação, os quais ainda não foram totalmente elucidados (ALIMI *et al*., 2018; VELEZ *et al*., 2018).

Por serem polímeros complexos, os MPs não podem ser adsorvidos pelas células. Em consequência, necessitam ser despolimerizados em oligômeros, dímeros ou monômeros (YUAN *et al*., 2020). Esse processo, geralmente, ocorre por catalisação de clivagem hidrolítica ocasionando alterações nas propriedades físico-químicas, especificamente, na redução do peso molecular, perda de resistência mecânica e alterações nas propriedades superficiais (HO *et al*., 2018; YUAN *et al*., 2020).

O processo de degradação biótica dos MPs permite sua conversão em dióxido de carbono, metano, água, compostos inorgânicos ou biomassa, ou seja, substâncias não tóxicas de baixa massa molecular que são inseridas nos ciclos biogeoquímicos (ASTM, 2010). Deste modo, as diferentes vias de atividade enzimática e clivagem de ligação envolvidas na biodegradação dos MPs são classificadas em biodeterioração, biofragmentação, assimilação e mineralização (Figura 3) (PATHAK, 2017).

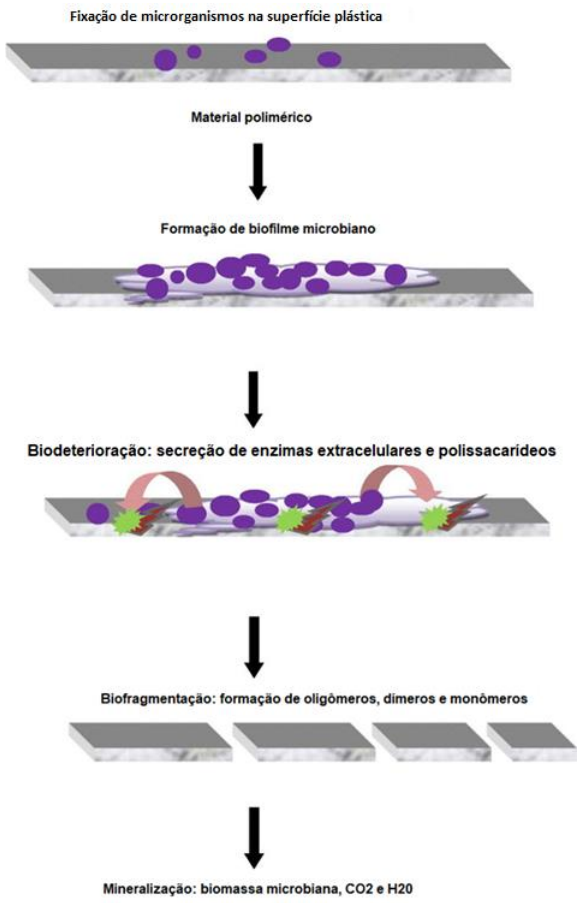

Figura 3. Esquema da biodegradação de plástico por microrganismos (adaptado de Kumar *et al*., 2020).

1.3.1 Biodeterioração

O processo de biodeterioração é o primeiro mecanismo de degradação atuante sobre os MPs, possuindo o objetivo de reduzir a resistência e durabilidade desse material. Por ser ocasionado por ações físico-químicas dos MOs, resulta na degradação superficial e decorrente alteração das propriedades destes polímeros (NAUENDORF *et al*., 2016; KUMAR *et al*., 2020).

A biodeterioração se inicia pela fixação da comunidade microbiana na superfície dos MPs e rápido desenvolvimento do plastífero, biofilme formado sobre a face de plásticos (KIRSTEIN *et al*., 2019). Ao aderirem aos MPs, os MOs secretam enzimas e polissacarídeos, principalmente, exopolissacarídeos, que auxiliam na forte adesão do plastífero à superfície plástica. Os exopolissacarídeos atuam também como tensoativos favorecendo a diminuição da hidrofobicidade e consequente taxa de penetração de espécies de MOs nesse material (KUMAR *et a1*., 2020).

As células fúngicas, especificamente, demonstram desenvolver inchaço localizado na camada de biofilme sobre os MPs, reduzindo as propriedades mecânicas do material significativamente. Além disso, apresentam maior potencial de fixação e crescimento quando presentes outros aditivos nos polímeros (RU; HUO; YANG, 2020).

1.3.2 Biofragmentação

A biofragmentação é o estágio subsequente ao de biodeterioração. Consiste em um mecanismo que envolve a conversão de polímeros em moléculas mais simples por meio de clivagem catalítica, ou seja, despolimerização. Esta via envolve duas principais etapas, oxidação das moléculas de menor peso e redução do peso molecular do polímero, que propiciam a atuação dos sistemas enzimáticos para posterior assimilação (KUMAR *et al*., 2020; AMOBONYE *et al*., 2021).

O processo de biofragmentação utiliza de exoenzimas e endoenzimas para despolimerizar os MPs. Essas enzimas catalisam a clivagem hidrolítica dos MPs agindo sobre as ligações glicosídicas, éster e peptídicas. As exoenzimas produzem oligômeros, dímeros e monômeros, como etilenoglicóis e ácido tereftálico. Os produtos das endoenzimas, por sua vez, necessitam ainda de processos de degradação para que sejam adsorvidos (PATHAK, 2017).

Diferentes compostos orgânicos e inorgânicos liberados por MOs foram identificados como facilitadores no mecanismo de biofragmentação. Estes compostos revelam serem

capazes de eliminar cátions da formação da superfície de MPs induzindo de melhor maneira a fragmentação. Além disso, enzimas como amidases, oxidases, lacases e peroxidases demonstram considerável envolvimento na biofragmentação dos MPs (GÓMEZ-MÉNDEZ *et al*., 2018; KRAUSE *et al*., 2020).

1.3.3 Assimilação

Após a biofragmentação, os compostos de baixo peso molecular produzidos são transportados para o citoplasma celular dos MOs e dão início a assimilação. Esse processo é caracterizado pela capacidade dos MOs em integrar moléculas captadas do meio externo ao próprio organismo. O mecanismo de assimilação permite, então, a metabolização de moléculas complexas em outras de estrutura mais simples. Todavia, ainda que as moléculas de MPs não tenham sido bem elucidadas pela assimilação por MOs, pressupõem-se que assim como os hidrocarbonetos esse processo envolva transporte ativo e passivo (AMOBONYE *et al*., 2021).

1.3.4 Mineralização

A mineralização é a etapa final do processo de biodegradação. Seu mecanismo compreende uma série de cadeias de reações enzimáticas, em meio aeróbico ou anaeróbico, que promovem a completa degradação das moléculas assimiladas de MPs em metabólitos oxidados. Esses metabólitos incluem metano, nitrogênio e, principalmente, água e dióxido de carbono, que podem ser reinseridos no meio ambiente sem ocasionar danos adversos (ALSHEHREI, 2017; HO *et al*., 2018; KUMAR *et al*., 2020). Durante esse processo podem ser formados ainda metabólitos intermediários que são direcionados a diferentes vias enzimáticas para atividade celular dos MOs (AMOBONYE *et al*., 2021). Nesse mecanismo, as enzimas esterases, liases, cutinases, peroxidades e lacases exibem relevante ação metabólica (ALSHEHREI, 2017).

1.4 Fatores que afetam a biodegradação microbiana de microplástico

A biodegradação microbiana dos MPs é afetada por variados aspectos agrupados entre características do polímero, condições ambientais e fatores químicos. Esses aspectos atuam facilitando a ação dos MOs proporcionando o crescimento microbiano conforme as propriedades dos MPs e condições ambientais externas. Entretanto, a taxa de biodegradação dos MPs é relativamente lenta e exige maior compreensão entre a interação e mecanismos

bioquímicos envolvidos com os MOs para possível aplicação em larga escala (YUAN *et al*., 2020; AMOBONYE *et al*., 2021).

1.4.1 Características do polímero

A taxa de biodegradação dos MPs é altamente dependente das propriedades físico-químicas de suas estruturas. Sabe-se que o alto peso molecular, cristalinidade, hidrofobicidade, orientação e mobilidade molecular, grupos funcionais e aditivos adicionados ao polímero plástico afetam diretamente na mineralização desse material (MIN *et al*., 2015; AMOBONYE *et al*., 2021).

A hidrofobicidade, por exemplo, é uma característica que se relaciona a extensão da colonização microbiana e a promoção de atividades enzimáticas extracelulares. Os MPs com superfícies hidrofílicas apresentam menores ângulos de contato com a água permitindo melhor adesão dos MOs a sua superfície (CHAMAS *et al*., 2020). Sangeetha *et al*. (2016) demonstram que a proporção de ramificações e grau de cristalinidade na morfologia dos MPs interferem diretamente na capacidade de assimilação dos MOs para biodegradação. Afirmam ainda que a porção não cristalina dessas moléculas são mais suscetíveis a ação de sistemas enzimáticos.

Lucas *et al.* (2008) e Tokiwa *et al.* (2009) inferem que a temperatura de fusão das moléculas de MPs também afeta fortemente a biodegradação. As alterações estruturais nas moléculas ocasionadas pela temperatura podem potencializar a ação microbiana, existindo assim, uma relação proporcional entre a temperatura e a taxa de biodegradação de MPs.

1.4.2 Fatores ambientais

A complexidade e elementos do meio ambiente que circundam os MPs desempenham papel fundamental na cinética e ação individual dos MOs no processo de biodegradação. As particularidades de cada ambiente diferem significativamente sobre a atividade microbiana. O impacto ambiental externo atua por duas características: crescimento e metabolismo dos MOs, incluindo biomassa, e oxidação dos MPs, ocasionando possíveis danos e envelhecimento no polímero (AMOBONYE *et al*., 2021). Os fatores externos abióticos que interferem na biodegradação consistem na exposição a raios ultravioleta (UV), temperatura, umidade, pH, salinidade e presença de produtos químicos. Esses fatores afetam, especialmente, a homogeneidade estrutural, hidrólise e formação de novos grupos funcionais sobre as moléculas de MPs (SIRACUSA, 2019; AMOBONYE *et al*., 2021).

Em ambientes marinhos, a biodegradação é estimulada por mecanismos sinérgicos de variadas reações metabólicas complexas para proporcionar a função saudável do ecossistema (KUMAR *et al*., 2020). Embora a ação por exposição a raios UV e a temperatura serem mais lentas e menos expressivas nesses ambientes, propiciam considerável perda de peso molecular e alterações químicas estruturais, como a cisão molecular (HO *et al*., 1999; KUMAR *et al*., 2020). Outros fatores que também contribuem para a biodegradação nesses ambientes são a presença constante de umidade e a ação mecânica das ondas que aumentam a miniaturização dos polímeros por meio de solubilidade e maiores reações de hidrólise (CHAMAS *et al*., 2020).

1.4.3 Reagentes químicos e aditivos

A presença de reagentes químicos no meio ambiente e aditivos nas estruturas de MPs (estabilizadores, plastificantes, retardantes de chamas e pigmentos) afetam diretamente na biodegradabilidade desses materiais. Ligados à matriz polimérica, esses compostos atuam ativando, inibindo ou catalisando o processo biodegradativo sobre os grupos funcionais presentes nas moléculas de MPs, assim como na sua hidrofobicidade (FOTOPOULOU; KARAPANAGIOTI, 2017).

Por atuarem como pró-degradadores ou inibidores de degradação, variados aditivos químicos vêm sendo estudados para comprovar seu potencial de ação sobre os MPs. Estudos utilizando dilaurato de dibutilestanho adicionados a PU demonstraram que essa substância age inibindo a biodegradação, uma vez que é altamente tóxica e atua com efeitos antimicrobianos (CREGUT *et al*., 2013). O amido e o ácido palmático, por sua vez, ocasionalmente potencializam a biodegradabilidade servindo como fonte de nutriente inicial para a ação dos MOs (MEHMOOD *et al*., 2016; JAYAPRAKASH; PALEMPALLI, 2018).

Agentes oxidantes e surfactantes também atuam promovendo a biodegradação microbiana. Os agentes oxidantes agem oxidando as superfícies dos MPs pela adição de radicais livres de hidroxila, como ácido nítrico e peróxido de hidrogênio (MOHARIR; KUMAR, 2019). Já os surfactantes, polisorbato 80 e dodecilsulfato, por exemplo, ocasionam o aumento da hidrofilicidade superficial (GHATGE *et al*., 2020).

2 OBJETIVOS

Diante da problemática ocasionada pela presença de microplásticos nos diferentes ecossistemas, esta pesquisa tem o objetivo principal de selecionar linhagens fúngicas capazes de biodegradar microplásticos de polietileno.

