



Universidade de Aveiro Departamento de Química

Ano 2021

**Maria José Lopes  
Manana**

**Biodegradação de Microplásticos**

**Biodegradation of Microplastics**

**2020-2021**



**Maria José Lopes  
Manana**

**Biodegradação de Microplásticos**

**Biodegradation of Microplastics**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Teresa Rocha Santos, Investigadora Principal com Agregação do Departamento de Química e do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro.

## **O júri**

Presidente	<b>Professora Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Martins Leal</b> Professora auxiliar – Departamento de Química – Universidade de Aveiro
Orientadora	<b>Doutora Teresa Alexandra Peixoto da Rocha Santos</b> Investigadora principal com Agregação do Departamento de química e do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), Universidade de Aveiro
Arguente	<b>Doutora Cristina Marisa Ribeiro de Almeida</b> Investigadora, CIIMAR – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental – Universidade do Porto

Agradeço à minha orientadora, Professora Teresa Rocha Santos, pela oportunidade de realizar o meu projeto de tese no seu laboratório, pela sua disponibilidade, orientação e acompanhamento ao longo de todo o percurso.

## **Agradecimentos**

Ao Professor Armando Duarte pelo conhecimento científico e disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas.

À Ana Paço por toda a ajuda, apoio, atenção, paciência e por todo o tempo despendido para me ajudar e responder às minhas dúvidas. Obrigada por sempre se ter mostrado muito prestável e muito acessível durante todo o tempo que estive no laboratório.

Aos meus amigos, especialmente à Ana Luísa, Beatriz, Laura, Raquel e Rute por todo o apoio demonstrado desde o início e pela força que me deram durante todo o tempo de universidade e não só. Obrigada, principalmente por toda a paciência que tiveram comigo e pela amizade, não desde sempre, mas para sempre.

À minha família, que sem eles nada era possível, mãe, pai, avós e Nuno pelo apoio incondicional e pela motivação transmitida sempre que foi preciso.

Obrigada!

## palavras-chave

Biodegradação, otimização, fungo, *Penicillium brevicompactum*, microplásticos, polietileno (PE), poliestireno (PS)

## resumo

A poluição causada por plástico no ambiente marinho afeta todo o ecossistema, tanto a nível ambiental como na própria sobrevivência de diversas espécies. A principal fonte, mas não exclusiva, é o plástico de “utilização única” em que após o seu pouco tempo de utilização é descartado.

Ainda que os resíduos de plástico sejam por vezes reciclados (32,5% dos resíduos) ou incinerados (42,6%), estes processos não são suficientes para eliminar todos os resíduos produzidos. Efetivamente, os restantes 24,9% acabam em aterros ou em cursos de água que os podem transportar para os oceanos. Milhares de plásticos e microplásticos estão presentes no meio marinho e são necessárias alternativas não só para eliminar o que já existe, mas também para práticas sustentáveis que diminuam a quantidade de plásticos produzida todos os anos, podendo estas passar por substituir cada vez mais o plástico por soluções “amigas do ambiente” e reutilizáveis.

A biodegradação poderá então surgir como uma solução para este problema. Neste trabalho foram realizadas 3 experiências diferentes, das quais, duas de biodegradação de microplásticos e uma de otimização do meio de cultura. Foi testada a capacidade do fungo *Penicillium brevicompactum*, para a degradação de dois tipos de plásticos, polietileno (PE) e poliestireno (PS). Uma vez que o fungo já tinha mostrado potencial na degradação de pellets de PE, foi testada a sua capacidade em amostras reais numa experiência de 28 dias. No caso do PS/EPS a experiência teve uma duração de 15 dias de forma a perceber se o fungo utilizava o microplástico como fonte de carbono. Para a experiência com o PE com diferentes densidades, HDPE e LDPE, foram alcançadas percentagens de remoção de microplástico na ordem dos  $8 \pm 8 \%$  e  $13 \pm 4 \%$ , respetivamente, ao fim de 28 dias. No caso do PS e EPS, ambos apresentaram percentagem de remoção de microplásticos, ao fim de 15 dias, de aproximadamente 15 %. Para o PS/EPS também foi realizada uma otimização do meio de cultura.

A biodegradação mostra-se como uma possível solução para a poluição de microplásticos, mas é necessário continuar a evitar práticas insustentáveis que levem ao aumento deste grande problema.

**keywords**

Biodegradation, optimization, fungi, *Penicillium brevicompactum*, microplastics, polyethylene (PE), polystyrene (PS)

**abstract**

The pollution caused by plastic in the marine environment is a crisis that worries the entire ecosystem, both in environmental terms and in the survival of several species. The main source, but not the only, is the “single use” plastic, which after a few times of use is often discarded.

Although plastic waste is sometimes recycled (32,5% of waste) or incinerated (42,6%), these processes are not sufficient to eliminate all the waste produced. The remaining 24,9% go to landfills or end up in water courses that transport them to the oceans. A great number of plastics and microplastics are present in the marine environment and alternatives are needed not only to eliminate what already exists, but also for sustainable practices that reduce the amount of plastics produced every year, which may increasingly replace plastic with “environmentally friendly” solutions and reusable.

Biodegradation could then emerge as a solution to this problem. In this work, 3 different experiments were carried out, two were biodegradation and one was the optimization of the culture medium. The capacity of the fungi *Penicillium brevicompactum*, was tested for the degradation of two types of plastics, polyethylene (PE) and polystyrene (PS). Since the fungus had already shown the potential to degrade PE pellets, its capacity was tested in real samples in a 28 days experiment. In the case of PS/EPS the experiment lasted 15 days in order to understand if the fungus used microplastics as a carbon source. For the experiment with PE with different densities, HDPE and LDPE, the percentages of microplastic removal were about  $8 \pm 8 \%$  e  $13 \pm 4 \%$ , respectively, after 28 days. In the case of PS and EPS, both showed a percentage of microplastics removal of approximately 15%, after 15 days. An optimization of the culture medium for PS/EPS was also carried out.

Biodegradation appears as a possible solution for the microplastics pollution, but it is necessary to continue to avoid unsustainable practices that lead to an increase of this problem.

## Índice

Lista de Figuras .....	ix
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Abreviações .....	xii
1. Introdução .....	1
1.1 Problemática dos Plásticos .....	1
1.2 Revisão da Literatura .....	3
1.2.1 Contextualização histórica dos plásticos .....	3
1.2.2 Embalagens de plástico mais utilizadas .....	8
1.2.3 A falta de respostas e a acumulação de poluição por lixos plásticos .....	11
1.2.4 Degradação de Plásticos.....	14
1.2.4.1 Degradação Mecânica .....	15
1.2.4.2 Fotodegradação ou degradação pela luz.....	15
1.2.4.3 Degradação Térmica .....	15
1.2.4.4 Degradação Química .....	16
1.2.5 Biodegradação de Microplásticos .....	16
1.2.5.1 Biodeterioração .....	17
1.2.5.2 Biofragmentação .....	18
1.2.5.3 Assimilação .....	18
1.3 Caracterização dos Plásticos .....	18
1.3.1 Polietileno (PE) .....	19
1.3.2 Poliestireno (PS).....	21
1.4 Caracterização do Fungo .....	22
1.4.1 <i>Penicillium brevicompactum</i> .....	23
1.5 Otimização das condições experimentais para a biodegradação do Poliestireno (PS) e poliestireno expandido (EPS).....	23
1.6 Objetivo.....	25
2. Materiais e Métodos .....	26
2.1 Microplásticos .....	26
2.2 Micro-organismo.....	27
2.3 Avaliação da capacidade de biodegradação dos microplásticos .....	28
2.4 Otimização do meio de cultura para os microplásticos Poliestireno e Poliestireno Expandido .....	31

2.5	Análise das amostras .....	34
3.	Resultados e Discussão .....	36
3.1.	Biodegradação do microplástico Polietileno usando o fungo <i>Penicillium brevicompactum</i> 36	
3.2	Biodegradação com o fungo <i>Penicillium brevicompactum</i> inoculado no meio com os microplásticos de poliestireno e poliestireno expandido.....	54
3.3	Otimização do meio de cultura para a biodegradação dos microplásticos Poliestireno e Poliestireno expandido pelo fungo <i>Penicillium brevicompactum</i> .....	63
3.	Conclusões e perspectivas futuras.....	73
4.	Bibliografia .....	75
5.	Anexos.....	83



## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Evolução da produção de plástico no mundo desde o ano de 1950 a 2015. Adaptado de Richie and Roser, disponível em <a href="https://ourworldindata.org/plastic-pollution">https://ourworldindata.org/plastic-pollution</a> <sup>19</sup> .....	4
<b>Figura 2.</b> Classes de plásticos que são frequentemente encontrados no ambiente. Adaptado de Andrady <sup>28</sup> .....	7
<b>Figura 3.</b> Distribuições de tempo de vida do produto para 8 setores. Retirado de Geyer, R. et al <sup>41</sup> .....	9
<b>Figura 4.</b> Produção de plástico por sector no ano de 2017. Adaptado de Statista, disponível em <a href="https://www.statista.com/statistics/1134796/plastic-production-by-industrial-sector-worldwide/">https://www.statista.com/statistics/1134796/plastic-production-by-industrial-sector-worldwide/</a> <sup>43</sup> .....	9
<b>Figura 5.</b> Procura dos plásticos na Europa por sector e por categoria de plástico. Retirado de (Plastics2020) <sup>21</sup> .....	10
<b>Figura 6.</b> Principais fontes de desperdício de plástico. Adaptado de “A european strategy for plastics in a circular economy” <sup>44</sup> .....	10
<b>Figura 7.</b> Uma laranja descascada e embalada em plástico. Retirado de CBS news disponível em <a href="https://www.cbsnews.com/news/whole-foods-responds-to-6-pre-peeled-orange-twitterstorm/">https://www.cbsnews.com/news/whole-foods-responds-to-6-pre-peeled-orange-twitterstorm/</a> <sup>47</sup> .....	12
<b>Figura 8.</b> Estrutura do polímero polietileno, à esquerda. Símbolos representados nas embalagens de polietileno representando o tipo de plástico utilizado, à direita.....	20
<b>Figura 9.</b> Estrutura do polímero poliestireno, à esquerda. Símbolo representado nas embalagens de poliestireno representando o tipo de plástico utilizado, à direita.....	21
<b>Figura 10.</b> Fotografias de fragmentos de HDPE (a) e LDPE (b) utilizados nas experiências. ....	26
<b>Figura 11.</b> Fragmentos de PS (a) e EPS (b) utilizados nas experiências. ....	27
<b>Figura 12.</b> Fotografias do fungo <i>P. Brevicompectum</i> num meio de crescimento a), e três exemplos de formas de crescimento do fungo i), ii) e iii). ....	28
<b>Figura 13.</b> Erlenmeyers com meio de cultura, após esterilização, preparados para a inoculação com o fungo <i>P. brevicompactum</i> . ....	29
<b>Figura 14.</b> Filtração dos meios de cultura, fungos e microplásticos. ....	30
<b>Figura 15.</b> Meios de cultura, fungos e plásticos separados por filtração e guardados nos respetivos frascos.....	30
<b>Figura 16.</b> Experiência de otimização do PS. Erlenmeyers com meio de cultura antes (imagem superior) e após (imagem inferior) a autoclavagem. ....	34
<b>Figura 17.</b> Análise de amostras de plásticos no FTIR-ATR.....	35
<b>Figura 18.</b> Amostras do saco de plástico de polietileno retiradas após 21 dias de incubação (primeira experiência).....	36
<b>Figura 19.</b> Fungo <i>P. brevicompactum</i> e plásticos após vinte e oito, e sete dias, à esquerda e à direita, respetivamente. ....	37
<b>Figura 20.</b> Espectro infravermelho na região dos 4000-500 $\text{cm}^{-1}$ de uma amostra de fungo <i>P. brevicompactum</i> (sem contacto com microplástico).....	40
<b>Figura 21.</b> Espectro infravermelho na região dos 4000-500 $\text{cm}^{-1}$ do fungo <i>P. brevicompactum</i> nas amostras de controlos e réplicas na presença do plástico HDPE. ....	41
<b>Figura 22.</b> Espectro infravermelho na região dos 4000-500 $\text{cm}^{-1}$ do fungo <i>P. brevicompactum</i> nas amostras de controlos e réplicas na presença do plástico LDPE. ....	41

<b>Figura 23.</b> Espectros $^{13}\text{C}$ RMN de quatro amostras do fungo <i>Penicillium brevicompactum</i> . “1” réplica do fungo ao fim dos 28 dias de experiência que esteve em contacto com o plástico do saco, “2” com o plástico do iogurte, “3” ao fungo de 0 dias e “4” ao controlo de fungo ao fim de 28 dias .....	42
<b>Figura 24.</b> Separação dos microplásticos LDPE do fungo liofilizado (superior esquerda) e fotografia em microscópio dos microplásticos em contacto com o fungo (a-LDPE e d-HDPE) e os controlos (b-LDPE e c-HDPE).....	47
<b>Figura 25.</b> Imagens obtidas pelo SEM de amostras de plástico. I-Amostra original I; S-Amostra original S; A-controlo I; B-controlo S; C-Réplica I; D-Réplica S. As imagens “ii” são fotografias ampliadas do plástico correspondente. ....	49
<b>Figura 26.</b> Espectro de infravermelho do plástico sem exposição ao fungo da amostra do iogurte (I-HDPE) e do saco de plástico (S-LDPE) obtidos. ....	50
<b>Figura 27.</b> Espectro infravermelho na região dos $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ dos controlos e réplicas (em contacto com o fungo <i>P. brevicompactum</i> ) do plástico HDPE ao longo das quatro semanas da experiência. ....	50
<b>Figura 28.</b> Espectro infravermelho na região dos $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ dos controlos e réplicas (em contacto com o fungo <i>P. brevicompactum</i> ) do plástico LDPE ao longo das quatro semanas de experiência. ....	51
<b>Figura 29.</b> Espectro infravermelho na região dos $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ do fungo <i>P. brevicompactum</i> nas amostras de controlos e réplicas na presença de microplástico de PS. ....	56
<b>Figura 30.</b> Espectro infravermelho na região dos $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ do fungo <i>P. brevicompactum</i> nas amostras de controlos e réplicas na presença de microplásticos de EPS. ....	56
<b>Figura 31.</b> Fotografia dos microplásticos das amostras de controlo (a-PS; c-EPS) e réplicas que estiveram em contacto com o fungo <i>P. brevicompactum</i> (b-PS; d-EPS) .....	59
<b>Figura 32.</b> Espectros de infravermelho dos microplásticos de PS e de EPS virgens (sem exposição ao fungo <i>P. brevicompactum</i> ).....	60
<b>Figura 33.</b> Espectro infravermelho na região dos $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ dos controlos e amostras do microplástico de PS para as três paragens. ....	60
<b>Figura 34.</b> Espectro infravermelho na região dos $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ dos controlos e amostras do microplástico de EPS para as três paragens.....	61
<b>Figura 35.</b> Fotografias dos 20 frascos no final da experiência de otimização do PS (superior) e EPS (inferior).....	68

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Plásticos mais utilizados no cotidiano, as suas estruturas e os principais usos. Adaptado de Shah AA et al. <sup>33</sup> .....	6
<b>Tabela 2.</b> Matriz obtida a partir do método CCD para três variáveis. ....	32
<b>Tabela 3.</b> Concentrações (g/L) de cada componente de meio de cultura (glucose, extrato de malte e peptona) obtido a partir do método CCD.....	33
<b>Tabela 4.</b> Biomassa inoculada (fungo <i>P. brevicompactum</i> ), final e a sua percentagem de crescimento após 7, 14, 21 e 28 dias (segunda experiência) na amostra de HDPE (iogurte). ....	38
<b>Tabela 5.</b> Biomassa inoculada (fungo <i>P. brevicompactum</i> ), final e a sua percentagem de crescimento após 7, 14, 21 e 28 dias (segunda experiência) na amostra de LDPE (saco). .	39
<b>Tabela 6.</b> Desvio químico (ppm) correspondentes às alterações químicas que ocorrem nos espectros <sup>13</sup> C RMN.....	43
<b>Tabela 7.</b> Percentagens de carbono, hidrogênio, azoto e enxofre, para as amostras de fungo - 28_I/S_C2 (A); 28_I_R1 (B); 28_S_R4 (C); fungo de 0 dias (D). ....	44
<b>Tabela 8.</b> Percentagem de microplásticos (MP) removidos (segunda experiência de 28 dias) com amostra HDPE (iogurte) na presença do fungo <i>P. brevicompactum</i> . ....	45
<b>Tabela 9.</b> Percentagem de microplásticos (MP) removidos (segunda experiência de 28 dias) com amostra LDPE (saco) na presença do fungo <i>P. brevicompactum</i> .....	46
<b>Tabela 10.</b> Absorvâncias obtidas para os comprimentos de onda 1600 e 1471 cm <sup>-1</sup> e índice do carbonilo correspondente relativo ao PE da segunda experiência de 28 dias, a) HDPE (I); b) LDPE (S). ....	52
<b>Tabela 11.</b> Biomassa inoculada de fungo <i>P. brevicompactum</i> (g), final e a sua percentagem de crescimento durante a experiência de 15 dias no meio inoculado com microplásticos de PS.....	54
<b>Tabela 12.</b> Biomassa inoculada de fungo <i>P. brevicompactum</i> (g), final e a sua percentagem de crescimento durante a experiência de 15 dias no meio inoculado com microplásticos de EPS. ....	55
<b>Tabela 13.</b> Percentagem de microplásticos (MP) de PS removidos ao longo da experiência de 15 dias na presença do fungo <i>P. brevicompactum</i> . ....	57
<b>Tabela 14.</b> Percentagem de microplásticos (MP) de EPS removidos ao longo da experiência de 15 dias na presença do fungo <i>P. brevicompactum</i> . ....	58
<b>Tabela 15.</b> Índice carbonilo relativo aos microplásticos de PS e de EPS da experiência de 15 dias.....	62
<b>Tabela 16.</b> Massas (g) e concentrações (g/L) dos componentes do meio de cultura correspondentes a cada Erlenmeyer para a otimização com o PS. ....	63
<b>Tabela 17.</b> Massas (g) e concentrações (g/L) componentes do meio de cultura correspondentes a cada Erlenmeyer para a otimização com o EPS. ....	64
<b>Tabela 18.</b> Biomassa inoculada de fungo <i>P. brevicompactum</i> (g), final e a sua percentagem de crescimento durante a experiência de 28 dias no meio inoculado com microplásticos de PS.....	65
<b>Tabela 19.</b> Biomassa inoculada de fungo <i>P. brevicompactum</i> (g), final e a sua percentagem de crescimento durante a experiência de 28 dias no meio inoculado com microplásticos de EPS. ....	65
<b>Tabela 20.</b> Percentagem de microplásticos (MP) de PS removidos ao longo da experiência de 28 dias na presença do fungo <i>P. brevicompactum</i> . ....	66

<b>Tabela 21.</b> Percentagem de microplásticos (MP) de EPS removidos ao longo da experiência de 28 dias na presença do fungo <i>P. brevicompactum</i> .....	67
<b>Tabela 22.</b> Valores de graus de liberdade (GL), soma dos quadrados ajustados (SQaj), quadrados médios ajustados (QMaj), F e P obtidos com “Minitab 19” para a otimização do meio de cultura (glucose, extrato de malte e peptona) para o PS.....	69
<b>Tabela 23.</b> Valores obtidos para as concentrações ótimas para o ensaio com PS. ....	70
<b>Tabela 24.</b> Valores de graus de liberdade (GL), soma dos quadrados ajustados (SQaj), quadrados médios ajustados (QMaj), F e P obtidos com “Minitab 19” para a otimização do meio de cultura (glucose, extrato de malte e peptona) para o EPS. ....	71
<b>Tabela 25.</b> Valores obtidos para as concentrações ótimas para o ensaio com EPS.....	72
<b>Tabela 26.</b> Biomassa inoculada (fungo <i>P. brevicompactum</i> ), final e a sua percentagem de crescimento após 7, 14, 21 e 28 dias (primeira experiência) amostra de HDPE (iogurte)..	83
<b>Tabela 27.</b> Biomassa inoculada (fungo <i>P. brevicompactum</i> ), final e a sua percentagem de crescimento após 7,14, 21 e 28 dias (primeira experiência) na amostra de LDPE (saco)...	84
<b>Tabela 28.</b> Percentagem de microplásticos (MP) removidos (primeira experiência de 28 dias) com amostra HDPE (iogurte) na presença do fungo <i>P. brevicompactum</i> . ....	85
<b>Tabela 29.</b> Percentagem de microplásticos (MP) removidos (primeira experiência de 28 dias) com amostra LDPE (saco) na presença do fungo <i>P. brevicompactum</i> . ....	87

#### Lista de Abreviações

ASTM	Sociedade Americana de Testes e Materiais
CCD	<i>Central Composite Design</i>
DOE	<i>Design of Experiments</i>
EPS	Poliestireno expandido
FTIR-ATR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
HDPE	Polietileno de alta densidade
LDPE	Polietileno de baixa densidade
LLDPE	Polietileno linear de baixa densidade
MDPE	Polietileno de média densidade
MP	Microplásticos
NOAA	<i>National Oceanic and Atmospheric Administration</i>
PE	Polietileno
PET	Polietileno tereftalato
POPs	Poluentes orgânicos persistentes
PP	Polietileno
PS	Poliestireno
PVC	Policloreto de vinilo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SEM	Microscópio Eletrónico de varrimento



## 1. Introdução

### 1.1 Problemática dos Plásticos

O plástico é um material muito utilizado no cotidiano de uma sociedade desenvolvida devido às suas propriedades específicas como durabilidade, força, leveza, transparência e versatilidade. É um material muito útil, oferecendo soluções em diversas áreas, desde a construção, equipamentos, saúde até ao embalamento e/ou conservação de alimentos<sup>1,2</sup>. O problema surge quando o plástico é usado apenas uma vez, durante minutos ou meros segundos, pois sendo um material leve e barato, o descarte torna-se mais fácil de justificar<sup>3</sup>. Após descarte, permanece no ambiente durante longos períodos de tempo devido à sua demorada e difícil degradação. O problema do descarte de plásticos no ambiente pode ser ainda exacerbado pela produção dos mesmos, nomeadamente em países sem controlo de emissões, visto que pode ser responsável pela libertação de substâncias tóxicas para o ar, prejudicando tanto quem trabalha como comunidades localizadas na região de produção<sup>4</sup>.

Atualmente, o uso excessivo de vários tipos de plásticos, sobretudo de “utilização única” - destacando-se embalagens, palhinhas, sacos, copos e talheres descartáveis - é um problema gravíssimo de poluição que pode ser evitado e esperançosamente, no futuro, eliminado por completo. Tanto para a comunidade científica como para a sociedade em geral, a poluição de plásticos tem vindo a tornar-se cada vez mais um assunto alarmante. Alguns dos plásticos podem mesmo possuir produtos químicos perigosos, aditivos, que proporcionam melhores características e aumentam o tempo de vida do material. Alguns dos mais utilizados são, por exemplo, plastificantes, estabilizadores de luz e calor, e pigmentos<sup>5</sup>.

Tanto a poluição dos plásticos como a presença destes compostos colocam em causa a vida dos organismos. No ambiente marinho, os resíduos de plásticos podem também representar uma fonte de poluentes orgânicos persistentes (POPs), muitas vezes tóxicos, que se aderem à superfície do material<sup>6</sup>.

O plástico está praticamente distribuído por toda a superfície do planeta, até mesmo em locais pouco habitados, consequência das fortes correntes marinhas que transportam os

plásticos e microplásticos durante milhares de quilómetros. Relatado por um artigo do “*The Guardian*”, numa ilha desabitada do pacífico foram encontrados 38 milhões de pedaços de lixo, maioritariamente compostos por plástico<sup>7</sup>.

Tornando a perspetiva ainda pior, o plástico divide-se gradualmente em partes mais pequenas, os microplásticos que afetam em muito os ecossistemas. Mesmo com o controlo da poluição de plásticos de maior dimensão, prevê-se que a poluição de micro e nanoplásticos no ambiente marinho cresça devido à fragmentação do lixo de plástico de maiores dimensões já existente. O quadro atual é de tal modo problemático que os microplásticos já se encontram presentes na nossa alimentação<sup>8</sup>, água<sup>9</sup> e ar<sup>10</sup>.

Presentemente, e depois de um elevado volume de notícias, estudos e investigações comprovando o impacto ambiental proveniente do uso massivo de plástico, as organizações têm vindo a alertar para a eliminação e substituição deste material por outros que sejam biodegradáveis, ou seja, que ao chegar ao ambiente se decomponham de forma natural pela ação de microrganismos como fungos, bactérias ou algas<sup>11</sup>. Uma notícia animadora é a eliminação gradual de plásticos descartáveis que alguns países se comprometeram a realizar, nomeadamente Portugal, que se começou a observar já em julho de 2021 com “uma redução quantitativa mensurável do consumo dos produtos de plástico de utilização única”<sup>12</sup>. Em relação à Europa, a Comissão Europeia tem como objetivo em 2030 que todas as embalagens de plástico sejam recicláveis, o que proporcionará a chamada economia circular<sup>13</sup>. No entanto, devido à atual situação de pandemia devido à COVID-19, é possível que se verifiquem alterações aos planos desta medida.

A biodegradação de (micro)plásticos apresenta outra possível solução para amenizar o grave problema da poluição. O uso de microrganismos, nomeadamente os fungos marinhos<sup>14</sup>, que utilizam como fonte de energia estes polímeros será certamente uma nova alternativa para combater este tão atual e arrasador desafio, tendo já sido comprovada a sua eficiência por um exemplo da biodegradação de polietileno<sup>15</sup>, o que ajudaria na redução dos resíduos produzidos.

## 1.2 Revisão da Literatura

### 1.2.1 Contextualização histórica dos plásticos

O termo “polimérico”, que veio dar origem a “polímero”, surge no ano de 1832 por um químico sueco. Polímeros designam macromoléculas estruturais, no entanto, o termo polímero por si só não garante que se esteja perante uma espécie de cadeia longa e alto peso molecular. Surge então, para esclarecer esta questão, o termo “macromolécula”, como definição para cadeias poliméricas de cadeia longa<sup>16</sup>. O termo “polímero” refere-se a uma molécula; já o vocábulo “plástico”, muitas vezes associado ao conceito anterior, refere-se à forma física e às propriedades de um sólido. No entanto, nos dias de hoje, como a maioria dos polímeros apresenta a capacidade de plasticidade são normalmente designados como plásticos<sup>16</sup>.

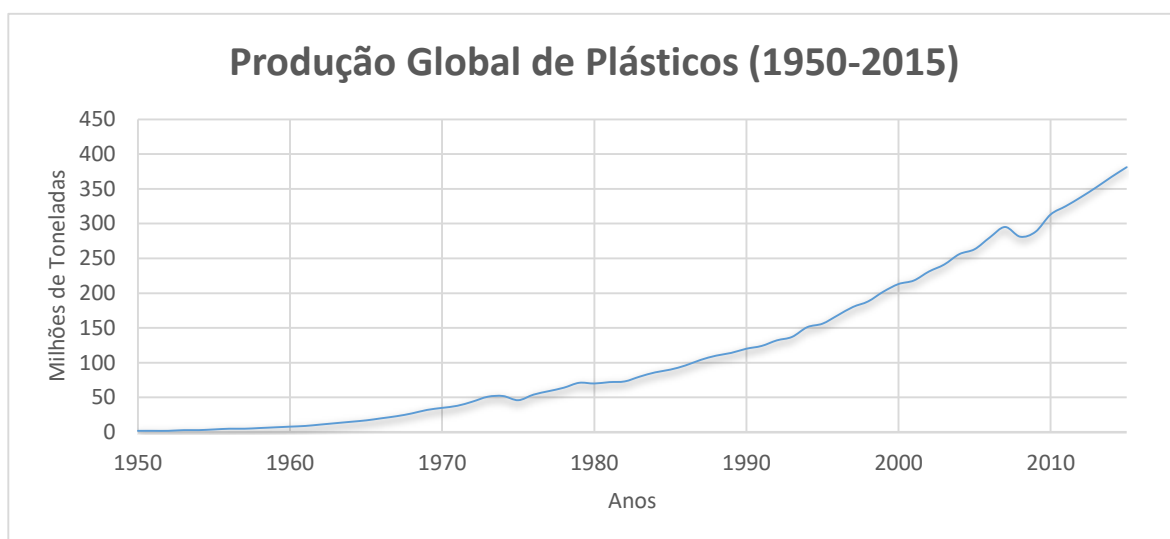
O termo “Plástico” é então usado para classificar um objeto que “pode ser moldado ou adequado para ser moldado”<sup>1</sup>, que possui propriedades físicas e comportamentos próprios para cada exemplar. Hoje em dia, “plástico” é uma palavra que engloba diversos materiais com variadas propriedades e características, sendo cada tipo diferente dos demais. É possível categorizar estes materiais em termoplásticos e termorrígidos em que os primeiros se caracterizam pela reação à temperatura, podendo alterar a sua forma, ou seja, podem ser derretidos quando aquecidos ou endurecidos quando arrefecidos, sendo materiais com propriedades reversíveis. Por outro lado, o segundo grupo é constituído por plásticos que quando aquecidos, passam por uma alteração química e se tornam num material irreversível que não pode voltar a sofrer modificações<sup>1</sup>.

Os plásticos surgiram devido à necessidade de substituir os materiais provenientes de animais como carapaças de tartaruga, marfim e ossos, que eram os mais utilizados pelos antepassados, mas que eram mais difíceis de encontrar e existiam em quantidade insuficiente para a procura da sociedade moderna. O uso do plástico trouxe também avanços na segurança e higiene, melhorando drasticamente as condições de vida das populações. Milhares de materiais hoje em dia são fabricados a partir dos diversos tipos de plásticos, com as diferentes propriedades características de cada um, proporcionando uma vasta gama de



materiais únicos e versáteis para as mais variadas áreas de aplicação <sup>17</sup>, como por exemplo, embalagens para acondicionamento de alimentos que diminuem o risco de danificação ou contaminação dos mesmos.

Efetivamente, desde que em 1907 surgiu o primeiro plástico sintético, a chamada baquelite, a produção não só nunca mais parou, como tem vindo sempre a aumentar, tal como se pode observar na **Figura 1** (em 2015 registou-se um valor de 381 milhões de toneladas). Em 2020 alcançou-se uma produção de plástico de 367 milhões de toneladas, diminuindo cerca de 0,3% comparativamente ao ano anterior<sup>18</sup>.



**Figura 1.** Evolução da produção de plástico no mundo desde o ano de 1950 a 2015. Adaptado de Richie and Roser, disponível em <https://ourworldindata.org/plastic-pollution> <sup>19</sup>.

Foram desenvolvidos procedimentos e técnicas para produzir cada vez mais e mais “modernos” produtos com plásticos<sup>20, 19</sup>. Sendo um material que pode ter diversos fins, é capaz de solucionar diversos desafios e necessidades que as sociedades e o consumo das mesmas vão enfrentando. Globalmente, só no ano de 2019, a produção de plástico alcançou um número de 368 milhões de toneladas, valor superior ao registado no ano anterior. Na Europa, pelo contrário, verificou-se um decréscimo de 61,8 milhões de toneladas para 57,9<sup>21</sup>. Do plástico produzido e utilizado mundialmente, e segundo dados de 2017 estima-se que 12 milhões de toneladas por ano de lixo plástico acabem nos oceanos<sup>22</sup>, representado cerca de 80% do lixo marinho. Já na União Europeia calcula-se que entre 150 000 e 500 000 toneladas de plástico acabem ou sejam depositados nos oceanos<sup>23</sup>.

No entanto, a maioria dos plásticos é produzida a partir de combustíveis fósseis<sup>21</sup>, uma matéria-prima comprovadamente insustentável e que deve ser gradualmente abandonada, sendo a sua alternativa o uso de bioplásticos. Os bioplásticos (assim definidos pela “*European Bioplastics*” caso sejam de base biológica (biomassa, como celulose), biodegradáveis (em que os microrganismos são capazes de os transformar noutras substâncias) ou ambas<sup>24</sup>) são uma alternativa com possivelmente menores impactos ambientais e maior sustentabilidade comparando com os plásticos convencionais que têm origem em combustíveis fósseis. Porém, acabam por ser produtos mais caros e consequentemente com baixa quota de mercado <sup>21</sup>.

Foi em parte graças ao baixo custo de produção dos plásticos produzidos a partir de combustíveis fósseis que, como já foi mencionado, se popularizaram os produtos de uso único feitos desse material que após serem descartados se tornaram um agente poluidor em diversos ambientes, especialmente nos aquáticos. Este problema de poluição começou na década de 50 do século passado, com o início da produção dos plásticos, tendo vindo a agravar-se até à atualidade, sendo possível observar nos dias de hoje muitos detritos de plásticos a flutuar na superfície das águas<sup>25</sup>. Com efeito, em 2014, estimava-se que 5,25 trilhões de partículas de plástico flutuassem nos oceanos<sup>26, 27</sup>. Esta situação é também preocupante para a vida animal como tartarugas e aves marinhas, calculando-se que pelo menos 44% destes animais ingeriram estes detritos<sup>28</sup>.