2.1 Objetivos específicos

A fim de cumprir o objetivo principal, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- Caracterizar o tamanho e morfologia do material polimérico submetido a biodegradação fúngica;
- Isolar e identificar, por aspectos macroscópicos e microscópicos, fungos filamentos oriundos de sedimento de Manguezal e Apicum;
- Efetuar ensaios em batelada utilizando culturas puras dos fungos filamentosos isolados;
- Identificar por biologia molecular as linhagens fúngicas promissoras;
- Investigar por meio de ensaios enzimáticos a possível atividade da lacase.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Polietileno

Foram utilizadas micropartículas transparentes produzidas a partir de PE com formato e tamanhos variados, disponíveis comercialmente e obtidas no comércio local de São Vicente/SP. O polímero apresenta granulometria máxima de 600 µm, índice de fluidez (190 °C / 2,16 kg) de 27-33 $g \cdot 10min^{-1}$, densidade aparente máxima de 370 $g \cdot L^{-1}$ e ponto de fusão de 100-112 °C.

Massas iniciais de cerca de 25 g de MPs de PE foram submetidas a peneiramento em vibrador mecânico para verificação de faixas de tamanho existentes. O peneiramento consistiu em empilhar peneiras com malhas decrescentes, do topo para a base, em intervalos de 500, 355, 250, 180, 125 e 63 µm. Na sequência, foi colocado o conjunto de peneiras em vibrador mecânico calibrado para 70% da capacidade máxima e deixado vibrar por cerca de 15 min (o vibrador funciona a 3.600 rpm).

O material retido em cada peneira foi pesado e observado em estereoscópio para avaliação de categoria morfológica presente, com base na descrição de Hidalgo-Ruz *et al*. (2012), ou seja, microfibras (filamentoso ou cilíndrico), microfragmentos (quebradiço ou angular), microesfera (*pellets*, arredondado, ovoide ou esférico) e microfilme (foliar). Foram, então, selecionados MPs de PE em formato de microesferas para o desenvolvimento dos ensaios de biodegradação. Em seguida, maiores quantidades de massa foram peneiradas e submetidas a processo de seleção manual sob estereoscópio, para maior homogeneidade das amostras. Por fim, as amostras finais de MPs de PE foram lavadas com álcool 70%, secas a temperatura ambiente e irradiadas sob luz UV durante 30 min como tratamento de esterilização.

3.2 Isolamento de fungos filamentosos de sedimentos de Manguezal e Apicum

Amostras simples de sedimento foram coletadas na área de Manguezal e Apicum à beira do Rio Una Prelado na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, em Peruíbe/SP (Figura 4). Seis amostras, contendo aproximadamente 50 g, foram obtidas em diferentes estações de amostragem a profundidades do sedimento de 1 a 5 cm em um quadrante de 5 cm^2. Estas amostras, denominadas entre Q1 e Q3 de acordo com a área de coleta, foram utilizadas como fonte de comunidades fúngicas (Figura 5). Cada amostra foi acondicionada em frascos coletores previamente esterilizados e acomodados em caixas térmicas, com o intuito de

manter a temperatura ambiente, até que fossem refrigeradas para posterior isolamento fúngico.

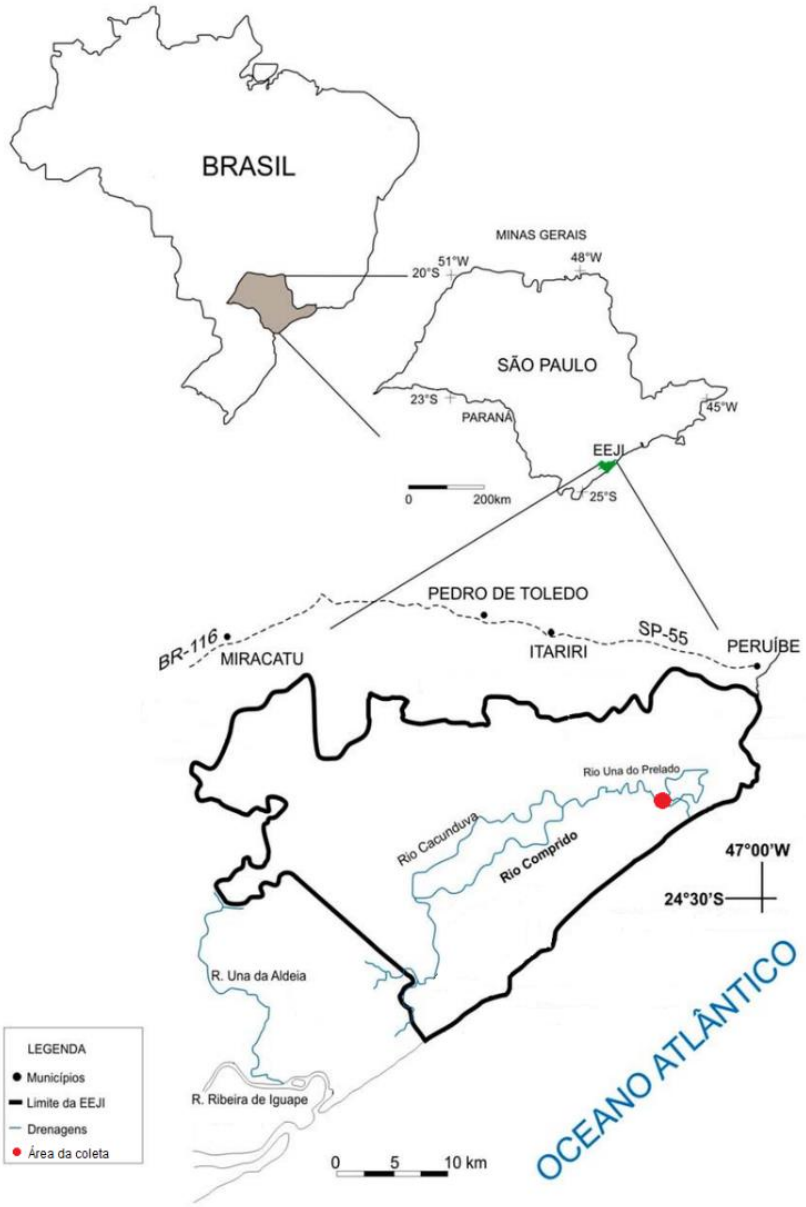

Figura 4. Mapa da Estação Ecológica de Juréia-Itatins apontando região de coleta de sedimentos (adaptado de Santos *et al*., 2011).

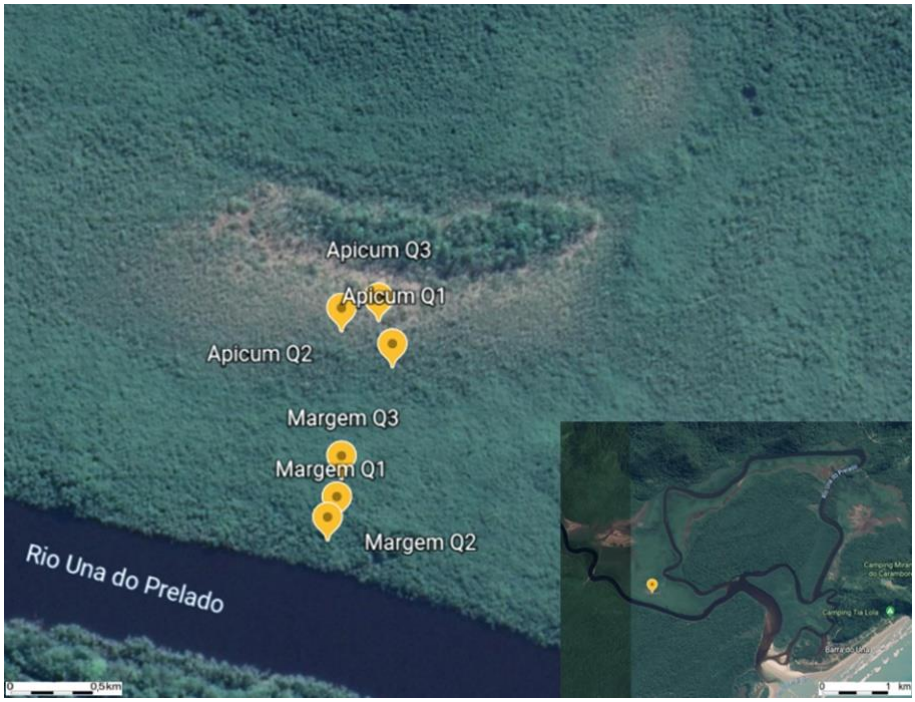

Figura 5. Área de coleta de sedimentos a Beira do Rio Una Prelado, Peruíbe/SP (Google Earth, 2022).
Nota: Os pontos de coleta de sedimentos apresentam as coordenadas: Manguezal Q1 (24°26’2.30”S, 47°5’57.9”O), Manguezal Q2 (24°26’1.9”S, 47°5’57.7”O), Manguezal Q3 (24°26’1.1”S, 47°5’57.6”O), Apicum Q1 (24°25’58.9”S, 47°5’56.5”O), Apicum Q2 (24°25’58.2”S, 47°5’57.6”O) e Apicum Q3 (24°25’58”S, 47°5’56.8”O).

Espécies de Ff foram isoladas pela mistura de 10 g de amostra de sedimento com 45 mL de solução salina (0,85%) contendo polisorbato 80 (0,01%), para cada ponto de coleta. A mistura foi agitada com vórtice de 100 rpm a 1 h em temperatura ambiente utilizando agitador de órbita para homogeneização. A suspensão resultante foi filtrada a vácuo utilizando papel filtro qualitativo (45 µm), para obtenção de solução contendo esporos fúngicos com escassez de sedimento, e diluída em série (10^{-4}). Em seguida, foram semeados 20 µL de suspensão em placas de Petri contendo ágar batata dextrose (PDA) e incubada a 30 °C por um período de sete dias. Após este intervalo, as colônias morfologicamente distintas foram subcultivadas e incubadas a mesmas condições para obtenção de culturas puras. O isolamento e utilização das linhagens fúngicas obtidas estão cadastradas junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob Código de Cadastro AFCF8A9.

3.3 Identificação dos isolados fúngicos

Os isolados fúngicos puros foram examinados microscopicamente por aplicação de técnica de microcultivo, de acordo com os procedimentos descritos por Barnett e Hunter

(1998), para identificação a menor nível taxonômico possível. As linhagens fúngicas avaliadas com melhor capacidade de biodegradar MPs de PE foram selecionadas para identificação molecular a nível de espécie.

Deste modo, cada linhagem foi cultivada em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio lipopolissacarídeo de metilglicose micobacteriano (10 $g \cdot L^{-1}$ de glicose, 3 $g \cdot L^{-1}$ de extrato de malte, 3 $g \cdot L^{-1}$ de extrato de levedura e 5 $g \cdot L^{-1}$ peptona bacteriológica), incubada a 30 ºC sob agitação de 150 rpm por um período de cinco dias e destinada ao Laboratório de Proteínas e Peptídeos Marinhos supervisionado pelo Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro, pertencente ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, para aplicação de protocolo de extração de DNA genômico.

Para tanto, 0,05 g do Ff foi transferido para um microtubo estéril contendo 100 μL de tampão *EAR* (TRIS/HCl: 100 mM, pH 8,5; EDTA: 5 mM, pH 8,0; NaCl 200 mM e 0,2% SDS) e 8 μL de proteinase K (20 $mg \cdot mL^{-1}$). A amostra foi incubada a 55 °C sob agitação de 300 rpm *over night*. Na sequência, a amostra foi aquecida por 10 min para inativar a proteinase K e centrifugadas a 12.000 rpm durante 5 min a 4 °C. Após esta etapa, 500 μL de tampão *TE* (TRIS/HCl: 10 mM, pH 7,5 e EDTA: 1 mM) e 5 μL de RNAse A (3 $mg \cdot mL^{-1}$) foram adicionados e incubados por mais 10 min a 37 °C. A amostra de DNA genômico foi armazenada a -20 °C.

Em seguida, a amplificação do fragmento do gene espaçador interno transcrito (ITS) do rDNA por PCR foi realizada usando os primers *Forward* (ITS1F) e *Reverse* (ITS4). Para a amplificação por PCR foi utilizado, então, o volume e concentração de 0,2 μL de *Taq* DNA Polymerase GE Healthcare™, 0,5 μL de dNTP MIX Promega Corporation™, 100 partes $mol \cdot \mu L^{-1}$ de cada primer, 1 μL dos genes alvos em solução de 2,5 μL de 10X PCR Buffer GE Healthcare™ e 18,8 μL de água MilliQ, em volume final 25 μL.