Esta situação foi sendo notada pela comunidade científica, pelo que nos anos de 70 aparece o primeiro artigo na literatura referindo o aparecimento de detritos de plástico no oceano Atlântico<sup>29</sup>. Ainda assim, a consciencialização para este problema só começou a crescer na década seguinte e foi só já em 2011 que se realizou a primeira conferência relacionada com o lixo plástico nos oceanos, organizada pela NOAA (*National Oceanic and Atmospheric Administration*) <sup>25</sup>.

Relativamente ao conceito de microplásticos, as origens deste não são tão conhecidas, mas foi mencionado no ano de 1990 quando foram encontrados fragmentos de plásticos de pequenas dimensões em praias<sup>30</sup>. Nesta altura ainda não havia consenso sobre qual o tamanho máximo que cada partícula poderia ter para ser considerada microplástico, e

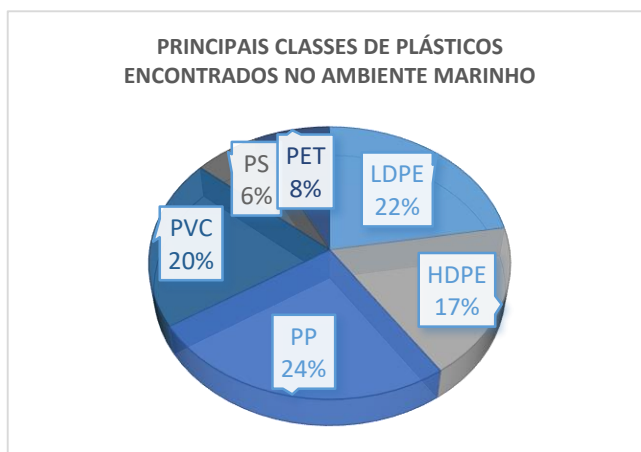
essa discussão só foi esclarecida em 2008<sup>25</sup>. Microplásticos são então pequenas partículas produzidas num tamanho reduzido, como pellets ou granulados (origem primária) ou que estiveram sujeitas a algum tipo de desgaste ou deterioração e são provenientes de materiais plásticos maiores (origem secundária)<sup>25,31</sup>. De acordo com a NOAA, um microplástico é assim classificado caso possua um tamanho inferior a 5 mm. Por outro lado, caso tenha uma dimensão de menos de 100 nm é denominado nanoplástico. Mesoplásticos entre 0,5 e 2,5 cm e por fim macroplásticos são assim intitulados ao possuir um tamanho superior a 2,5 cm<sup>32</sup>.

Dos vários plásticos existentes, cada tipo apresenta propriedades específicas que o torna mais adequado para determinados usos, havendo conseqüentemente alguns tipos mais utilizados do que os outros. Pela sua utilização mais frequente, esses existem também em maior quantidade no ambiente marinho, devido à já mencionada falta de preocupação com o seu descarte. São eles o Polietileno (PE) (de alta densidade (HDPE) ou de baixa densidade (LDPE)), o Polipropileno (PP), o Policloreto de vinilo (PVC), o Poliestireno (PS), (incluindo o expandido, EPS) e o Polietileno tereftalato (PET)<sup>33</sup>. Na **Tabela 1** estão representadas as estruturas de cada um deles e os seus principais usos na sociedade.

**Tabela 1.** Plásticos mais utilizados no quotidiano, as suas estruturas e os principais usos. Adaptado de Shah AA et al.<sup>33</sup>.

Plástico	Estrutura	Principais usos
PE	$(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)_n$	Sacos de plástico, algumas garrafas, filmes de embalagens de alimentos, brinquedos
PP	$(-\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}}-)_n$	Tampas de garrafa, palhinhas, material automóvel
PVC	$(-\text{CH}_2-\overset{\text{Cl}}{\underset{ }{\text{CH}}}-)_n$	Certos equipamentos de várias indústrias, construção, algumas garrafas, material de eletricidade
PS	$(-\text{CH}_2-\overset{\text{C}_6\text{H}_5}{\underset{ }{\text{CH}}}-)_n$	Copos descartáveis, materiais de embalagens, alguns usos eletrónicos
PET	$(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}-\text{O}-)_n$	Garrafas de água, embalagens alimentares, algumas fibras

Dos muitos resíduos destes plásticos que acabam no ambiente marinho, aquele que se encontra em maior percentagem é o polipropileno, com 24%. Seguidamente surge o polietileno de baixa densidade, constituindo 22% dos plásticos encontrados nesse ambiente, e logo de seguida o policloreto de vinilo. Em menor quantidade aparecem o polietileno tereftalato, representando 8%, e o poliestireno, 6%, como se pode observar na **Figura 2**<sup>28</sup>.



**Figura 2.** Classes de plásticos que são frequentemente encontrados no ambiente. Adaptado de Andrady <sup>28</sup>.

Para solucionar a problemática da presença destes plásticos no ambiente, são então necessárias práticas sustentáveis que diminuam a quantidade de plásticos produzida todos os anos. Estas poderão passar por substituir cada vez mais o plástico por soluções “amigas do ambiente”, isto é, alternativas sustentáveis, reutilizáveis e biodegradáveis. É, portanto, necessário alterar os maus hábitos de consumo, respeitando cada vez mais o nosso meio envolvente.

Apesar de virem a ser desenvolvidos métodos para a redução da poluição por plásticos, ainda nenhum é perfeito. Um exemplo é o que acontece com a reciclagem, em que a proporção de plásticos que são reciclados é na ordem dos 32,5% (dados relativos ao ano de 2018 globalmente), o que não demonstra de toda eficiência desta abordagem. Para além disso nem todos os plásticos são facilmente reciclados, pelo que são necessárias novas alternativas e práticas de consciencialização na sociedade para esta prática. A incineração aparece como outra alternativa, tendo já uma taxa de utilização na ordem dos 42,6%, mas a grande desvantagem desta prática é a consequente poluição do ar com gases tóxicos, em

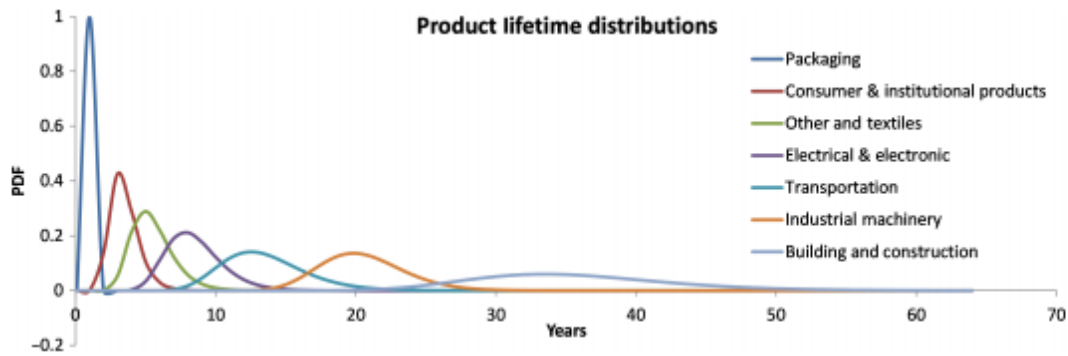
países em que não realizam efetivamente um controlo, prejudicando também o ambiente e, consequentemente, os seres vivos que nele habitam. É de notar ainda que alguma percentagem dos plásticos usados, 24,9%, permanece infelizmente no ambiente<sup>34</sup>.

### 1.2.2 Embalagens de plástico mais utilizadas

Também na área alimentar aumentou a utilização de plásticos por substituição dos materiais mais tradicionais de embalagem como o vidro, metal ou papel. São materiais leves, convenientes e práticos, e muitas vezes transparentes de forma que o consumidor possa observar o produto dentro da embalagem. Embalagens de plástico, em princípio, não alteram o sabor nem a qualidade do produto embalado, protegendo ainda da contaminação do exterior. Devido à sua versatilidade é possível embalar diversos produtos desde alimentos frescos, frutas e vegetais a bebidas e até iogurtes<sup>35</sup>. A segurança, higiene, preservação, transporte e armazenamento dos alimentos são fatores que foram melhorados com as embalagens de plástico, que oferecem proteção a nível químico, físico e microbiológico<sup>36</sup>. Os alimentos mais perecíveis são os que mais beneficiaram do embalamento com estes materiais, e no geral permitiu-se reduzir e evitar desperdícios e aumentar também o tempo de prateleira<sup>37, 38</sup>.

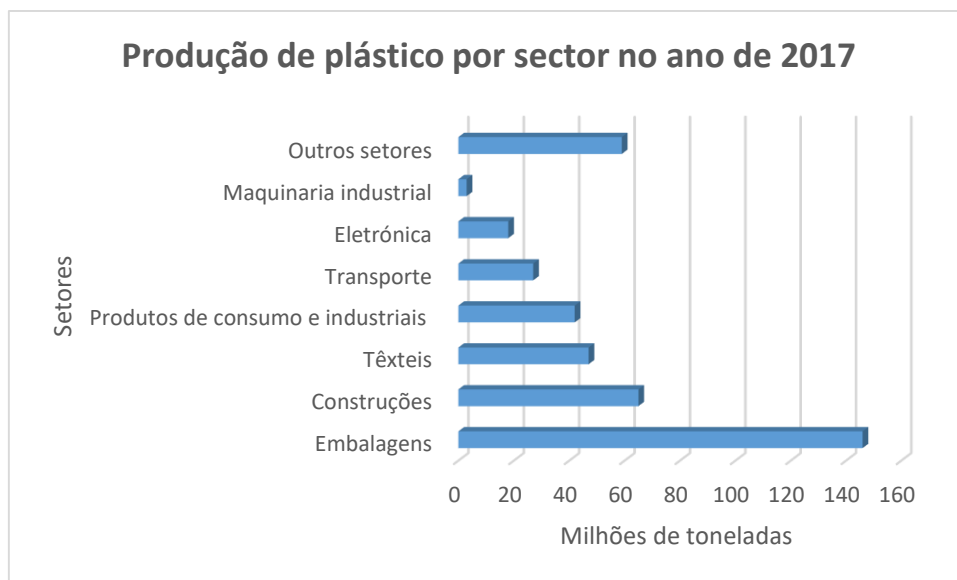
Ainda assim não se deve esquecer que muitos destes plásticos poderão ter na sua composição compostos químicos prejudiciais que estarão em contacto direto com os alimentos, podendo trazer alguns riscos à Saúde Humana, quando estes não são usados devidamente<sup>4,39</sup>. As bebidas e alimentos representam atualmente 85% do embalamento por plástico<sup>40</sup>, sendo que aproximadamente um terço da produção de resina plástica é destinada ao material de embalamento descartável. Não obstante, começa-se já a observar um esforço por várias pessoas em “voltar atrás no tempo” e optar por comprar “a granel” e por produtos não embalados, tentando evitar as embalagens de “utilização única” de plástico.

Outro fator agravante do uso de plásticos, para além da sua produção massiva, é o seu tempo de utilização, sendo os plásticos usados no embalamento a categoria dos plásticos que apresenta menor duração como ilustrado pela **Figura 3**<sup>41</sup>.



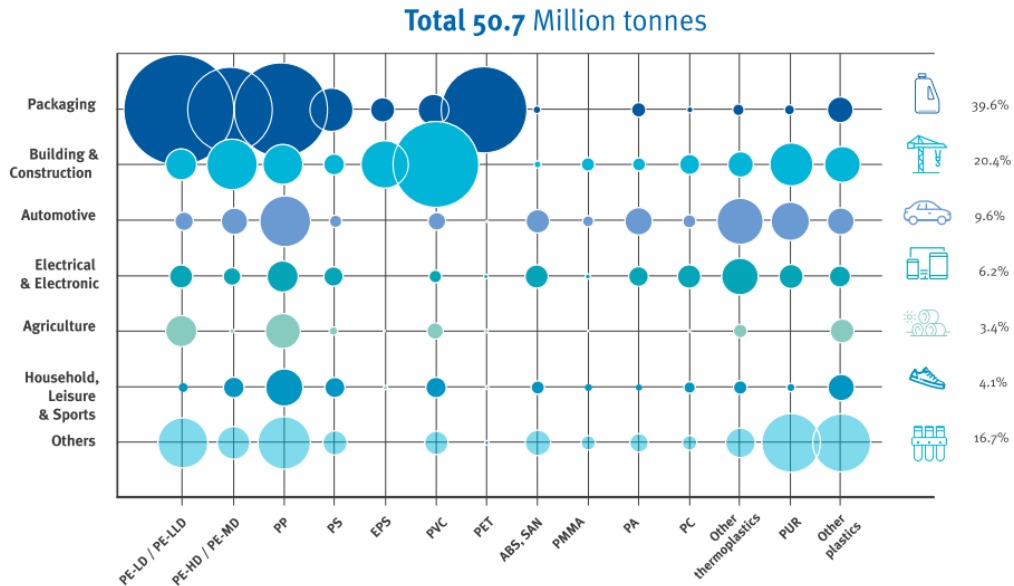
**Figura 3.** Distribuições de tempo de vida do produto para 8 setores. Retirado de Geyer, R. et al <sup>41</sup>.

Dos 146 milhões de toneladas gerados pela indústria de embalagens em 2017, a maior fatia, constituindo cerca de 42% da produção, foi de PE (HDPE -32%; HDPE -18%), seguido de PP (20%) e PET (18%)<sup>41</sup>. Em menores percentagens aparecem o PS (5%) e o PVC (2%)<sup>42</sup>. Segue-se se a indústria da construção numa percentagem de 19% dos plásticos fabricados, sendo neste caso o PVC o mais predominante (69%)<sup>41</sup>. Na **Figura 4** é possível observar as quantidades produzidas para cada secção de indústria, verificando o destaque das embalagens em relação a outros setores<sup>43</sup>.



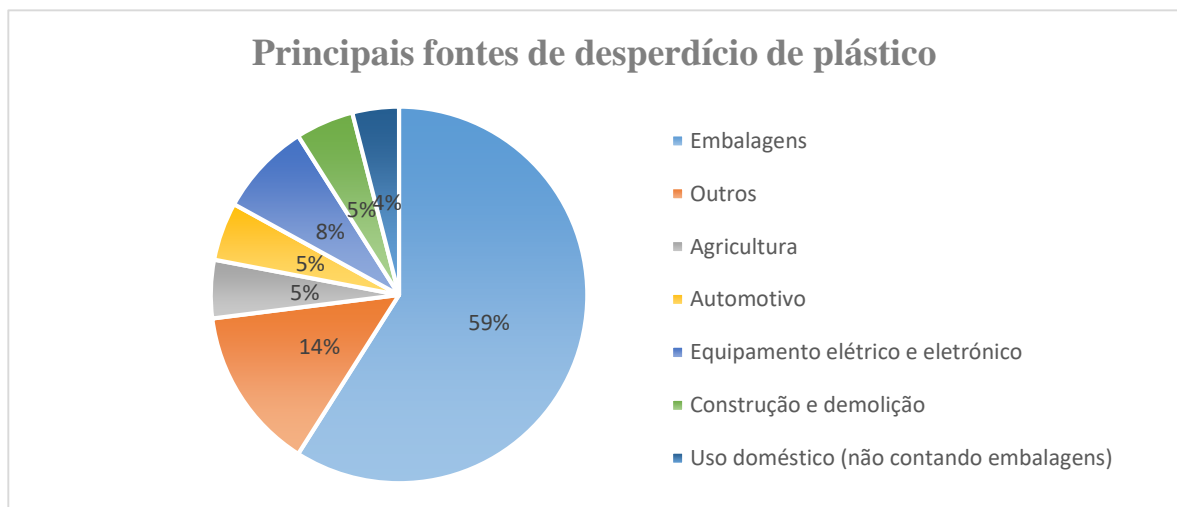
**Figura 4.** Produção de plástico por sector no ano de 2017. Adaptado de *Statista*, disponível em <https://www.statista.com/statistics/1134796/plastic-production-by-industrial-sector-worldwide/><sup>43</sup>.

Da mesma forma que em termos de produção as embalagens se destacam, também na procura esta tendência é corroborada. Em 2019 a procura por embalagens de plástico na Europa continuou a mais elevada comparando com outras indústrias. De um total de 50,7 milhões de toneladas de plástico, 39,6 % pertence às embalagens, como representado na **Figura 5**<sup>21</sup>.



**Figura 5.** Procura dos plásticos na Europa por sector e por categoria de plástico. Retirado de (*Plastics2020*)<sup>21</sup>.

Consequentemente, sendo as embalagens os plásticos mais procurados e produzidos, são também a maior fonte de resíduos, representando 59% dos mesmos no ano de 2018, como demonstrado pela **Figura 6**.



**Figura 6.** Principais fontes de desperdício de plástico. Adaptado de "A european strategy for plastics in a circular economy"<sup>44</sup>.

Ainda dentro da categoria das embalagens de plástico utilizadas destacam-se na UE as garrafas, que no ano de 2015 representaram uma quantidade de 1 664 882 toneladas, seguidas pelos copos e tampas<sup>42</sup>.

Perante estes dados, torna-se evidente a necessidade de criar medidas eficazes e urgentes para resolver o problema já existente do lixo plástico nos oceanos. É subsequentemente fundamental evitar que mais quantidades destes resíduos se continuem a acumular.

### 1.2.3 A falta de respostas e a acumulação de poluição por lixos plásticos

Embalagens das grandes empresas multinacionais de renome da área alimentar, nomeadamente a *Coca Cola*, *PepsiCo* e *Nestlé*, são as mais encontradas no ambiente<sup>45, 46</sup>. É precisamente da parte destas entidades que a inovação relativamente às embalagens de “utilização única” de origem fóssil deveria começar. No entanto, não podemos esquecer que fazer a troca por materiais biodegradáveis vai causar uma enorme pressão na natureza, pois os materiais como o papel ou os provenientes da agricultura são de fontes naturais que muitas vezes são sobre exploradas e causam o aumento da desflorestação<sup>45</sup>. As próprias empresas devem, portanto, pensar em novas formas de distribuir os seus produtos, sendo um desafio de inovação que envolve a sustentabilidade do planeta.

A sociedade moderna procura constantemente opções de embalamento novas e mais convenientes, ao ponto de parecer esquecer que muitas vezes os produtos no seu estado natural já possuem uma proteção a agressões exteriores eficiente. Deste modo, criam-se embalagens que, para facilitar a vida a um grupo reduzido de pessoas, ou para diminuir minimamente o esforço da preparação de alimentos, sacrifica a sustentabilidade do planeta. Um exemplo disso está ilustrado na **Figura 7**, em que uma cadeia de supermercados decidiu lançar um produto que consistia numa laranja descascada envolta por uma embalagem de plástico que irá ter certamente uma vida curta, pois após a compra e o consumo do produto a embalagem irá ser descartada imediatamente<sup>47</sup>. Neste caso, a embalagem é redundante, uma vez que a natureza produz este fruto com a própria casca com a função de o proteger. Produtos como este são inoportáveis num mundo já cheio de plástico, e em que se tornou



urgente evitar atitudes que possam beneficiar o ser humano sem considerar o impacto negativo que poderão ter sobre o mundo.



**Figura 7.** Uma laranja descascada e embalada em plástico. Retirado de *CBS news* disponível em <https://www.cbsnews.com/news/whole-foods-responds-to-6-pre-peeled-orange-twitterstorm/><sup>47</sup>.

Assim, para resolver o problema da acumulação de plásticos no mar, devem ser tomadas medidas, não só pelas grandes companhias já mencionadas, e que lançam produtos como o exemplo dado, mas também por todos os elementos da sociedade em geral. Começando pela consciencialização da população para o consumo sustentável, e/ou por uma rede de colaboração entre governos, produtores, consumidores e investigadores, bem como instaurando uma gestão de resíduos, podemos começar a resolver a crise dos plásticos. Através de legislações, regulamentações, incentivos e educação por parte dos governos de cada país, através de uma cooperação global, é possível começar a punir certos comportamentos poluidores. Por parte dos produtores, a solução passará pela criação de novas matérias-primas, práticas e investimentos de forma a alterar as embalagens como as conhecemos. Aos consumidores cabe a responsabilidade das compras conscientes e em reduzir, reutilizar e reciclar. A ciência também é muito importante nesta e noutras áreas envolventes como em pesquisa marinha, saúde ambiental e social. Por último, estas medidas deverão ser acompanhadas de uma gestão cuidada dos resíduos produzidos, da remoção do lixo e da sua possível utilização como novos recursos<sup>48</sup>. Reduzir a produção e procura de plástico, substituir o plástico por outras alternativas mais sustentáveis, implementar sistemas eficientes de reciclagem aumentando também a sua capacidade, e o *scale-up* dos processos químicos são portanto medidas para alcançar um mundo com poluição de plástico diminuída<sup>49</sup>.

Contudo, mesmo com a adoção das medidas propostas no parágrafo anterior para minimizar o problema da produção excessiva de plásticos, permanece por resolver a questão da imensa quantidade de plásticos já acumulada nos mares e oceanos. “ O lixo marinho pode ser definido como persistente, fabricado ou material sólido processado, descartado ou abandonado em ambientes costeiros e marinhos”<sup>50</sup>. As fontes do lixo marinho podem ser provenientes de terra, a partir de rios e praias, ou de atividades decorrentes nos oceanos, como pescas. As soluções para a sua eliminação passarão então por processos, técnicas, conhecimentos e instrumentos para pelo menos começar por diminuir os impactos desta poluição<sup>51</sup>. De acordo com os autores Williams e Rangel-Buitargo (2019) as soluções para o lixo marinho podem ser divididas em cinco categorias:

- a) Começando a abordagem pela construção de **conhecimento** acerca das fontes, extensão e os impactos do lixo de determinado local ou área, para mais facilmente surgirem opções de soluções, existem nesta categoria duas medidas a colocar em prática: a definição de método único e consensual para clarificar o lixo marinho, e a realização de investigação sobre o mesmo.
- b) A **prevenção** surge como a segunda categoria baseando-se em medidas com o objetivo de impedir a contínua entrada de resíduos no ambiente.
- c) As soluções de **mitigação**, a terceira categoria, consistem em atividades relacionadas com o ser humano, nomeadamente com a fomentação da economia circular, fortificação de cooperações, mudanças e inovações de produtos.
- d) A quarta categoria, **remoção**, como o próprio nome indica trata-se da eliminação e limpeza dos detritos já existentes no ambiente, sendo, todavia, esta a mais demorada e dispendiosa, e com o obstáculo de ser possível remover apenas uma pequena parte do que existe, os detritos de maior dimensão.
- e) Por último, é necessário alterar **comportamentos** da sociedade como um todo<sup>51</sup>.

Ainda que as outras categorias pareçam exequíveis, é na etapa de remoção dos lixos que se continua a observar a maior dificuldade. Neste contexto a degradação, ou mais especificamente a biodegradação dos plásticos, surge como uma solução a ter em conta, visto o demorado tempo de deterioração dos mesmos sem o auxílio desta técnica.

#### 1.2.4 Degradação de Plásticos

A degradação de plásticos é definida por Shal et al. (2008) como “qualquer mudança física ou química no polímero como resultado de fatores ambientais, como luz, calor, humidade, condições químicas ou atividade biológica”<sup>33</sup>, sendo que o peso molecular médio do material também sofre alterações<sup>28</sup>. O termo degradação refere-se então a uma série de reações químicas que quebram as estruturas dos polímeros e induzem modificações das suas propriedades. Pode ter origem em diversos processos e leva à fragmentação de polímeros e à consequente formação de microplásticos de origem secundária no ambiente. A degradação pode levar a mudanças de propriedades como a cor, superfície morfológica, cristalinidade, tamanho das partículas e densidade e também na sua funcionalidade<sup>52</sup>. A degradação é classificada de acordo com o que a causa, por exemplo, degradação biótica na qual se enquadra a biodegradação pela ação de organismos vivos, e a degradação abiótica, da qual fazem parte a fotodegradação (pela ação da luz), degradação térmica por (ação da temperatura) e hidrólise (por ação da água)<sup>28</sup>. É de notar, no entanto, que muitas vezes o início do processo de degradação tem origem em fatores ambientais ou abióticos que ajudam a enfraquecer a estrutura do plástico promovendo a sua deterioração<sup>53</sup>. Os mecanismos de degradação abiótica podem ser classificados segundo as categorias explicitadas nos pontos 1.2.4.1 a 1.2.4.4 da presente dissertação.

A partir de algumas técnicas como a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR), é possível determinar as estruturas dos monómeros, mostrando se ocorreram alterações causadas pela biodegradação, comparando com espectros do plástico original, ou seja, sem degradação, que são característicos de cada material. Quando uma determinada amostra é analisada pelo equipamento FTIR-ATR, neste caso os fungos e os microplásticos, é sujeita a radiação infravermelha (IR), que é absorvida, e obtém-se um espectro, neste caso um gráfico onde está representada no eixo das ordenadas a absorvância medida em função do comprimento de onda correspondente em  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>54</sup>

#### 1.2.4.1 Degradação Mecânica

A degradação mecânica pode ser originada a partir de forças de compressão e/ou tensão causadas por diversas fontes, como por ação do ar ou água, pressões causadas por questões climáticas como chuva ou neve, e até perturbações provocadas por animais. Neste tipo de degradação as alterações não são visíveis pelo ser humano, mas a nível molecular podem já estar presentes. Como complemento a esta degradação existe a temperatura, radiações solares ou compostos químicos<sup>53</sup>.

#### 1.2.4.2 Fotodegradação ou degradação pela luz

A degradação pela luz depende naturalmente da intensidade e da duração que um determinado plástico está sujeito a essas condições. O processo envolve energia transportada por fótons que podem então criar um estado de instabilidade em várias moléculas. A transferência de energia pode ser realizada por vários meios como a fotoionização, luminescência, fluorescência e radiação térmica. No entanto, nem todos os materiais são fotossensíveis sendo necessário primeiro adicionar estruturas moleculares para induzir esta degradação<sup>53</sup>. No ambiente marinho, é normalmente a radiação UV-B (~295-315 nm) da luz proveniente do sol que inicia a degradação foto-oxidativa<sup>28, 33</sup>.

#### 1.2.4.3 Degradação Térmica

Este tipo de degradação, em polímeros termoplásticos, ocorre quando o material é submetido a temperaturas muito elevadas que fazem com que o polímero se altere do estado sólido para líquido. Normalmente, a temperatura do meio ambiente é inferior à temperatura necessária para que ocorram alterações, não atingindo o ponto de fusão do material. Não obstante, há polímeros que sofrem modificações a temperaturas perto das encontradas no ambiente<sup>53</sup>.

A degradação térmica envolve dois tipos de reações que ocorrem ao mesmo tempo. Uma delas é a quebra aleatória de ligações e a outra é a quebra da extremidade da cadeia de ligações C-C. O peso molecular do polímero decresce lentamente e grandes quantidades de monómeros são libertados ao mesmo tempo<sup>55</sup>.

#### 1.2.4.4 Degradação Química

O processo de degradação química pode ser induzido de diferentes formas. A degradação oxidativa, por exemplo, é causada pela forma atmosférica do oxigênio que ataca ligações covalentes produzindo radicais livres. Outro método pelo qual os plásticos podem sofrer este tipo de degradação é a hidrólise, um processo pela qual a água divide ligações covalentes em grupos químicos específicos, nomeadamente, ésteres, éteres, amidas, anidridos e amidas de éster<sup>53</sup>. Estes tipos de degradação, oxidativa ou hidrólise, dependem da estrutura do polímero, no entanto o processo depende de vários parâmetros como o pH, temperatura, atividade da água e do tempo<sup>53</sup>.

#### 1.2.5 Biodegradação de Microplásticos

Inicialmente, a biodegradação ou degradação biótica era definida como “decomposição de substâncias pela ação de microrganismos”<sup>53</sup>. A Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM) define-a como “Processo que é capaz da decomposição de materiais em dióxido de carbono, metano, água, compostos inorgânicos ou biomassa em que o mecanismo predominante é a ação enzimática de microrganismos, que pode ser medida por testes padrão, num período de tempo especificado, refletindo condições de descarte disponíveis”. As características do polímero, fatores ambientais (abióticos) e a presença de químicos influenciam a eficiência da degradação e enfraquecem primeiramente o material antes da ação de microrganismos<sup>15</sup>.

A biodegradação ocorre normalmente em três processos diferentes: biodeterioração seguida por biofragmentação e por fim assimilação<sup>53</sup>.

#### 1.2.5.1 Biodeterioração

A biodeterioração é a degradação que ocorre na superfície do polímero e altera consequentemente as suas propriedades mecânicas, físicas e químicas. É um resultado da atividade dos microrganismos na dita superfície do material. Esses organismos podem pertencer a grupos de bactérias, protozoários, algas e/ou fungos ou ser uma comunidade de várias espécies e podem agir de forma física, química e/ou enzimática. Este processo de biodeterioração pode ainda ser auxiliado por fatores abióticos<sup>53</sup>.

##### a) Ação física dos organismos

Alguns microrganismos têm a capacidade de produzir uma secreção que atua como cola e que os ajuda a aderir à superfície do material. O tamanho e a distribuição dos poros podem vir a ser alterados devido a esta substância penetrar nas estruturas porosas do polímero, o que subsequentemente o pode vir a quebrar ou formar rachaduras, e onde o microrganismo irá ser também protegido. O material, pela ação destes microrganismos, vai perder a resistência que o caracteriza e vai enfraquecendo, o que é ideal pois o objetivo é obter unidades mais pequenas de partículas do plástico<sup>53</sup>.

##### b) Ação química dos organismos

Alguns microrganismos, como é o exemplo de bactérias, produzem e libertam químicos que ajudam na biodeterioração dos polímeros. Os compostos químicos podem agir de diversas formas, como erosão, por exemplo<sup>53</sup>.

##### c) Ação enzimática dos organismos

Enzimas como lipases, esterases, ureases e proteases, que são produzidas por alguns microrganismos, estão envolvidas em processos de biodeterioração. No entanto, necessitam de cofatores para quebrar determinadas ligações. Com ferramentas biotecnológicas é possível otimizar estas enzimas para que se alcancem melhores resultados<sup>53</sup>.

#### 1.2.5.2 Biofragmentação

A fragmentação é um processo necessário para que a próxima etapa, a assimilação, possa acontecer. Isto deve-se ao facto de os polímeros serem moléculas com um grande peso molecular, o que impossibilita a sua passagem através da parede ou membrana celular dos microrganismos. Deste modo, têm de ocorrer quebras de ligações para que sejam obtidos monómeros. A partir da análise da formação/existência destes monómeros é possível então comprovar ou não se a fragmentação ocorreu. A energia para a quebra dessas ligações pode ser proveniente de várias origens como térmica, mecânica, química ou biológica<sup>53</sup>.

#### 1.2.5.3 Assimilação

Por fim, depois das duas etapas anteriormente referidas a assimilação ocorre, quando os fragmentos são já pequenos o suficiente para integrarem as células dos microrganismos, permitindo o seu crescimento e reprodução, sendo fonte de energia e nutrientes. Para a sua assimilação pelas células, existe a possibilidade de os monómeros passarem de forma mais facilitada, como é o caso da assimilação com auxílio de portadores específicos da membrana; ou podem, no caso de se tratarem de membranas impermeáveis, necessitar de sofrer ainda outras reações de biotransformação, das quais resultarão novas substâncias, mais fáceis de assimilar<sup>53</sup>.

### 1.3 Caracterização dos Plásticos

Dos plásticos que apresentam maior abundância na produção mundial, e que por consequência são também dos mais utilizados no embalamento e dos resíduos mais encontrados no ambiente marinho, são, nomeadamente, o polietileno (PE) e o poliestireno (PS).

### 1.3.1 Polietileno (PE)

Como já referido anteriormente, o polietileno é dos plásticos mais utilizados e conseqüentemente dos resíduos mais abundantemente encontrados nos oceanos. Está presente também em aparelhos eletrônicos, produtos domésticos e industriais de diversas áreas. Inicialmente não existia consenso em relação à nomenclatura, podendo este polímero ser denominado por polieteno ou polimetileno (recomendado em 1939 pela IUPAC), no entanto, polietileno é o mais comumente usado<sup>56</sup>.

A partir do gás etileno, um gás incolor obtido a partir da quebra de etano a altas temperaturas, é possível produzir homopolímeros recorrendo a processos de fabricação diferentes com também diferentes catalisadores e co-monomeros<sup>57</sup>. A estrutura química do polietileno é possivelmente das mais simples encontradas, e é o polímero mais barato<sup>38</sup>. É composta por repetições de unidades de monómeros do alceno etileno ( $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ ), que estão covalentemente ligados, formando uma cadeia polimerizada<sup>58</sup>. O polietileno foi descoberto por acidente no ano de 1933, no entanto só em 1935 é que começou a ser produzido em grandes quantidades. Em 1939 surge, em Inglaterra, o primeiro produto comercializado de LDPE, polietileno de baixa densidade.

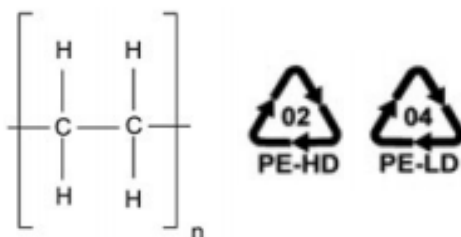
Os polietilenos são classificados pela sua densidade, sendo que quantas mais ramificações estiverem na estrutura, menor a densidade do material<sup>59</sup>. Existem três tipos diferentes de polietilenos, LDPE (polietileno de baixa densidade), LLDPE (polietileno linear de baixa densidade) e HDPE (polietileno de alta densidade). A classificação baseia-se então na densidade de cada polímero, em que o LLDPE está compreendido entre 0,880–0,915  $\text{g.cm}^{-3}$ , já o LDPE situa-se entre 0,915–0,940  $\text{g.cm}^{-3}$ , e por fim o HDPE, que caracteriza-se por possuir uma densidade de 0,945–0,97  $\text{g.cm}^{-3}$ <sup>60</sup>.

Na produção de embalagens os tipos mais utilizados são o HDPE e o LDPE. O primeiro é representado por uma cadeia linear com poucas ramificações e é pouco transparente, contrariamente ao LDPE que apresenta muitas ramificações. Comparando estes dois tipos de polietileno, o HDPE apresenta melhor resistência química, dureza e um



ponto de fusão superior (~135°C comparando com 110°C do LDPE)<sup>58</sup>, é mais cristalino e consequentemente mais opaco, e possui maior resistência <sup>59</sup>.

Nas embalagens produzidas a partir de plásticos estão representados símbolos correspondentes ao tipo de polímero utilizado, ou seja, ao aparecer um triângulo representado com número 02 corresponde ao HDPE e o 04 ao LDPE, **Figura 8** <sup>58</sup>.



**Figura 8.** Estrutura do polímero polietileno, à esquerda. Símbolos representados nas embalagens de polietileno representando o tipo de plástico utilizado, à direita.

Nos últimos anos, com a problemática do plástico a ganhar dimensões cada vez mais preocupantes para a sociedade, foram realizadas várias experiências com o objetivo de os biodegradar <sup>61</sup>. Algumas delas, tendo obtido resultados positivos ao utilizar tanto bactérias como fungos, têm criado alguma esperança relativamente à utilização deste método com microrganismos.

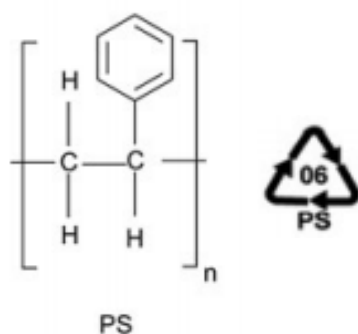
Na equipa onde o trabalho da presente dissertação foi realizado, já foi efetuado também um estudo relativamente à biodegradação do polietileno (PE) utilizando o fungo *Zalerion maritimum*, que demonstrou resultados muito promissores<sup>15</sup>. O fungo e microplásticos de PE estiveram em contacto durante um mês, e os resultados finais demonstraram que tanto a massa como o tamanho do plástico diminuíram, concluindo-se que o fungo foi capaz de realizar a biodegradação, uma informação muito importante e promissora para futuros estudos utilizando outros tipos de plástico.

### 1.3.2 Poliestireno (PS)

O poliestireno é o polímero termoplástico aromático mais utilizado. É um material amorfo, produto da adição de um etilbenzeno, mais conhecido como estireno. Tem como aplicações o já referido embalagem, mas também como isolante. É muito utilizado devido às suas propriedades mecânicas, de fácil manuseamento e sobretudo por ser um material barato<sup>62</sup>. Outra forma deste plástico muito usada em embalagens é o poliestireno expandido (EPS), que se trata de um material leve, com boa resistência à compressão e à humidade<sup>59</sup>. Também conhecido como esferovite, o EPS é formado a partir de três etapas: pré-expansão, amadurecimento/estabilização e por fim a moldagem, no entanto, é necessário primeiramente que seja adicionado pentano ao PS. Ao ser sujeito a temperaturas superiores a 90°C, o pentano evapora e provoca a inflação do material, aumentando-o cerca de vinte a cinquenta vezes<sup>63</sup>.

O poliestireno pode ser polimerizado a partir de vários processos diferentes como polimerização por radical livre ou também por polimerização térmica ou radiação. Existem vários tipos de PS como o GPPS (poliestireno de uso geral), HIPS (poliestireno de alto impacto) e o já mencionado EPS<sup>62</sup>.

A estrutura do poliestireno ( $\text{CH}_2=\text{CHC}_6\text{H}_5$ ) e o símbolo (PS 06) pelo qual ele é representado estão apresentados na **Figura 9**. É uma unidade de repetição linear muito simples comparando com outros polímeros, apenas o polietileno é mais simples.



**Figura 9.** Estrutura do polímero poliestireno, à esquerda. Símbolo representado nas embalagens de poliestireno representando o tipo de plástico utilizado, à direita.

Tal como para o polietileno, também para o poliestireno e poliestireno expandido já foram realizados estudos sobre a capacidade de microrganismos aderirem aos mesmos<sup>64</sup> e de os biodegradar<sup>65</sup>.

Uma investigação recente utilizou os microrganismos *Cephalosporium species* (sp.) e *Mucor species* (sp.) para estudar as suas capacidades na biodegradação do PS<sup>66</sup>. Estes fungos utilizam os plásticos como fonte de carbono para o seu crescimento. Os resultados analisados demonstraram que efetivamente os fungos utilizavam o poliestireno presente no meio, biodegradando-o.

#### 1.4 Caracterização do Fungo

Em 1979, Kohlmeyer and Kohlmeyer definiram que “Fungos marinhos obrigatórios são aqueles que crescem e esporulam exclusivamente num habitat marinho ou estuarino; Fungos marinhos facultativos são aqueles de água doce e meios terrestres capazes de crescer e, possivelmente, também esporular no ambiente marinho.”<sup>67</sup>. Mais recentemente, Pang et al, 2016, define “fungos marinhos” como “qualquer fungo que é recuperado de habitat marinhos porque: 1) é capaz de crescer e/ou esporular (em substratos) em ambientes marinhos; 2) forma relações simbióticas com outros organismos marinhos; ou 3) é demonstrado que se adapta e evolui a nível genético ou é metabolicamente ativo em ambientes marinhos” e “*marine-derived fungi*” como “refere ao ambiente do qual os fungos são isolados”<sup>68,69</sup>. De acordo com os últimos dados do “<https://www.marinefungi.org/>” existem cerca de 1901 espécies de fungos marinhos<sup>70</sup>.

Os fungos filamentosos são microrganismos capazes de se adaptar a diferentes ambientes e tipos de poluentes. Relativamente a estes últimos eles são capazes de os quebrar em pequenas substâncias e usá-las para se desenvolverem/crescerem. Também os fungos são importantes em processos de degradação, como mencionado anteriormente, e mineralização. Os fungos alimentam-se por absorção de nutrientes exteriormente às suas células e posteriormente libertam enzimas digestivas que são capazes de quebrar ligações de moléculas orgânicas em compostos mais pequenos que serão absorvidos, tornando por isso mesmo estes fungos muito interessantes na biodegradação de plástico<sup>71</sup>.

Um estudo realizado na costa portuguesa demonstrou que o fungo *Penicillium*, particularmente *brevicompactum*, um fungo marinho facultativo, é dos mais encontrados no ambiente aquático<sup>72</sup>.

#### 1.4.1 *Penicillium brevicompactum*

“Um penicílio consiste essencialmente num aglomerado bem definido de fiálides ou células semelhantes com pequenos conídios secos unicelulares em cadeias”<sup>73</sup>, é a definição em que se enquadra o género *Penicillium*. Este fungo pertence ao filo *Ascomycota*, subfilo *Pezizomycotina*, classe *Eurotiomycetes*, subclasse *Eurotiomycetidae*, ordem *Eurotiales*, família *Aspergillaceae* e género *Penicillium*<sup>74</sup>. Os fungos, organismos eucariotas, estão divididos em três grupos, enquadrando-se o *P. brevicompactum* na categoria dos fungos filamentosos. Esta espécie é capaz de aderir a superfícies como o plástico, no entanto, esta sua capacidade pode ser influenciada pelas condições ambientais e bióticas<sup>75</sup>. É precisamente por causa da influência do ambiente no desempenho destes fungos, que uma otimização é importante na sua utilização, nomeadamente, do meio de cultura selecionado.

É muito comum encontrar o fungo *Penicillium brevicompactum*, em meios tão diversos como no ar de locais fechados, no solo e em alimentos<sup>76</sup>, nomeadamente, em iogurtes<sup>77</sup>. É conhecido por produzir um metabolito secundário específico, um composto imunossupressor denominado ácido micofenólico (MPA). Este composto apresenta diversas funções como antifúngico, antiviral, antibacteriano e antitumoral<sup>78</sup>.

#### 1.5 Otimização das condições experimentais para a biodegradação do Poliestireno (PS) e Poliestireno Expandido (EPS)

A melhoria das condições experimentais, nomeadamente do meio de cultura, é, como já foi referido, fundamental para o aperfeiçoamento do processo de biodegradação por estes fungos. O crescimento do fungo e a presença de plásticos são fatores a ter em conta uma vez que, quanto mais opções existem em termos de nutrientes, menos o fungo selecionará o plástico como fonte, pois tem outras opções mais fáceis. A otimização permite alcançar uma maior percentagem de biodegradação comparando com o meio de cultura “padrão” utilizado, o meio reduzido. Em relação ao PE, esta otimização já foi feita no laboratório, em trabalhos

anteriores. Já para o plástico PS e EPS, que também mostraram efeitos de biodegradação por parte do fungo, irá ser estudada a melhor opção de concentrações de componentes de meio (glucose, extrato de malte e peptona), de forma à otimização do mesmo.

Para possibilitar a obtenção das concentrações de um meio otimizado para uma maior degradação, é estatística e matematicamente importante utilizar métodos como o “*central composite design*” (CCD). Um CCD é capaz de relacionar, neste caso, três variáveis, evitando ao operador o trabalho de experimentar todas as combinações possíveis entre elas, o que traria, inevitavelmente, um grande dispêndio de tempo e de recursos. Existem neste método três tipos de pontos: pontos de projeto fatorial de dois níveis ou fatorial fracionário; pontos axiais ou pontos estrela, e pontos centrais. Os primeiros caracterizam-se por combinações que variam entre +1 e -1, os segundos são pontos que estão a uma distância chamada  $\alpha$  do centro e os terceiros, como o nome indica, posicionam-se no centro. Tendo em conta estes tipos de pontos, é possível calcular a partir da **Equação 1** quantas experiências (N) será necessário efetuar tendo em conta que  $2^k$  representa os pontos de projeto fatorial de dois níveis ou fatorial fracionário,  $2k$  os pontos estrela e  $n$  os pontos centrais (os valores da equação correspondem a experimentos com três variáveis).

$$\text{Equação 1: } N = 2^k + 2k + n \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow N = 8 + 6 + 6 = 20$$

Tem-se, portanto, que se efetuar vinte experiências. Os valores obtidos, ou seja, a percentagem de degradação correspondente a cada um dos vinte *Erlenmeyers*, cada um com diferentes concentrações dos componentes do meio de cultura, que serão analisados posteriormente a partir do DOE (*Design of experiments*), *software* “Minitab 19”, que se subdivide em vários designs, no entanto, neste caso, foi usado um procedimento de “superfície de resposta” em que se enquadra o CCD. Assim, através de uma equação polinomial de segundo grau é possível obter a relação entre as variáveis (componentes do meio) e os resultados obtidos, neste caso, de degradação alcançada. A equação referida, **Equação 2**, está descrita abaixo, onde a incógnita Y corresponde à resposta prevista (percentagem de degradação),  $\beta_0$  é uma constante;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  correspondem à forma linear;  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  e  $\beta_{33}$  a coeficientes quadráticos e  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  e  $\beta_{23}$  à interação entre dois componentes. Por

fim,  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  correspondem às variáveis independentes (1- Glucose, 2- Extrato de Malte e 3-Pepton) <sup>79,80,81</sup>.

**Equação 2:**  $Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_{21} + \beta_{22}x_{22} + \beta_{33}x_{23} + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3$

Em resumo, primeiramente é necessário utilizar o CCD para determinar as condições da experiência (nº de experimentos e proporção dos componentes do meio em cada frasco), seguindo-se o ensaio experimental. Por fim, e após a recolha da percentagem de degradação em cada experimento, utiliza-se o *software* “Minitab 19” para as análises estatísticas, determinando assim as concentrações para o meio ótimo.

## 1.6 Objetivo

O objetivo deste trabalho é procurar uma solução para a poluição por microplásticos presente no ambiente marinho, a partir de ferramentas biotecnológicas como o uso de organismos vivos, nomeadamente o fungo *Penicillium brevicompactum*, que em estudos anteriores mostrou potencial na função da biodegradação de plásticos.

Este estudo terá como base uma primeira fase de experiências, com duração de 15 dias, em que os fungos irão estar em contacto, num meio de cultura com nutrientes reduzidos, com amostras PS virgem e amostras reais de EPS para serem analisados os resultados da sua biodegradação. Numa segunda fase de experiências, descrita abaixo, para além das amostras dos materiais já enumerados serão também postas em contacto com os fungos amostras de PE. A escolha deste material baseia-se na literatura existente, que evidencia resultados promissores relativamente à sua biodegradação na presença de fungos, não sendo assim necessário realizar uma experiência preliminar<sup>15</sup>.

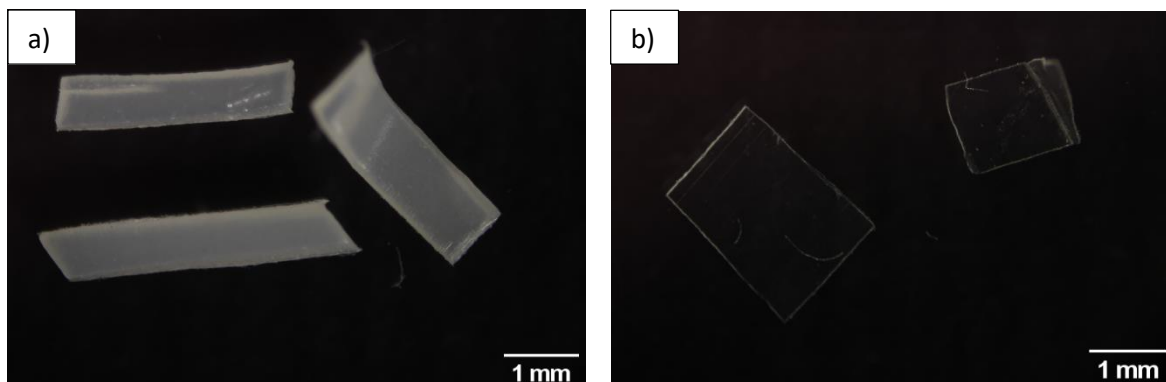
Na segunda fase, amostras reais de embalagens alimentares, nomeadamente de PE e PS/EPS, vão ser sujeitos ao mesmo processo, biodegradação, nas mesmas condições que na primeira fase, alterando apenas a duração da experiência para 28 dias. No caso do PS/EPS, será realizada uma otimização do meio de cultura de forma a aumentar a biodegradação com duração também de 28 dias.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Microplásticos

#### i. Polietileno (PE)

Foram utilizadas amostras reais de dois tipos de PE, uma vez que era conhecido que o fungo degradava amostras virgens sendo assim testada a capacidade de biodegradação em amostras que são realmente encontradas no ambiente. A primeira com origem numa embalagem de um iogurte líquido (HDPE) e a segunda com origem num saco de plástico multiuso (LDPE) (com a função de congelar e conservar alimentos). Foram cortados manualmente, com ajuda de uma tesoura e pinça, para terem um tamanho adequado à classificação como microplásticos. Os fragmentos de HDPE tinham uma forma de retângulo fino, e os de LDPE a forma de quadrados. Utilizou-se um microscópio ótico Olympus BX41, com uma ampliação de 4x, para visualizar exemplares de fragmentos utilizados nas experiências, presentes na **Figura 10** (a) HDPE e b) LDPE. O programa “Image j”<sup>82</sup> foi utilizado para adicionar a escala.

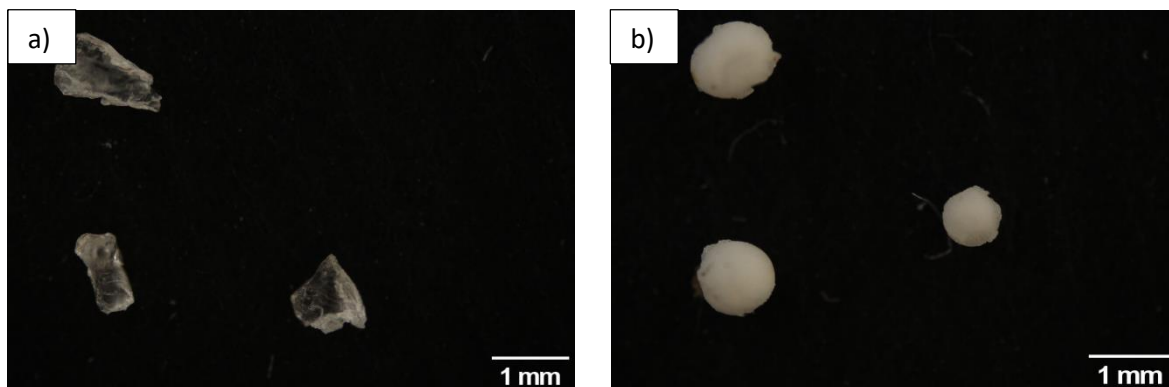


**Figura 10.** Fotografias de fragmentos de HDPE (a) e LDPE (b) utilizados nas experiências.

#### ii. Poliestireno (PS) e Poliestireno Expandido (EPS)

A amostra de PS virgem usada nesta experiência é da marca Aldrich. Os fragmentos foram obtidos a partir da sua trituração e posteriormente, com recurso a peneiras, os fragmentos foram separados com base nos seus tamanhos. Para as experiências efetuadas neste trabalho, foram utilizados os fragmentos de microplásticos com dimensões entre 0,5

mm e 1 mm. Por outro lado, a amostra real (EPS), foi retirada de um pedaço maior de esferovite que foi utilizado para proteger um eletrodoméstico. Através do espectro de FTIR-ATR verificou-se que correspondia ao EPS. Esta amostra também foi triturada e peneirada para se obter fragmentos com dimensões entre os 1 e 2 mm. No entanto, após a autoclavagem os fragmentos diminuíram de tamanho, igualando-se aos valores mencionados para o material anterior. Ambos os fragmentos estão representados na **Figura 11**.



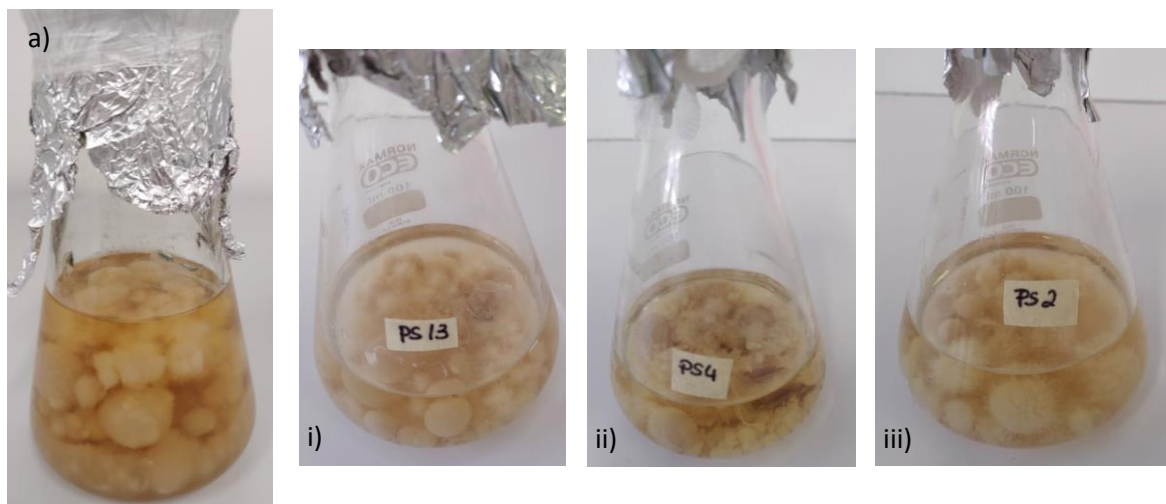
**Figura 11.** Fragmentos de PS (a) e EPS (b)) utilizados nas experiências.

## 2.2 Micro-organismo

### i. Material biológico e condições de crescimento

O fungo *Penicillium brevicompactum* foi mantido em condições ótimas (de temperatura, agitação e meio de cultura) na incubadora para crescimento durante todo o tempo de trabalho, no entanto, uma semana antes de cada experiência iniciar, o fungo foi trocado para um meio de crescimento novo. Os meios de cultura de crescimento eram compostos por 35 g/L de sal marinho (sigma), 20 g/L de glucose (labkem), 20 g/L de extrato de malte (oxid) e 1 g/L de peptona (sigma-aldrich), sendo depois o volume necessário perfeito com água destilada. Em cada *Erlenmeyer* (250 mL) foi colocado um volume de cerca de 200 mL do meio de cultura, sendo este posteriormente autoclavado; a inoculação foi depois feita na bancada, à chama. Por fim, selando as tampas com *parafilm*, os *Erlenmeyers* foram colocados na incubadora a cerca de 25°C e a uma rotação de 120 rpm até à altura em que iriam ser utilizados. Na **Figura 12** está representado o fungo no meio de crescimento a) e formas de crescimento do fungo num exemplo da experiência de otimização do PS, i), ii) e iii).





**Figura 12.** Fotografias do fungo *P. Brevicompactum* num meio de crescimento a), e três exemplos de formas de crescimento do fungo i), ii) e iii).

### 2.3 Avaliação da capacidade de biodegradação dos microplásticos

As experiências decorreram num espaço de tempo de 15 ou 28 dias. No caso da experiência com o polietileno foi utilizado um meio de cultura otimizado (estudo já realizado anteriormente<sup>83</sup>), que era constituído por 35 g/L de sal marinho; 4,6 g/L de glucose; 16,3 g/L de extrato de malte e 0,6 g/L de peptona. No caso do poliestireno, foi realizada uma primeira experiência de 15 dias com um meio de cultura com concentrações reduzidas. Este meio continha uma concentração de glucose, extrato de malte e peptona dez vezes inferior à do meio de crescimento. Era assim composto por 35 g/L de sal marinho; 2 g/L de glucose; 2 g/L de extrato de malte e 0,1 g/L de peptona. A redução das concentrações do meio teve como objetivo diminuir as fontes de energia disponíveis para o fungo, de forma a este considerar o microplástico como alternativa.

Foi realizada ainda uma experiência de otimização do meio de cultura para o PS e EPS de forma a aumentar a percentagem de biodegradação, onde foram utilizados vinte meios de cultura com concentrações diferentes (à exceção do sal marinho), com base no planeamento experimental (Tabela 3).

Relativamente ao PE, foi avaliada a capacidade do fungo para degradar fragmentos deste microplástico durante 28 dias, recolhendo-se amostras a cada 7 dias. No início, foram colocados um total cinquenta e seis frascos (*Erlenmeyers* de 100 mL) numa incubadora a 25 °C com rotação de 120 rpm, correspondendo a catorze frascos por cada semana, contendo cada um deles 50 mL do meio de cultura otimizado. Os *Erlenmeyers* com 50 mL de meio de cultura e cerca 0,015 g de microplásticos, foram esterilizados, usando um autoclave (controlos e réplicas). Quatro *Erlenmeyers* continham apenas meio de cultura e microplásticos, funcionando como controlos (dois de HDPE e dois de LDPE) de forma a garantir que os microplásticos não sofriam a influência do meio de cultura e do processo de esterilização. Outros dois *Erlenmeyers* serviram de controlo para avaliar o crescimento dos fungos num meio desprovido de microplásticos. Nestes últimos e nos restantes oito (quatro réplicas de cada um dos plásticos (HDPE e LDPE) para avaliar a sua capacidade de degradação do microplástico e de crescimento ao longo do tempo) foi inoculado 0,500 g de fungo *P. brevicompactum*, **Figura 13**.

Para todas as experiências foi feito um teste apenas com água, sal marinho e microplásticos para avaliar se o processo de esterilização por autoclave degradava os microplásticos. A partir da análise dos espectros obtidos dos microplásticos em FTIR-ATR comprovou-se que não ocorre degradação.



**Figura 13.** *Erlenmeyers* com meio de cultura, após esterilização, preparados para a inoculação com o fungo *P. brevicompactum*.

A cada semana (de sete em sete dias), catorze *Erlenmeyers* eram retirados da incubadora. Usando um processo de filtração foi possível separar o conteúdo dos mesmos (o fungo, os microplásticos e o meio de cultura) como se pode observar na **Figura 14**, para frascos diferentes, **Figura 15**. A filtração foi realizada “à mão”, o conteúdo era colocado no filtro e os fungos tal como os microplásticos foram retirados com a ajuda de uma pinça para os respetivos frascos. Para ter a certeza que todos os microplásticos eram separados, no fim

do fungo estar liofilizado, foi feita uma recolha dos mesmos, uma vez que era mais fácil a sua visualização, igualmente com ajuda de uma pinça (Figura 24).



**Figura 14.** Filtração dos meios de cultura, fungos e microplásticos.

Os frascos que continham o fungo foram congelados para posterior liofilização. Os frascos que continham os microplásticos foram colocados na estufa a 60 °C para secarem. Por fim, procedeu-se à pesagem do fungo, bem como dos microplásticos, registando-se a massa final.



**Figura 15.** Meios de cultura, fungos e plásticos separados por filtração e guardados nos respetivos frascos.

Relativamente aos microplásticos recuperados foi essencial, por vezes, remover resíduos de fungo que permaneceram aderidos aos mesmos. O processo de remoção do fungo consistiu na colocação dos microplásticos num copo com cerca de 20 mL de ácido nítrico com uma concentração de 68-70% durante 1 hora. Após o tempo decorrido foram novamente filtrados e lavados com água destilada e colocados na estufa a uma temperatura de 60°C.

Este tratamento foi realizado apenas para a primeira experiência de biodegradação do microplástico PE, no entanto não teve resultado uma vez que na análise por FTIR-ATR os espectros evidenciavam o aparecimento de fungo influenciando o espectro do plástico.

Nas experiências de 15 dias foram retiradas amostras a cada 5 dias, ou seja, ao 5º, 10º e 15º dia. O procedimento da experiência foi mantido igual tendo como exceção as concentrações do meio de cultura (PS/EPS – meio reduzido) havendo sempre duas réplicas de controlo de microplásticos, duas réplicas de controlo de fungo e quatro réplicas de microplásticos incubados com o fungo.

#### 2.4 Otimização do meio de cultura para os microplásticos Poliestireno e Poliestireno Expandido

Como referido anteriormente, foi feita uma otimização do meio de cultura para as experiências de biodegradação de PS e EPS. Para este fim, foi utilizado o *software* “Minitab 19” de modo a obter as concentrações (de glucose (fonte de carbono), extrato de malte e peptona (fontes de azoto e outros nutrientes)) estimadas que seriam ótimas, ou seja, que proporcionariam maior degradação dos microplásticos com o fungo *P. brevicompactum*. O método “*central composite design*” ou CCD que foi usado determinou serem necessários vinte *Erlenmeyers* com diferentes concentrações dos componentes do meio de cultura para testar de igual forma cada um dos microplásticos, PS e o EPS. Na **Tabela 2** estão representados os resultados obtidos variando entre  $-\alpha$ , -1, 0, +1 e  $+\alpha$ , em que  $\alpha=1,68$ .

O  $\alpha$  (pontos axiais ou pontos estrela - são pontos que estão a uma distância chamada  $\alpha$  do centro) pode ser determinado manualmente pela seguinte Equação:

$$\alpha = [2^k]^{1/4}, \text{ em que } k \text{ (fatores)}=3$$

$$\alpha = [2^3]^{1/4} = 1,68$$

**Tabela 2.** Matriz obtida a partir do método CCD para três variáveis.

Nº da experiência	Glucose	Extrato de malte	Peptona
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

Na **Tabela 3** estão apresentadas as concentrações que foram obtidas pelo CCD, em que o extrato de malte e a glucose teriam um máximo de 25 g/L e um mínimo de 0 g/L. Por sua vez a peptona teve um mínimo também de 0 g/L e máximo de 2,5 g/L. Assim, para a glucose e para o extrato de malte teremos como correspondência aos pontos as seguintes concentrações  $-\alpha$ : 0,000 g/L; -1: 5,067 g/L; 0: 12,50 g/L; 1: 19,93 g/L e  $\alpha$ : 25,00 g/L. No caso da peptona  $-\alpha$ : 0,000 g/L; -1: 0,5067 g/L; 0: 1,250 g/L; 1: 1,993 g/L e  $\alpha$ : 2,500 g/L. Quanto ao sal marinho, o outro componente do meio de cultura, foi mantido em todos os ensaios em igual concentração à do meio de crescimento utilizado, 35 g/L, para manter a salinidade.

**Tabela 3.** Concentrações (g/L) de cada componente de meio de cultura (glucose, extrato de malte e peptona) obtido a partir do método CCD.

Nº da experiência	Glucose (g/L)	Extrato de malte (g/L)	Peptona (g/L)
1	5,067	5,067	0,5067
2	19,93	5,067	0,5067
3	5,067	19,93	0,5067
4	19,93	19,93	0,5067
5	5,067	5,067	1,993
6	19,93	5,067	1,993
7	5,067	19,93	1,993
8	19,93	19,93	1,993
9	0,000	12,50	1,250
10	25,00	12,50	1,250
11	12,50	0,000	1,250
12	12,50	25,00	1,250
13	12,50	12,50	0,000
14	12,50	12,50	2,500
15	12,50	12,50	1,250
16	12,50	12,50	1,250
17	12,50	12,50	1,250
18	12,50	12,50	1,250
19	12,50	12,50	1,250
20	12,50	12,50	1,250

Os 40 *Erlenmeyers* (correspondentes aos vinte das experiências para cada microplástico, PS e EPS), que continham 50 mL de meio de cultura e 0,015 g do respetivo microplástico, foram autoclavados. Na **Figura 16** estão representados os *Erlenmeyers* com o PS, antes e depois de serem esterilizados. Foi possível observar as diferenças nas cores do meio correspondentes às diferentes concentrações de cada componente (glucose, extrato de malte e peptona), como descritas no parágrafo anterior e na Tabela 3. Após o processo de esterilização, observou-se claramente que as cores dos meios de cultura escureceram. Isto deveu-se ao facto de a temperatura ter desencadeado algumas reações químicas, podendo ter ocorrido, nomeadamente, reações de *Maillard* (entre aminoácidos/proteínas (NH<sub>2</sub>) e açúcares (grupo carbonil)) ou caramelização de açúcares (compostos de cor castanha)<sup>84</sup>. A esterilização é, não obstante, um passo fundamental do procedimento experimental, uma vez que sem esta etapa é impossível eliminar potenciais contaminações e, por isso mesmo, não se poderá avançar para etapa de inoculação que se lhe segue.



**Figura 16.** Experiência de otimização do PS. *Erlenmeyers* com meio de cultura antes (imagem superior) e após (imagem inferior) a autoclavagem.

Os meios de cultura foram inoculados com 0,500 g de fungo cada um numa sala exclusiva para o efeito e com bancadas devidamente desinfetadas. Por fim, os *Erlenmeyers* com o meio de cultura inoculado com o fungo foram colocados na incubadora durante 28 dias, a uma temperatura de 25 °C e a uma rotação de 120 rpm. No fim da experiência os meios foram filtrados para separação dos fungos (para posterior liofilização) e microplásticos (para secagem na estufa a 60 °C). Com o objetivo de obter a percentagem de biodegradação e de crescimento do fungo para cada concentração de meio de cultura pesaram-se os microplásticos e o fungo, respetivamente, após secagem.

## 2.5 Análise das amostras

Utilizou-se a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR), usando o equipamento Perkin Elmer (EUA) Spectrum BX FTIR-ATR. Foram realizados 64 scans por cada amostra, na gama dos 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 4,0  $\text{cm}^{-1}$ , num intervalo de 1,0  $\text{cm}^{-1}$  e nas unidades de absorvância. Todas as amostras

(controles e réplicas), como também os microplásticos virgens (sem exposição ao fungo ou ao meio de cultura), foram analisados, **Figura 17**.