A reação de PCR foi efetuada em um termociclador com etapas individuais de amplificação. Inicialmente, a câmara de reação foi aquecida a uma temperatura de 95 °C mantida durante 5 min para ativação da *Taq* DNA Polymerase. Na sequência, houve o aquecimento a 94 °C por 30s da câmara de reação, para que houvesse a desnaturação do fragmento de DNA alvo. A seguir, a temperatura foi reduzida para 52 °C durante 30s, permitindo o anelamento dos primers de cada um dos modelos de DNA de cadeia simples obtidos. Na sequência, ocorreu o ajuste da temperatura para 72 °C, ideal para atividade da *Taq* DNA Polymerase utilizada, sob 1 min para extensão do DNA. Os processos de desnaturação, anelamento e extensão do DNA consistem em único ciclo, entretanto, foram necessários 35

ciclos para obtenção de cópias do fragmento de DNA amplificado. Após o último ciclo, a temperatura foi mantida a 72 °C durante 8 min para garantir que qualquer DNA restante fosse completamente alongado. Por fim, a câmara de reação foi esfriada a 4 °C por tempo indeterminado para armazenamento a curto período dos fragmentos de DNA genômico obtidos.

Os produtos de PCR foram limpos usando Kit PCR Purification PureLink^{TM}, qualificados e submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, para verificação do tamanho dos fragmentos de DNA e a pureza.

Posteriormente, os fragmentos obtidos foram encaminhados para realização do sequenciamento genético no Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco, pertencente ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Em seguida, as sequências foram comparadas e analisadas contra o banco de dados da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) usando o programa BLAST.

3.4 Seleção de linhagens fúngicas biodegradadoras de microplásticos de polietileno

Seis isolados fúngicos foram avaliados quanto à capacidade de biodegradar MPs de PE. Sob condições adaptadas de Ameen *et al*. (2015), Paço *et al*. (2017) e Zhang *et al*. (2020), cada isolado foi cultivado individualmente em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de crescimento mínimo (2 $g \cdot L^{-1}$ de glicose, 2 $g \cdot L^{-1}$ de extrato de malte e 0,1 $g \cdot L^{-1}$ de peptona), 5 discos (5 mm) de micélio fúngico e 0,05 g de MPs de PE (250 μm). A incubação foi feita por um período de 28 dias à temperatura de 30 °C sob agitação de 150 rpm. Réplicas foram mantidas e amostradas após 7, 14, 21 e 28 dias. O conjunto controle feito por inoculação de micélio fúngico em meio de crescimento, para observar o crescimento da biomassa em meio ausente de MPs, foi mantido simultaneamente para cada amostra. O controle de MPs de PE em meio de crescimento ausente de micélio fúngico, para verificar os efeitos derivados de sua presença no meio, foi mantido apenas para amostragem a 7 e 28 dias de avaliação. Ao término de cada período, os ensaios passaram por avaliação do crescimento celular (3.5.1) e avaliação do microplástico residual (3.5.2). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

O ensaio de biodegradação contendo a linhagem fúngica avaliada com melhor capacidade de biodegradar MPs de PE passou por mesmo método de cultivo e amostragem supracitados.

3.5 Técnicas e parâmetros analíticos de biodegradação

3.5.1 Avaliação do crescimento de biomassa

Ao término dos ensaios de biodegradação, as amostras (tratamentos e controles inoculados) foram recuperadas dos agitadores e peneiradas. A biomassa fúngica foi lavada com água destilada e separada dos MPs de PE por peneiramento usando peneira com malha de 500 μm. Em seguida, a biomassa passou por filtração a vácuo utilizando papel filtro qualitativo (45 μm) com o intuito de remover a umidade. Na sequência, a biomassa foi inspecionada com a finalidade de identificar e extrair possíveis MPs de PE aderidos e, quando necessário, a avaliação foi auxiliada com uso de estereoscópio. Por fim, a biomassa foi submetida a secagem a 60 ºC por 4 h para exame de peso seco.

3.5.2 Avaliação do microplástico residual

O material que contém MPs de PE, resultante do peneiramento da biomassa, e o controle ausente de inóculo fúngico passaram por peneiramento usando peneira com malha de 250 μm e secagem a 30 °C por 24 h para registro de peso seco, com o intuito de averiguar possível perda de massa. Os MPs observados com biomassa fúngica aderida foram tratados utilizando peróxido de hidrogênio 30% durante 1 h consoante método utilizado por Duan *et al*. (2020) e Wang *et al*. (2021a) de remoção de matéria orgânica. Após este tratamento, os MPs foram lavados com água destilada, filtrados a vácuo utilizando papel filtro qualitativo (45 μm) com o intuito de remover a umidade e resubmetidos a secagem a 30 ºC por 24 h, seguido de registro de peso seco.

Para o ensaio contendo a linhagem fúngica avaliada com melhor capacidade de biodegradar de MPs de PE, os MPs residuais foram secos a 30 °C por 24 h. Posteriormente, os MPs de PE foram submetidos a peneiramento em vibrador mecânico em peneiras com malhas em intervalos de 250, 180, 125 e 63 μm e registrado o peso seco, para averiguar as faixas de tamanho, a fim de comprovar a sua miniaturização.

3.5.3 Mensuração de pH

O pH do meio de crescimento mínimo, das amostras de tratamento, do controle do ensaio com o isolado fúngico com maior capacidade de biodegradar MPs de PE e do controle contendo apenas meio de crescimento e MPs de PE foram mensurados para observação do desenvolvimento fúngico e influência dos MPs de PE no meio. Para tal, alíquotas de 30 mL

do meio de crescimento utilizado e do sobrenadante das amostras recolhidas foram avaliadas utilizando pHmetro de bancada Tecnopon™.

3.5.4 Ensaio de atividade enzimática da lacase

A linhagem fúngica avaliada com melhor capacidade de biodegradação de MPs de PE teve o nível de atividade da lacase (Lcc) presente no meio de crescimento das amostras (tratamentos e controles inoculados) testado. Segundo Zhang *et al*. (2020), dentre as diversas enzimas fúngicas capazes de biodegradar MPs de PE, as lacases e peroxidases são descritas. Em estudo conduzido pelos referidos autores, a atividade de Lcc é reforçada, tendo em vista que a Lcc é reconhecidamente referenciada como participante no processo de degradação de variados compostos recalcitrantes e xenobióticos, embora o mecanismo específico desta enzima não tenha sido muito explorado em MPs.

A atividade da Lcc foi estimada pela oxidação do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotriazolina-6-sulfônico)) (ABTS) pelo aumento da absorbância à 420 nm, conforme protocolo da Profa. Dra. Sara Isabel Cruz Silvério, pertencente ao Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Portugal. Para tanto, foi usado 0,5 mL de solução de ABTS (1,5 mM) no tampão de citrato-fosfato a 2,45 mL (100 mM, pH 4,0) com 0,05 mL do sobrenadante das amostras recolhidas. Uma unidade (U) de atividade da Lcc foi definida como a quantidade de enzima responsável por alterar a absorbância de 1 $\mu mol \cdot min^{-1}$ a temperatura de 20-25 °C. A Lcc testada neste ensaio foi expressa em unidades por litro ($U \cdot L^{-1}$) (Equação 1).

$$Atividade\ Lcc = \frac{\Delta E \times Vt}{\varepsilon \times d \times Va} \times FD$$

Onde,

ΔE: variação da absorbância por minuto à 420 nm.

ε: coeficiente de extinção molar do ABTS (36.000 $M^{-1}\ cm^{-1}$).

d: percurso ótico.

Vt: volume total da reação enzimática.

Va: volume da amostra enzimática.

FD: fator de diluição.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Tamanho e morfologia dos microplásticos de polietileno

Os tamanhos dos MPs de PE variaram de 500 a <63 µm. As classes granulométricas de 355 µm (23%) e 250 µm (29%) foram as principais faixas de tamanho. Em seguida, houve maior abundância de 125 µm (20%), 180 µm (19%), 63 µm (7%) e 500 µm e <63 µm, que representaram apenas 1% cada do total de MPs (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição de 25 g de microplásticos de polietileno conforme tamanho granulométrico.

Classe granulométrica (µm)	Massa (g)	Abundância (%)
500	0,2	1
355	5,6	23
250	6,9	29
180	4,6	19
125	4,9	20
63	1,7	7
<63	0,3	1

Três morfologias foram detectadas nas amostras de MPs de PE: microfibras, microfragmentos e microesferas (Figura 6). A categoria de microesfera foi o formato de maior predominância. As formas de microfragmento e microfibra tiveram uma menor proporção, respectivamente.

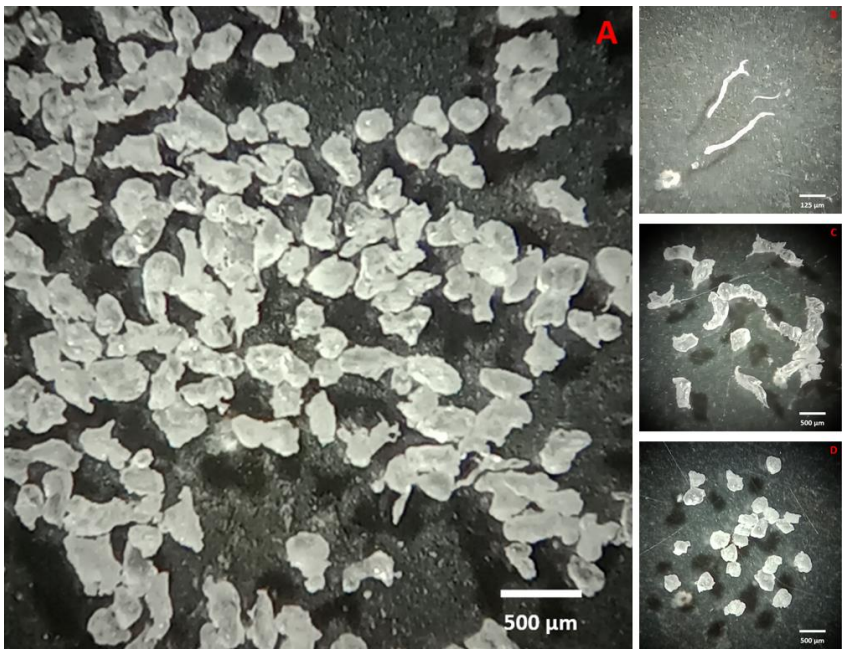

Figura 6. Morfologia do microplásticos de polietileno observados. **A:** micropartículas gerais, **B:** microfibra, **C:** microfragmento e **D:** microesfera.

Estudos recentes realizados no Brasil têm revelado inúmeros tamanhos e morfologias de MPs flutuando em águas costeiras ou presentes nos sedimentos. Lacerda *et al*. (2022) e Bertoldi *et al*. (2021) observaram a presença de microfragmentos e microfibras de PE na superfície de sistemas aquáticos da região metropolitana de Porto Alegre/RS com tamanhos variando entre 100 e 5.000 μm. Segundo Carvalho, Silva e Costa (2021), Maynard *et al*. (2021) e Tsukada *et al*. (2021), o PE predomina entre os tipos de polímeros plásticos possivelmente devido a degradação de macroplásticos de maiores densidades. Entretanto, ainda que as microesferas não sejam evidenciadas, Turra *et al*. (2014) e Izar *et al*. (2019) relataram a presença de 13.138 microesferas/m³, sendo 78% de PE, em regiões costeiras do Estado de São Paulo e 29.775,75 microesferas/m³ na Baía de Santos.

No que tange aos MPs presentes no sistema gastrointestinal de organismos aquáticos brasileiros, Pegado *et al*. (2018) observaram a presença de 97,7% de microesferas com tamanho variando entre 380 e 4.160 μm em 46 espécies do rio amazonas. Justino *et al*. (2021), por sua vez, relataram a ingestão de microesferas de 20 a 5.000 μm em peixes com diferentes tipos de nutrição no Complexo do Sistema Estuarino de Santa Cruz, em Itamaracá/PE, de modo que esta morfologia compunha 40% dos tipos observados. Esses dados sugerem que embora as microesferas estejam pouco presentes em macrorganismos (ORONA-NÁVAR et al., 2022), vem sendo encontradas em considerável proporção em animais basais da cadeia trófica, como peixes e bivalves (DING *et al*., 2021; WANG *et al*., 2021b; SRIDHAR *et al*., 2022).