**Figura 17.** Análise de amostras de plásticos no FTIR-ATR.

Também foi utilizado o microscópio eletrónico de varrimento (SEM)<sup>85</sup> com o objetivo de observar as diferenças entre as réplicas e os controlos e a aderência dos fungos aos microplásticos. Para tal foram utilizados um controlo e uma réplica, de cada um dos microplásticos, assim como as amostras virgens (não submetidas à ação dos fungos, provenientes das mesmas fontes que as amostras utilizadas nas experiências de biodegradação) denominadas de amostra I (oriunda da embalagem de iogurte) e amostra S (do saco de plástico). Foi usado um microscópio SEM Hitachi S4100 (Japão) - “*Field Emission Gun*” (FEG) operado a 15 kV. As amostras foram colocadas diretamente na fita de carbono e revestidas por evaporação de carbono.

Os fungos (um controlo e uma réplica que estiveram em contacto com os microplásticos, assim como uma amostra do fungo de 0 dias) foram analisados por ressonância magnética nuclear (RMN)<sup>86</sup>. A espectroscopia de RMN fornece informação sobre a estrutura e dinâmica molecular a partir da absorção de radiação eletromagnética pelos núcleos de determinada molécula. Foi utilizado o x400 > espectrómetro Bruker Avance III - 400 MHz.

A Análise Elementar (Truspec 630-200-200)<sup>87</sup> foi usada para determinar a composição de carbono, azoto, hidrogénio e enxofre das amostras de fungo liofilizado.

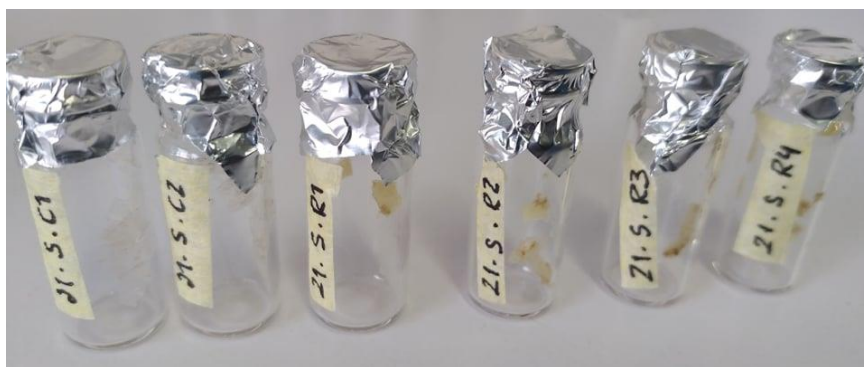


### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Biodegradação do microplástico Polietileno usando o fungo *Penicillium brevicompactum*

Como já referido anteriormente, a experiência com o polietileno decorreu durante um período de 28 dias. Foram escolhidas duas amostras do mesmo plástico, com densidades diferentes, de uso comum e muitas vezes encontradas no ambiente, sendo elas provenientes de uma embalagem de iogurte e de um saco de plástico.

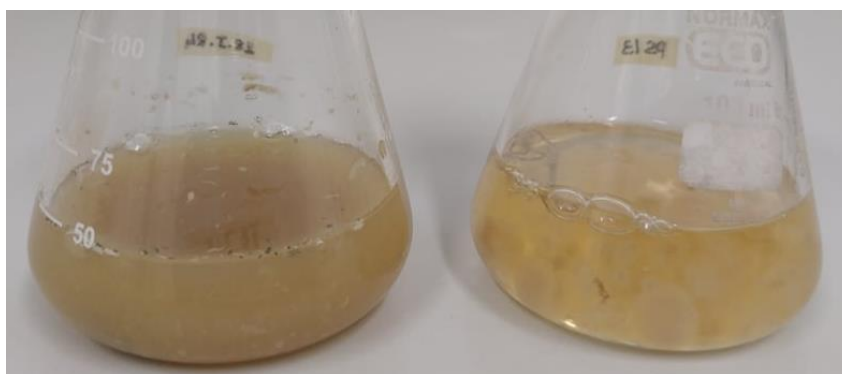
A experiência teve como objetivo avaliar a capacidade de degradação do fungo *P. brevicompactum* de amostras de HDPE oriundo de uma embalagem de iogurte e de LDPE de um saco de plástico, bem como o crescimento fúngico na presença de microplásticos dos mesmos. No entanto, alguns problemas surgiram aquando da análise dos resultados (presentes no **Anexo A**), uma vez que ao longo das quatro semanas o fungo mostrou oscilações no seu crescimento, sendo esperado que ao longo do tempo de experiência a quantidade de fungo aumentasse, e tal não aconteceu. Verificou-se também que *P. brevicompactum* estava morto ao fim dos 28 dias da experiência. Relativamente aos microplásticos e através da análise dos espectros de FTIR foi possível inferir poucas ou nenhuma diferença entre os controlos e as réplicas, e entre as diferentes semanas. Ainda assim, foi possível observar que o fungo esteve efetivamente em contacto com os microplásticos, como podemos observar na **Figura 18**, uma vez que nas réplicas (quatro últimos frascos) existia presença de fungo na superfície dos microplásticos. Os controlos permaneceram livres de qualquer substância/fungo ao longo de toda a experiência.



**Figura 18.** Amostras do saco de plástico de polietileno retiradas após 21 dias de incubação (primeira experiência).

Face aos factos de o fungo ter morrido e de registarem oscilações na remoção dos microplásticos, foi necessário repetir a experiência tentando controlar melhor as condições de exposição.

Foi então repetida a experiência com o plástico polietileno, no entanto, ao fim dos 28 dias o fungo mostrou-se com uma aparência diferente do que era esperado. Ao invés de estar na sua forma dita normal, globular ou forma irregular (devido à esporulação), o fungo apresentava-se líquido, sem qualquer forma descritível. A **Figura 19** mostra o fungo inoculado em meio de cultura após, à esquerda 28 dias e à direita 7 dias, de incubação. As diferenças são claras pois, no segundo frasco, pode-se observar um meio límpido com o fungo, enquanto que no primeiro frasco se observa um meio turvo, indicador de uma possível contaminação por bactérias. Outra das explicações para este fenómeno poderá ter sido a temperatura dentro da incubadora, uma vez que este equipamento apenas possui a capacidade de a aumentar, não diminuir. A incubadora encontrava-se numa sala com temperatura controlada, no entanto esta descontrolou-se diversas vezes não tendo sido capaz de manter o seu interior a temperatura de 25 °C e a experiência ficou comprometida. Com efeito, a temperatura é um fator crucial para a sobrevivência de organismos vivos.



**Figura 19.** Fungo *P. brevicompactum* e plásticos após vinte e oito, e sete dias, à esquerda e à direita, respetivamente.

Nas **Tabelas 4 e 5** podem-se observar as percentagens de crescimento do fungo e biomassa, na presença de microplásticos HDPE e LDPE, respetivamente.

Para todas as tabelas apresentadas o “D” significa os dias a que a amostra foi retirada da incubadora, “I” amostra do iogurte, “S” amostra do saco, “C” controlo, “F” fungo, “P” plástico e “R” réplica.

**Tabela 4.** Biomassa inoculada (fungo *P. brevicompactum*), final e a sua percentagem de crescimento após 7, 14, 21 e 28 dias (segunda experiência) na amostra de HDPE (iogurte).

	Biomassa inoculada (g)*	Biomassa inoculada (seca) (g)	Biomassa final (seca) (g)	Crescimento (g)	Crescimento do fungo (g) (média ± desvio padrão)	Percentagem de Biomassa (%)	Percentagem de biomassa (%) (média ± desvio padrão)
7D_I/S_C1F	0,510	0,0282	0,3330	0,3048	0,34±0,03	8,48	8,1±0,3
7D_I/S_C2F	0,570	0,0316	0,4035	0,3719		7,82	
7D_I_R1	0,566	0,0313	0,4179	0,3866	0,38±0,04	7,50	7,9±0,6
7D_I_R2	0,633	0,0350	0,4053	0,3703		8,65	
7D_I_R3	0,610	0,0338	0,4797	0,4459		7,04	
7D_I_R4	0,539	0,0284	0,3610	0,3312		8,27	
14D_I/S_C1F	0,551	0,0305	0,5316	0,5011	0,49±0,01	5,74	5,80±0,04
14D_I/S_C2F	0,543	0,0301	0,5160	0,4859		5,83	
14D_I_R1	0,571	0,0316	0,5847	0,5531	0,50±0,04	5,41	5,8±0,4
14D_I_R2	0,526	0,0291	0,5225	0,4934		5,57	
14D_I_R3	0,620	0,0343	0,5436	0,5093		6,31	
14D_I_R4	0,519	0,0287	0,4753	0,4466		6,04	
21D_I/S_C1F	0,546	0,0302	0,4829	0,4527	0,51±0,06	6,26	5,7±0,6
21D_I/S_C2F	0,544	0,0301	0,5943	0,5642		5,07	
21D_I_R1	0,641	0,0355	0,6080	0,5725	0,43±0,08	5,84	6,9±0,8
21D_I_R2	0,504	0,0279	0,3938	0,3659		7,09	
21D_I_R3	0,560	0,0310	0,4662	0,4352		6,65	
21D_I_R4	0,582	0,0322	0,3973	0,3651		8,12	
28D_I/S_C1F	0,504	0,0279	0,5130	0,4851	0,48±0,01	5,44	5,7±0,2
28D_I/S_C2F	0,528	0,0292	0,4947	0,4655		5,91	
28D_I_R1	0,576	0,0319	0,2549	0,2230	0,21±0,05	12,5	13±3
28D_I_R2**						—	
28D_I_R3	0,526	0,0291	0,2851	0,2560		10,2	
28D_I_R4	0,519	0,0287	0,1672	0,1385		17,2	

\*balança utilizada com 3 casas decimais

\*\*frasco partiu-se

O crescimento do fungo foi na ordem dos  $8,1 \pm 0,3$  % e  $7,9 \pm 0,6$  %, respetivamente para controlos e réplicas após 7 dias de incubação e observou-se ainda um decréscimo ao fim dos 14 dias para cerca de  $5,80 \pm 0,04$  % nos controlos e  $5,8 \pm 0,4$  % nas réplicas. Aos 21 dias o fungo não apresentou diferenças acentuadas, apenas um pequeno aumento de  $6,9 \pm 0,8$  % nas réplicas. Ao fim da experiência, 28 dias, o fungo apresentou um aumento de massa de  $13 \pm 3$  %. Contudo, foi possível observar que os controlos têm valores muito perto das réplicas comprovando que o microplástico não é prejudicial para a sobrevivência do fungo.

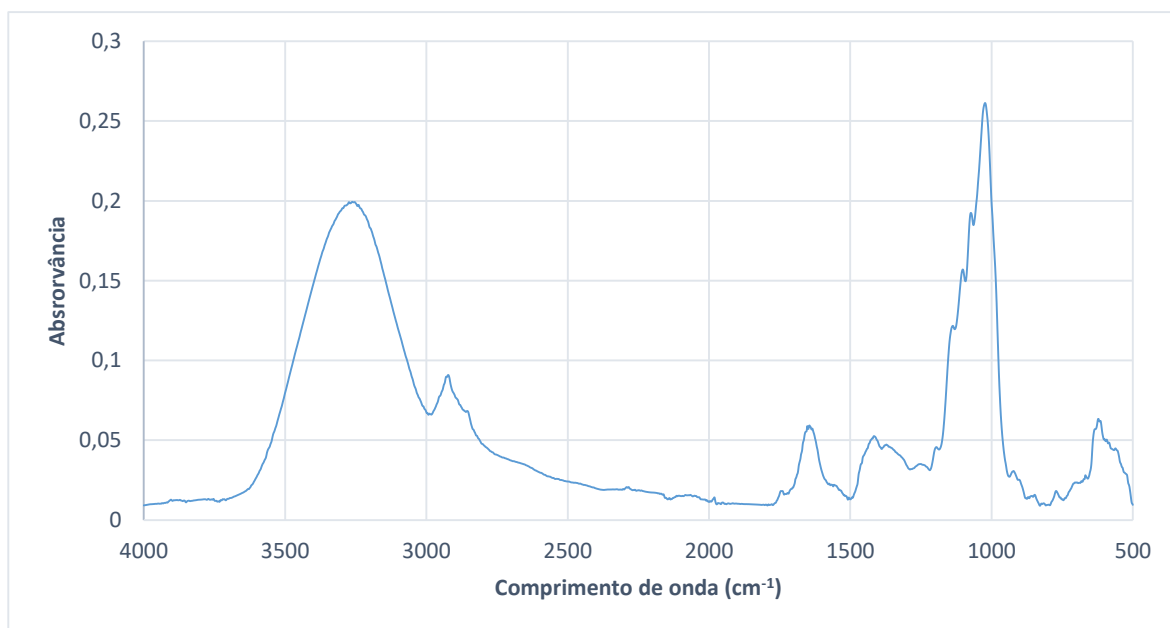
**Tabela 5.** Biomassa inoculada (fungo *P. brevicompactum*), final e a sua percentagem de crescimento após 7, 14, 21 e 28 dias (segunda experiência) na amostra de LDPE (saco).

	Biomassa inoculada (g)*	Biomassa inoculada (seca) (g)	Biomassa final (seca) (g)	Crescimento (g)	Crescimento do fungo (g) (média ± desvio padrão)	Percentagem de Biomassa (%)	Percentagem de biomassa (%) (média ± desvio padrão)
7D_I/S_C1F	0,510	0,0282	0,3330	0,3048	0,34±0,03	8,48	8,1±0,3
7D_I/S_C2F	0,570	0,0316	0,4035	0,3719		7,82	
7D_S_R1	0,522	0,0289	0,4432	0,4143	0,36±0,04	6,52	9±1
7D_S_R2	0,585	0,0324	0,3611	0,3287		8,97	
7D_S_R3	0,606	0,0336	0,3997	0,3662		8,39	
7D_S_R4	0,562	0,0311	0,3556	0,3245		8,75	
14D_I/S_C1F	0,551	0,0305	0,5316	0,5011	0,49±0,01	5,74	5,80±0,04
14D_I/S_C2F	0,543	0,0301	0,5160	0,4859		5,83	
14D_S_R1	0,645	0,0357	0,5464	0,5107	0,53±0,02	6,53	5,4±0,7
14D_S_R2	0,504	0,0279	0,5298	0,5019		5,27	
14D_S_R3	0,531	0,0294	0,5722	0,5428		5,14	
14D_S_R4	0,509	0,0282	0,5833	0,5551		4,83	
21D_I/S_C1F	0,546	0,0302	0,4829	0,4527	0,51±0,06	6,26	5,70±0,06
21D_I/S_C2	0,544	0,0301	0,5943	0,5642		5,07	
21D_S_R1	0,685	0,0379	0,4939	0,4560	0,45±0,05	7,68	7±1
21D_S_R2	0,614	0,0340	0,4367	0,4027		7,78	
21D_S_R3	0,512	0,0283	0,5586	0,5303		5,07	
21D_S_R4	0,664	0,0368	0,4578	0,4210		8,03	
28D_I/S_C1F	0,504	0,0279	0,5130	0,4851	0,48±0,01	5,44	5,7±0,2
28D_I/S_C2F	0,528	0,0292	0,4947	0,4655		5,91	
28D_S_R1	0,550	0,0305	0,2408	0,2104	0,26±0,06	12,6	11±2
28D_S_R2	0,535	0,0296	0,3890	0,3594		7,61	
28D_S_R3	0,543	0,0301	0,2547	0,2246		11,8	
28D_S_R4	0,588	0,0326	0,2590	0,2265		12,6	

\*balança utilizada com 3 casas decimais

A percentagem de crescimento do fungo na presença da amostra do saco de plástico demonstrou o mesmo comportamento já discutido para a Tabela 4. As diferenças/ oscilações de temperaturas que ocorreram durante a experiência podem ser uma possível explicação para o ocorrido, visto que o comportamento foi idêntico para ambos os tipos de microplásticos, HDPE e LDPE.

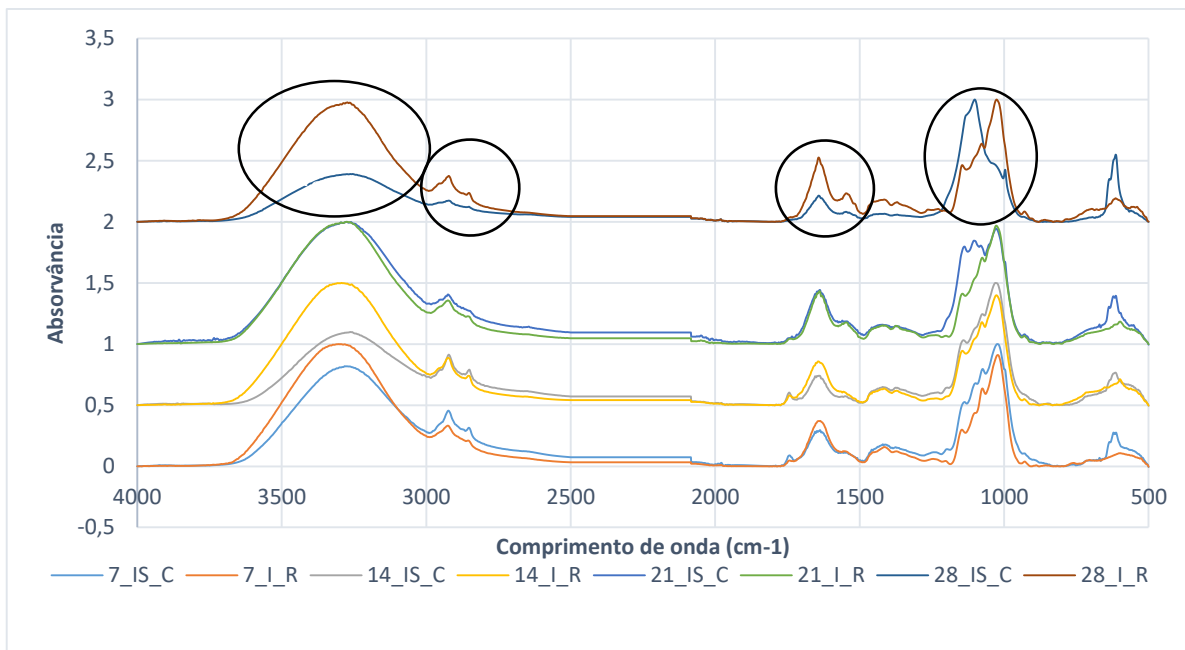
Na **Figura 20**, está representado um espectro infravermelho na região de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  do fungo *P. brevicompactum* que não esteve em contacto com microplástico.



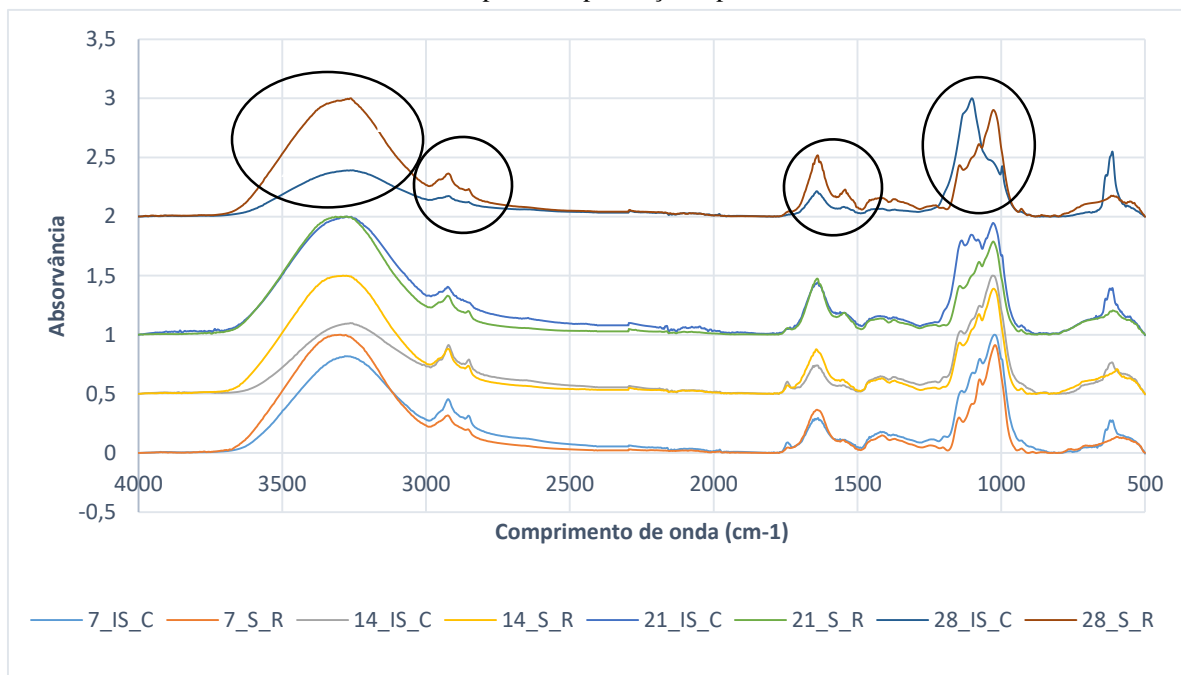
**Figura 20.** Espectro infravermelho na região dos 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  de uma amostra de fungo *P. brevicompactum* (sem contacto com microplástico).

No espectro de FTIR-ATR da amostra de fungo é possível destacar diversos picos, nomeadamente, um pico causado pelas ligações O-H na região dos 3350  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde à água. Entre as zonas 3000 e 2800  $\text{cm}^{-1}$ , encontram-se dois picos, correspondentes aos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  normalmente associados aos lípidos. A estes compostos também são relacionadas as ligações C=O representadas na zona dos 1800 a 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Os picos encontrados nos comprimentos de onda de 1700 e 1500  $\text{cm}^{-1}$  e o pico 1300  $\text{cm}^{-1}$  podem corresponder a amidas, presentes nas proteínas e um pico entre 1500 e 1400  $\text{cm}^{-1}$  relativos a vibrações C-N das mesmas moléculas. Os picos entre 1150 e 1050  $\text{cm}^{-1}$  correspondem à presença de ligações C-O provenientes de polissacarídeos<sup>88,89</sup>.

Na **Figura 21** encontram-se os espectros do fungo *P. brevicompactum*, de amostras de controlo e réplicas, ao longo dos 7, 14, 21 e 28 dias, que esteve em contacto com o microplástico do iogurte, HDPE (um controlo e uma réplica correspondentes a cada semana). Na **Figura 22** encontram-se representados os espectros obtidos para as amostras de fungos dos controlos e réplicas dos vários dias da experiência com o microplástico LDPE.



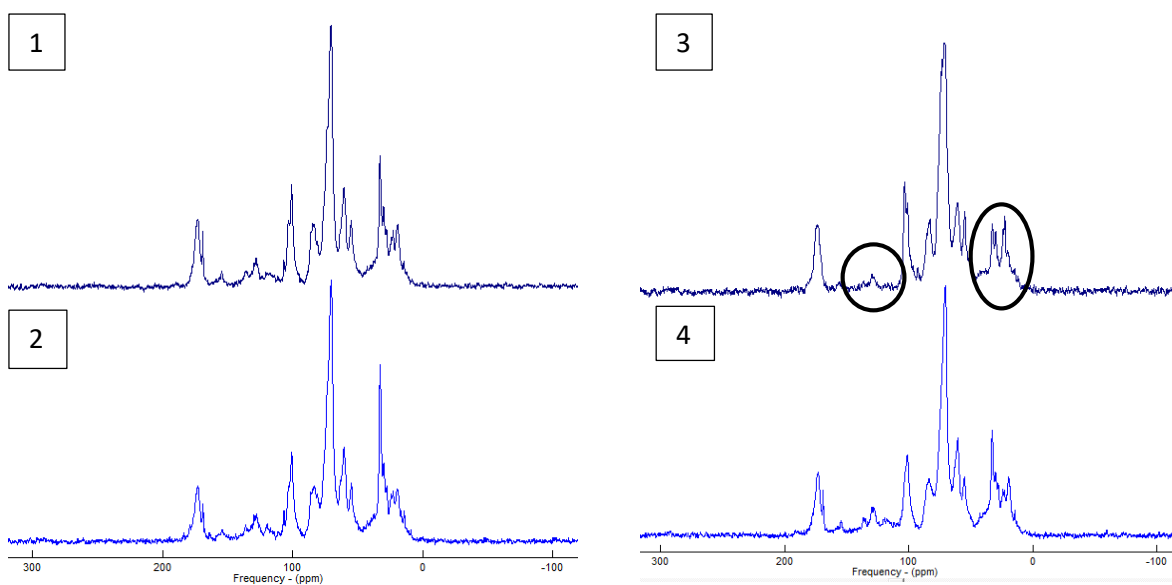
**Figura 21.** Espectro infravermelho na região dos 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  do fungo *P. brevicompactum* nas amostras de controlos e réplicas na presença do plástico HDPE.



**Figura 22.** Espectro infravermelho na região dos 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  do fungo *P. brevicompactum* nas amostras de controlos e réplicas na presença do plástico LDPE.

Foi possível observar em todos os espectros, HDPE e LDPE, o mesmo perfil observado na Figura 20. Comparando os controlos com as réplicas observou-se que todos diferem na zona dos 3600 aos 3000  $\text{cm}^{-1}$ , dos 3050 aos 2800  $\text{cm}^{-1}$ ; dos 1700 aos 1500  $\text{cm}^{-1}$  e na zona dos 1200 aos 1000  $\text{cm}^{-1}$  (identificadas pelos círculos pretos). Ao fim dos 28 dias da experiência existiam diferenças nos espectros, nomeadamente notou-se aumento da amplitude e evidência das bandas da réplica localizadas entre 3600 aos 3000  $\text{cm}^{-1}$  e 1700 aos 1500  $\text{cm}^{-1}$  quando comparado a réplica ao controlo, podendo indicar um possível aumento de proteínas. Entre 3050 e os 2800  $\text{cm}^{-1}$  o pico tornou-se mais evidente na réplica, podendo evidenciar o aparecimento de lípidos. Na região dos 1200 aos 1000  $\text{cm}^{-1}$  o perfil das réplicas manteve-se semelhante ao longo da experiência, no entanto, o perfil dos controlos foi se alterando, aumentando a sua amplitude, indicando um possível aumento de polissacarídeos.

Na **Figura 23** estão representados os espectros de RMN obtidos para as amostras de fungo em que “1” corresponde a uma réplica do fungo ao fim dos 28 dias de experiência que esteve em contacto com o plástico do saco, “2” com o plástico do iogurte, “3” ao fungo de 0 dias e “4” ao controlo de fungo ao fim de 28 dias. Nestes espectros foi possível observar diferentes regiões correspondentes a alterações químicas, apresentadas seguidamente na **Tabela 6**. De uma forma simplificada, dos 0 aos 50 ppm corresponde a ligações C-C, dos 50 aos 100 ppm C-O, dos 100 aos 150 ppm C=C e dos 150 aos 200 ppm C=O<sup>90</sup>.



**Figura 23.** Espectros <sup>13</sup>C RMN de quatro amostras do fungo *Penicillium brevicompactum*. “1” réplica do fungo ao fim dos 28 dias de experiência que esteve em contacto com o plástico do saco, “2” com o plástico do iogurte, “3” ao fungo de 0 dias e “4” ao controlo de fungo ao fim de 28 dias

**Tabela 6.** Desvio químico (ppm) correspondentes às alterações químicas que ocorrem nos espectros  $^{13}\text{C}$  RMN.

Carbono	Desvio químico (ppm)
C=O (cetonas)	205-220
C=O (aldeídos)	190-200
C=O (ácidos e ésteres)	170-185
C (anéis aromáticos)	125-150
C=C (alcenos)	115-140
RCH <sub>2</sub> OH	50-65
RCH <sub>2</sub> CL	40-45
RCH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	37-45
R <sub>3</sub> CH	25-35
CH <sub>3</sub> CO-	20-30
R <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	16-25
RCH <sub>3</sub>	10-15

Após a observação dos quatro espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN obtidos, concluiu-se que as réplicas (1 e 2) e o controlo (4) são muito semelhantes entre si. No entanto, verificaram-se variações no espectro 3 (fungo aos 0 dias), comparativamente com os restantes. As alterações localizaram-se na zona entre os 0 e os 50 ppm e entre os 100 e 150 ppm, evidenciando alterações ao nível das ligações C-C e C=C, respetivamente, demonstrando possíveis alterações a nível de certos compostos como proteínas (C-C), polissacarídeos (C-C) e/ou lípidos (C=C), uma vez que possuem estas ligações na sua estrutura. O pico cujo desvio químico se situa entre 0 e 50 ppm apresentou-se mais baixo no espectro do fungo dos 0 dias comparando com os restantes onde se observou um claro aumento evidenciando um possível aumento de proteínas e polissacarídeos. A região dos 100 aos 150 ppm indicou diferenças consideravelmente menos acentuadas, no entanto evidencia o aumento de lípidos, pois no fungo de 0 dias o pico é menor e nos restantes espectros aumenta.

Na **Tabela 7** encontram-se representadas as percentagens de carbono, hidrogénio, azoto e enxofre obtidas para as quatro amostras de fungo, nomeadamente, de um controlo ao fim de 28 dias de experiência (A), uma réplica que esteve em contacto com o



microplástico do iogurte (HDPE) (B) e do saco (LDPE) (C) e do fungo aos 0 dias (D), que não esteve exposto ao plástico.

**Tabela 7.** Percentagens de carbono, hidrogénio, azoto e enxofre, para as amostras de fungo - 28\_I/S\_C2 (A); 28\_I\_R1 (B); 28\_S\_R4 (C); fungo de 0 dias (D).

Nome da amostra	Massa (mg)	%C	%H	%N	%S
A- 28_I/S_C2	1,95	17,23	3,37	1,54	0,65
B- 28_I_R1	1,50	23,01	4,00	1,95	0,34
C- 28_S_R4	1,58	24,02	4,23	2,09	0,38
D- Fungo de 0 dias	1,49	25,31	4,75	1,34	0,25

As amostras dos fungos analisadas (B e C) demonstraram entre si poucas variações nas percentagens de carbono, hidrogénio, azoto e enxofre, apresentadas na tabela anterior, concluindo-se assim que o tipo de microplástico não influenciou a mudança na constituição do fungo. Já comparando as amostras (B e C) com o fungo de 0 dias (D) observou-se que apenas no azoto e no enxofre as diferenças eram mais acentuadas. No entanto, a amostra do controlo (A) e a amostra do fungo de 0 dias (D) mostraram diferenças na percentagem de carbono e hidrogénio, sendo estas superiores no D, e de azoto e enxofre inferiores. Uma das razões possíveis é que o fungo D provém de um meio de cultura de crescimento, ou seja, mais rico, ao contrário do fungo A que esteve 28 dias em condições diferentes e com menos nutrientes disponíveis. Relativamente às amostras do controlo (A) e amostras B e C observamos que as percentagens de carbono e hidrogénio são superiores nestas últimas. Uma possível explicação é a presença dos microplásticos nos meios das amostras B e C, que servem como fonte de carbono e tornam assim o meio um pouco mais rico, do que o meio de controlo.

Em suma, através da análise dos espectros de Infravermelho e de  $^{13}\text{C}$  RMN concluiu-se que provavelmente houve um aumento de proteínas ao longo da experiência nas réplicas, quando comparado com os controlos. O aumento da percentagem de carbono nas réplicas evidência a mesma conclusão, sendo um elemento presente nos compostos, tal como o aumento da percentagem de azoto.

As percentagens de microplásticos removidos ao longo da segunda experiência de biodegradação do PE, com o fungo *P. brevicompactum*, de HDPE e LDPE estão apresentadas nas **Tabelas 8 e 9**, respetivamente.

**Tabela 8.** Percentagem de microplásticos (MP) removidos (segunda experiência de 28 dias) com amostra HDPE (iogurte) na presença do fungo *P. brevicompactum*.