4.2 Identificação macroscópica e microscópica dos isolados fúngicos

Na etapa inicial do isolamento, 58 colônias fúngicas derivadas das diluições seriadas das amostras de sedimento de Manguezal e Apicum demonstraram capacidade de crescimento em PDA. Deste total, 6 isolados fúngicos puros foram obtidos a partir das características macroscópicas. As análises microscópicas permitiram identificar 4 gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Trichoderma* (Tabela 2). As amostras derivadas de sedimento de Manguezal demonstraram a presença de *Penicillium* sp., *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp. e *Trichoderma* spp. As amostras de sedimento de Apicum, por sua vez, apresentaram *Rhizopus* sp. e *Aspergillus* spp. (Figura 7).

Tabela 2. Isolados fúngicos derivados de amostras de sedimento de Manguezal e Apicum.

Área	Localidade	Código	Espécie
Manguezal	Q1	MQ1A	*Penicillium* sp.
		MQ1B	*Trichoderma* spp.
		MQ1C	*Aspergillus* spp.
Apicum	Q2	MQ2A	*Trichoderma* spp.
	Q2	AQ2A	*Rhizopus* sp.
	Q3	AQ3A	*Aspergillus* spp.

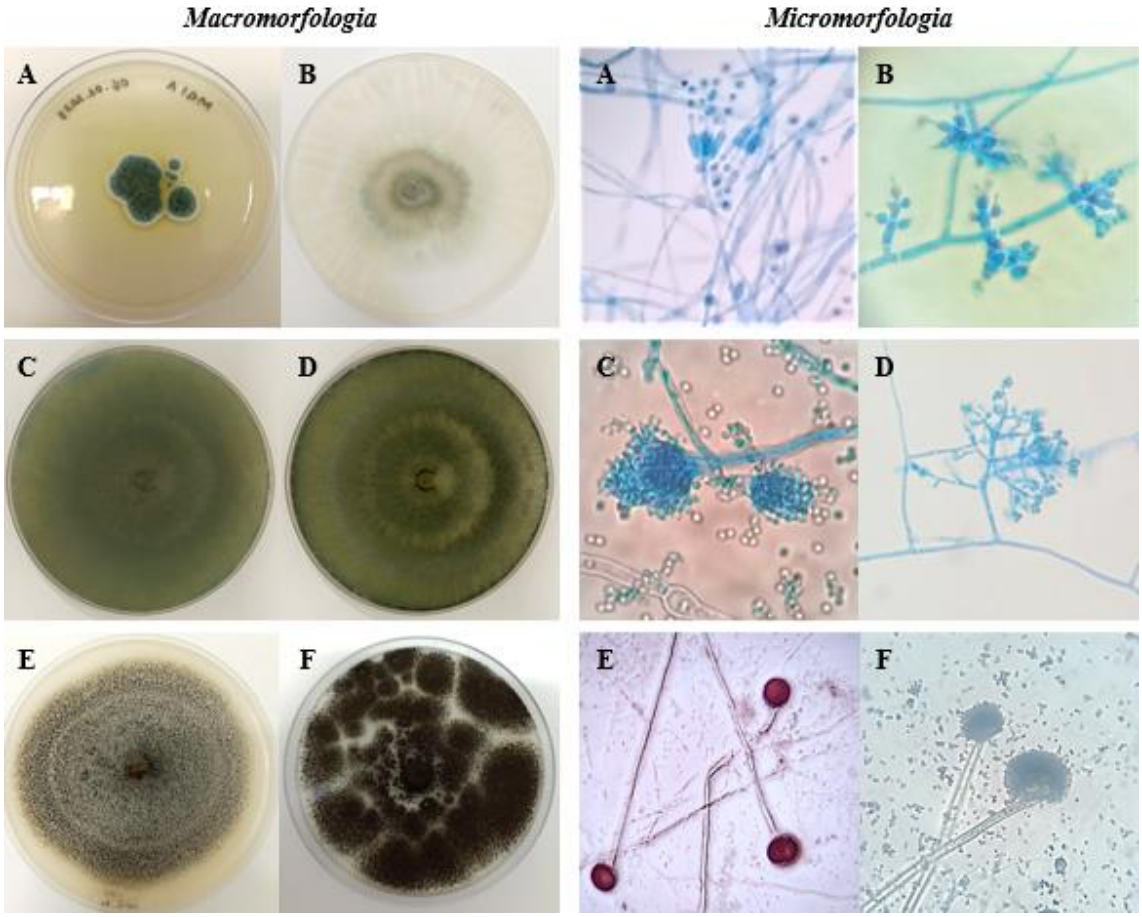

Figura 7. Macromorfologia e micromorfologia dos isolados fúngicos: **A:** MQ1A*: Penicillum* sp., **B:** MQ1B: *Trichoderma* spp., **C:** MQ1C: *Aspergillus* spp., **D:** MQ2A: *Trichoderma* spp. **E:** AQ2A: *Rhizopus* sp. e **F:** *Aspergillus* spp.

Os Ff têm sido frequentemente isolados na busca de novas características potenciais de aplicabilidade biotecnológica, principalmente aos provenientes de ecossistemas marinhos, que possuem fisiologia e propriedades totalmente distintas dos de ambientes terrestres. Ameen *et al*. (2015) isolaram 45 Ff de sedimentos de Manguezal para testar o potencial de biodegradar PEBD em meio contendo 20 $g \cdot L^{-1}$ de glicose como fonte de carbono. Os autores destacaram que os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Candida* foram os mais representativos contendo 8, 8 e 3 espécies, respectivamente. Saénz *et al*. (2019) objetivaram isolar apenas o gênero

Aspergillus de Manguezal e Apicum equatorianos a partir de placas de Petri com ágar Sabouraud, sais minerais e clorofenicol, para impedir o crescimento de bactérias. Isolaram espécies de *Aspergillus niger* e *A. terreus* que se demonstraram capazes biodegradar consideravelmente o PEBD. Sangale, Shahnawaz e Ade (2019) isolaram 109 Ff em sedimentos de rizosfera de Manguezais indianos, utilizando também placas contento ágar Sabouraud, para avaliar o potencial de biodegradar o PE. Todavia, apesar da grande quantidade de isolados, os pesquisadores ressaltaram que apenas 6 espécies foram qualificadas para essa atividade: *Aspergillus awamori*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. sydowii*, *Meyerozima guilliermondii* e *Penicillium chrysogenum*. Um total de 31 espécies fungos endolicênicos isolados em placas contendo PDA foram obtidos associados a líquens em mangues no Sri Lanka, de modo que somente 23 foram identificadas a nível de espécie (PERERA *et al*., 2022). Dentre elas, *Chaetomium globosum*, *Daldinia eschscholtzii*, *Neofusicoccum occulatum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Schizophyllum commune* e *Xylaria feejeensis* apresentaram serem promissoras na biodegradação de PEBD. As incubações das culturas foram realizadas em temperaturas entre 28 e 37 ºC, similar a feita para este estudo. Porém, questões referentes a condições de cultivo e reprodutibilidade do ecossistema de coleta afetam diretamente no crescimento de Ff em laboratório, justificando a baixa quantidade de espécies isoladas quando comparadas com os demais estudos desenvolvidos com Ff também isolados de Manguezal. É possível observar, ainda, a constante presença de Ff do gênero *Aspergillus*, uma vez que se trata de um organismo cosmopolita muito comum em diversos ecossistemas.

4.3 Seleção de linhagens fúngicas biodegradadoras de microplásticos de polietileno

Todas as linhagens fúngicas isoladas formaram *pellets* de tamanho e aparência variáveis. Após 14 dias de incubação, foi observada uma forte associação dos MPs de PE com a biomassa.

As linhagens que apresentaram uma maior capacidade de crescimento quando expostas a MPs de PE foram AQ3A, MQ1B e AQ2A (Tabela 3). Os valores de biomassa final, após 28 dias de tratamento, foram de 0,8900 $g \cdot mL^{-1}$, 0,0695 $g \cdot mL^{-1}$ e 0,0415 $g \cdot mL^{-1}$, respectivamente. Em contrapartida, para as linhagens MQ1A, MQ1C e MQ2A foi observado um declínio de biomassa seca entre o 14º e 21º dia de ensaio.

Tabela 3. Avaliação dos ensaios de biodegradação de MPs de PE pelos isolados fúngicos.

Isolado fúngico	Gênero	Biomassa			MPs de PE			
		Inicial ($g \cdot mL^{-1}$)	Final ($g \cdot mL^{-1}$)	Controle ($g \cdot mL^{-1}$)	Inicial (g)	Final (g)	Degradação	
							Peso (g)	%
MQ1A	*Penicillium* sp.	0	0,0500	0,0465	0,0515	0,0405	0,0110	21
MQ1B	*Trichoderma* spp.	0	0,0695	0,0720	0,0505	0,0315	0,0190	38
MQ1C	*Aspergillus* spp.	0	0,0415	0,0405	0,0530	0,0315	0,0215	41
MQ2A	*Trichoderma* spp.	0	0,0360	0,0565	0,0535	0,0445	0,0090	17
AQ2A	*Rhizopus* sp.	0	0,0575	0,0395	0,0510	0,0325	0,0185	36
AQ3A	*Aspergillus* spp.	0	0,0890	0,0450	0,0520	0,0275	0,0245	47

O peso residual de MP de PE foi dependente do tempo e linhagem fúngica avaliada. As linhagens AQ3A, MQ1C e MQ1B apresentaram as maiores taxas de degradação, correspondendo a 47%, 41% e 38%, respectivamente. O controle ausente de inóculo apresentou redução na perda de peso de até 0,005 g.

De acordo com os parâmetros estabelecidos para o presente estudo, maior valor de biomassa seca e redução de MPs de PE, o AQ3A, *Aspergillus* spp., foi considerado como o mais promissor. Entretanto, o Ff MQ1B, também apresentou aspectos promissores, sendo necessário o desenvolvimento de um maior número de ensaios e estudos complementares de forma a explorar a capacidade de biodegradação de MPs de PE deste MO.

Ojha *et al*. (2017) limitaram-se a apenas duas espécies de *Penicillium*, *P. oxalicum* e *P. chrysogenum*, como biodegradadores de microfilmes de PEBD e PEAD num período de 90 dias. A perda residual observada dos MPs foi mais significativa do que a obtida neste estudo. As amostras de PEBD tiverem perda de 36,6% e 34,55% para *P. oxalicum* e *P. chrysogenum*, respectivamente, enquanto para PEAD tiveram 55,34% e 58,59%. Todavia, o crescimento de biomassa se demonstrou inferior, de modo que *P. oxilicum* teve 0,034 $g \cdot L^{-1}$ e 0,045 $g \cdot L^{-1}$ para PEBD e PEAD, respectivamente, enquanto *P. chrysogenum* teve 0,043 $g \cdot L^{-1}$ e 0,084 $g \cdot L^{-1}$. Sangale, Shahnawaz e Ade (2019) relataram a avaliação de *Penicillium chrysogenum*, bem como demais fungos isolados de Manguezal, em biodegradar PEBD em diferentes contrações de pH após 60 dias de período de incubação. Entretanto, apesar de considerar essa linhagem como eficiente da degradação de PE, os autores não relatam numericamente a capacidade de biodegradação do Ff.

Conforme Munir *et al*. (2018), o isolado *Trichoderma viride*, proveniente de aterro, reduziu peso de filme de PEBD em 5,13% ao final de 45 dias de ensaio. Enquanto Hikmah, Setyaningsih e Pangastuti (2018) averiguaram a redução de 4,87%, 7,12% e 7,51% para diferentes linhagens de *Trichoderma* por 35 dias. A capacidade dessas linhagens específicas

em biodegradar MPs de PE se demonstrou muito baixa e similar entre si. Enquanto neste estudo foi obtido uma biodegradação de 17% e 38% para MQ2A e MQ1B, linhagens diferentes de *Trichoderma*, respectivamente. Contudo, os autores citam uma taxa de crescimento de biomassa lenta e pequena, condizente com o ocorrido com MQ2A, que apresentou a menor biomassa avaliada após o período de incubação com 0,036 $g \cdot L^{-1}$.