	MP início (g)*	MP recuperados (g)*	MP removidos (g)	Remoção de plásticos (g) (média ± desvio padrão)	Percentagem de MP removidos (%)	Percentagem de MP Removidos (%) (média ± desvio padrão)
7D_I_C1P	0,0150	0,0149	0,0001	0,00005±0,00005	0,67	0,3±0,3
7D_I_C2P	0,0150	0,0150	0		0	
7D_I_R1	0,0149	0,0123	0,0026	0,004±0,002	18	28±10
7D_I_R2	0,0148	0,0113	0,0035		24	
7D_I_R3	0,0149	0,0113	0,0036		24	
7D_I_R4	0,0149	0,0082	0,0067		45	
14D_I_C1P	0,0152	0,0150	0,0002	0,0003±0,0001	1,3	2,0±0,6
14D_I_C2P	0,0153	0,0149	0,0004		2,6	
14D_I_R1	0,0150	0,0099	0,0051	0,004±0,002	34	28±10
14D_I_R2	0,0149	0,0093	0,0056		38	
14D_I_R3	0,0151	0,0107	0,0044		29	
14D_I_R4	0,0147	0,0131	0,0016		11	
21D_I_C1P	0,0150	0,0147	0,0003	0,0002±0,0001	2	1,3±0,6
21D_I_C2P	0,0148	0,0147	0,0001		0,68	
21D_I_R1	0,0147	0,0123	0,0024	0,00230 ±0,00008	16	15±1
21D_I_R2	0,0152	0,0129	0,0023		15	
21D_I_R3	0,0150	0,0128	0,0022		15	
21D_I_R4	0,0152	0,0130	0,0022		15	
28D_I_C1P	0,0155	0,0155	0	0,0003±0,0003	0,00	2±2
28D_I_C2	0,0151	0,0145	0,0006		4	
28D_I_R1	0,0155	0,0152	0,0003	0,001±0,001	2	8±8
28D_I_R2	0,0155	0,0124	0,0031		20	
28D_I_R3	0,0152	0,0139	0,0013		9	
28D_I_R4	0,0149	0,0147	0,0002		1,3	

\* balança utilizada com 4 casas decimais

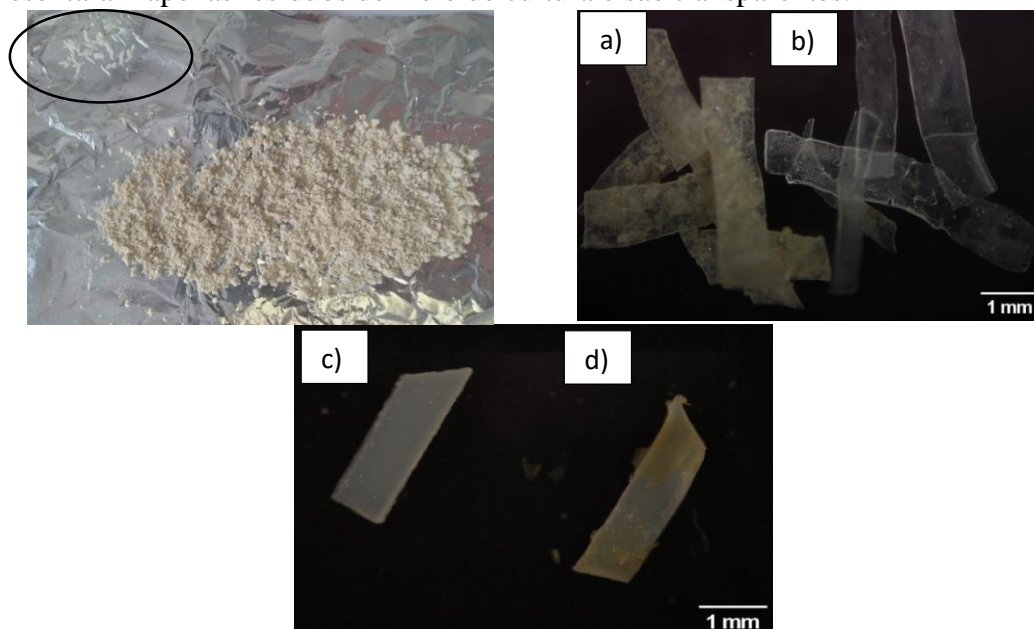
**Tabela 9.** Percentagem de microplásticos (MP) removidos (segunda experiência de 28 dias) com amostra LDPE (saco) na presença do fungo *P. brevicompactum*.

	MP início (g)*	MP recuperados (g)*	MP removidos (g)	Remoção de plásticos (g) (média ± desvio padrão)	Percentagem de MP removidos (%)	Percentagem de MP Removidos (%) (média ± desvio padrão)
7D_S_C1P	0,0149	0,0149	0	0,0004±0,0004	0	3±3
7D_S_C2P	0,0155	0,0147	0,0008		5	
7D_S_R1	0,0151	0,0066	0,0085	0,006±0,002	56	38±11
7D_S_R2	0,0148	0,0094	0,0054		37	
7D_S_R3	0,0152	0,0103	0,0049		32	
7D_S_R4	0,0152	0,0111	0,0041		27	
14D_S_C1P	0,0152	0,0142	0,0010	0,0006±0,0005	6	4±3
14D_S_C2P	0,0152	0,0151	0,0001		0,66	
14D_S_R1	0,0155	0,0085	0,0070	0,007±0,001	45	44±6
14D_S_R2	0,0148	0,0081	0,0067		45	
14D_S_R3	0,0146	0,0097	0,0049		34	
14D_S_R4	0,0148	0,0072	0,0076		51	
21D_S_C1P	0,0148	0,0145	0,0003	0,0005±0,0002	2	3±1
21D_S_C2P	0,0149	0,0143	0,0006		4	
21D_S_R1	0,0153	0,0091	0,0062	0,0006±0,0007	41	40±5
21D_S_R2	0,0149	0,0082	0,0067		45	
21D_S_R3	0,0155	0,0092	0,0063		41	
21D_S_R4	0,0152	0,0103	0,0049		32	
28D_S_C1P	0,0149	0,0148	0,0001	0,00015±0,00005	0,67	1,0±0,3
28D_S_C2P	0,0154	0,0152	0,0002		1,30	
28D_S_R1	0,0148	0,0131	0,0017	0,0019±0,0006	12	13±4
28D_S_R2	0,0152	0,0123	0,0029		19	
28D_S_R3	0,0151	0,0138	0,0013		9	
28D_S_R4	0,0154	0,0136	0,0018		12	

\* balança utilizada com 4 casas decimais

As percentagens de remoção de microplásticos nas amostras de controlo, de HDPE e LDPE, aproximaram-se de 0 % (não sendo exatamente porque há sempre perdas de plástico na sua recuperação (aquando da filtração), ou podem ter ficado nas paredes ou tampas dos *Erlenmeyers*) enquanto que nas amostras das réplicas foram muito superiores. Ao fim dos 7 e 14 dias de experiência com o HDPE obtiveram-se percentagens de remoção de microplástico de cerca de  $28 \pm 10$  %, para ambas as semanas, vindo a diminuir aos 21 dias para  $15 \pm 1$  %. No caso da amostra do saco de plástico (LDPE) as percentagens da sua remoção foram superiores comparativamente ao HDPE apresentando  $38 \pm 11$  % ao fim de 7 dias de experiência,  $44 \pm 6$  % aos 14 dias e  $40 \pm 5$  % aos 21 dias. No entanto, ao fim dos 28 dias observou-se que as percentagens de remoção de microplásticos foram inferiores (HDPE-  $8 \pm 8$  % e LDPE-  $13 \pm 4$  %) comparando com as amostras ao fim dos 7, 14 e 21 dias. Uma possível explicação para os valores obtidos pode ser a presença de matéria orgânica (fungo aderido aos microplásticos). Os microplásticos, neste caso, LDPE ao serem

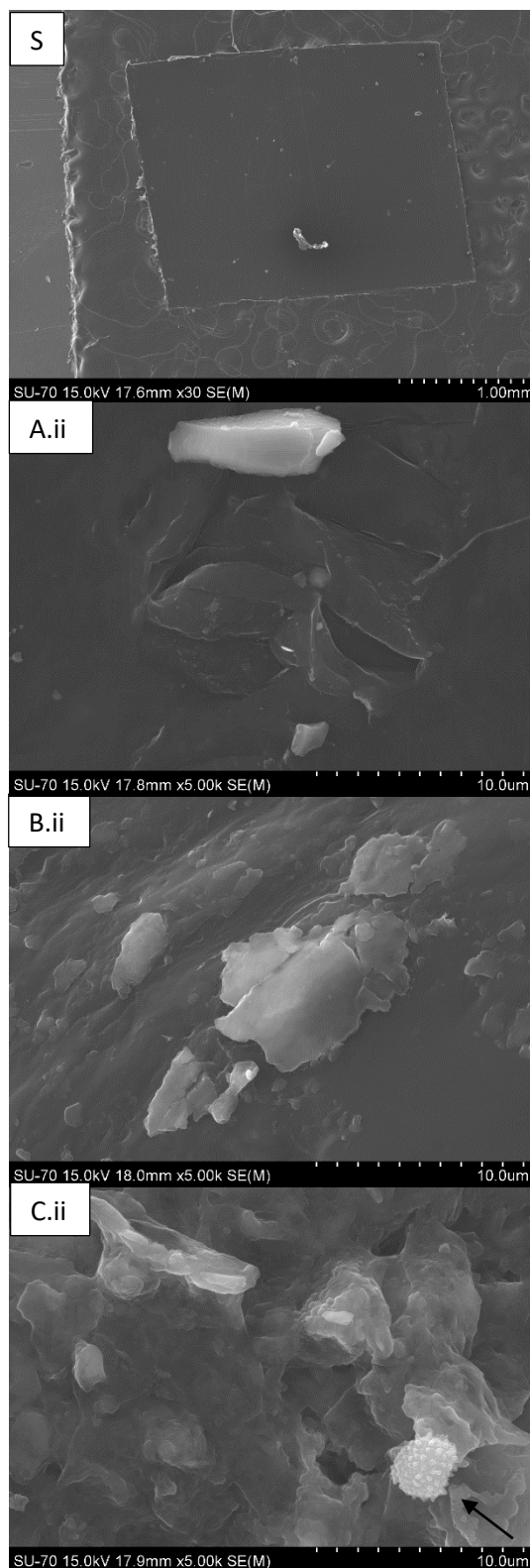
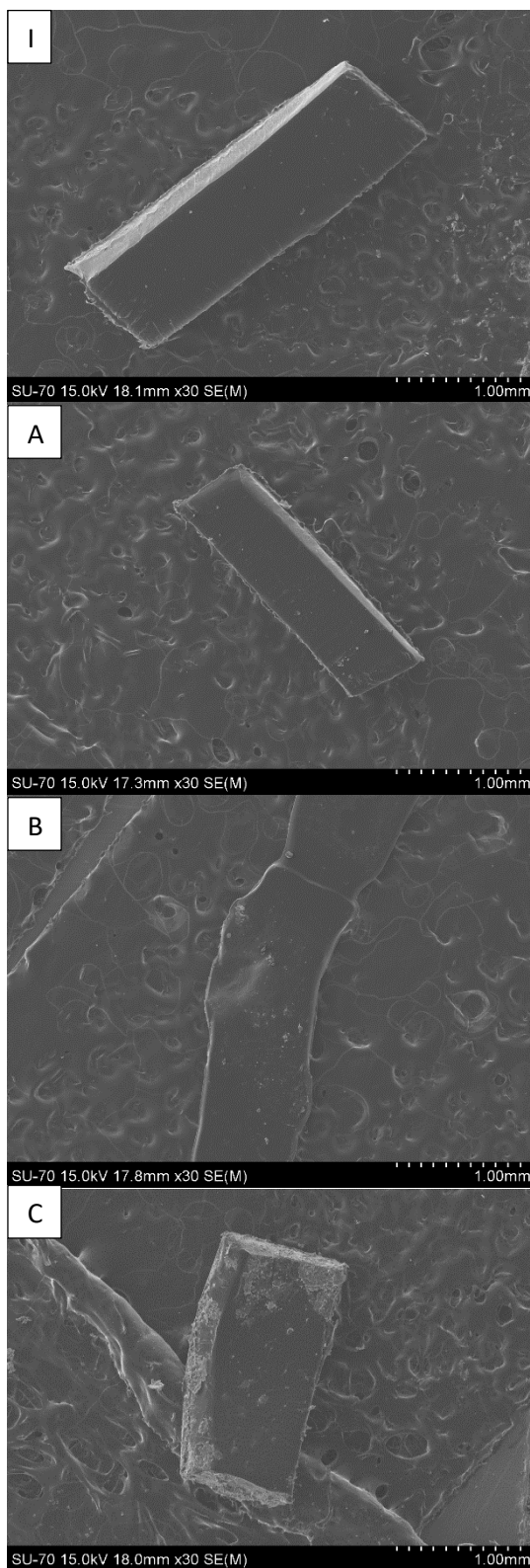
separados do fungo depois deste ser liofilizado, imagem superior esquerda da **Figura 24**, apresentam sempre matéria orgânica aderida o que influencia a massa final dos fragmentos de plástico (na experiência anterior foi feito um tratamento com ácido nítrico aos microplásticos de forma a eliminar a matéria orgânica, no entanto, não mostrou vantagens uma vez que na análise de FTIR o espectro evidenciava a existência de fungo. Assim, não foi realizado nenhum tratamento neste caso). Com auxílio de um microscópio ótico foram tiradas fotografias aos plásticos permitindo observar as diferenças entre as réplicas, que estiveram em contacto com o fungo (a-LDPE e d-HDPE), e os controlos (b-LDPE e c-HDPE) ao fim dos 28 dias de experiência. Mais uma vez, as diferenças foram claras, destacando-se a cor amarelada das réplicas a) e d) que evidencia a presença do fungo e mostra a tendência que este tem para aderir aos plásticos. No caso dos controlos b) e c), estes apresentaram apenas resíduos de meio de cultura e são transparentes.

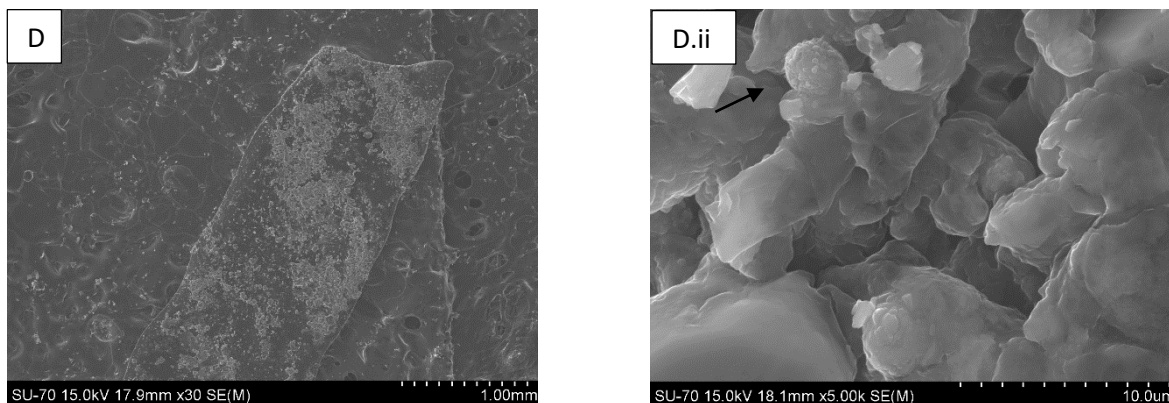


**Figura 24.** Separação dos microplásticos LDPE do fungo liofilizado (superior esquerda) e fotografia em microscópio dos microplásticos em contacto com o fungo (a-LDPE e d-HDPE) e os controlos (b-LDPE e c-HDPE).

As imagens obtidas no SEM, onde “I” corresponde à amostra virgem de um fragmento de microplástico proveniente do iogurte, “S” à amostra virgem de microplástico oriundo do saco, “A” ao controlo do microplástico proveniente do iogurte ao fim de 28 dias de experiência e “B” ao controlo do microplástico do saco, “C” à réplica do microplástico proveniente do iogurte que esteve em contacto com o fungo ao fim dos 28 dias de experiência e “D” à réplica do microplástico oriundo do saco, estão apresentadas na **Figura 25**. As amostras dos controlos (A e B) e das réplicas (C e D) foram ampliadas, representadas por

“ii”, com o objetivo de ser mais fácil observar os pormenores, nomeadamente os fungos nas réplicas.

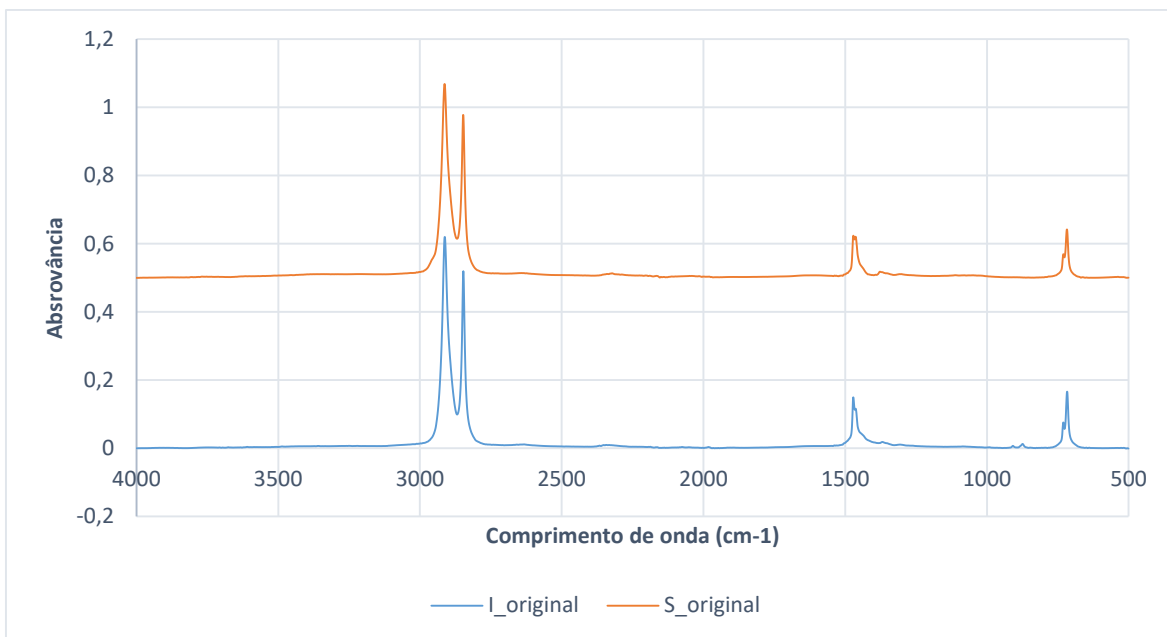




**Figura 25.** Imagens obtidas pelo SEM de amostras de plástico. I-Amostra original I; S-Amostra original S; A-controlo I; B-controlo S; C-Réplica I; D-Réplica S. As imagens “ii” são fotografias ampliadas do plástico correspondente.

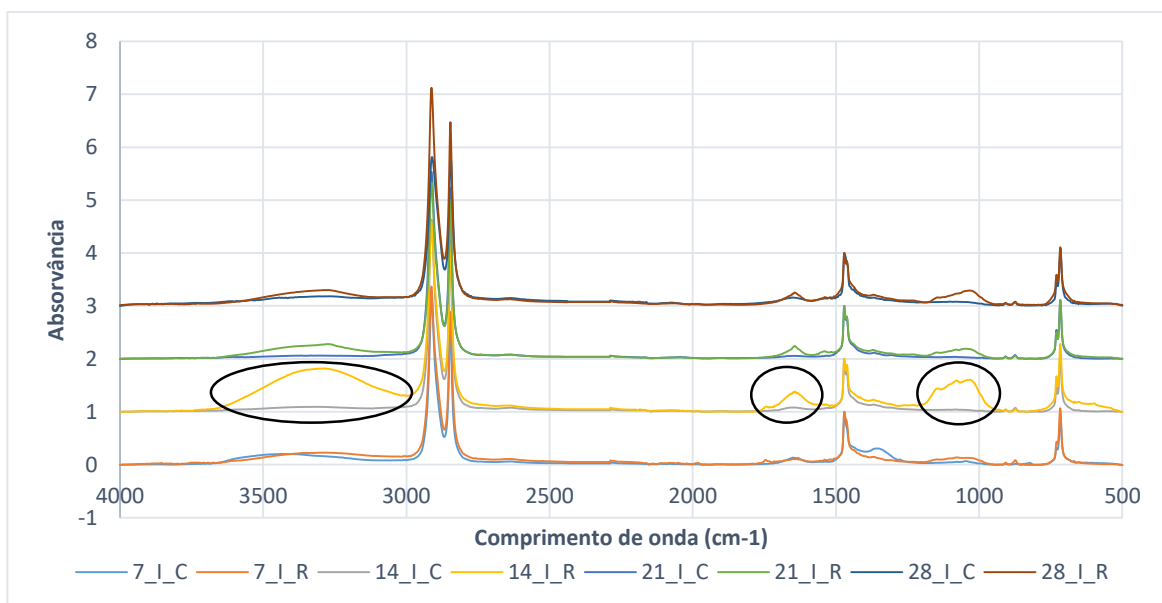
As imagens mostram algumas diferenças principalmente entre os microplásticos virgens e controlos, com as réplicas. As imagens I e S são muito semelhantes às A e B, respetivamente, uma vez que as primeiras correspondem aos microplásticos virgens e as segundas aos controlos que estiveram em contacto apenas com meio de cultura ao longo dos 28 dias de experiência. Relativamente às imagens C e D foi possível notar que o fungo está presente, comparativamente com os controlos, A e B. Nas imagens com uma escala mais ampliada, “ii”, foi possível observar que os controlos estão desprovidos de resíduos, enquanto que as réplicas apresentavam fungo aderido ao microplástico (evidenciados pelas setas pretas, imagens C.ii e D.ii).

Na **Figura 26** encontra-se representado o espectro de infravermelho de amostras de microplástico (HDPE e LDPE) sem exposição ao fungo. Neste espectro destacam-se três bandas/picos característicos do polietileno, nomeadamente, entre os 3000 e os 2800  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondem ao alongamento assimétrico do  $\text{CH}_2$ , entre 1500 e os 1450  $\text{cm}^{-1}$ , ao alongamento simétrico do  $\text{CH}_2$  e entre 750 e os 700  $\text{cm}^{-1}$ , à deformação do  $\text{CH}_2$  e a zona dos 731-720  $\text{cm}^{-1}$  a uma deformação oscilante. Os espectros de infravermelho dos microplásticos, HDPE e LDPE, são muito semelhantes. Destacam-se os picos na região dos 2919  $\text{cm}^{-1}$ , 2851  $\text{cm}^{-1}$  e os picos 1473 e 1463  $\text{cm}^{-1}$ <sup>91</sup>.

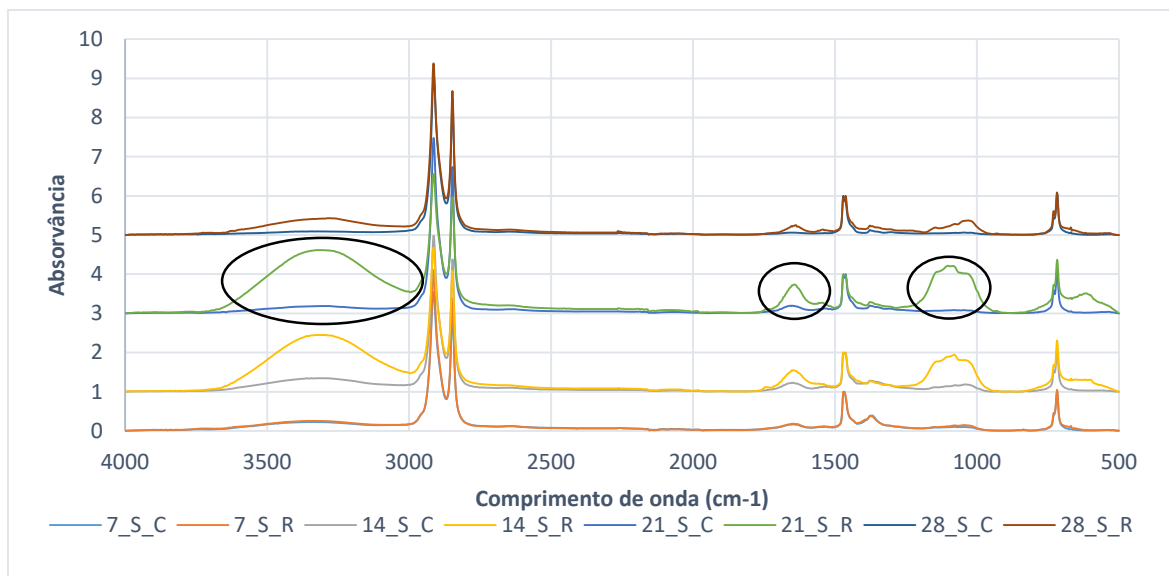


**Figura 26.** Espectro de infravermelho do plástico sem exposição ao fungo da amostra do iogurte (I-HDPE) e do saco de plástico (S-LDPE) obtidos.

Nas **Figuras 27 e 28** encontram-se os espectros de infravermelho correspondentes aos microplásticos dos controlos (C) e réplicas (R) ao longo dos 28 dias da relativos aos microplásticos HDPE e LDPE, respetivamente.



**Figura 27.** Espectro infravermelho na região dos 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  dos controlos e réplicas (em contacto com o fungo *P. brevicompactum*) do plástico HDPE ao longo das quatro semanas da experiência.



**Figura 28.** Espectro infravermelho na região dos 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  dos controlos e réplicas (em contacto com o fungo *P. brevicompactum*) do plástico LDPE ao longo das quatro semanas de experiência.

Uma vez que se podem visualizar novas bandas nos espectros das réplicas é possível afirmar que ocorreu degradação dos microplásticos de HDPE e LDPE. Apareceram bandas nos espectros de infravermelho das réplicas na região dos 3600 aos 3000  $\text{cm}^{-1}$  devido a grupos O-H, formação de um pico na região dos 1700-1500  $\text{cm}^{-1}$  causada por vibrações de grupos carbonilo e um aparecimento de uma banda na região dos 1200-1000  $\text{cm}^{-1}$  devido a ligações C-O-C, que nos controlos não existia (destacados nas Figuras 27 e 28 por círculos pretos, exemplos aleatórios)<sup>91</sup>. Ao fim dos 21 e 28 dias, HDPE, foi impossível obter um espectro de infravermelho correspondente apenas ao microplástico pois o fungo aderiu ao mesmo, tendo-se verificado o aparecimento de picos devido ao fungo nomeadamente na zona de 1200 a 1000  $\text{cm}^{-1}$ . Aos 14 e 21 dias as diferenças entre o controlo e a réplica são bastante evidentes nas zonas de degradação de 3600 aos 3000  $\text{cm}^{-1}$ , 1700-1500  $\text{cm}^{-1}$  e 1200-1000  $\text{cm}^{-1}$ . O espectro de infravermelho da amostra de microplástico LDPE após 28 dias de exposição ao fungo demonstra igualmente a presença de fungo, não sendo possível retirar conclusões.

Foi calculado o índice de carbonilo (CI), **Equação 3**, onde o numerador corresponde à absorvância do pico do carbonilo (1600  $\text{cm}^{-1}$ ) (Abs 1) e o denominador à absorvância do pico de referência, o polietileno (1471  $\text{cm}^{-1}$ ) (Abs 2)<sup>92</sup>.

$$\text{Equação 3: } CI = \frac{Abs(1)}{Abs(2)}$$



Na **Tabela 10** estão representados os valores da absorvância e do comprimento de onda correspondente obtidos com o auxílio do software “SpectraGryph 1.2”, existindo sempre oscilações em relação aos valores tabelados de 1600  $\text{cm}^{-1}$  e 1471  $\text{cm}^{-1}$ .

**Tabela 10.** Absorvâncias obtidas para os comprimentos de onda 1600 e 1471  $\text{cm}^{-1}$  e índice do carbonilo correspondente relativo ao PE da segunda experiência de 28 dias, a) HDPE (I); b) LDPE (S).

a)

	Comprimento de onda do pico carbonilo	Abs $\text{cm}^{-1}$ (carbonilo)	Comprimento de onda (referência)	Abs $\text{cm}^{-1}$ (Referência)	Índice carbonilo
7_I_C	1651,3	0,1344	1470,5	0,9950	<b>0,1351</b>
7_I_R	1646,5	0,1080	1470,5	0,9929	<b>0,1088</b>
14_I_C	1643,9	0,0824	1470,9	0,9965	<b>0,0826</b>
14_I_R	1643,6	0,3805	1470,8	0,9946	<b>0,3826</b>
21_I_C	—	0,000	1471,0	0,9999	<b>0</b>
21_I_R	1643,8	0,2432	1470,8	0,9937	<b>0,2447</b>
28_I_C	1653,0	0,1593	1470,4	0,9946	<b>0,1601</b>
28_I_R	1643,6	0,2527	1470,8	0,9954	<b>0,2538</b>

b)

	Comprimento de onda do pico carbonilo	Abs $\text{cm}^{-1}$ (carbonilo)	Comprimento de onda (referência)	Abs $\text{cm}^{-1}$ (Referência)	Índice carbonilo
7_S_C	1644,7	0,1677	1467,6	0,9982	<b>0,1680</b>
7_S_R	1645,4	0,1839	1469,7	0,9972	<b>0,1844</b>
14_S_C	1645,4	0,2269	1463,8	0,9996	<b>0,2269</b>
14_S_R	1645,7	0,5511	1470,3	0,9989	<b>0,5517</b>
21_S_C	1651,3	0,1980	1462,9	0,9996	<b>0,1981</b>
21_S_R	1643,3	0,7367	1469,6	0,9982	<b>0,7380</b>
28_S_C	1651,6	0,0624	1470,0	1,000	<b>0,0624</b>
28_S_R	1638,2	0,2516	1462,5	0,9970	<b>0,2523</b>

Com a absorvância correspondente aos comprimentos de onda de 1600  $\text{cm}^{-1}$  e de 1471  $\text{cm}^{-1}$  foi calculado o índice de carbonilo. Na Tabela 10 a) pode observar-se que, à exceção dos 7 dias de experiência, todos os controlos de microplástico tiveram índice carbonilo inferior às réplicas, o que era esperado, uma vez que nos controlos não era espectável ter ocorrido degradação. Estes resultados corroboram o que foi apresentado na Figura 27 em que se observam as bandas de degradação a partir dos 14 dias. Relativamente aos microplásticos de LDPE, Tabela 10 b), todas as réplicas apresentaram valores superiores comparativamente aos controlos, sendo a maior diferença registada ao fim dos 21 dias, concordante também com as bandas de degradação do espectro, Figura 28.

Como conclusão, na segunda experiência com o plástico PE, em 28 dias, houve um aumento da biomassa em  $13 \pm 3 \%$  para o caso do HDPE e  $11 \pm 2 \%$  para o LDPE. O fungo demonstrou aderência a ambos os plásticos como se comprovou pelas fotografias apresentadas na Figura 25. A partir da percentagem de remoção dos microplásticos, dos espectros de infravermelho e do índice de carbonilo, foi possível determinar que ocorreu degradação, sendo que foram alcançadas percentagens de remoção de microplástico na ordem dos  $8 \pm 8 \%$  e  $13 \pm 4 \%$  ao fim de 28 dias para o HDPE e LDPE, respetivamente. No entanto, estes valores podem ser na realidade superiores, uma vez que as amostras tinham fungo aderido, o que influenciou inevitavelmente a massa final. Outra razão para se suspeitar que as percentagens de degradação possam ser maiores é que ao fim de 21 dias obtivemos valores superiores, cerca de  $15 \%$  e  $40 \%$ , para o HDPE e LDPE, comparando com os 28 dias.

Um estudo sobre a biodegradação do polietileno, mas durante um período mais longo (três meses) e com um fungo diferente (*Penicillium simplicissimum* YK), demonstrou que o micro-organismo crescia no meio com o microplástico como também o utilizava como fonte de carbono<sup>93</sup>. Outra investigação com o fungo *Trichoderma harzianum* alcançou uma percentagem de remoção de microplástico PE de 23% durante uma experiência de três meses<sup>94</sup>. Para além dos fungos, também bactérias demonstram esta capacidade, tal como *Pseudomonas sp.* AKS2 que foi inoculada com o plástico LDPE durante um período de 45 dias de experiência a uma temperatura de 30°C. A percentagem de degradação alcançada ao fim do tempo da experiência, 45 dias, foi de  $5 \pm 1\%$ <sup>95</sup>. Assim, os valores obtidos ( $8 \pm 8 \%$  e  $13 \pm 4 \%$  para o HDPE e LDPE) foram bons resultados, no entanto podem ser melhorados. Alguns autores aumentaram a degradação por pré-tratamento, como por exemplo irradiação do plástico com luz UV, o que poderia ser interessante experimentar para perceber se aumentariam as percentagens obtidas.

### 3.2 Biodegradação com o fungo *Penicillium brevicompactum* inoculado no meio com os microplásticos de Poliestireno e Poliestireno Expandido

O objetivo das experiências com os microplásticos de poliestireno (PS) e poliestireno expandido (EPS) foi verificar se ocorreria, ou não, biodegradação no período de 15 dias. Na **Tabela 11** e **Tabela 12**, estão apresentadas as percentagens de crescimento do fungo *P. brevicompactum* que foram obtidas ao longo dos 15 dias, para as inoculações no meio de cultura com os microplásticos PS e EPS, respetivamente. Estão presentes todos os dados ao longo da experiência, nomeadamente da quantidade biomassa inoculada e final, dos seis controlos e doze réplicas, correspondentes a cada paragem.