A maioria dos estudos que avaliaram a biodegradação de MPs de PE por isolados de *Aspergillus* utilizaram-se apenas da perda de peso residual, em diferentes períodos de tratamento, como padrão analítico. Muhonja *et al*. (2018) analisaram 20 linhagens diferentes, de modo que *A. oryzae* e *A. fumigatus* apresentaram a melhor taxa de biodegradação de microfilme de PEBD durante 112 dias com 36,4% 4 24,1%, respectivamente. Taghavi *et al*. (2021), verificaram em período semelhante, 100 dias, a ação de *A. flavus* sobre microfilme de PEAD, obtendo 5,5% de perda de peso de MPs. Estudos utilizando consórcio de *Aspergillus* obtiveram resultados com alta biodegradabilidade de MPs de PE, sugerindo uma alternativa do uso de Ffs em conjunto como solução para biorremediar esse contaminante do ambiente. Souza *et al*. (2021) realizaram um consórcio de *A. niger*, *flavus* e *oryzae*, em diferentes condições de cultivo em 55 dias de tratamento, tendo a melhor biodegradação de microfilme de PEBD com 26,15% em inoculação com caldo de batata dextrose. El-Sayed, Rabie e Hamed (2021), por sua vez, obtiveram 39,1% de biodegradação em consórcio de *A. carbonarius* e *A. fumigatus* em 112 dias. Assim como este estudo, Zhang *et al*. (2020) e Kunlere, Fagade e Nwadike (2021), utilizaram de microesferas como morfologia de MPs de PE, verificando uma baixa porcentagem de perda de peso, 3,9% e 3,33%, respectivamente. Ambos realizaram o estudo com *A. flavus*, porém Zhang *et al*. (2020) utilizou de PEAD, enquanto Kunlere, Fagade e Nwadike (2012), composição de PEBD.

A biodegradação de MPs de PE estudada por Awasthi *et al*. (2017), Harrat *et al*. (2022) e Seenivasgan, Karthuka e Poonkuzhali (2022) foi explorada por meio de Ff do gênero *Rhizopus*. Awasthi *et al*. (2017) e Seenivasgan, Karthuka e Poonkuzhali (2022) avaliaram o Ff *Rhizopus oryzae* sob microfilmes de PEBD. Os primeiros traçaram um ensaio de 30 dias obtendo 8,4% de biodegradação, enquanto os segundos tiveram 60 dias uma perda 60% de MPs juntamente de um crescimento de biomassa. Harrat *et al*. (2022), a seu turno, analisaram ensaios com linhagem de *Rhizopus* por 30 dias em diferentes meios de cultivo e concentrações variadas de MPs de PEBD, verificando a maior perda de peso residual, 20%, em teste em vitro contento meio de crescimento mínimo.

Em suma, a taxa de biodegradação em diferentes pesquisas quando comparadas a este estudo se apresentam com certa similaridade, com exceção de linhagens de *Trichoderma*. Porém, apesar da proximidade de valores, deve ser considerada a diferença morfológica de MPs de PE utilizados. Enquanto a maioria dos estudos utilizam de microfilmes como polímero alvo, este estudo visou a utilização de microesferas de PE, o que pode propiciar uma maior área de ação do micélio fúngico sobre o material polimérico. Tem de ser ponderado, ainda, as diversas condições de meio cultivo e concentração de MPs em cada avaliação que interferem diretamente na capacidade de biodegradação de cada linhagem.

4.4 Identificação molecular de linhagens fúngicas biodegradadoras de microplásticos de polietileno

As sequências dos fragmentos do gene ITS do rDNA das linhagens isoladas quando comparadas com dados semelhantes disponíveis no GenBank, por meio de uma busca de alinhamento online, permitiram a identificação a nível de espécie. O resultado indicou que as sequências de ITS rDNA de AQ3A, linhagem fúngica avaliada com melhor capacidade de biodegradar MPs de PE, corresponderam a 99,83% a *Aspergillus niger*. A linhagem MQ1B, que também apresentou potencial de biodegradação, obteve correspondência de 95,50% a *Trichoderma harzianum*. A identificação molecular e morfológica de isolados fúngicos quando avaliadas em conjunto possibilitam maior exatidão na identificação de uma espécie. Neste estudo, a identificação molecular corroborou com a identificação morfológica a nível de gênero de duas linhagens isoladas, MQ1B e AQ3A.

4.5 Ensaio de biodegradação

4.5.1 Avaliação do crescimento de biomassa e microplástico residual

Durante o ensaio de biodegradação de MPs de PE por *Aspergillus niger*, foi observada uma variação de biomassa e de MP residual. Ao final dos 28 dias de ensaio foi constatado um crescimento de biomassa de 0,0865 $g \cdot mL^{-1}$ e 53,8% de remoção de MPs de PE (Figura 8). Foi possível observar, assim, uma correlação existente entre o Ff e o material polimérico, uma vez que o ganho de biomassa ocorreu juntamente com a queda de massa residual de MPs de PE.

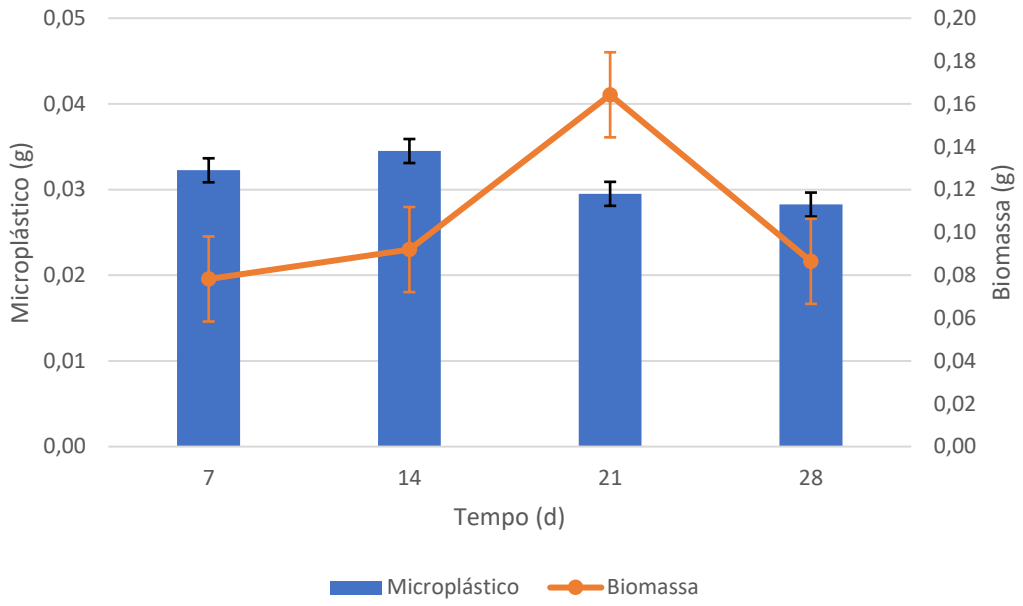

Figura 8. Ensaio de biodegradação de microplásticos de polietileno pela linhagem *A. niger* durante 28 dias.

Ao avaliar o conjunto controle ausente de MPs de PE, foi observado um aumento de massa menor do que na presença de MPs, podendo ser atribuído ao uso do material polimérico pelo Ff como fonte de nutriente. Esse fator se demonstra com maior evidência para as amostras expostas aos MPs de PE por 21 dias, quando houve maior ganho de biomassa em detrimento do MP residual. Essa evidência sugere que nos primeiros 14 dias de ensaio *A. niger* utilizou do meio de crescimento mínimo como fonte de energia, tendo em vista a baixa taxa de perda de MP residual. A partir do 14º dia, sob estresse pela ausência de fonte de nutriente, com exceção dos MPs de PE, houve um crescimento de biomassa possivelmente pelo consumo do material polimérico, tendo em vista a perda de MP residual. Entretanto, percebe-se que ao fim do período de ensaio ocorre uma queda na produção de biomassa, indicando a dificuldade do Ff em dar seguimento ao processo de biodegradação.

Os MPs de PE residuais provenientes do ensaio de biodegradação que foram resubmetidos a peneiramento em vibrador mecânico demonstraram que houve uma miniaturização em seu tamanho, especificamente, em 180 µm. Contudo, apesar de ter ocorrido uma miniaturização, seu peso foi irrisório, uma vez que foi menor que 0,0001 g.

Em estudo anterior, Saénz *et al*. (2019) relataram perda de peso em microfilmes de LDPE em ensaios conduzidos em condições mínimas de carbono durante 77 dias com Ff isolados de sedimentos de Manguezal. Dentre as linhagens fúngicas, *A. niger*, foi capaz de

reduzir 35,3% dos MPs de PE. Sangale, Shahnawaz e Ade (2019) isolaram uma linhagem fúngicas de *A. niger* de sedimento de rizosfera de Manguezal indiano com potencial em biodegradar MPs de PE. Os autores relatem a capacidade de biodegradação dessas linhagens, conduzindo ensaios durante 60 dias, com percentual de perda de peso dos MPs de PE de 30,82%.

Observações semelhantes de perda de peso de MPs de PE dos autores supracitados foram observados por Lakshimi e Selvi (2021) utilizando isolado de *A. niger*, proveniente de aterro, com percentual de perda para MPs de PE foi de 21,88% em 90 dias. Souza *et al*., (2021), utilizando consórcio de *A. niger*, *flavus* e *oryzae*, obteve degradação entre 3,52% e 26,16% em diferentes condições de cultivo durante um período de 55 dias.

Embora os demais autores relatem a capacidade de biodegradação de MPs de PE por diferentes linhagens de *A. niger*, este estudo obteve um maior valor percentual de redução de MPs de PE em menor período de exposição a cultura fúngica. Porém, é necessário considerar ainda a utilização de diferentes meios de cultivo de cada estudo, assim como a diferença morfologia plástica usada, microfilmes.

4.5.2 Mensuração de pH

Ao longo do crescimento fúngico, reações bioquímicas mediadas por uma diversidade de enzimas intra e extracelulares secretadas estão associadas a despolimerização de compostos aos seus constituintes, ocasionando a alteração do pH do meio. Inicialmente, todos os ensaios de biodegradação apresentaram pH 6,0, referentes ao valor do pH do meio de crescimento mínimo. Após 28 dias de tratamento, o pH foi medido como 1,51, tornando-se mais ácido durante o crescimento fúngico em contato com os MPs de PE. O pH dos controles contendo o Ff ausente de MPs de PE também apresentaram acidificação do pH, com 1,44. A redução do pH ocorreu em momentos simultâneos para ambas as amostragens com declínio a partir do 14º dia.

A redução do pH valida que a linhagem fúngica estava metabolicamente ativa durante o processo de biodegradação. Esta faixa de pH observada durante os ensaios sugere ser ideal para o crescimento de Ff do gênero *Aspergillus*, visto que Sangale, Shahnawaz e Ade (2019) relataram em seus estudos que em pH próximo de 3,5 é possível observar ação de biodegradação com o mesmo gênero fúngico. As amostras controles contendo apenas meio de

crescimento mínimo e MPs de PE alteraram o pH de 6,0 para 4,6, demonstrando que o PE pode interferir na característica do meio. Porém esta faixa de pH se manteve constante durante as 4 semanas de avaliação.

4.5.3 Ensaio de atividade enzimática da lacase

Embora a enzima Lcc auxilie na oxidação do esqueleto de hidrocarbonetos (EL-SAYED; RABIE; HAMED, 2021), sua atividade no sobrenadante do meio livre celular não foi identificada. As variações de absorbância observadas por meio do método ABTS para teste enzimático da Lcc extracelular foram consideradas mínimas ou, ainda, inexistentes. No entanto, considerando a existência da redução do peso dos MPs de PE, mecanismos subjacentes e demais enzimas oxidorredutases necessitam ser avaliadas pela possível contribuição no envolvimento do processo de biodegradação, principalmente, pela capacidade de tornar o PE hidrofílico (RESTREPÓ-FLÓREZ, 2014). Estudos anteriores afirmar que, assim como a Lcc, a enzima manganês peroxidase liberada por MOs é capaz de degradar MPs de PE ativando sua clivagem hidrolítica (SHEEL; PANT, 2018). Deve ser considerado também, ainda que em alternativa dubitável, a capacidade da linhagem fúngica *A. niger* em utilizar de enzimas periplasmáticas durante a biodegradação de MPs de PE.

5 CONCLUSÃO

A caracterização do tamanho dos MPs de PE obtidos comercialmente, com base na granulometria avaliada, permitiu verificar maiores concentrações de MPs na faixa de 250 µm e 355 µm, com porcentagem de 29% e 23%, respectivamente. A categoria morfológica identificada, por sua vez, foi de microfibras, microfragmentos e microesferas, sendo esta última a de maior representatividade.

A partir da coleta de sedimento de Manguezal e Apicum da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, foram obtidas 58 colônias fúngicas, das quais 6 linhagens puras foram isoladas. Com base nos aspectos micro e macromorfológicos, foram identificados 4 gêneros distintos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Trichoderma*.

A seleção das linhagens fúngicas com capacidade de biodegradar MPs de PE possibilitou verificar que os isolados AQ3A e apresentaram maior capacidade de biodegradação. O isolado AQ3A foi considerado a linhagem mais promissora com crescimento de biomassa de 0,8900 $g \cdot mL^{-1}$ e degradação de 47%. O isolado MQ1A, a seu turno, apresentou ganho de 0,0695 $g \cdot mL^{-1}$ de biomassa e degradação de 38%.

O sequenciamento de ITS rDNA das linhagens fúngicas promissoras em biodegradar MPs de PE identificou três espécies distintas. AQ3A obteve correspondência com *Aspergillus niger*, enquanto MQ1A foi detectado como *Trichoderma harzianum*.

Em repetição do ensaio de biodegradação com *A. niger*, foi constatado, após 28 dias, o crescimento de biomassa de 0,0865 $g \cdot mL^{-1}$ e 53,8% de degradação de MPs de PE. Entretanto, embora houve a remoção dos MPs e verificado a acidez do meio de crescimento ao fim do ensaio, não foi identificada a atividade enzimática da lacase, sugerindo a ação de outras enzimas oxidorredutases no processo de biodegradação.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que isolados fúngicos podem contribuir ativamente para a biodegradação de MPs de PE em condições oligotróficas. No entanto, outras técnicas de biodegradação e parâmetros analíticos são necessários para comprovar a biodegradação efetiva, para que essas linhagens possam ser utilizadas em estudos futuros.

5.1 Perspectivas futuras

Visando novos estudos que deem continuidade a esta pesquisa, é proposto e considerado a avaliações complementares da biodegradação dos MPs de PE por meio de

testes de demanda bioquímica de oxigênio e evolução da produção de dióxido de carbono em condições aeróbicas. O primeiro, objetiva averiguar a oxidação dos MPs de PE mediante seu consumo pela biomassa fúngica. O segundo, por sua vez, consiste em avaliar a biodegradação da cadeia polimérica de PE desencadeada pelos Ff após utilização do MPs como fonte de carbono.

Diferentes parâmetros analíticos também devem ser ponderados. A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, por exemplo, compõem um fator determinante utilizado para fornecer a presença e alterações de grupos funcionais a estrutura dos MPs de PE submetidos aos ensaios de biodegradação. É importante, também, considerar a investigação de variados sistemas enzimáticos, principalmente oxidorretudases, e seu mecanismo específico atuante sobre MPs de PE, tendo em vista que não são muito explorados.

REFERÊNCIAS

Abraham, J.; Ghosh, E.; Mukherjee, P. & Gajendiran, A. 2016. Microbial degradation of low density polyethylene. **Environmental Progress & Sustainable Energy, 36**(1): 147–154. https://doi.org/10.1002/ep.12467

Akindoyo, J.O.; Beg, M.D.H.; Ghazali, S.; Islam, M.R.; Jeyaratnam, N. & Yuvaraj, A.R. 2016. Polyurethane types, synthesis and applications – a review. **RSC Advances, 6**(115): 114453–114482. https://doi.org/10.1039/C6RA14525F

Alimi, O.S.; Budarz, J.F.; Hernandez, L.M. & Tufenkji, N. 2018. Microplastics and nanoplastics in aquatic environments: aggregation, deposition, and enhanced contaminant transport. **Environmental Science & Technology, 52**(4): 1704–1724. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05559

AlMa'adeed, M.A. & Krupa, I. 2016. **Polyolefin compounds and materials:** fundamentals and industrial applications. Springer, Cham, 1a Edição, 354p.

Alshehrei, F. 2017. Biodegradation of synthetic and natural plastic by microorganisms. **Journal of Applied & Environmental Microbiology, 5**(1): 8-19. https://doi.org/10.12691/jaem-5-1-2

Ameen F.; Moslem, M.; Hadi, S. & Al-Sabri, A.E. 2015. Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by mangrove fungi from the Red Sea Coast. **Progress in Ruber, Plastics and Recycling Technology**, **31**(2): 125–144. https://doi.org/10.1177/147776061503100204

Amobonye, A.; Bhagwat, P.; Singh, S. & Pillai, S. 2021. Plastic biodegradation: frontline microbes and their enzymes. **Science of The Total Environment, 759**: 143536. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143536

Andrady, A.L. & Neal, M.A. 2009. Applications and social benefits of plastic. Philosophical **Transactions of The Royal Society B, 364**(1526): 1977–1984. https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0304

Andrady, A.L. 2017. The plastic in microplastics: a review. **Marine Pollution Bulletin, 119**(1): 12–22. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.082

Arpia, A.A.; Chen, W.H; Ubando, A.T.; Naqvi, S.R. & Culaba, A.B. 2021. Microplastic degradation as a sustainable concurrent approach for producing biofuel and obliterating hazardous environmental effects: a state-of-the-art review. **Journal of Hazardous Materials, 418**: 126381. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126381

ASTM – ASTM International. 2010. ASTM D996-10a, Standard terminology of packaging and distribution environments. West Conshohocken.

Aujoulat, F.; Roger, F.; Bourdier, A.; Lotthé, A.; Lamy, B.; Marchandin, H. & Jumas-Bilak, E. 2012. From environment to man: gene evolution and adaptation of human opportunistic bacterial pathogens. **Genes (Basel), 3**(2): 191–232. https://doi.org/10.3390/genes3020191

Auta, H.S.; Emenike, C.U. & Fauziah, S.H. 2017. Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects and

potential solutions. **Environment International, 102**: 165–176. https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.02.013

Avio, C.G.; Gorbi, S. & Regoli, F. 2017. Plastics and microplastics in the oceans: from emerging pollutants to emerged threat. **Marine Environmental Research, 128**: 2–11. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.05.012

Awathi, S.; Srivastava, N.; Singh, T.; Tiwary, D. & Mishra, P.K. 2017. Biodegradation of thermally treated low density polyethylene by fungus *Rhizopus oryzae* NS5. **3 Biotech, 7**: 73. https://doi.org/10.1007/s13205-017-0699-4

Bahl, S.; Dolma, J.; Singh, J. J. & Sehgal, S. 2021. Biodegradation of plastics: a state of the art review. **Materials Today: Proceedings, 39**(1): 31–34. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.06.096

Bai, C.L.; Liu, L.Y.; Hu, Y.B.; Zeng, E.Y. & Guo, Y. 2022. Microplastics: A review A review of analytical methods, occurrence and characteristics in food, and potential toxicities to biota. **Science of The Total Environment, 806**(1): 150263. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150263

Barceló, D. & Picó, Y. 2019. Microplastics in the global aquatic environment: analysis, effects, remediation and policy solutions. **Journal of Environmental Chemical Engineering, 7**(5): 103421. https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103421

Barnett, H.L. & Hunter, B.B. 1998. **Illustrated genera of imperfect Fungi:** fourth edition. Amer Phytopathological Society, 4a Edição, 240p.

Barone, G.; Varrella, S.; Tangherlini, M.; Rastelli, E.; Dell'Anno, A.; Danovaro, R. & Corinaldesi, C. 2019. Marine fungi: biotechnological perspectives from deep-hypersaline anoxic basins. **Diversity, 11**(7): 113. https://doi.org/10.3390/d11070113

Bertoldi, C.; Lara, L.Z.; Mizushima, F.A.L.; Martins, F.C.G.; Battisti, M.A.; Hinrichs, R. & Fernandes, A.N. 2021. First evidence of microplastic contamination in the freshwater of Lake Guaíba, Porto Alegre, Brazil. **Science of The Total Environmental, 759**: 143503. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143503

Boucher, J. & Friot, D. 2017. **Primary microplastics in the oceans:** a global evaluation of sources. Gland: IUCN, 43 p.

Brooks, A.N.; Turkarslan, S.; Beer, K.D.; Lo, F.Y. & Baliga, N.S. 2011. Adaptation of cells to new environments. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine, 3**(5): 544–561. https://doi.org/10.1002/wsbm.136

Caruso, J. 2015. Microplastics in marine environments: possible interactions with the microbial assemblage. **Journal of Pollution Effects & Control, 3**(2): 2. https://doi.org/10.4172/2375-4397.1000e111

Carvalho, J.P.S.; Silva, T.S. & Costa, M.F. 2021. Distribution, characteristics and short-term variability of microplastics in beach sediment of Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. **Marine Pollution Bulletin, 166**: 112212. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112212

Chae, Y. & An, Y. 2018. Current research trends on plastic pollution and ecological impacts on the soil ecosystem: a review. **Environmental Pollution, 240**: 387–395. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.008

Chamas, A.; Moon, H.; Zheng, J.; Qiu, Y.; Tabassum, T.; Jang, J.H.; Abu-Omar, M.; Scott, S.L. & Suh, S. 2020. Degradation rates of plastics in the environment. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 8**(9): 3494–3511. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06635

Collard, F. & Ask, A. 2021. Plastic ingestion by Arctic fauna: a review. **Science of The Total Environment, 786**: 147462. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147462

Costa, J.P.; Santos, P.S.M.; Duarte, A.C. & Rocha-Santos, T. 2016. (Nano)plastics in the environment – sources, fates and effects. **Science of The Total Environment, 566-567**: 15–16. http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.041

Cregut, M.; Bedas, M.; Durand, M.J. & Thouand, G. 2013. New insights into polyurethane biodegradation and realistic prospects for the development of a sustainable waste recycling process. **Biotechnology Advances, 31**(8): 1634–1647. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.011

Crešnar, B. & Petrič, S. 2011. Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics, 1814**(1): 29–35. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.06.020

Danso, D.; Chow, J. & Streit, W.R. 2019. Plastics: environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. **Applied and Environmental Microbiology, 85**(19): e01095-19. https://doi.org/10.1128/AEM.01095-19

Das, M.P.; Kumar, S. & Das, J. 2018. Fungal-mediated deterioration and biodegradation study of low-density polyethylene (LDPE) isolated from municipal dump yard in Chennai, India. **Energy, Ecology and Environment, 2**: 229–236. https://doi.org/10.1007/s40974-018-0085-z

Détrée, C. & Gallardo-Escárate, C. 2018. Single and repetitive microplastics exposures induce immune system modulation and homeostasis alteration in the edible mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Fish Shellfish Immunology, 83**: 52–60. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.018

Ding, J.; Sun, C.; He, C.; Li, J.; Ju, P. & Li, F. 2021. Microplastics in four bivalve species and basis for using bivalves as bioindicators of microplastic pollution. **Science of The Total Environment, 782**: 146830. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146830

Duan, J.; Han, J.; Zhou, H.; Lau, Y.L.; An, W.; Wei, P.; Cheung, S.G.; Yang, Y. & Tam, N.F. 2020. Development of a digestion method for determining microplastic pollution in vegetal-rich clayey mangrove sediments. **Science of The Total Environment**, **707**: 136030. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136030

Duis, K. & Coors, A. 2016. Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. **Environmental Sciences Europe, 28**(1): 2. https://doi.org/10.1186/s12302-015-0069-y

Eerkes-Medrano, D.; Thompson, R.C. & Aldridge, D.C. 2015. Microplastics in freshwater systems: a review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. **Water Research, 75**: 63–82. https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.012

Eich, A.; Mildenberger, T.; Laforsch, C. & Weber, M. 2015. Biofilm and diatom succession on polyethylene (PE) and biodegradable plastic bags in two marine habitats: early

signs of degradation in the pelagic and benthic zone? **PLoS One, 10**(9): e037201. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137201

El-Sayed, M.T.; Rabie, G.H. & Hamed, E.A. 2021. Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) using the mixed culture of *Aspergillus carbonarius* and *A. fumigates*. **Environment, Development and Sustainability, 23**: 14556–14584. https://link.springer.com/article/10.1007/s10668-021-01258-7

Fotopoulou, K.N. & Karapanagioti, H.K. 2017. Degradation of various plastics in the environment. **The Handbook of Environmental Chemistry, 78**: 71–92. https://doi.org/10.1007/698_2017_11

Frias, J.P.G.L. & Nash, R. 2019. Microplastics: finding a consensus on the definition. **Marine Pollution Bulletin, 138**: 145–147. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.11.022

Ghatge, S.; Yang, Y.; Ahn, J.H. & Hur, H.G. 2020. Biodegradation of polyethylene: a brief review. **Applied Biological Chemistry, 63**(1): 27. https://doi.org/10.1186/s13765-020-00511-3

Gómez-Méndez, L.D.; Moreno-Bayona, D.A.; Poutou-Piñales, R.A.; Salcedo-Reyes, J.C.; Pedroza-Rodríguez, A.M.; Vargas, A. & Bogoya, J.M. 2018. Biodeterioration of plasma pretreated LDPE sheets by *Pleurotus ostreatus*. **PLoS One, 13**(9): e0203786. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203786

Gradus, R.H.J.M.; Nillesen, P.H.L.; Dijkgraaf, E. & van Koppen, R.J. 2017. A cost-effectiveness analysis for incineration or recycling of Duch household plastic waste. **Ecological Economics, 135**: 22–28. https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2016.12.021

Grand Review Research. 2020. **Plastic market size, share & trends analysis report by product (PE, PP, PU, PVC, PET, polystyrene, ABS, PBT, PPO, epoxy polymers, LCP, PC, polyamide), by application, by region, and segment forecasts, 2020–2027.** 200 p.