Para todas as tabelas apresentadas o “D” significa os dias a que a amostra foi retirada da incubadora, “PS” amostra dos pellets de PS, “EPS” amostra real EPS, “C” controlo, “F” fungo, “P” plástico e “R” réplica.

**Tabela 11.** Biomassa inoculada de fungo *P. brevicompactum* (g), final e a sua percentagem de crescimento durante a experiência de 15 dias no meio inoculado com microplásticos de PS.

	Biomassa inoculada (g)*	Biomassa inoculada (seca) (g)	Biomassa final (seca) (g)	Crescimento (g)	Crescimento do fungo (g) (média ± desvio padrão)	Percentagem de Biomassa (%)	Percentagem de biomassa (%) (média ± desvio padrão)
5D_PS/EPS_C1	0,496	0,0410	0,1022	0,0612	0,070±0,008	40,1	38±2
5D_PS/EPS_C2	0,514	0,0425	0,1201	0,0776		35,4	
5D_PS_R1	0,631	0,0521	0,1031	0,0510	0,07±0,01	55,6	42±6
5D_PS_R2	0,565	0,0467	0,1348	0,0881		34,6	
5D_PS_R3	0,509	0,0420	0,1039	0,0619		40,5	
5D_PS_R4	0,536	0,0443	0,1044	0,0601		42,4	
10D_PS/EPS_C1	0,548	0,0453	0,1526	0,1073	0,09±0,02	29,7	33±4
10D_PS/EPS_C2	0,516	0,0426	0,1159	0,0733		36,8	
10D_PS_R1	0,610	0,0504	0,1547	0,1043	0,09±0,02	32,6	34±5
10D_PS_R2	0,527	0,0435	0,1022	0,0587		42,6	
10D_PS_R3	0,499	0,0412	0,1441	0,1029		28,6	
10D_PS_R4	0,520	0,0430	0,1390	0,0961		30,9	
15D_PS/EPS_C1	0,530	0,0438	0,1135	0,0697	0,080±0,005	38,6	37±2
15D_PS/EPS_C2	0,513	0,0424	0,1227	0,0803		34,5	
15D_PS_R1	0,512	0,0423	0,1332	0,0909	0,090±0,006	31,8	33±2
15D_PS_R2	0,540	0,0446	0,1226	0,0780		36,4	
15D_PS_R3	0,516	0,0426	0,1263	0,0837		33,8	
15D_PS_R4	0,505	0,0417	0,1344	0,0927		31,0	

\*balança utilizada com 3 casas decimais

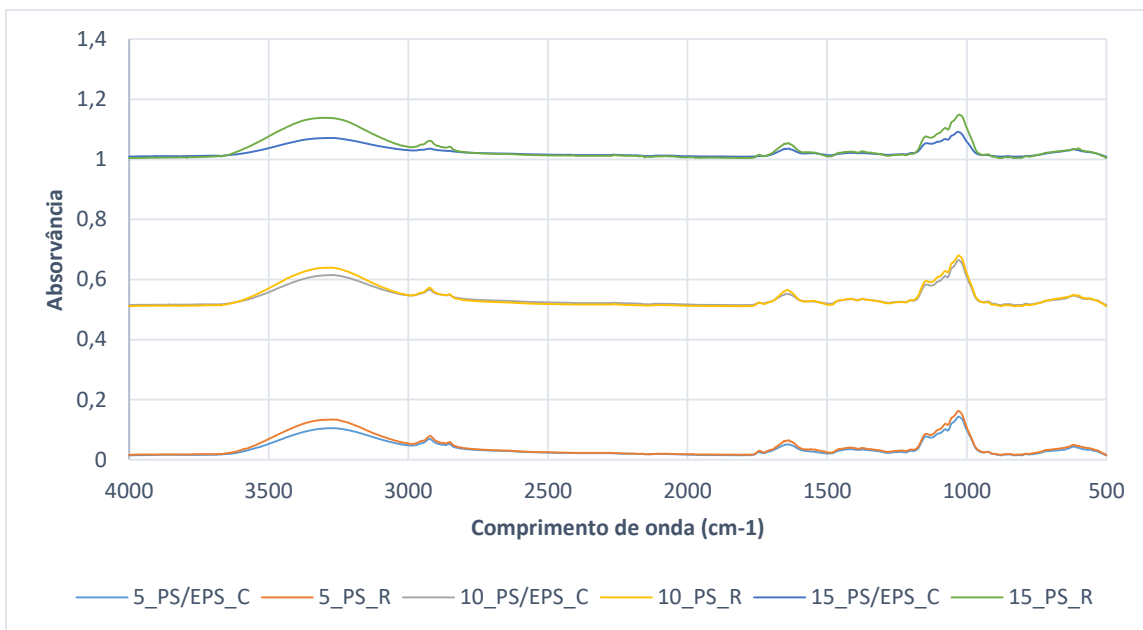
**Tabela 12.** Biomassa inoculada de fungo *P. brevicompactum* (g), final e a sua percentagem de crescimento durante a experiência de 15 dias no meio inoculado com microplásticos de EPS.

	Biomassa inoculada (g)*	Biomassa inoculada (seca) (g)	Biomassa final (seca) (g)	Crescimento (g)	Crescimento do fungo (g) (média ± desvio padrão)	Percentagem de Biomassa (%)	Percentagem de biomassa (%) (média ± desvio padrão)
5D_PS/EPS_C1	0,496	0,0410	0,1022	0,0612	0,070±0,008	40,1	38±2
5D_PS/EPS_C2	0,514	0,0425	0,1201	0,0776		35,4	
5D_EPS_R1	0,516	0,0426	0,0995	0,0569	0,06±0,01	42,8	42±6
5D_EPS_R2	0,547	0,0452	0,1233	0,0781		36,6	
5D_EPS_R3	0,626	0,0517	0,1012	0,0495		51,1	
5D_EPS_R4	0,526	0,0435	0,1157	0,0723		37,6	
10D_PS/EPS_C1	0,548	0,0453	0,1526	0,1073	0,09±0,02	29,7	33±4
10D_PS/EPS_C2	0,516	0,0426	0,1159	0,0733		36,8	
10D_EPS_R1	0,571	0,0472	0,1320	0,0848	0,080±0,005	35,7	36±2
10D_EPS_R2	0,523	0,0432	0,1210	0,0778		35,7	
10D_EPS_R3	0,491	0,0406	0,1202	0,0796		33,7	
10D_EPS_R4	0,542	0,0448	0,1149	0,0701		39,0	
15D_PS/EPS_C1	0,530	0,0438	0,1135	0,0697	0,080±0,005	38,6	37±2
15D_PS/EPS_C2	0,513	0,0424	0,1227	0,0803		34,5	
15D_EPS_R1	0,522	0,0431	0,1147	0,0716	0,080±0,006	37,6	35±2
15D_EPS_R2	0,535	0,0442	0,1331	0,0889		33,2	
15D_EPS_R3	0,503	0,0416	0,1249	0,0834		33,3	
15D_EPS_R4	0,507	0,0419	0,1233	0,0814		34,0	

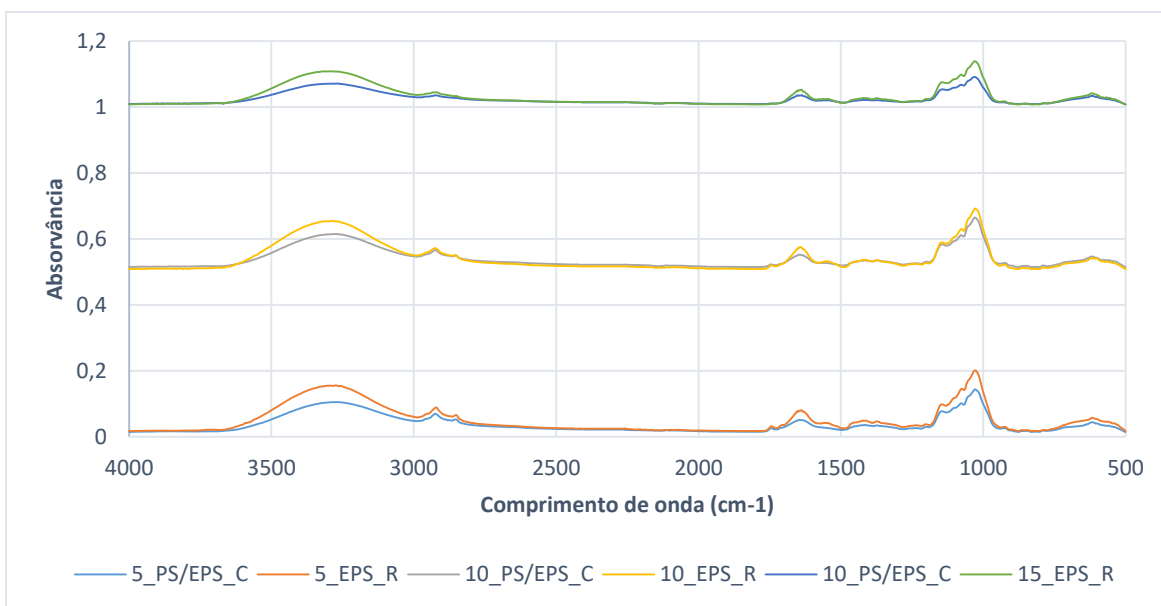
\*balança utilizada com 3 casas decimais

A partir das percentagens de crescimento obtidas ao fim de cada semana de experiência, durante os 15 dias, concluiu-se que os microplásticos presentes no meio não interferiram de forma negativa no crescimento do fungo. Assim, inferiu-se que não eram tóxicos nem colocavam em causa a sobrevivência do fungo, uma vez que não se verificam grandes oscilações entre controlos e réplicas. Nos primeiros 5 dias observou-se que o fungo *P. brevicompactum* aumentou cerca de  $38 \pm 2$  % nos controlos e  $42 \pm 6$  % em ambas as réplicas de PS e EPS. No entanto, teve um decréscimo, não muito acentuado, ao fim de 10 dias (cerca de  $34 \pm 5$  % /  $36 \pm 2$  % - PS/EPS) e de 15 dias (cerca de  $33 \pm 2$  % /  $35 \pm 2$  % - PS/EPS). Este acontecimento de diminuição de crescimento poderá ser explicado pelo decaimento de nutrientes que foram consumidos mais rapidamente no início da experiência.

Na **Figura 29 e Figura 30**, apresentadas seguidamente, estão representados os espectros de infravermelho obtidos do fungo *P. brevicompactum* que esteve em contacto com os microplásticos de PS e de EPS, respetivamente, um controlo e uma réplica de cada paragem (ao fim de 5, 10 e 15 dias).



**Figura 29.** Espectro infravermelho na região dos 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  do fungo *P. brevicompactum* nas amostras de controlos e réplicas na presença de microplástico de PS.



**Figura 30.** Espectro infravermelho na região dos 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  do fungo *P. brevicompactum* nas amostras de controlos e réplicas na presença de microplásticos de EPS.

Foi possível observar em todos os espectros das Figuras acima, 29 e 30, o mesmo perfil observado na Figura 20, espectro de infravermelho do fungo sem exposição aos microplásticos. Entre controlos e réplicas ocorreram alterações, nomeadamente nas zonas 3600 aos 3000  $\text{cm}^{-1}$ , dos 3050 aos 2800  $\text{cm}^{-1}$ ; dos 1700 aos 1500  $\text{cm}^{-1}$  e na zona dos 1200 aos 1000  $\text{cm}^{-1}$ , como referido anteriormente na experiência do polietileno durante 28 dias.

No caso dos microplásticos de PS e de EPS as diferenças nestas regiões são menos acentuadas comparando com as observadas nos espectros dos plásticos HDPE e LDPE, no entanto é um resultado esperado tendo a conta a diferença do período da experiência.

Nas **Tabelas 13 e 14** estão apresentadas as percentagens de microplásticos de PS e EPS removidos, respetivamente, como também a quantidade de microplásticos introduzidos no início e a quantidade recuperada. Estão presentes os dois controlos e quatro réplicas por cada paragem (5, 10 e 15 dias) com o objetivo de perceber se a quantidade de microplástico diminuiu, trazendo assim resultados positivos e demonstrando a existência de biodegradação.

**Tabela 13.** Percentagem de microplásticos (MP) de PS removidos ao longo da experiência de 15 dias na presença do fungo *P. brevicompactum*.

	MP inicio (g)**	MP recuperados (g)**	MP removidos (g)	Remoção de plásticos (g) (média ± desvio padrão)	Percentagem de MP removidos (%)	Percentagem de MP Removidos (%) (média ± desvio padrão)
5D_PS_C1P	0,0158	0,0157	0,0001	0,0001	0,6	0,60±0,01
5D_PS_C2P	0,0163	0,0162	0,0001		0,6	
5D_PS_R1	0,0158	0,0148	0,0010	0,0020±0,0006	6	13±5
5D_PS_R2	0,0146	0,0120	0,0026		18	
5D_PS_R3	0,0162	0,0144	0,0018		11	
5D_PS_R4	0,0148	0,0124	0,0024		16	
10D_PS_C1P	0,0167	0,0163	0,0004	0,0006±0,0002	2	3±1
10D_PS_C2P	0,0158	0,0151	0,0007		4	
10D_PS_R1	0,0158	0,0128	0,0030	0,0024±0,0007	19	15±4
10D_PS_R2	0,0149	0,0137	0,0012		8	
10D_PS_R3	0,0147	0,0122	0,0025		17	
10D_PS_R4	0,0154	0,0127	0,0027		18	
15D_PS_C1P*	0,0152	0,0076	0,0076	0,005±0,003	50	29±21
15D_PS_C2P*	0,0153	0,0140	0,0013		9	
15D_PS_R1*	0,0149	0,0092	0,0057	0,004±0,001	38	28±8
15D_PS_R2*	0,0139	0,0106	0,0033		24	
15D_PS_R3*	0,0153	0,0104	0,0049		32	
15D_PS_R4*	0,0143	0,0117	0,0026		18	

\*valores sem significância

\*\* balança utilizada com 4 casas decimais

**Tabela 14.** Percentagem de microplásticos (MP) de EPS removidos ao longo da experiência de 15 dias na presença do fungo *P. brevicompactum*.

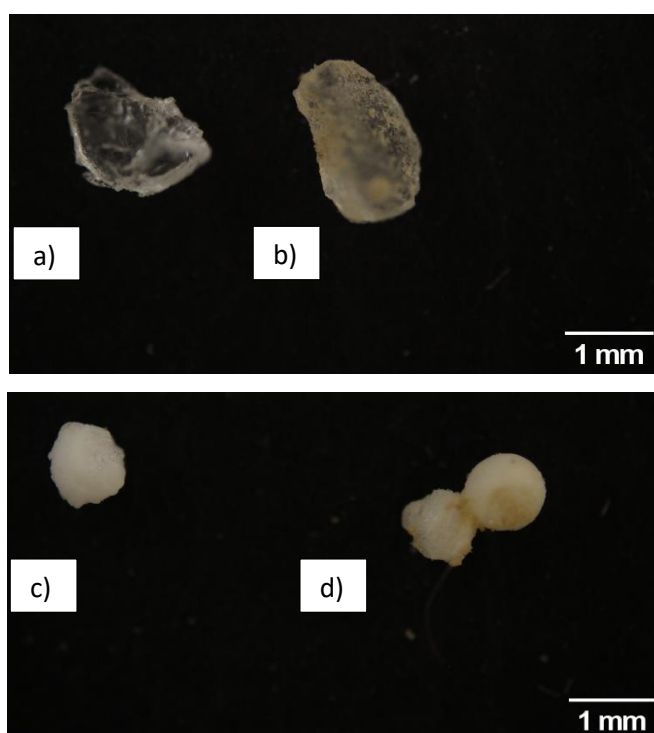
	MP início (g)**	MP recuperados (g)**	MP removidos (g)	Remoção de plásticos (g) (média ± desvio padrão)	Percentagem de MP removidos (%)	Percentagem de MP Removidos (%) (média ± desvio padrão)
5D_EPS_C2P	0,0138	0,0135	0,0003	0,0002 ±0,0001	2	1,4±0,8
5D_EPS_C1P	0,0167	0,0166	0,0001		0,6	
5D_EPS_R1	0,0163	0,0139	0,0024	0,0021 ±0,0004	15	13±2
5D_EPS_R2	0,0149	0,0129	0,0020		13	
5D_EPS_R3	0,0164	0,0141	0,0023		14	
5D_EPS_R4	0,0162	0,0147	0,0015		9	
10D_EPS_C1P	0,0154	0,0144	0,0010	0,00110 ±0,00005	6	7,0±0,5
10D_EPS_C2P	0,0148	0,0137	0,0011		7	
10D_EPS_R1	0,0151	0,0137	0,0014	0,002 ±0,005	9	10±3
10D_EPS_R2	0,0147	0,0138	0,0009		6	
10D_EPS_R3	0,0150	0,0136	0,0014		9	
10D_EPS_R4	0,0151	0,0129	0,0022		15	
15D_EPS_C1P*	0,0146	0,0121	0,0025	0,004 ±0,001	17	24±7
15D_EPS_C2P*	0,0147	0,0101	0,0046		31	
15D_EPS_R1*	0,0170	0,0135	0,0035	0,003 ±0,001	21	16±5
15D_EPS_R2	0,0174	0,0141	0,0033		19	
15D_EPS_R3	0,0149	0,0139	0,0010		7	
15D_EPS_R4	0,0152	0,0126	0,0026		17	

\* balança utilizada com 4 casas decimais

As percentagens de remoção ao fim de 5 dias nos controlos foram muito baixas ( $0,60 \pm 0,01$  % no PS e  $1,4 \pm 0,8$  % no EPS), sendo esperado uma vez que os microplásticos estiveram apenas em contacto com o meio de cultura. Como os controlos apresentavam uma percentagem de remoção de microplásticos pouco acentuada, foi possível afirmar que o meio de cultura não causava alterações nos microplásticos. As percentagens de remoção de microplásticos das réplicas inoculadas com o fungo *P. brevicompactum* ao fim de 5 dias situavam-se nos 13 % ( $13 \pm 5$  % para o PS e  $13 \pm 2$  % para o EPS). Ao fim de 10 dias de experiência, as réplicas apresentaram um valor de  $15 \pm 4$  % e  $10 \pm 3$  % de percentagem de remoção para o primeiro e segundo microplástico, respetivamente. Devido a um erro por parte do operador, as amostras de microplásticos de PS correspondentes aos 15 dias não podem ser contabilizadas pois ocorreu uma mistura por parte das mesmas e consequente perda, assim como os controlos dos 15 dias dos microplásticos de EPS. Assim, as percentagens de remoção de  $29 \pm 21$  %,  $28 \pm 8$  % e  $24 \pm 7$  % não são fidedignas. No fim de 15 dias foi obtido uma percentagem média de remoção de  $16 \pm 5$  % de microplásticos de EPS. As percentagens de remoção obtidas levaram a concluir que ocorreu degradação já que nos controlos foram mínimas quando comparadas com as obtidas nas réplicas, sendo que

ambas podem ser influenciadas por pequenas perdas durante a filtração e manuseamento dos frascos.

Na **Figura 31** estão representadas duas fotografias correspondentes a cada um dos microplásticos, PS e EPS, controlos (a e c) e réplicas (b e d), que estiveram em contacto com o fungo *P. brevicompactum* ao longo dos 15 dias da experiência. Nelas é possível observar a diferença de cor e aspeto entre os microplásticos das réplicas e os microplásticos dos controlos. Os microplásticos recolhidos das réplicas tem uma cor mais amarelada, devido ao fungo aderido à sua superfície. A mudança de cor da superfície dos microplásticos também é um fator de como ocorreu degradação<sup>96</sup>.

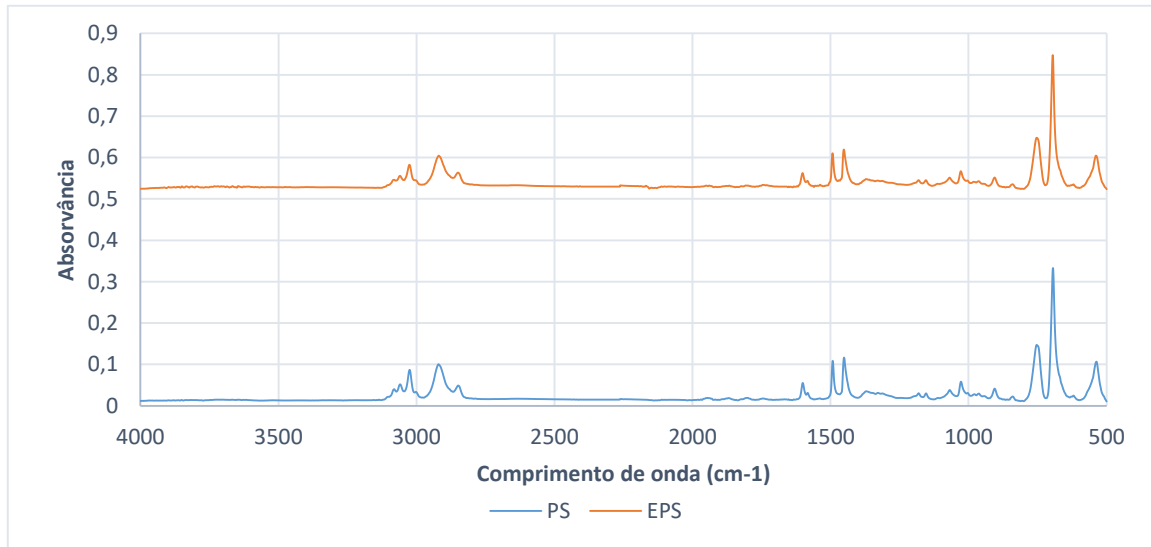


**Figura 31.** Fotografia dos microplásticos das amostras de controlo (a-PS; c-EPS) e réplicas que estiveram em contacto com o fungo *P. brevicompactum* (b-PS; d-EPS)

Na **Figura 32** está representado o espectro dos microplásticos PS e EPS virgens (plásticos que não participaram na experiência) obtidos. Os espectros de infravermelho apresentam vários picos característicos deste microplástico que correspondem a diferentes ligações. A região entre os  $3200\text{ cm}^{-1}$  e os  $2800\text{ cm}^{-1}$  correspondem à ligação de alongamento C-H. Por sua vez, os picos localizados em  $3082$ ,  $3060$  e  $3026\text{ cm}^{-1}$  estão relacionados com as absorções das vibrações de alongamento de C-H aromáticos. Os grupos metilenos ( $-\text{CH}_2$ ) assimétricos e simétricos aparecem nas zonas de  $2923\text{ cm}^{-1}$  e  $2834\text{ cm}^{-1}$ , respetivamente. Os picos da região entre  $2000$  e os  $1665\text{ cm}^{-1}$  corresponde aos anéis aromáticos mono-

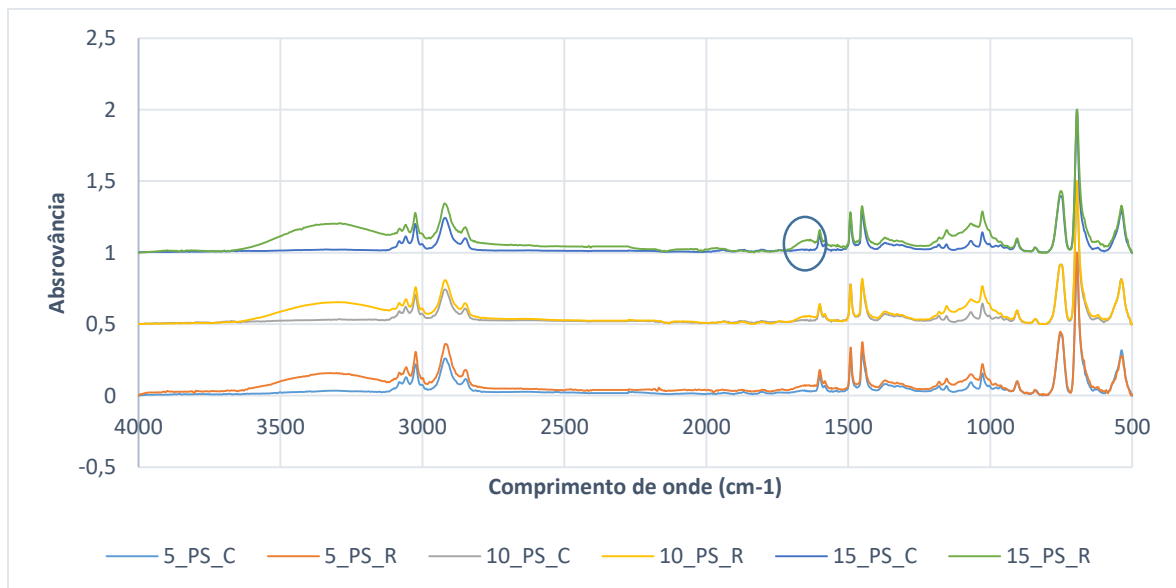


substituídos. As ligações C-C que correspondem a anéis aromáticos aparecem em quatro picos: 1601, 1583, 1493 e 1452  $\text{cm}^{-1}$ . O pico 1480  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao anel benzeno. No caso deste plástico, a zona da sua identificação situa-se na região dos 1300  $\text{cm}^{-1}$  a 900  $\text{cm}^{-1}$  66,97,98.

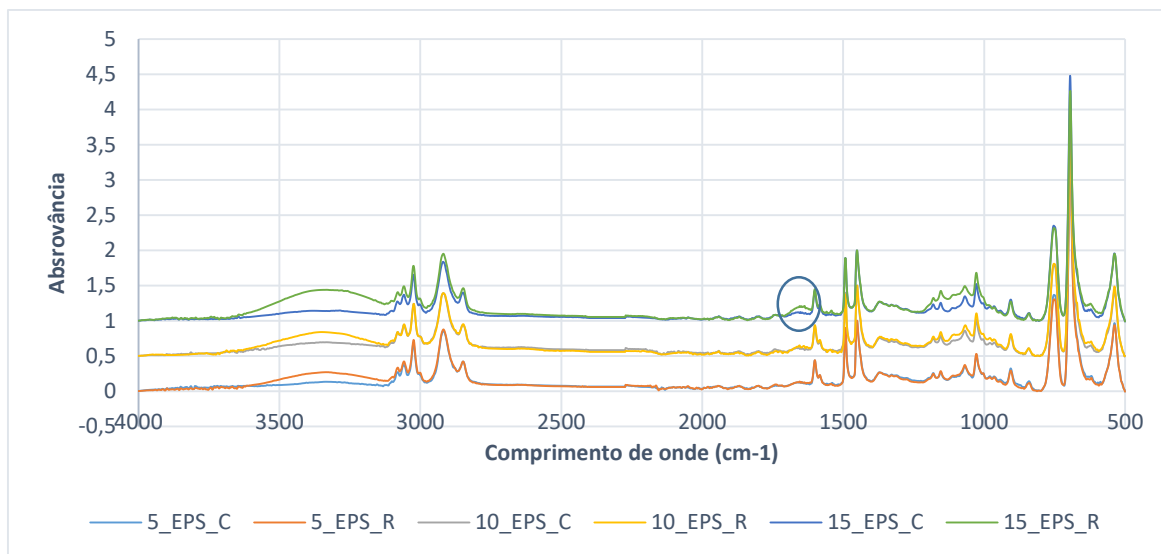


**Figura 32.** Espectros de infravermelho dos microplásticos de PS e de EPS virgens (sem exposição ao fungo *P. brevicompactum*).

Na **Figura 33** estão representados espectros de infravermelhos dos controlos e réplicas (que estiveram em contacto com o fungo) do microplástico de PS e na **Figura 34** para o microplástico de EPS. Estão apresentados um controlo e uma réplica, por cada paragem, 5, 10 e 15 dias.



**Figura 33.** Espectro infravermelho na região dos 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  dos controlos e amostras do microplástico de PS para as três paragens.



**Figura 34.** Espectro infravermelho na região dos 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  dos controles e amostras do microplástico de EPS para as três paragens.

Para estudar a degradação do PS/EPS, foi feita uma comparação com o espectro da Figura 32, picos característicos deste microplástico, e foi possível observar o mesmo perfil e ocorrência de picos característicos como referido anteriormente. A zona de comprimento de onda entre 1630 e os  $1600 \text{ cm}^{-1}$  é onde ocorrem as mudanças correspondentes à biodegradação<sup>99,100</sup>. Relativamente a esta zona observa-se mais acentuadamente no espectro dos 15 dias um aumento da banda na réplica quando comparado com o controlo, em ambos os microplásticos. No entanto, na zona entre 3600 e os  $3000 \text{ cm}^{-1}$  foi possível observar diferenças entre os controlos, que não possuem aquela banda, e as réplicas em que a banda aparece. Durante a degradação há grupos químicos que se podem formar ou dissociar.

Seguidamente foi calculado o índice de carbonilo, **Equação 3**, neste caso o pico de referência para o PS/EPS é  $1452 \text{ cm}^{-1}$ <sup>101,92</sup>. Os valores da absorvância correspondentes a cada comprimento de onda foram obtidos com auxílio ao programa “Spectra Gryph 1.2”.

Na **Tabela 15** estão organizados todos os valores de índice de carbonilo para o microplástico de PS e de EPS que participaram na experiência de biodegradação como para os microplásticos virgens.

**Tabela 15.** Índice carbonilo relativo aos microplásticos de PS e de EPS da experiência de 15 dias.

	Comprimento de onda do pico carbonilo	Abs cm <sup>-1</sup> (carbonilo)	Comprimento de onda (referência)	Abs cm <sup>-1</sup> (Referência)	Índice carbonilo
PS_virgem	1600,0	0,4133	1451,1	0,9991	0,4137
5_PS_C	1600,3	0,0264	1450,5	0,0599	0,4404
5_PS_R	1600,4	0,4782	1450,3	0,9978	0,4793
10_PS_C	1600,6	0,0268	1451,0	0,0618	0,4332
10_PS_R	1600,4	0,0328	1450,5	0,0734	0,4469
15_PS_C	1600,8	0,0407	1451,6	0,0973	0,4182
15_PS_r	1600,7	0,4860	1451,3	0,9994	0,4863
EPS_virgem	1601,4	0,3990	1451,8	0,9977	0,3999
5_EPS_C	1600,4	0,0222	1451,0	0,0509	0,4356
5_EPS_R	1600,4	0,0437	1450,6	0,0998	0,4377
10_EPS_C	1600,4	0,0257	1450,6	0,0606	0,4239
10_EPS_R	1600,1	0,0254	1450,2	0,0579	0,4382
15_EPS_C	1600,7	0,1102	1451,0	0,2771	0,3976
15_EPS_R	1600,5	0,0362	1450,6	0,0808	0,4477

A partir dos valores de índice de carbonilo calculados, correspondentes à última coluna da tabela anterior, verifica-se que as réplicas (R) apresentavam valores superiores aos controlos (C), o que esperado que acontecesse, uma vez que o fungo estava presente no meio com os microplásticos nas réplicas, levando à sua degradação. Ao fim de 15 dias da experiência foi onde se verificou a diferença mais acentuada, comprovando também com a formação da banda entre 1630 e os 1600 cm<sup>-1</sup> devidas a grupos C-C e que podem ser atribuídas à possível degradação dos microplásticos, Figura 33 e 34 (espectros de infravermelho).

Em suma, ao fim dos 15 dias de biodegradação, o tempo total de experiência, o fungo *P. brevicompactum* foi capaz de crescer cerca de 33 ± 2 % /34 ± 2 % (PS/EPS) e de remover aproximadamente 15 % de ambos os microplásticos. Os resultados do PS ao fim de 15 dias não podem servir como comparação, como anteriormente explicado, e assim, foram utilizados para esse fim, os valores de 10 dias, que foram semelhantes aos 15 dias de EPS.

Um estudo utilizando outros micro-organismos com o objetivo de biodegradar EPS numa experiência num meio sólido num período 30 dias alcançou percentagens de 74,43 % e 63,43 % com o fungo *Pestalotiopsis* sp, e a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, respetivamente. Estes resultados foram substancialmente melhores. No futuro seria interessante experimentar outro micro-organismo como uma bactéria e um meio de cultura diferente com o objetivo de aumentar a percentagem de degradação.

### 3.3 Otimização do meio de cultura para a biodegradação dos microplásticos Poliestireno e Poliestireno Expandido pelo fungo *Penicillium brevicompactum*

Para a otimização do meio de cultura para os microplásticos de PS e de EPS recorreu-se ao “Minitab 19”. Nas **Tabelas 16 e 17** estão apresentados as massas (g) e as concentrações (g/L) de cada componente do meio de cultura (glucose, extrato de malte e peptona) para o PS e EPS, respetivamente.