Guo, X. & Wang, J. 2019. The chemical behaviors of microplastics in marine environment: a review. **Marine Pollution Bulletin, 142**: 1–14. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.019

Harrat, R.; Bourzam, G.; Ouled-Haddar, H. & Soumati, B. 2022. In vitro and ex situ biodegradation of low-density polyethylene by a Rhizopus sp. strain isolated from a local dumsite in North-East Algeria. **Environment and Natural Resources Journal, 20**(5): 1–10. https://doi.org/10.32526/ennrj/20/202200026

Hartmann, N.B.; Hüffer, T.; Thompson, R.C.; Hassellöv, M.; Verschoor, A.; Daugaard, A.E.; Rist, S.; Karlsson, T.; Brennholt, N.; Coler, M.; Herrling, M.P.; Hess, M.C.; Ivleva, N.P.; Lusher, A.L. & Wagner, M. 2019. Are we speaking the same language? Recommendations for a definition and categorization framework for plastic debris. **Environmental Science & Technology, 53**(3): 1039–1047. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05297

Hidalgo-Ruz, V.; Gutow, L.; Thompson, R.C.; & Thiel, M. 2021. Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. **Environmental Science & Technology, 46**(6), 3060–3075. https://doi.org/10.1021/es2031505

Hikmah, M.; Setyaningsih, R. & Pangastuti, A. 2018. The potential of lignolytic Trichodema isolates in LDPE (low density polyethylene) plastic biodegradation. **IOP Conference Series: Material Science and Engeneering, 333**: 012076. https://doi.org/10.1088/1757-899X/333/1/012076

Ho, K.L.G.; Pometto III, A.L.; Gadea-Rivas, A.; Briceño, J.A. & Rojas, A. 1999. Degradation of polylactic acid (PLA) plastic in Costa Rican soil and Iowa University compost rows. **Journal of Environmental Polymer Degradation, 7**: 173–177. https://doi.org/10.1023/A:1022874530586

Ho, B.T.; Roberts, T.K. & Lucas, S. 2018. An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach. **Critical Reviews in biotechnology, 38**(2): 308–320. https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1355293

IMO – International Maritime Organization. 2015. **Plastic particles in the ocean may be as harmful as plastic bags, report says.** Disponível em: *https://www.imo.org/en/MediaCentre/PressBriefings/Pages/15-microplastics.aspx*. Acessado em: 15/04/2021.

ISO – Organização Internacional de Normalização. **ISO/TR 21.960:** Plastics – Environmental aspects – State of knowledge and methodologies. Rio de Janeiro, 2020.

Izar, G.M.; Morais, L.G.; Pereira, C.D.S.; Cesar, A.; Abessa, D.M.S. & Christofoletti, R.A. 2019. Quantitative analysis of pellets on beaches of the São Paulo coast and associated non-ingested ecotoxicological effects on marine organisms. **Regional Studies in Marine Science, 29**: 100705. https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100705

Jayaprakash, V. & Palempalli, U.M.D. 2018. Effect of palmitic acid in the acceleration of polyethylene biodegradation by *Aspergillus oryzae*. **Journal of Pure and Applied Microbiology, 12**(4): 2259–2268. https://doi.org/10.22207/JPAM.12.4.66

Jayashree, L.P. & Vanmathi, S.K. 2021. *In vitro* biodegradation of low-density polyethylene by soil microorganismos. **Research Journal of Chemistry and Environment, 25**(12): 44–52. https://doi.org/10.25303/2512rjce4452

Ji, Z.; Huang, Y.; Feng, Y.; Johansen, A.; Xue, J.; Tremblay, L. A. & Li, Z. 2021. Effects of pristine microplastics and nanoplastics on soil invertebrates: a systematic review and meta-analysis of available data. **Science of The Total Environment, 788**: 147784. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147784

Jung, J.W; Kang, J.S., Choi, J. & Park, J.W. 2020. Chronic toxicity of endocrine disrupting chemicals used in plastic products in Korean resident species: implications for aquatic ecological risk assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety, 192**: 110309. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110309

Justino, A.K.S.; Lenoble, V.; Pelage, L.; Ferreira, G.V.B.; Passarone, R.; Frédou, T. & Lucena Frédou, F. 2021. Microplastic contamination in tropical fishes: an assessment of different feeding habits. **Regional Studies in Marine Science, 45**: 101857. https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101857

Kirstein, I.V.; Wichels, A.; Gullans, E.; Krohne, G. & Gerdts, G. 2019. The plastisphere – uncovering tightly attached plastic "specific" microorganisms. **PLoS One, 14**(4): e0215859. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215859

Krause, S.; Molari, M.; Gorb, E.V., Gorb, S.N., Kossel, E. & Haeckel, M. 2020. Persistence of plastic debris and its colonization by bacterial communities after two decades on the abyssal seafloor. **Scientific Reports, 10**: 9484. https://doi.org/10.1038/s41598-020-66361-7

Kukkola, A.; Krause, S.; Lynch, I.; Smith, G. H. S. & Nel, H. 2021. Nano and microplastic interactions with freshwater biota – current knowledge, challenges and future solutions. **Environmental International, 152**: 106504. https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106504

Kumar, G.A.; Anjana, K.; Hinduja, H.; Sujitha, K. & Dharani, G. 2020. Review on plastic wastes in marine environment – biodegradation and biotechnological solutions. **Marine Pollution Bulletin, 150**: 110733. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110733

Kunlere, I.O.; Fagade, O. E. & Nwadike, B. I. 2019. Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by certain indigenous bacteria and fungi. **International Journal of Environmental Studies, 76**(3): 428–440. https://doi.org/10.1080/00207233.2019.1579586

Lacerda, A.L.F.; Taylor, J.D.; Rodrigues, L.S.; Kessler, F.; Secchi, E. & Proietti, M.C. 2022. Floating plastics and their associated biota in the Western South Atlantic. **Science of The Total Environmental, 805**: 150186. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150186

Lakshimi, P.J. & Selvi, K.V. 2021. In vitro biodegradation of low-density polyethylene by soil microorganisms. **Research Journal of Chemistry and Environment, 25**(12): 44–52. https:// doi.org/10.25303/2512rjce4452

Lambert, S.; Sinclair, C. & Boxall, A. 2014. Occurrence, degradation, and effect of polymer-based materials in the environment. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 277**: 1–53. https://doi.org/10.1007/978-3-319-01327-5_1

Li., D.; Zhou, L.; Wang, X.; He, L. & Yang, X. 2019. Effect of crystallinity of polyethylene with different densities on breakdown strength and conductance property. **Materials (Basel), 12**(11): 1746. https://doi.org/ 10.3390/ma12111746

Lin, Z.; Jin, T.; Zou, T.; Xu, L.; Xi, B.; Xu, D.; He, J.; Xiong, L.; Tang, C.; Peng, J.; Zhou, Y. & Fe, J. 2022. Current progress on plastic/microplastic degradation: fact influences and mechanism. **Environmental Pollution, 304**: 119159. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119159

Lintsen, H.; Hollestelle, M. & Hölsgens, R. 2017. **The plastics revolution:** how the Netherlands became a global player in plastics. Eindhoven: Foundation for the History of Technology, 1a Edição, 223p.

Liu, G.; Zhu, Z.; Yang, Y.; Sun, Y.; Yu, F. & Ma, J. 2019. Sorption behavior and mechanism of hydrophilic organic chemicals to virgin and aged microplastics in freshwater and seawater. **Environmental Pollution, 246**: 26–33. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.100

Lucas, N.; Bienaime, C.; Belloy, C.; Queneudec, M.; Silvestre, F. & Nava-Saucedo, J.E. 2008. Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques – a review. **Chemosphere, 73**(4): 428–442. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.064

Makhlouf, A.; Satha, H.; Frihi, D.; Gherib, S. & Seguela, R. 2016. Optimization of the crystallinity of polypropylene/submicronic-talc composites: the role of filler ratio and cooling rate. **Express Polymer Letters, 10**(3): 237–247. https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2016.22

Maynard, I.F.N.; Bortoluzzi, P.C.; Nascimento, L.M.; Madi, R.R.; Cavalcanti, E.B.; Lima, A.S.; Jeraldo, V.L.S. & Marques, M.N. 2021. Analysis of the occurrence of microplastics in beach sand on the Brazilian coast. **Science of The Total Environmental, 771**: 144777. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144777

Meaza, I.; Toyoda, J. H. & Wise, J. P. 2020. Microplastics in the sea turtles, marine mammals and humans: a one environmental health perspective. **Frontiers in Environmental Science, 8**: 298. https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.575614

Mehmood, C.T.; Qazi, I.A.; Hashmi, I.; Bhargava, S. & Deepa, S. 2016. Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) modified with dye sensitized titania and starch blend using *Stenotrophomonas pavanii*. **International Biodeterioration & Biodegradation, 113**: 276–286. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.01.025

Meyer, V.; Basenko, E.Y.; Benz, J.P.; Braus, G.H.; Caddick, M.X.; Csukai, M.; de Vries, R.P.; Endy, D.; Frisvad, J.C.; Gunde-Cimerman, N.; Haarmann, T.; Hadar, Y.; Hansen, K.; Johnson, R.I.; Keller, N.P.; Kraševec, N.; Mortensen, U.H.; Perez, R.; Ram, A.F.J.; Record, E.; Ross, P.; Shapaval, V.; Steiniger, C.; van den Brink, H.; van Munster, J.; Yarder, O. & Wösten, H.A.B. 2020. Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. **Fungal Biology and Biotechnology, 7**: 5. https://doi.org/10.1186/s40694-020-00095-z

Michaud, L.; di Marco, G.; Bruni, V. & lo Giudice, A. 2007. Biodegradative potential and characterization of psychrotolerant polychlorinated biphenyl-degrading marine bacteria isolated form a coastal station in the Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). **Marine Pollution Bulletin, 54**(11): 1754–1761. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.07.011

Min, T.T.; Spiridinova, R.R.; Agazamo, R.Z. & Sirotkin, A.S. 2015. Improving the compatibility and assessing the biodegradation of polymer composites of low density polyethene an plymide-6. **International Polymer Science and Technology, 42**(1): 51–56. https://doi.org/10.1177/0307174X1504200111

Moharir, R.V. & Kumar, S. 2019. Challenges associated with plastic waste disposal and allied microbial routes for its effective degradation: a comprehensive review. **Journal of Cleaner Production, 208**: 65–76. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.059

Muhonja, C.N.; Makonde, H.; Magoma, G. & Imbuga, M. 2018. Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi-Kenya. **PloS ONE, 13**(7): e0198446. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198446

Munir, E.; Harefa, R.S.M.; Priyani, N. & Suryanto, D. 2018. Plastic degrading fungi *Trichoderma viride* and *Aspergillus nomius* isolated from local landfill soil in Medan. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 126**: 012145. https://doi.org/10.1088/1755-1315/126/1/012145

Nauendorf, A.; Krause, S.; Bigalke, N.K.; Gorb, E.V.; Gorb, S.N.; Haeckel, M.; Wahl, M. & Treude, T. 2016. Microbial colonization and degradation of polyethylene & biodegradable plastic bags in temperate fine-grained organic-rich marine sediments.

Marine Pollution Bulletin, 103(1-2): 168–178. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.12.024

Ojha, N.; Pradhan, N.; Singh, S.; Barla, A.; Shrivastava, A.; Khatya, P.; Rai, V. & Bose, S. 2017. Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization. **Scientific Reports, 7**: 39515. https://doi.org/10.1038/srep39515

Olicón-Hernández, D.R.; González-López, J. & Aranda, E. 2017. Overview on the biochemical potential of filamentous fungi to degrade pharmaceutical compounds. **Frontiers in Microbiology, 8**: 1792. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01792

Orona-Návar, C; García-Morales, R.; Loge, F.J.; Mahlknecht, J.; Aguilar-Hernández, I. & Ornelas-Soto, N. 2022. Microplastics in Latin America and the Caribbean: a review on current status and perspectives. **Journal of Environmental Management, 309**: 114698. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114698

Paço, A.; Duarte, K.; Costa, J.P.; Santos, P.S.M.; Pereira, R.; Pereira, M.E.; Freitas, A.C.; Duarte, A.C. & Rocha-Santos, T.A.P. 2017. Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. **Science of The Total Environment**, **586**: 10–15. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.017

Paço, A.; Jacinto, J.; da Costa, J.P.; Santos, P.S.M.; Vitorino, R.; Duarte, A.C. & Rocha-Santos, T. 2019. Biotechnological tools for the effective management of plastics in the environment. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 49**(5): 410–441. https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1548862

Pathak, V.M. & Navneet. 2017. Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. **Bioresources and Bioprocessing, 4**: 15. https://doi.org/10.1186/s40643-017-0145-9

Pegado, T.S.S.; Schmid, K.; Winemiller, K.O.; Chelazzi, D.; Cincinelli, A.; Dei, L. & Giarrizzo, T. 2018. First evidence of microplastic ingestion by fishes from the Amazon River estuary. **Marine Pollution Bulletin, 133**: 814–821. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.06.035

Peiponen, K.E.; Räty, J.; Ishaq, U.; Pélisset, S. & Ali, R. 2019. Outlook on optical identification of micro- and nanoplastics in aquatic environments. **Chemosphere, 214**: 424–429. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.111

Perera, T.W.N.K.; Weerasinghe, W.R.H.; Attanayake, R.N. & Paranagama, P.A. 2022. Biodegradation of low-density polyethylene by mangrove-associated endolichenic fungi and their enzymatic regimes. **Letters in Applied Microbiology, 75**(6): 1526–1537. https://doi.org/10.1111/lam.13819

Plastic Europe. 2020. **Plastics – the facts 2019:** an analysis of European plastics production, demand and waste data. Bruxelas: 65 p.

Raghukumar, S. 2017. **Fungi in coastal and oceanic marine ecosystems: marine fungi.** Springer International Publishing, 1a Edição, 378p.

Rai, P.; Mehrotra, S.; Priya, S.; Gnansounou, E. & Sharma, S.K. 2021. Recent advances in the sustainable design and applications of biodegradable polymers. **Bioresource technology, 325**: 124739. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124739

Rajmohan, K.V.S.; Ramya, C.; Viswanathan, M.R. & Varjani, S. 2019. Plastic pollutants: effective waste management for pollution control and abatement. **Current Opinion in Environmental Science & Health, 12**: 72–84. https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.08.006

Ray, S. & Cooney, R.P. 2018. Chapter 9 – Thermal degradation of polymer and polymer composites, 185-206. *In:* Kutz, M. (ed.). **Handbook of Environmental Degradation of Materials**, 3a Edição, 684p.

Restrepo-Flórez; J.M.; Bassi, A. & Thompson, M.R. 2014. Microbial degradation and deterioration of polyethylene – a review. **International Biodeterioration & Biodegradation, 88**: 83–90. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.014

Rocha-Santos, T. & Duarte, A.C. 2015. A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry, 65**: 47–53. https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.10.011

Rojas, A.M.H.; Nakayo, J.J.; Bulnes, J.L.L. & Anzualdo, V.I.T. 2020. Microbial biodegradation of polyethylene of low density, under controlled thermal conditions in air lift bio-reactor. **3C Tecnología. Glosas de innovación aplicadas a la pyme**: 179–189. h ttps://doi.org/10.17993/3ctecno.2020. specialissue6.179-189

Ru, J.; Huo, Y. & Yang, Y. 2020. Microbial degradation and valorization of plastic wastes. **Frontiers in Microbiology, 11**: 442. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00442

Sáenz, M.; Borodulina, T., Diaz, L., Banchon, C. 2019. Minimal Conditions to Degrade Low Density Polyethylene by *Aspergillus terreus* and *niger*. **Journal of Ecological Engineering, 20**(6), 44-51. https://doi.org/10.12911/22998993/108699

Sanchéz, C. 2020. Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: an overview of macro- and microplastics biodegradation. **Biotechnology Advances, 40**: 107501. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107501

Sangale, M.K.; Shahnawaz, M. & Ade, A.B. 2019. Potential of fungi isolated from the dumping sites mangrove rhizosphere soil to degrade polythene. **Scientific Reports, 9**: 5390. https://doi.org/10.1038/s41598-019-41448-y

Santos, C.S.; Suguio, K.; MORAES, F.C.; Sallun, A.E.M.; Garcia, M.J.; Oliveira, P.E.; Medeiros, V.B. & Sallun Filho, W. 2011. Caracterização dos tipos de espículas esponjosas silicosas encontradas em sedimentos paleolacustres coletados na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo. **Revista Geociências – UnG**, **10**(1): 64–73.

Schirinzi, G. F.; Pérez-Pomeda, I.; Sanchís, J.; Rossini, C.; Farré, M. & Barceló, D. 2017. Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. **Environmental Research, 159**: 579–587. https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.08.043

Schwartz, M.; Perrot, T.; Aubert, E.; Dumarçay, S.; Favier, F.; Gérardin, P.; Morel-Rouhier, M.; Mulliert, G.; Saiag, F.; Didierjean, C. & Gelhaye, E. 2018. Molecular recognition of wood polyphenols by phase II detoxification enzymes of the white rot *Trametes versicolor*. **Scientific Reports, 8**: 8472. https://doi.org/10.1038/s41598-018-26601-3

Sekhar, V.C.; Nampoothiria, K.M.; Mohana, A.J.; Naira, N.R.; Bhaskarb, T. & Pandey, A. 2016. Microbial degradation of high impact polystyrene (HIPS), an e-plastic with

decabromodiphenyl oxide and antimony trioxide. **Journal of Hazard Materials, 318**: 347–354. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.07.008

Sen, S.K. & Raut, S. 2015. Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE): a review. **Journal of Environmental Chemical Engineering, 3**(1): 462–473. https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.01.003

Seenivasagan, R.; Karthuka, A. & Poonkuzhali, K. 2022. In vitro and in silico study of the efficacy of fungi in low-density polyethylene degradation in a disposal paper cup. **Water, Air & Soil Pollution, 233**: 77. https://doi.org/10.1007/s11270-022-05534-8

Sharma, S. & Chatterjee, S. 2017. Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review. **Environmental Science and Pollution Research, 24**: 21530–21547. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9910-8

Sheel, A. & Pant, D. 2017. Microbial depolymerization, 61–103. *In:* Varjani, S.J.; Gnansounuou, E.; Baskar, G.; Pant, D. & Zakaria, Z.A. (ed.). **Waste bioremediation, energy, environment, and sustainability**, 1a Edição.

Shin, J.; Kim, J.E., Lee; Y.W. & Son, H. 2018. Fungal cytochrome P450 ante the P450 complement (CYPome) of *Fusarium graminearum*. **Toxins, 10**(3): 112. https://doi.org/10.3390/toxins10030112

Silva, F.J.G. & Gouveia, R.M. 2020. **Cleaner production tools and environmental management practices:** tower a better future. Springer International Publishing, 1a Edição, 420p.

Siracusa, V. 2019. Microbial degradation of synthetic biopolymers waste. **Polymers (Basel), 11**(6): 1066. https://doi.org/10.3390/polym11061066

Souza, G.C.; Sheriff, R.S.; Ullanat, V.; Shrikrishna, A.; Joshi, A.V.; Hiremath, L. & Entoori, K. 2021a. Fungal biodegradation of low-density polyethylene using consortium of *Aspergillus* species under controlled conditions. **Heliyon, 7**(5): e07008. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07008

Sridhar, A., Kannan, D., Kapoor, A., & Prabhakar, S. 2022. Extraction and detection methods of microplastics in food and marine systems: a critical review. **Chemosphere, 286**(1): 131653. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131653

Solomando, A.; Capó, X.; Alomar, C.; Compa, M.; Valencia, J. M.; Sureda, A. & Deudero, S. 2021. Assessment of the effect of long-term exposure to microplastics and depuration period in *Sparus aurata* Linnaeus, 1758: liver and blood biomarkers. **Science of The Total Environment, 786**: 147479. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147479

Sun, C.; Wang, Z.; Chenc, L. & Fengmin L. 2020. Fabrication of robust and compressive chitin and graphene oxide sponges for removal of microplastics with different functional groups. **Chemical Engineering Journal, 393**: 124796. https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124796

Taghavi, N.; Singhal, N.; Zhuang, W.Q. & Baroutian, S. 2021. Degradation of plastic waste using stimulated and naturally occurring microbial strains. **Chemosphere, 263**: 127975. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127975

Tokiwa, Y.; Calabia, B.P.; Ugwu, C.U. & Aiba, S. 2009. Biodegradability of plastics. **International Journal of Molecular Sciences, 10**(9), 3722–3742. https://doi.org/10.3390/ijms10093722

Tsukada, E.; Fernandes, E.; Vidal, C. & Salla, R.F. 2021. Beach morphodynamics and its relationship with the deposition of plastic particles: a preliminary study in southeastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin, 172**: 112809. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112809

Turra, A.; Manzano, A.B.; Dias, R.J.S.; Mahiques, M.M.; Barbosa, L.; Balthazar-Silva, D. & Moreira, F.T. 2014. Three-dimensional distribution of plastic pellets in sandy beaches: shifting paradigms. **Scientific Reports, 4**: 4435. https://doi.org/10.1038/srep04435

Velez, J.F.M.; Shashoua, Y.; Syberg, K. & Khan, F.R. 2018. Considerations on the use of equilibrium models for the characterization of HOC-microplastic interactions in vector studies. **Chemosphere, 210**: 359–365. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.020

Vered, G.; Kaplan, A.; Avisar, D. & Shenkar, N. 2019. Using solitary ascidians to assess microplastic and phthalate plasticizers pollution among marine biota: a case study of the Eastern Mediterranean and Red Sea. **Marine Pollution Bulletin, 138**: 618–625. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.12.013

von Moos, N.; Burkhardt-Holm, P. & Köhler, A. 2012. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. **Environmental Science & Technology, 46**(20): 11327–11335. https://doi.org/10.1021/es302332w

Walkinshaw, C.; Lindeque, P.K.; Thompson, R.; Tolhurst, T. & Cole, M. 2019. Microplastics and seafood: lower trophic organisms at highest risk of contamination. **Ecotoxicology and Environmental Safety, 190**: 110066. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110066

Wang, W.; Gao, H.; Jin, S.; Li, R. & Na, G. 2019. The ecotoxicological effects of microplastics on aquatic food web, from primary producer to human: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety, 173**: 110–117. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.113

Wang, D.; Su, L.; Ruan, H.D.; Chen, J.; Lu, J.; Lee, C.H. & Jiang, S.Y. 2021a. Quantitative and qualitative determination of microplastics in oyster, seawater and sediment from the coastal areas in Zhuhai, China. **Marine Pollution Bulletin**, **164**: 112000. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112000

Wang, F.; Wu, H.; Wu, W.; Wang, L.; Liu, J.; An, L. & Xu, Q. 2021b. Microplastic characteristics in organismos of different trophic levels from Liaohe Estuary, China. **Science of The Total Environment, 789**: 148027. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148027

Yan, Z.; Zhao, H.; Zhao, Y.; Zhu, Q.; Qiao, R.; Ren, H. & Zhang, R. 2020. An efficient method for extracting microplastics from feces of different species. **Journal of Hazardous Materials, 384**: 121489. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121489

Yuan, J.; Ma., J.; Sun, Y.; Zhou, T.; Zhao, Y. & Yu, F. 2020. Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics. **Science of The Total Environment, 715**: 136968. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136968

Zhang, J.; Gao, D.; Li, Q.; Zhao, Y.; Li, L.; Lin, H.; Bi, Q. & Zhao, Y. 2020. Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* form the guts of wax moth *Galleria mellonella*. **Science of The Total Environment**, **704**: 135931. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135931

Ziajahromi, S.; Kumar, A.; Neale, P. A. & Leusch, F. D. L. 2018. Environmentally relevant concentrations of polyethylene microplastics negatively impact the survival, growth and emergence of sediment-dwelling invertebrates. **Environmental Pollution, 236**: 425–431. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.094