**Tabela 16.** Massas (g) e concentrações (g/L) dos componentes do meio de cultura correspondentes a cada *Erlenmeyer* para a otimização com o PS.

Nº da experiência	Glucose (g)	[Glucose] (g/L)	Extrato de malte (g)	[Extrato de malte] (g/L)	Peptona (g)	[Peptona] (g/L)
1	0,269	5,38	0,255	5,10	0,0250	0,501
2	0,995	19,9	0,335	6,70	0,0250	0,501
3	0,256	5,12	1,004	20,1	0,0280	0,561
4	0,997	19,9	1,004	20,1	0,0240	0,481
5	0,269	5,38	0,280	5,63	0,0980	1,959
6	0,998	20,0	0,494	9,88	0,1530	3,058
7	0,277	5,54	1,057	21,1	0,1090	2,179
8	1,018	20,4	1,014	20,3	0,1160	2,319
9	0,000	0,00	0,690	13,8	0,0650	1,300
10	1,255	25,1	0,741	14,8	0,0640	1,280
11	0,627	12,5	0,000	0,00	0,0640	1,280
12	0,647	12,9	1,372	27,4	0,0900	1,800
13	0,744	14,9	0,629	12,6	0,000	0,000
14	0,630	12,6	0,633	12,7	0,1260	2,520
15	0,665	13,3	0,636	12,7	0,0660	1,320
16	0,659	13,2	0,626	12,5	0,0730	1,460
17	0,667	13,3	0,630	12,6	0,0930	1,860
18	0,623	12,5	0,622	12,4	0,0770	1,540
19	0,669	13,4	0,636	12,7	0,0680	1,360
20	0,653	13,1	0,650	13,0	0,0670	1,340

**Tabela 17.** Massas (g) e concentrações (g/L) componentes do meio de cultura correspondentes a cada *Erlenmeyer* para a otimização com o EPS.

Nº da experiência	Glucose (g)	[Glucose] (g/L)	Extrato de malte (g)	[Extrato de malte] (g/L)	Peptona (g)	[Peptona] (g/L)
1	0,247	4,94	0,269	5,38	0,0280	0,561
2	0,995	19,9	0,319	6,38	0,0380	0,761
3	0,230	4,60	0,986	19,7	0,0330	0,661
4	0,999	20,1	1,002	20,0	0,0230	0,461
5	0,269	5,38	0,298	5,99	0,1050	2,099
6	1,021	20,4	0,233	4,66	0,1060	2,119
7	0,244	4,88	1,027	20,5	0,1020	2,039
8	1,007	20,1	0,992	19,8	0,1140	2,279
9	0,000	0,00	0,630	12,6	0,0620	1,240
10	1,288	25,8	0,637	12,7	0,0660	1,320
11	0,653	13,1	0,000	0,00	0,0640	1,280
12	0,796	15,9	1,248	25,0	0,0625	1,250
13	0,623	12,5	0,653	13,1	0,000	0,000
14	0,638	12,8	0,640	12,8	0,1260	2,520
15	0,634	12,7	0,724	14,5	0,0620	1,240
16	0,624	12,5	0,636	12,7	0,0630	1,260
17	0,837	16,7	0,635	12,7	0,0770	1,540
18	0,663	13,3	0,680	13,6	0,0980	1,960
19	0,655	13,1	0,638	12,8	0,0650	1,300
20	0,627	12,5	0,629	12,6	0,0720	1,440

Nas **Tabelas 18 e 19** apresentam-se as quantidades de biomassa inoculadas do fungo *P. brevicompactum*, e a suas percentagens de crescimento, ao longo dos 28 dias de otimização do meio de cultura, que esteve em contacto com os microplásticos de PS e de EPS, respetivamente.

**Tabela 18.** Biomassa inoculada de fungo *P. brevicompactum* (g), final e a sua percentagem de crescimento durante a experiência de 28 dias no meio inoculado com microplásticos de PS.

	Biomassa inoculada (g)*	Biomassa inoculada (seca) (g)	Biomassa final (seca) (g)	Crescimento (g)	Percentagem de biomassa (%)
PS1	0,569	0,0470	0,2608	0,2138	18,0
PS2	0,556	0,0459	0,5572	0,5513	8,24
PS3	0,563	0,0465	0,6465	0,6000	7,19
PS4	0,579	0,0478	0,8271	0,7793	5,78
PS5	0,507	0,0419	0,1846	0,1427	22,7
PS6	0,501	0,0414	0,5783	0,5369	7,16
PS7	0,520	0,0430	0,5271	0,4841	8,15
PS8	0,514	0,0425	0,8049	0,7624	5,28
PS9	0,558	0,0461	0,2564	0,2103	18,0
PS10	0,538	0,0444	0,9140	0,8696	4,86
PS11	0,595	0,0492	0,3712	0,3221	13,2
PS12	0,523	0,0432	0,5416	0,4984	7,98
PS13	0,579	0,0478	0,5076	0,4598	9,42
PS14	0,544	0,0449	0,4801	0,4352	9,36
PS15	0,569	0,0470	0,6176	0,5706	7,61
PS16	0,519	0,0429	0,4884	0,4455	8,78
PS17	0,528	0,0436	0,3688	0,3252	11,8
PS18	0,160	0,0426	0,3175	0,2749	13,4
PS19	0,675	0,0558	0,4276	0,3718	13,0
PS20	0,534	0,0441	0,3765	0,3324	11,7

\*balança utilizada com 3 casas decimais

**Tabela 19.** Biomassa inoculada de fungo *P. brevicompactum* (g), final e a sua percentagem de crescimento durante a experiência de 28 dias no meio inoculado com microplásticos de EPS.

	Biomassa inoculada (g)*	Biomassa inoculada (seca) (g)	Biomassa final (seca) (g)	Crescimento (g)	Percentagem de biomassa (%)
EPS1	0,517	0,0427	0,2621	0,2194	16,3
EPS2	0,564	0,0466	0,6414	0,5948	7,26
EPS3	0,531	0,0439	0,6223	0,5784	7,05
EPS4	0,563	0,0465	0,8769	0,8304	5,30
EPS5	0,513	0,0424	0,3128	0,2704	13,6
EPS6	0,545	0,0450	0,2408	0,1958	18,7
EPS7	0,521	0,0430	0,3640	0,3210	11,8
EPS8	0,518	0,0428	0,4586	0,4158	9,33
EPS9	0,556	0,0459	0,2716	0,2257	16,9
EPS10	0,554	0,0458	0,7787	0,7329	5,88
EPS11	0,510	0,0421	0,3777	0,3356	11,2
EPS12	0,596	0,0492	0,5303	0,4811	9,28
EPS13	0,511	0,0422	0,5110	0,4688	8,26
EPS14	0,530	0,0438	0,2692	0,2254	16,3
EPS15	0,566	0,0468	0,3034	0,2566	15,4
EPS16	0,551	0,0455	0,2264	0,1809	20,1
EPS17	0,535	0,0442	0,4983	0,4541	8,87
EPS18	0,508	0,0420	0,3571	0,3151	11,8
EPS19	0,582	0,0481	0,3730	0,3249	12,9
EPS20	0,827	0,0683	0,2384	0,1701	28,7

\* balança utilizada com 3 casas decimais

As percentagens de crescimento do fungo obtidas nos diferentes frascos com diferentes concentrações dos componentes do meio, descritas nas tabelas anteriores, demonstraram que o crescimento do fungo foi desde 4,86 % (frasco 10) a 22,7 % (frasco 5) com o PS e 5,30 % (frasco 4) a 28,7 % (frasco 20) na otimização do EPS. A partir do frasco 15 as percentagens de crescimento deveriam ser semelhantes uma vez que as concentrações dos meios são idênticas. Na otimização do PS os valores são relativamente perto uns dos outros, contrariamente ao EPS em que o frasco 16 e o 20 apresentaram valores de percentagens muito superiores. Isto pode ser explicado por, apesar de serem réplicas, são réplicas biológicas podendo o fungo comportar-se de maneira diferente. O EPS, por ser hidrofóbico, tem tendência a ficar nas paredes do *Erlenmeyer*, podendo ter acontecido que nas outras amostras houve menos contacto entre fungo e plástico.

Nas **Tabelas 20 e 21** apresentam-se as percentagens de microplásticos removidos durante as experiências de otimização do PS e EPS, respetivamente.

**Tabela 20.** Percentagem de microplásticos (MP) de PS removidos ao longo da experiência de 28 dias na presença do fungo *P. brevicompactum*.

	MP no início (g)*	MP recuperados (g)*	MP removidos (g)	Percentagem de MP Removidos (%)
PS1	0,0149	0,0119	0,0030	20,1
PS2	0,0151	0,0085	0,0066	43,7
PS3	0,0150	0,0053	0,0097	64,7
PS4	0,0155	0,0036	0,0119	76,8
PS5	0,0150	0,0129	0,0021	14,0
PS6	0,0151	0,0037	0,0114	75,5
PS7	0,0148	0,0080	0,0068	46,0
PS8	0,0150	0,0055	0,0095	63,3
PS9	0,0148	0,0096	0,0052	35,1
PS10	0,0150	0,0057	0,0093	62,0
PS11	0,0147	0,0068	0,0079	53,7
PS12	0,0149	0,0061	0,0088	59,1
PS13	0,0149	0,0092	0,0057	38,3
PS14	0,0147	0,0061	0,0086	58,5
PS15	0,0151	0,0068	0,0083	55,0
PS16	0,0150	0,0042	0,0108	72,0
PS17	0,0149	0,0047	0,0102	68,5
PS18	0,0150	0,0073	0,0077	51,3
PS19	0,0148	0,0040	0,0108	73,0
PS20	0,0156	0,0057	0,0099	63,5

\* balança utilizada com 4 casas decimais

**Tabela 21.** Percentagem de microplásticos (MP) de EPS removidos ao longo da experiência de 28 dias na presença do fungo *P. brevicompactum*.

	MP no início (g)*	MP recuperados (g)*	MP removidos (g)	Percentagem de MP Removidos (%)
EPS1	0,0158	0,0124	0,0034	21,5
EPS2	0,0153	0,0049	0,0104	68,0
EPS3	0,0152	0,0103	0,0049	32,2
EPS4	0,0153	0,0037	0,0116	75,8
EPS5	0,0155	0,0093	0,0062	40,0
EPS6	0,0150	0,0132	0,0018	12,0
EPS7	0,0156	0,0123	0,0033	21,2
EPS8	0,0152	0,0117	0,0035	23,0
EPS9	0,0148	0,0099	0,0049	33,1
EPS10	0,0152	0,0031	0,0121	79,6
EPS11	0,0156	0,0102	0,0054	34,6
EPS12	0,0150	0,0042	0,0108	72,0
EPS13	0,0150	0,0049	0,0101	67,3
EPS14	0,0155	0,0110	0,0045	29,0
EPS15	0,0152	0,0133	0,0019	12,5
EPS16	0,0152	0,0060	0,0092	60,5
EPS17	0,0150	0,0091	0,0059	39,3
EPS18	0,0150	0,0139	0,0011	7,33
EPS19	0,0153	0,0122	0,0031	20,3
EPS20	0,0152	0,0141	0,0011	7,24

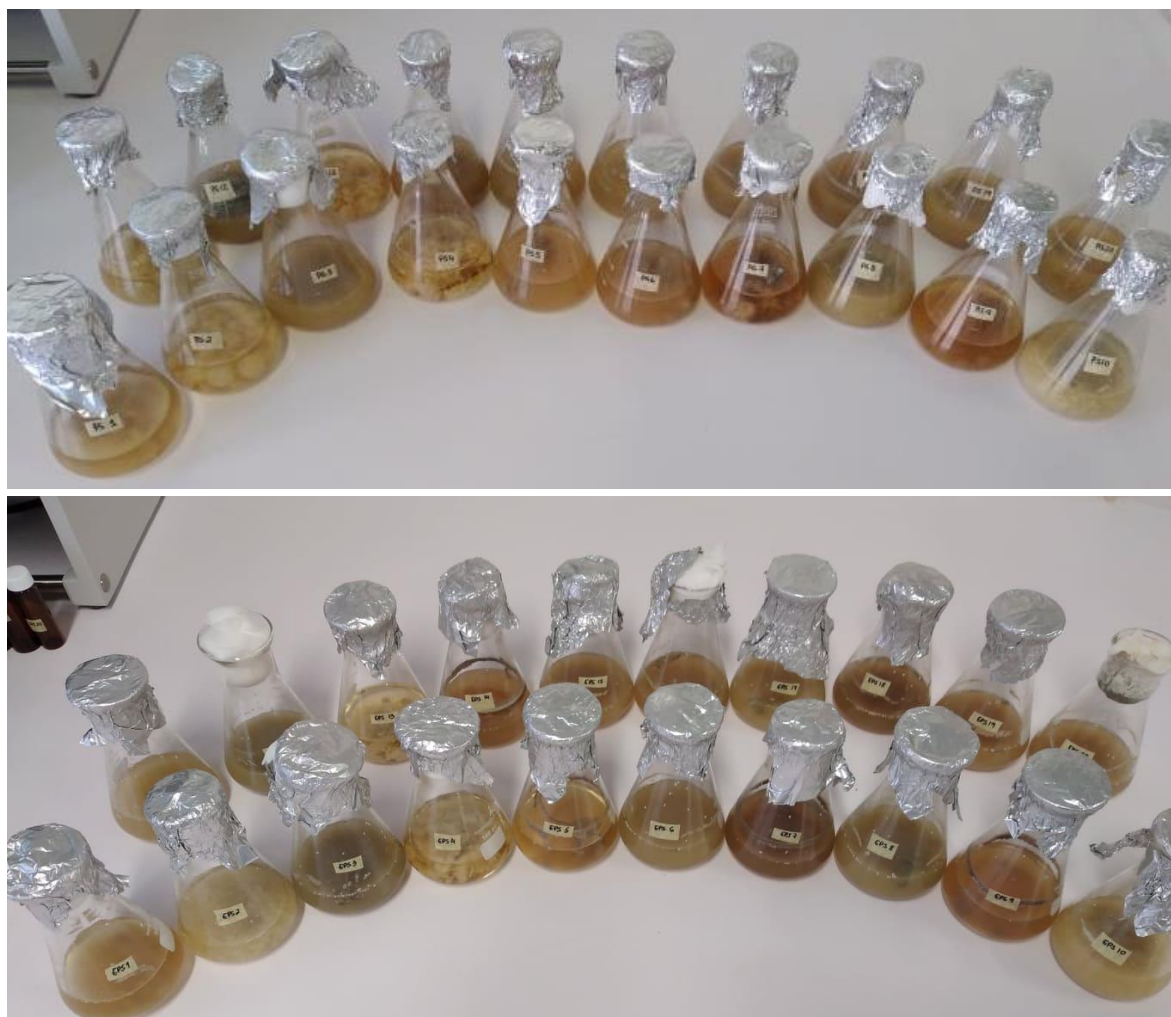
\* balança utilizada com 4 casas decimais

Tendo em conta as percentagens da remoção de microplásticos obtidas na otimização do meio de cultura para o PS observou-se que os valores variam entre 14,0 % (frasco 5) e 76,8 % (frasco 4). No caso do EPS as percentagens de remoção encontram-se entre 7,24 % (frasco 20) e 79,6 % (frasco 10).

De acordo com as percentagens de crescimento do *P. brevicompactum* e de remoção de plásticos constatou-se que onde o fungo cresceu mais, frasco 5 e 20, PS e EPS, respetivamente, foi onde a percentagem de remoção de plástico foi mais baixa. Uma possível justificação é a composição do meio, que será melhor para o fungo e este excluiu a hipótese de utilizar o plástico. Relativamente às maiores percentagens de remoção alcançadas, frasco 4 no PS e frasco 10 no EPS, observou-se que a percentagem de crescimento do fungo foi cerca de 5 % em ambos os casos, perto da percentagem mínima geral de crescimento do fungo.



Na **Figura 35** estão apresentadas duas fotografias correspondentes ao final da experiência de otimização do microplástico de PS (imagem superior) e de EPS (imagem inferior). Em termos de sobrevivência dos fungos os resultados do PS foram melhores, uma vez que, com o EPS apenas em seis frascos o fungo se apresentava visualmente vivos (frascos 2, 4, 5, 10, 11 e 13).



**Figura 35.** Fotografias dos 20 frascos no final da experiência de otimização do PS (superior) e EPS (inferior).

Na **Tabela 22** encontra-se a análise de variância dos modelos resultantes da aplicação do “Minitab 19” para o PS.

**Tabela 22.** Valores de graus de liberdade (GL), soma dos quadrados ajustados (SQaj), quadrados médios ajustados (QMaj), F e P obtidos com “Minitab 19” para a otimização do meio de cultura (glucose, extrato de malte e peptona) para o PS.

FONTE	GL	SQ(aj.)	QM(aj.)	F	P
<b>MODELO</b>	9	4594,55	510,51	4,26	0,017
<b>LINEAR</b>	3	2751,62	917,21	7,65	0,006
GLUCOSE	1	1868,26	1868,26	15,58	0,003
EXTRATO DE MALTE	1	827,82	827,82	6,90	0,025
PEPTONA	1	55,53	55,53	0,46	0,512
<b>QUADRADO</b>	3	805,33	268,44	2,24	0,146
GLUCOSE*GLUCOSE	1	416,04	416,04	3,47	0,092
EXTRATO DE MALTE*EXTRATO DE MALTE	1	97,77	97,77	0,82	0,388
PEPTONA*PEPTONA	1	426,50	426,50	3,56	0,089
<b>INTERAÇÃO COM 2 FATORES</b>	3	1037,59	345,86	2,88	0,089
GLUCOSE*EXTRATO DE MALTE	1	386,42	386,42	3,22	0,103
GLUCOSE*PEPTONA	1	233,28	233,28	1,95	0,193
EXTRATO DE MALTE*PEPTONA	1	417,89	417,89	3,49	0,091
<b>ERRO</b>	10	1199,09	119,9	—	—
<b>FALTA DE AJUSTE</b>	5	792,48	158,50	1,95	0,241
<b>ERRO PURO</b>	5	406,6	81,32	*	*
<b>TOTAL</b>	19	5793,64	—	—	—

Com base nos valores F e P obtidos, apresentados na tabela anterior, foi possível determinar que no modelo linear nos componentes “glucose” e “extrato de malte” para a otimização do meio com PS, apresentam significância estatística, uma vez que apresentam valores de P inferiores a 0,05.

Comparando os termos quadrados e as interações entre componentes, nenhum mostrava significância estatística. No entanto os mais significativos foram “peptona\*peptona” e “extrato de malte\*peptona”.

A partir da equação seguinte, resultante da aplicação do “Minitab 19” foi possível concluir que “glucose”, “extrato de malte” e “peptona” têm efeitos positivos, ou seja, quanto maior a concentração maior a degradação, tal como a relação entre “glucose e peptona”.

**Degradação PS (%)** = -35,1 + 4,36 glucose + 5,43 extrato de malte + 21,5 peptona – 0,0973 glucose\*glucose - 0,0471 extrato de malte\*extrato de malte – 9,85 peptona\*peptona – 0,1258 glucose\*extrato de malte + 0,978 glucose\*peptona – 1,308 extrato de malte\*peptona

No entanto, as restantes interações e valores quadrados apresentam efeitos negativos, ou seja, quanto maior a concentração, menor a degradação.

Recorrendo ao “Minitab 19”, foi possível obter informação sobre quais seriam as concentrações ótimas, **Tabela 23**.

**Tabela 23.** Valores obtidos para as concentrações ótimas para o ensaio com PS.

Solução	[glucose](g/L)	[extrato de malte] (g/L)	[peptona] (g/L)	% de Degradação
1	25,00	0,000	2,500	91,25%
2	0,9378	25,00	0,000	72,36%
3	23,79	5,417	1,323	71,13%

Tendo em conta as percentagens de degradação estimadas, na tabela 23, a primeira solução poderia ser mais vantajosa uma vez que apresenta o valor mais elevado, 91,25%. No entanto, a terceira seria a mais coerente uma vez que tanto a “glucose” como o “extrato de malte” são significativos e a “peptona” apresenta efeitos positivos e é o único caso em que a concentração de um dos componentes não é zero. Portanto a composição do meio de cultura otimizado seria 23,79 g/L de “glucose”, 5,417 g/L de “extrato de malte” e 1,323 g/L de “peptona”.

Na **Tabela 24** encontra-se a análise de variância dos modelos resultantes da aplicação do “Minitab 19” para o EPS.

**Tabela 24.** Valores de graus de liberdade (GL), soma dos quadrados ajustados (SQaj), quadrados médios ajustados (QMaj), F e P obtidos com “Minitab 19” para a otimização do meio de cultura (glucose, extrato de malte e peptona) para o EPS.

FONTE	GL	SQ(aj.)	QM(aj.)	F	P
<b>MODELO</b>	9	7214,2	801,58	2,09	0,133
<b>LINEAR</b>	3	3888,1	1296,04	3,38	0,062
GLUCOSE	1	1478,8	1478,83	3,86	0,078
EXTRATO DE MALTE	1	396,8	396,8	1,04	0,333
PEPTONA	1	2012,5	2012,46	5,25	0,045
<b>QUADRADO</b>	3	1461,5	487,16	1,27	0,336
GLUCOSE*GLUCOSE	1	818,9	818,90	2,14	0,174
EXTRATO DE MALTE*EXTRATO DE MALTE	1	601,4	601,37	1,57	0,239
PEPTONA*PEPTONA	1	311,1	311,08	0,81	0,389
<b>INTERAÇÃO COM 2 FATORES</b>	3	1864,6	621,53	1,62	0,246
GLUCOSE*EXTRATO DE MALTE	1	91,2	91,19	0,24	0,636
GLUCOSE*PEPTONA	1	1686,4	1686,35	4,40	0,062
EXTRATO DE MALTE*PEPTONA	1	87,1	87,05	0,23	0,644
<b>ERRO</b>	10	3831,2	383,12	—	—
<b>FALTA DE AJUSTE</b>	5	1558,4	311,68	0,69	0,656
<b>ERRO PURO</b>	5	2272,8	454,56	*	*
<b>TOTAL</b>	19	11045,4	—	—	—

Relativamente à otimização com EPS, apenas a “peptona” foi considerada com significância estatística, com valor P de  $0,045 < 0,05$ . A “glucose” apresenta um valor próximo de 0,05, podendo talvez também ser considerada, mas o “extrato de malte” excede em muito esse valor, 0,333. O valor F é mais elevado na “peptona” e “glucose”, componentes que apresentaram valores com significância estatística.

Comparando os valores quadrados e de interação, nenhum apresentava significância estatística, no entanto o mais próximo é relativo à interação entre a “glucose \* peptona”.

A partir do “Minitab 19” também foi possível obter a equação seguinte para a degradação do EPS:

$$\text{Degradação do EPS (\%)} = 30,8 + 0,51 \text{ glucose} - 2,22 \text{ extrato de malte} + 3,0 \text{ peptona} + 0,1365 \text{ glucose*glucose} + 0,1169 \text{ extrato de malte*extrato de malte} + 8,41 \text{ peptona*peptona} + 0,061 \text{ glucose*extrato de malte} - 2,63 \text{ glucose*peptona} - 0,60 \text{ extrato de malte*peptona}$$

De acordo com a equação anterior, os componentes “glucose” e “peptona” apresentam efeitos positivos na biodegradação, ou seja, quanto maior for a concentração destes componentes, maior será a degradação. Também o quadrado da “glucose”, “extrato de malte” e “peptona” e a interação entre a “glucose \* extrato de malte”, apresentam efeitos positivos.

Para o EPS também foram estimadas as concentrações ótimas com o alvo de 100% relativamente à degradação, **Tabela 25**.

**Tabela 25.** Valores obtidos para as concentrações ótimas para o ensaio com EPS.

Solução	[glucose](g/L)	[extrato de malte] (g/L)	[peptona] (g/L)	% de Degradação
<b>1</b>	13,34	25,00	0,000	100%
<b>2</b>	20,34	22,26	0,5757	100%
<b>3</b>	23,36	0,1569	0,3050	100%

De acordo com os resultados obtidos e tendo em conta que neste caso a “peptona” é o componente mais significativo, a primeira opção seria excluída. Pela equação fornecida, observa-se que o “extrato de malte” apresenta efeitos negativos na biodegradação, no entanto, o fungo para crescer necessita de nutrientes provenientes do mesmo. No futuro seria vantajoso realizar duas experiências com as soluções de concentrações “2” e “3” para comprovar qual seria a melhor.

### 3. Conclusões e perspectivas futuras

Na primeira experiência de biodegradação com o polietileno, para além do fungo ter morrido, as percentagens de crescimento do mesmo e de remoção de microplástico não foram concordantes ao longo das semanas. Por exemplo, ao fim de 7 dias o crescimento do fungo apresentou uma percentagem de  $15 \pm 4 \%$  para ambos os plásticos, HDPE e LDPE, semelhante à do final da experiência,  $14 \pm 2 \%$  e  $13 \pm 1 \%$ , respetivamente. As percentagens de remoção de plástico apresentam valores muito dispares, havendo mesmo valores negativos, o que é naturalmente impossível. No entanto, foi possível observar que existiu de facto contacto entre o fungo e os microplásticos pela observação de matéria orgânica nas réplicas e a ausência de substâncias nos controlos. No caso da segunda tentativa de biodegradação, o fungo teve o mesmo comportamento, não tendo conseguido sobreviver ao fim dos 28 dias. No final do tempo de experiência, o fungo apresentou um crescimento de cerca de  $13 \pm 3\%$  quando em contacto com o HDPE e  $11 \pm 2 \%$  com o LDPE, demonstrando valores semelhantes quando comparando com o primeiro ensaio. Ainda assim, para a segunda experiência as percentagens de remoção de plástico foram substancialmente melhores a nível de estabilidade e concordância de valores (controlos sempre com percentagem muito menor que as réplicas), alcançando  $8 \pm 8\%$  para o HDPE e  $13 \pm 4 \%$  para o LDPE, demonstrando uma mais valia na repetição do ensaio.

Na experiência preliminar com o PS/EPS verificou-se crescimento do fungo,  $33 \pm 2 \%$  e  $35 \pm 2 \%$  ao fim de 15 dias, respetivamente, e percentagens de remoção de plásticos na ordem dos  $15 \%$  para ambos os microplásticos. Também neste ensaio o fungo mostrou aderência aos microplásticos comprovado pelas imagens obtidas do microscópio. A partir de uma otimização do procedimento experimental, nomeadamente do meio de cultura, foi possível obter as concentrações que serão as ideais para maior degradação do microplástico.

No futuro recomenda-se mais cuidado na inoculação, nomeadamente em ter um “campo estéril mais amplo”, limpeza da sala e controlo de todas as condições tal como a temperatura. Seria importante tentar perceber se o motivo da não sobrevivência do fungo no caso das duas experiências de 28 dias com o polietileno foi apenas a temperatura ou se outro parâmetro teve influência. Em projetos futuros seria fulcral testar os resultados da otimização

feita e, com base nos resultados dessa testagem, realizar nova experiência de biodegradação com o PS e EPS e com o meio otimizado.

Considerando todas as informações recolhidas e analisadas durante o presente projeto, é possível concluir que o fungo *Penicillium brevicompactum* é uma boa opção para a biodegradação de plásticos nomeadamente, PE, PS e EPS. É fundamental continuar a investigação no sentido de melhorar os processos já existentes e continuar à procura de novos métodos para a eliminação dos plásticos já existentes nos oceanos.

#### 4. Bibliografia

1. PlasticsEurope. Plastics – the Facts 2018. An analysis of European plastics production, demand and waste data. Published online 2018:38. Accessed January 5, 2021. Available at: <https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/10/2018-Plastics-the-facts.pdf>
2. Guzzetti E., Sureda A., Tejada S., Faggio C. (2018). Microplastic in marine organism: Environmental and toxicological effects. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2018;64:164-171. doi:10.1016/j.etap.2018.10.009
3. The plastic backlash: what's behind our sudden rage – and will it make a difference? | Plastics | The Guardian. Published 2018. Accessed January 5, 2021. Available at: <https://www.theguardian.com/environment/2018/nov/13/the-plastic-backlash-whats-behind-our-sudden-rage-and-will-it-make-a-difference>
4. GreenPeace Reports "Packaging Away The Planet". Published online 2019. Accessed January 5, 2021. Available at: <https://www.greenpeace.org/usa/reports/packaging-away-the-planet-2019/>
5. Hahladakis J.N., Velis C.A., Weber R., Iacovidou E., Purnell P. (2018) An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of Hazardous Materials*. 2018;344:179-199. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.10.014
6. Cole M., Lindeque P., Halsband C., Galloway T.S. (2011) Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*. 2011;62(12):2588-2597. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.09.025
7. The Guardian "38 million pieces of plastic waste found on uninhabited South Pacific island". Published 2017. Accessed January 5, 2021. Available at: [https://www.theguardian.com/environment/2017/may/15/38-million-pieces-of-plastic-waste-found-on-uninhabited-south-pacific-island?utm\\_source=esp&utm\\_medium=Email&utm\\_campaign=GU+Today+main+NEW+H+categories&utm\\_term=226173&subid=22127261&CMP=EMCNEWE](https://www.theguardian.com/environment/2017/may/15/38-million-pieces-of-plastic-waste-found-on-uninhabited-south-pacific-island?utm_source=esp&utm_medium=Email&utm_campaign=GU+Today+main+NEW+H+categories&utm_term=226173&subid=22127261&CMP=EMCNEWE)
8. Shruti V.C., Pérez-Guevara F., Elizalde-Martínez I., Kutralam-Muniasamy G. (2020) First study of its kind on the microplastic contamination of soft drinks, cold tea and energy drinks - Future research and environmental considerations. *Science of The Total Environment*. 2020;726. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138580
9. Koelmans A.A., Mohamed Nor N.H., Hermsen E., Kooi M., Mintenig S.M., De France J. (2019) Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality. *Water Research*. 2019;155:410-422. doi:10.1016/j.watres.2019.02.054
10. Gasperi J., Wright S.L., Dris R., Collard, F., Mandin, C., Guerrouache, M., Langlois, V., Kelly, F., Tassin, B. (2018) Microplastics in air: Are we breathing it in? *Current Opinion in Environmental Science & Health*. 2018;1:1-5. doi:10.1016/j.coesh.2017.10.002
11. Iwata T. (2015) Biodegradable and bio-based polymers: Future prospects of eco-



- friendly plastics. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2015;54(11):3210-3215. doi:10.1002/anie.201410770
12. Diário de Notícias "Fim dos plásticos descartáveis na UE começa em julho". Accessed June 9, 2021. Available at: <https://www.dn.pt/sociedade/fim-dos-plasticos-descartaveis-na-ue-comeca-em-julho-13802744.html>
  13. Comissão Europeia "Comunicação da comissão ao parlamento europeu, ao conselho, ao banco central europeu, ao comité económico e social europeu, ao comité das regiões e ao banco europeu de investimento - Estratégia anual para o crescimento sustentável 2020". Published 2019. Accessed January 5, 2021. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:52019DC0650&from=EN>
  14. Gladfelter A.S., James T.Y., Amend A.S. (2019) Marine fungi. *Current Biology*. 2019;29(6):R191-R195. doi:10.1016/j.cub.2019.02.009
  15. Paço A., Duarte K., da 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 Total Environment*. 2017;586:10-15. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.02.017
  16. Rasmussen S.C.(2018) Revisiting the Early History of Synthetic Polymers : Critiques and New Insights. *Ambix*. 2018;0(0):1-17. doi:10.1080/00026980.2018.1512775
  17. PlasticsEurope. Plastics – the Facts 2019. An analysis of European plastics production, demand and waste data. Published online 2019. Accessed January 5, 2021. Available at: <https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/10/2019-Plastics-the-facts.pdf>
  18. PlasticsEurope. EU plastics production and demand - first estimates for 2020. Accessed September 11, 2021. Available at: <https://www.plasticseurope.org/en/newsroom/news/eu-plastics-production-and-demand-first-estimates-2020>
  19. PlasticPollution by Roser HR and M. *Our World Data*. Published online 2018. Accessed January 5, 2021. Available at: <https://ourworldindata.org/plastic-pollution>
  20. Oluniyi Solomon O., Palanisami T. (2016) Microplastics in the Marine Environment: Current Status, Assessment Methodologies, Impacts and Solutions. *Journal of Pollution Effects & Control*. 2016;04(02). doi:10.4172/2375-4397.1000161
  21. PlasticsEurope. Accelerating sustainable solutions valued by society. Published 2020. Accessed January 5, 2021. Available at: <https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/4312-plastics-facts-2020>
  22. GreenPeace, "The Ocean Plastic Crisis". Published 2017. Accessed January 5, 2021. Available at: <https://www.greenpeace.org/usa/the-ocean-plastic-crisis/>
  23. Comissão Europeia "Comunicação da comissão ao parlamento europeu, ao conselho, ao comité económico e social europeu e ao comité das regiões - Uma Estratégia Europeia para os Plásticos na Economia Circular". Published 2018. Accessed January 5, 2021. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal->

content/PT/TXT/HTML/?uri=CELEX:52018DC0028&from=HR

24. European Bioplastics "What are bioplastics". Accessed June 9, 2021. Available at: <https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>
25. GESAMP - Science for Sustainable Oceans. Published online 2015. Accessed January 5, 2021. Available at: <https://www.imo.org/en/MediaCentre/Pages/WhatsNew-409.aspx>
26. Xanthos D., Walker T.R.(2017) International policies to reduce plastic marine pollution from single-use plastics (plastic bags and microbeads): A review. *Marine Pollution Bulletin*. 2017;118(1-2):17-26. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.02.048
27. Eriksen M., Lebreton L.C.M., Carson H.S., Thiel, M., Moore, C.J., Borerro, J.C., Galgani, F., Ryan, P.G., Reisser, J. (2014) Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS One*. 2014;9(12):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0111913
28. Andrady A.L. (2011) Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 2011;62(8):1596-1605. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.05.030
29. Carpenter E.J., Smith K.L.. (1972) Plastics on the Sargasso sea surface. *Science* (80-). 1972;175(4027):1240-1241. doi:10.1126/science.175.4027.1240
30. Proceedings of the Second International Conference on Marine Debris: 2-7 ... - Google Livros. Accessed January 23, 2021. Available at: [https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=pl5H8jtl7P0C&oi=fnd&pg=PA85&dq=plastic+debris+on+beaches+Ryan+and+Moloney+\(1990\)&ots=2vfzaTsv04&sig=D2Ww6hxsD5hXz4zP-p\\_AuNjUloQ#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=pl5H8jtl7P0C&oi=fnd&pg=PA85&dq=plastic+debris+on+beaches+Ryan+and+Moloney+(1990)&ots=2vfzaTsv04&sig=D2Ww6hxsD5hXz4zP-p_AuNjUloQ#v=onepage&q&f=false)
31. Wu W.M., Yang J., Criddle C.S. (2016) Microplastics pollution and reduction strategies. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. 2017;11(1):1-4. doi:10.1007/s11783-017-0897-7
32. Andrady A.L. (2017) The plastic in microplastics : A review. *Marine Pollution Bulletin*. 2017;119(1):12-22. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.01.082
33. Shah A.A., Hasan F., Hameed A., Ahmed S. (2008) Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. 2008;26(3):246-265. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.12.005
34. PlasticsEurope. Plastics – the Facts 2020. An analysis of European plastics production, demand and waste data. Published online 2020. Accessed January 5, 2021. Available at: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2020/>
35. PlasticsEurope(e). Packaging. Published online 2017. Accessed January 5, 2021. Available at: <https://plasticseurope.org/plastics-explained/plastics-in-use/packaging-2/>
36. Gaikwad K.K., Singh S., Ajji A. (2018) Moisture absorbers for food packaging applications. *Environmental Chemistry Letters*. 2019;17(2):609-628. doi:10.1007/s10311-018-0810-z

37. Al-Tayyar N.A., Youssef A.M., Al-Hindi R.R. (2020) Antimicrobial packaging efficiency of ZnO-SiO<sub>2</sub> nanocomposites infused into PVA/CS film for enhancing the shelf life of food products. *Food Packaging Shelf Life*. 2020;25(April):100523. doi:10.1016/j.fpsl.2020.100523
38. Marsh K., Bugusu B. (2007) Food packaging - Roles, materials, and environmental issues: Scientific status summary. *Journal of Food Science*. 2007;72(3). doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00301.x
39. Groh K.J., Backhaus T., Carney-Almroth B., Geueke, B., Inostroza, P.A., Lennquist, A., Leslie, H.A., Maffini, M., Slunge, D., Trasande, L., Warhust, A. M., Muncke, J. (2018) Overview of known plastic packaging-associated chemicals and their hazards. *Science of The Total Environment*. 2019;651:3253-3268. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.10.015
40. Qasim U., Osman A.I., Al-Muhtaseb A.H., Farrell, C., Al-Abri, M., Ali, M., Vo, D. N., Jamil, F., Rooney, D.W. (2020) Renewable cellulosic nanocomposites for food packaging to avoid fossil fuel plastic pollution: a review. *Environmental Chemistry Letters*. Published online 2020. doi:10.1007/s10311-020-01090-x
41. Geyer R., Jambeck J.R., Law K.L. (2017) Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*. 2017;3(7):25-29. doi:10.1126/sciadv.1700782
42. Plastics: Reuse, recycling and marine litter. Published 2018. Accessed January 5, 2021. Available at: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/3cdca2d1-c5f2-11e8-9424-01aa75ed71a1/language-en/format-PDF/source-77711773>
43. Statista - Plastic production by industrial sector globally. Accessed September 11, 2021. Available at: <https://www.statista.com/statistics/1134796/plastic-production-by-industrial-sector-worldwide/>
44. European Commission - Plastics strategy. Accessed January 5, 2021. Available at: [https://ec.europa.eu/environment/strategy/plastics-strategy\\_en](https://ec.europa.eu/environment/strategy/plastics-strategy_en)
45. The Guardian. "Coca-Cola, Pepsi and Nestlé named top plastic polluters for third year in a row" | Plastics | Published 2020. Accessed January 5, 2021. Available at: <https://www.theguardian.com/environment/2020/dec/07/coca-cola-pepsi-and-nestle-named-top-plastic-polluters-for-third-year-in-a-row>
46. BFFP. Branded. Vol. II: Identifying the World's top corporate plastic polluters. 2019;II:77.
47. CBS News - "Whole Foods responds to \$5,99 pre-peeled orange Twitterstorm". Published 2016. Accessed January 5, 2021. Available at: <https://www.cbsnews.com/news/whole-foods-responds-to-6-pre-peeled-orange-twitterstorm/>
48. Worm B., Lotze H.K., Jubinville I., Wilcox C., Jambeck J. (2017) Plastic as a Persistent Marine Pollutant. *Annual Review of Environment and Resources*. 2017;42:1-26. doi:10.1146/annurev-environ-102016-060700
49. Indahningrum R putri. Evaluation scenarios toward zero plastic pollution.

- 2020;2507(1):1-9.
50. United nations EP. Annual report, seizing the green opportunity, 2019. Published online 2009.
  51. Williams A.T., Rangel-buitrago N. (2018) Marine Litter: Solutions for a Major Environmental Problem. *Journal of Coastal Research* Published online 2018. doi:10.2112/JCOASTRES-D-18-00096.1
  52. Guo X., Wang J. (2019) The chemical behaviors of microplastics in marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*. 2019;142(February):1-14. doi:10.1016/j.marpolbul.2019.03.019
  53. Lucas N., Bienaime C., Belloy C., Queneudec M., Silvestre F., Nava-Saucedo J.E.(2008) Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques - A review. *Chemosphere*. 2008;73(4):429-442. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.06.064
  54. How Does FTIR Work? | Innovatech Labs. Accessed May 10, 2021. Available at: <https://www.innovatechlabs.com/newsroom/672/stuff-works-ftir-analysis/>
  55. Singh B., Sharma N. (2008) Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability*. 2008;93(3):561-584. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008
  56. Ronca, S. (2017). Polyethylene. *Brydson's Plastics Materials*, 247–278. doi:10.1016/b978-0-323-35824-8.00010-4
  57. Patel R.M. (2017) Polyethylene. *Multilayer Flexible Packaging Second Ed*. Published online 2016:17-34. doi:10.1016/B978-0-323-37100-1.00002-8
  58. Piergiovanni L., Limbo S. (2016) Oil Derived Polymers. *Food Packaging Materials*. Published online 2016:38-41. doi:10.1007/978-3-319-24732-8
  59. Emblem A. (2012) Plastics properties for packaging materials. *Packaging Technology*. Published online 2012:287-309. doi:10.1533/9780857095701.2.287
  60. Soares JBP, McKenna TFL. Introduction to Polyolefins, Polyolefin Reaction Engineering. *Polyolefin React Eng*. Published online 2012:1-13. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527646944>
  61. Kala D., Bardají R., Aparecida J., Moretto S., Pedro J., Furlan R. (2020) A mini - review: current advances in polyethylene biodegradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2020;5:1-10. doi:10.1007/s11274-020-2808-5
  62. Polystyrene. Accessed January 5, 2021. Available at: [http://polymerdatabase.com/polymer\\_chemistry/Polystyrene.html](http://polymerdatabase.com/polymer_chemistry/Polystyrene.html)
  63. Expanded Polystyrene (EPS). Accessed January 5, 2021. Available at: <https://omnexus.specialchem.com/selection-guide/expanded-polystyrene-eps-foam-insulation>
  64. Atiq N, Ahmed S, Ali MI, Andleeb S, Ahmad B. Isolation and identification of polystyrene biodegrading bacteria from soil. 2010;4(November 2006):1537-1541.
  65. Ho B.T., Roberts T.K., Lucas S. (2017) An overview on biodegradation of

- polystyrene and modified polystyrene : the microbial approach. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2018;0(0):308-320. doi:10.1080/07388551.2017.1355293
66. Chaudhary A.K., Vijayakumar R.P. (2019) Studies on biological degradation of polystyrene by pure fungal cultures. *Environment Development Sustainability*. 2020;22(5):4495-4508. doi:10.1007/s10668-019-00394-5
  67. Hyde K.D., Jones E.B.G., Leño E., Pointing S.B., Poonyth A.D., Vrijmoed L.L.P.(1998) Role of fungi in marine ecosystems. *Biodiversity & Conservation*. 1998;7(9):1147-1161. doi:10.1023/A:1008823515157
  68. Pang K.L., Overy D.P., Jones E.B.G., Calado, M.L., Burgaud, G., Walker, A.K., Johnson, J.A., Kerr, R.G., Cha, H.J., Bills, G.F. (2016) ‘Marine fungi’ and ‘marine-derived fungi’ in natural product chemistry research: Toward a new consensual definition. *Fungal Biology Reviews*. 2016;30(4):163-175. doi:10.1016/j.fbr.2016.08.001
  69. Jones E.B.G., Pang K.L., Abdel-Wahab M.A., Scholz, B., Hude, K.D., Boekhout, T., Ebel, R., Rateb, M.E., Henderson, L., Sakayaroj, J., Suetrong, S., Dayarathne, M.C., Kumar, V., Raghukumar, S., Sridhar, K.R., Bahkali, A.H.A., Gleason, F.H., Norphanphoun, C.(2019) *An Online Resource for Marine Fungi. Fungal Diversity Vol 96*. Springer Netherlands; 2019. doi:10.1007/s13225-019-00426-5
  70. Search Marine Fungi. Accessed June 9, 2021. Available at: <https://www.marinefungi.org/>
  71. Sánchez C. (2019) Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro- and microplastics biodegradation. *Biotechnology Advances*. 2020;40:107501. doi:10.1016/j.biotechadv.2019.107501
  72. Gonçalves M.F.M., Santos L., Silva B.M. V., Abreu, A.C., Vicente, T.F.L., Esteves, A.C., Alves, A. (2019) Biodiversity of *Penicillium* species from marine environments in Portugal and description of *Penicillium lusitanum* sp. nov., a novel species isolated from sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2019;69(10):3014-3021. doi:10.1099/ijsem.0.003535
  73. Pitt J.I., Hocking A.D. (1997) *Penicillium and Related Genera. Fungi Food Spoilage*. Published online 1997:203-338. doi:10.1007/978-1-4615-6391-4\_7
  74. Mycobank. Accessed January 5, 2021. Available at: [https://www.mycobank.org/page/Name details page/name/Penicillium brevicompactum](https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/name/Penicillium%20brevicompactum)
  75. Fernandes S., Simões L.C., Lima N., Simões M. (2019) Adhesion of filamentous fungi isolated from drinking water under different process conditions. *Water Research*. 2019;164. doi:10.1016/j.watres.2019.114951
  76. Visagie C.M., Houbraken J., Frisvad J.C, Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T., Samson, R.A. (2014) Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*. 2014;78(1):343-371. doi:10.1016/j.simyco.2014.09.001
  77. Ndagijimana M., Chaves-López C., Corsetti A., Tofalo, R., Sergi, M., Paparella, A.,

- Guerzoni, M.E., Suzzi, G. (2008) Growth and metabolites production by *Penicillium brevicompactum* in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*. 2008;127(3):276-283. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.019
78. Anand S., Srivastava P. (2020) Optimization Strategies for Purification of Mycophenolic Acid Produced by *Penicillium brevicompactum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2020;191(2):867-880. doi:10.1007/s12010-019-03204-w
  79. Asghar A., Raman A.A.A., Daud W.M.A.W. (2014) A Comparison of Central Composite Design and Taguchi Method for Optimizing Fenton Process. *Scientific World Journal*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/869120
  80. Fewer, Branchu; S, Forbes ;R, York ;P, Nyqvist ;H S. CCD for Investigating Stability of Liposomes. *Pharm Res*. 1999;16(5):702-708.
  81. Ahmadi M., Vahabzadeh F., Bonakdarpour B., Mofarrah E., Mehranian M. (2005) Application of the central composite design and response surface methodology to the advanced treatment of olive oil processing wastewater using Fenton ' s peroxidation. *Journal of Hazardous Materials* 2005;123:187-195. doi:10.1016/j.jhazmat.2005.03.042
  82. Introduction ImageJ. Accessed June 13, 2021. Available at: <https://imagej.net/learn/>
  83. Paço AMS do. A. Paço. Biodegradation of microplastics : Optimization and Scale up. Biodegradação de microplásticos : Otimização e Aumento da escala. Published online 2018.
  84. Wageningen L. Landbouwhogeschool Wageningen the Netherlands. Effects of sterilization on components. 1971;9.
  85. CICECO » Microscópio eletrónico de varrimento (SEM). Accessed June 29, 2021. Available at: [http://www.ciceco.ua.pt/index.php?menu=272&tabela=equipamento\\_detail&equipamentoid=57&language=pt](http://www.ciceco.ua.pt/index.php?menu=272&tabela=equipamento_detail&equipamentoid=57&language=pt)
  86. CICECO - Aveiro Institute of Materials » equipamento e instalações » Serviço de RMN de Estado Sólido Serviço de análises RMN do estado sólido. Accessed June 29, 2021. Available at: <http://www.ciceco.ua.pt/index.php?menu=413&language=pt&tabela=geral>
  87. CICECO » Sistema de Análise Elementar. Accessed June 29, 2021. Available at: [http://www.ciceco.ua.pt/index.php?menu=272&language=eng&tabela=equipamento\\_detail&equipamentoid=35](http://www.ciceco.ua.pt/index.php?menu=272&language=eng&tabela=equipamento_detail&equipamentoid=35)
  88. Mularczyk-Oliwa, M., Bombalska, A., Kaliszewski, M., Wlodarski, M., Kwaśny M, Kopczyński, K., Szpakowska, M., Trafny, E.A. (2013) Rapid discrimination of several fungus species with FTIR spectroscopy and statistical analysis. *Biul Wojsk Akad Tech*. 2013;62(3):71-80.
  89. Salman A, Tsrer L, Pomerantz A, Moreh R, Mordechai S, Huleihel M. (2010) FTIR spectroscopy for detection and identification of fungal phytopathogenes. *Spectroscopy*. 2010;24(3-4):261-267. doi:10.3233/SPE-2010-0448
  90. Interpreting C-13 NMR Spectra - Chemistry LibreTexts. Accessed July 22, 2021.

Available at:  
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Spectroscopy/Magnetic\\_Resonance\\_Spectroscopies/Nuclear\\_Magnetic\\_Resonance/NMR%3A\\_Experimental/Carbon-13\\_NMR/Interpreting\\_C-13\\_NMR\\_Spectra](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Magnetic_Resonance_Spectroscopies/Nuclear_Magnetic_Resonance/NMR%3A_Experimental/Carbon-13_NMR/Interpreting_C-13_NMR_Spectra)

91. Ołdak D., Kaczmarek H., Buffeteau T., Sourisseau C. (2005) Photo- and biodegradation processes in polyethylene, cellulose and their blends studied by ATR-FTIR and raman spectroscopies. *Journal of Materials Science*. 2005;40(16):4189-4198. doi:10.1007/s10853-005-2821-y
92. Rodrigues M.O., Abrantes N., Gonçalves F.J.M., Nogueira H., Marques J.C., Gonçalves A.M.M. (2018) Spatial and temporal distribution of microplastics in water and sediments of a freshwater system (Antuã River, Portugal). *Science of The Total Environment*. 2018;633:1549-1559. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.03.233
93. Yamada-onodera K, Mukumoto H, Katsuyaya Y., Saiganji, A., Tani, Y. (2001) Degradation of polyethylene by a fungus , *Penicillium simplicissimum* YK. 2001;72:323-327.
94. Sowmya H. V., Krishnappa M. (2014) Degradation of polyethylene by *Trichoderma harzianum* — SEM , FTIR , and NMR analyses. *Environmental Monitoring and Assessment* Published online 2014:6577-6586. doi:10.1007/s10661-014-3875-6
95. Tribedi, P., & Sil, A. K. (2012). Low-density polyethylene degradation by *Pseudomonas* sp. AKS2 biofilm. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(6), 4146–4153. doi:10.1007/s11356-012-1378-y
96. Dang T.C.H., Nguyen D.T., Thai H., Nguyen, T.C., Tran, T.T.H., Le, V.H., Nguyen, V.H., Tran, X.B., Pham, T.P.T., Nguyen, T.G., Nguyen, Q.T. (2018) Plastic degradation by thermophilic *Bacillus* sp. BCBT21 isolated from composting agricultural residual in Vietnam. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 2018;9(1). doi:10.1088/2043-6254/aaabaf
97. Olmos D., Martín E. V., González-Benito J. (2014) New molecular-scale information on polystyrene dynamics in PS and PS-BaTiO<sub>3</sub> composites from FTIR spectroscopy. *Phys Chem Chem Phys*. 2014;16(44):24339-24349. doi:10.1039/c4cp03516j
98. Mielczarski J.A., Jeyachandran Y.L., Mielczarski E., Rai B. (2011) Modification of polystyrene surface in aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2011;362(2):532-539. doi:10.1016/j.jcis.2011.05.068
99. Jang B.N., Wilkie C.A. (2005) The thermal degradation of polystyrene nanocomposite. *Polymer* 2005;46(9):2933-2942. doi:10.1016/j.polymer.2005.01.098
100. Su S., Wilkie C.A. (2004) The thermal degradation of nanocomposites that contain an oligomeric ammonium cation on the clay. *Polymer Degradation and Stability*. 2004;83(2):347-362. doi:10.1016/S0141-3910(03)00279-9
101. Prata J.C., Reis V., Paço A., Martins P., Cruz A., P. da Costa J., Duarte A.C., Rocha-Santos T. (2020) Effects of spatial and seasonal factors on the characteristics and carbonyl index of (micro)plastics in a sandy beach in Aveiro, Portugal. *Science of The Total Environment*. 2020;709. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.135892

## 5. Anexos

### A.

Nas **Tabelas 26 e 27** podem-se observar as percentagens de crescimento do fungo e biomassa, na presença de microplásticos de HDPE e LDPE, respetivamente.

**Tabela 26.** Biomassa inoculada (fungo *P. brevicompactum*), final e a sua percentagem de crescimento após 7, 14, 21 e 28 dias (primeira experiência) amostra de HDPE (iogurte).

	Biomassa inoculada (g)*	Biomassa inoculada (seca) (g)	Biomassa final (seca) (g)	Crescimento (g)	Crescimento do fungo (g) (média ± desvio padrão)	Porcentagem de Biomassa (%)	Porcentagem de biomassa (%) (média ± desvio padrão)
7D_I/S_C1F	0,577	0,0404	0,2128	0,1724	0,24±0,07	19,0	15±4
7D_I/S_C2F	0,566	0,0396	0,3466	0,3070		11,4	
7D_I_R1	0,567	0,0397	0,1892	0,1495	0,24±0,05	21,0	15±4
7D_I_R2	0,541	0,0379	0,3115	0,2736		12,2	
7D_I_R3	0,593	0,0415	0,3264	0,2849		12,7	
7D_I_R4	0,500	0,0350	0,2789	0,2439		12,6	
14D_I/S_C1F	0,540	0,0378	0,5216	0,4838		0,47±0,01	
14D_I/S_C2F	0,552	0,0386	0,4941	0,4555	7,82		
14D_I_R1	0,525	0,0367	0,4563	0,4196	0,47±0,04	8,05	7±1
14D_I_R2	0,494	0,0346	0,5573	0,5227		6,20	
14D_I_R3	0,492	0,0344	0,4886	0,4542		7,05	
14D_I_R4	0,493	0,0345	0,5012	0,4667		6,88	
21D_I/S_C1F	0,520	0,0364	0,4223	0,3859	0,32±0,06	8,62	10±2
21D_I/S_C2F	0,510	0,0357	0,2941	0,2584		12,1	
21D_I_R1	0,510	0,0357	0,3801	0,3444	0,32±0,01	9,39	10±1
21D_I_R2	0,513	0,0359	0,3577	0,3218		10,0	
21D_I_R3	0,533	0,0373	0,3434	0,3061		10,9	
21D_I_R4	0,575	0,0402	0,3668	0,3266		11,0	
28D_I/S_C1F	0,499	0,0349	0,2818	0,2469	0,250±0,001	12,4	12,0±0,1
28D_I/S_C2F	0,507	0,0355	0,2834	0,2479		12,5	
28D_I_R1	0,502	0,0351	0,2885	0,2534	0,23±0,02	12,2	14±2
28D_I_R2	0,562	0,0393	0,2811	0,2418		14,0	
28D_I_R3	0,505	0,0353	0,2609	0,2256		13,6	
28D_I_R4	0,545	0,0381	0,2257	0,1876		16,9	

\* balança utilizada com 3 casas decimais



**Tabela 27.** Biomassa inoculada (fungo *P. brevicompactum*), final e a sua percentagem de crescimento após 7,14, 21 e 28 dias (primeira experiência) na amostra de LDPE (saco).

	Biomassa inoculada (g)*	Biomassa inoculada (seca) (g)	Biomassa final (seca) (g)	Crescimento (g)	Crescimento do fungo (g) (média ± desvio padrão)	Percentagem de Biomassa (%)	Percentagem de biomassa (%) (média ± desvio padrão)
7D_I/S_C1F	0,577	0,0404	0,2128	0,1724	0,24±0,07	19,0	15±4
7D_I/S_C2F	0,566	0,0396	0,3466	0,3070		11,4	
7D_S_R1	0,519	0,0363	0,2588	0,2225	0,24±0,04	14,0	15±4
7D_S_R2	0,817	0,0572	0,2557	0,1985		22,4	
7D_S_R3	0,593	0,0415	0,3345	0,2930		12,4	
7D_S_R4	0,509	0,0356	0,2905	0,2549		12,3	
14D_I/S_C1F	0,540	0,0378	0,5216	0,4838	0,47±0,01	7,25	7,5±0,3
14D_I/S_C2F	0,552	0,0386	0,4941	0,4555		7,82	
14D_S_R1	0,513	0,0359	0,4709	0,4350	0,47±0,04	7,62	7±1
14D_S_R2	0,524	0,0367	0,5632	0,5265		6,51	
14D_S_R3	0,499	0,0349	0,4576	0,4227		7,63	
14D_S_R4	0,519	0,0363	0,5432	0,5069		6,69	
21D_I/S_C1F	0,520	0,0364	0,4223	0,3859	0,30±0,06	8,62	10±2
21D_I/S_C2	0,510	0,0357	0,2941	0,2584		12,1	
21D_S_R1	0,488	0,0342	0,3738	0,3396	0,30±0,02	9,14	11±1
21D_S_R2	0,532	0,0372	0,3239	0,2867		11,5	
21D_S_R3	0,511	0,0358	0,3615	0,3257		9,89	
21D_S_R4	0,546	0,0382	0,3310	0,2928		11,5	
28D_I/S_C1F	0,499	0,0349	0,2818	0,2469	0,250±0,001	12,4	12,0±0,1
28D_I/S_C2F	0,507	0,0355	0,2834	0,2479		12,5	
28D_S_R1	0,514	0,0360	0,2499	0,2139	0,24±0,02	14,4	13±1
28D_S_R2	0,528	0,0370	0,2588	0,2218		14,3	
28D_S_R3	0,489	0,0342	0,2955	0,2613		11,6	
28D_S_R4	0,503	0,0352	0,2802	0,2450		12,6	

\*balança utilizada com 3 casas decimais

Foi possível observar algumas irregularidades nas percentagens de crescimento de fungo. Ao fim de 7 dias de experiência o fungo apresentava um crescimento de cerca de  $15 \pm 4$  % nos controlos e réplicas de ambos os plásticos, no entanto, ao fim de 14 dias diminuiu para  $7,5 \pm 0,3$  % nos controlos e  $7 \pm 1$  % nas réplicas HDPE e LDPE. Aos 21 dias de experiência aumentam para cerca de  $10 \pm 2$  % nos controlos,  $10 \pm 1$  % nas réplicas HDPE e  $11 \pm 1$  % nas réplicas LDPE. No final da experiência o fungo apresentava um crescimento de cerca de  $12,0 \pm 0,1$  % nos controlos,  $14 \pm 2$  % nas réplicas HDPE e  $13 \pm 1$  % nas réplicas LDPE, valor ainda assim abaixo do que se registou nos primeiros 7 dias. No entanto os resultados foram concordantes no sentido que em ambas as experiências, HDPE e LDPE, o fungo cresceu e diminuiu a sua quantidade em igual proporção, devido ao facto, muito

provavelmente, de ter estado sujeito às mesmas condições, como principalmente a temperatura.

Na **Tabela 28**, estão apresentadas as percentagens de microplásticos removidos obtidas ao longo de toda a experiência do plástico HDPE (designado por “I” pelo facto de ter origem na embalagem do iogurte). É de realçar que os microplásticos foram lavados com água destilada e sofreram o tratamento com o ácido nítrico (réplicas 1 e 2), pois colocou-se a questão de o meio de cultura ou demasiada matéria orgânica causasse interferência na análise pelo FTIR. No entanto tal não se verificou, pois, os resultados não apresentaram diferenças acentuadas. Assim, é representada a média das réplicas 1 e 2 e a média da 3 e 4 (sem tratamento, ou seja, na presença de matéria orgânica), contrariamente às restantes experiências onde é apresentada a média das quatro réplicas.

**Tabela 28.** Percentagem de microplásticos (MP) removidos (primeira experiência de 28 dias) com amostra HDPE (iogurte) na presença do fungo *P. brevicompactum*.

	MP início (g)**	MP recuperados (g)**	MP removidos (g)	Remoção de plásticos (g) (média ± desvio padrão)	Percentagem de MP removidos (%)	Percentagem de MP Removidos (%) (média ± desvio padrão)
7D_I_C1P	0,0144	0,0141	0,0003	0,0010±0,0007	2	7±4
7D_I_C2P	0,0146	0,0130	0,0016		11	
7D_I_R1	0,0138	0,0131	0,0007	0,00075±0,00005	5	5,3±0,2
7D_I_R2	0,0147	0,0139	0,0008		5	
7D_I_R3*	0,0142	0,0135	0,0007	0,0004±0,0004	5	3±3
7D_I_R4*	0,0139	0,0139	0		0	
14D_I_C1P	0,0146	0,0140	0,0006	0,00065±0,00005	4	4,5±0,4
14D_I_C2P	0,0142	0,0135	0,0007		5	
14D_I_R1	0,0139	0,0133	0,0006	0,0011±0,0005	4	8±3
14D_I_R2	0,0146	0,0130	0,0016		11	
14D_I_R3*	0,0145	0,0128	0,0017	0,0016±0,0001	12	11±1
14D_I_R4*	0,0150	0,0135	0,0015		10	
21D_I_C1P	0,0147	0,0138	0,0009	0,0010±0,0001	6	7±1
21D_I_C2P	0,0135	0,0124	0,0011		8	
21D_I_R1	0,0134	0,0132	0,0002	-0,0001±0,0003	3	-0,8±2,3
21D_I_R2	0,0132	0,0136	-0,0004		-3	
21D_I_R3*	0,0142	0,0139	0,0003	0,0004±0,0005	2	2,5±0,4
21D_I_R4*	0,0141	0,0137	0,0004		3	
28D_I_C1P	0,0136	0,0126	0,0010	0,002±0,001	7	15±8
28D_I_C2	0,0139	0,0107	0,0032		23	
28D_I_R1	0,0140	0,0132	0,0008	0,0010±0,0002	6	7,1±1,3
28D_I_R2	0,0143	0,0131	0,0012		8	
28D_I_R3*	0,0137	0,0146	-0,0009	-0,0008±0,0001	-7	-5,8±0,7
28D_I_R4*	0,0138	0,0145	-0,0007		-5	

\* não foram lavados nem submetidos ao tratamento com HNO<sub>3</sub>

\*\* balança utilizada com 4 casas decimais

Relativamente aos 7 dias a percentagem de remoção de microplástico dos controlos ( $7 \pm 4 \%$ ) e réplicas (1 e 2 –  $5,3 \pm 0,2 \%$ ; 3 e 4 –  $3 \pm 3 \%$ ) não correspondeu ao esperado pois era expectável que na presença de fungo (réplicas) a percentagem de remoção fosse superior. Os valores das réplicas 3 e 4 iriam, em princípio, dar inferiores uma vez que não tendo sido “lavados” apresentam mais massa e conseqüentemente uma percentagem de remoção inferior. Ao fim de 14 dias o controlo apresentava, igualmente, um valor superior ao esperado,  $4,5 \pm 0,4 \%$ , pois a percentagem de remoção devia-se apresentar muito perto de 0, uma vez que pode haver sempre perdas de fragmentos de plástico, como nas paredes do frasco ou na tampa. Os valores dos 21 dias continuam a demonstrar que algo ocorreu, pois, os controlos apresentaram  $7 \pm 1 \%$  de remoção comparando com as réplicas 1/2 e 3/4, onde se obteve  $-0,8 \pm 2,3 \%$  e  $2,5 \pm 0,4 \%$ , respetivamente. Ao final da experiência, nos 28 dias, os valores não correspondem igualmente ao que era esperado.

Na **Tabela 29** estão presentes os resultados das percentagens de remoção de microplástico referente ao plástico LDPE (designados por S por ter origem no saco de plástico) que mais uma vez não são concordantes e em muito semelhantes no que toca à instabilidade observada nos resultados da Tabela 28.

**Tabela 29.** Percentagem de microplásticos (MP) removidos (primeira experiência de 28 dias) com amostra LDPE (saco) na presença do fungo *P. brevicompactum*.

	MP início (g)**	MP recuperados (g)**	MP removidos (g)	Remoção de plásticos (g) (média ± desvio padrão)	Percentagem de MP removidos (%)	Percentagem de MP Removidos (%) (média ± desvio padrão)
7D_S_C1P	0,0147	0,0117	0,0003	0,0039±0,0009	2	67±4
7D_S_C2P	0,0145	0,0098	0,0047		11	
7D_S_R1	0,0148	0,0111	0,0037	0,0034±0,0004	5	5,3±0,2
7D_S_R2	0,0144	0,0114	0,0030		5	
7D_S_R3*	0,0149	0,0130	0,0019	0,0013±0,0007	13	8±4
7D_S_R4*	0,0150	0,0144	0,0006		4	
14D_S_C1P	0,0150	0,0140	0,0010	0,0014±0,0004	7	9±3
14D_S_C2P	0,0152	0,0134	0,0018		12	
14D_S_R1	0,0149	0,0133	0,0016	0,0025±0,0009	11	16±5
14D_S_R2	0,0163	0,0129	0,0034		21	
14D_S_R3*	0,0153	0,0144	0,0009	0,0011±0,0002	6	7±1
14D_S_R4*	0,0150	0,0137	0,0013		9	
21D_S_C1P	0,0154	0,0136	0,0018	0,0012±0,0006	12	8±4
21D_S_C2P	0,0152	0,0146	0,0006		4	
21D_S_R1	0,0145	0,0145	0	0,002±0,002	0	11±11
21D_S_R2	0,0148	0,0115	0,0033		22	
21D_S_R3*	0,0147	0,0136	0,0011	-0,0005±0,002	7	-3±10
21D_S_R4*	0,0156	0,0176	-0,0020		-13	
28D_S_C1P	0,0149	0,0131	0,0018	0,0013±0,0006	12	9±4
28D_S_C2P	0,0143	0,0136	0,0007		5	
28D_S_R1	0,0159	0,0133	0,0026	0,002±0,001	16	10±6
28D_S_R2	0,0149	0,0143	0,0006		4	
28D_S_R3*	0,0154	0,0166	-0,0012	-0,0014±0,0002	-8	-9±1
28D_S_R4*	0,0151	0,0166	-0,0015		-10	

\* não foram lavados nem submetidos ao tratamento com HNO<sub>3</sub>

\*\* balança utilizada com 4 casas decimais