



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

RAYANE REIS SOUSA

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE MICROPLÁSTICO DE POLIETILENO E
SUA INTERAÇÃO COM O HERBICIDA 2,4-D UTILIZANDO O BIOINDICADOR
*Girardia tigrina***

**Gurupi, TO
2025**

Rayane Reis Sousa

Avaliação ecotoxicológica de microplástico de polietileno e sua interação com o herbicida 2,4-D utilizando o bioindicador *Girardia tigrina*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Tocantins (UFT), como requisito à obtenção do grau de Doutora em Produção vegetal

Orientadora: Profa. Dra. Grasielle Soares Cavallini
Coorientador: Prof. Dr. Nelson Luís Gonçalves Dias de Souza.

**Gurupi, TO
2025**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

R378a Reis Sousa, Rayane.

Avaliação ecotoxicológica de microplástico de polietileno e sua interação com o herbicida 2,4-D utilizando o bioindicador *Girardia tigrina*. / Rayane Reis Sousa. – Gurupi, TO, 2025.

79 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em Produção Vegetal, 2025.

Orientadora : Grasielle Soares Cavallini

Coorientador: Nelson Luis Gonçalves Dias de Souza

1. Ecotoxicidade. 2. Herbicida. 3. Impactos ambientais. 4. Organismos aquáticos. I. Título

CDD 635

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Rayane Reis Sousa

Avaliação ecotoxicológica de microplástico de polietileno e sua interação com o herbicida 2,4-D utilizando o bioindicador *Girardia tigrina*

Tese apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Gurupi. Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e foi avaliado para a obtenção do título de Doutora (a) em Produção Vegetal e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Grasielle Soares Cavallini, UFT

Prof. Dr. Douglas Henrique Pereira, ITA

Prof. Dr. Marcelo Mendes Pedroza, IFTO

Prof. Dr. Carlos Magno de Sousa Vidal, UNICENTRO

Prof. Dr. Danival José de Souza, UFT

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar forças em momentos difíceis e na busca permanente pelo conhecimento.

Ao meu marido Diego de Araújo por todo amor, apoio e compreensão.

Aos meus pais e minha irmã, pelo exemplo de vida, dedicação e ajuda em todos os momentos da minha vida.

Agradeço de forma muito especial à minha orientadora, Dra. Grasielle Cavallini, que com paciência e sabedoria soube conduzir esta tese, peço a Deus que a proteja todos os dias.

E meu coorientador Professor Dr. Nelson pela assistência e técnica prestada no decurso da pesquisa.

Aos meus professores, que foram gentis, respeitosos e generosos ao nos conduzir por meio de seus sábios ensinamentos.

Agradeço aos professores que aceitaram participar como avaliadores na minha banca de defesa da tese de Doutorado.

A meu amigo Fredson Leal, que me acompanhou em todos os momentos. Obrigada por todo apoio e pelas dicas imprescindíveis, e meus amigos que tive o prazer de conhecer nesse processo Kaio César, Julia e a Wádilla Moraes por todo apoio e amizade.

Ao Laboratório de Ecotoxicologia que cedeu o espaço para a concretização desta pesquisa e em especial a Thayrine e o Rone por todo o auxílio.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, a UFT pelo dinamismo e profissionalismo de toda sua equipe e a CAPES pela concessão da bolsa.

Tudo o que fizerem, façam de todo o coração, como para o Senhor e não para as pessoas, sabendo que receberão do Senhor a recompensa da herança. É a Cristo, o Senhor, que vocês estão servindo.

Colossenses 3:23-24.

RESUMO

Os mananciais no entorno de áreas agrícolas são altamente expostos à contaminação devido ao escoamento dos defensivos agrícolas. Dentre as classes de agrotóxicos mais utilizadas estão os herbicidas, em especial o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) que é o segundo herbicida mais comercializado no Brasil. Além dos defensivos agrícolas, a ocorrência de microplásticos (MPs) no ambiente aquático também tem sido relatada em várias partes do mundo. Em rios brasileiros, ambos os contaminantes foram encontrados em níveis elevados, levando a uma alta probabilidade de sua associação, o que pode alterar seus efeitos individuais e potencialmente intensificar sua toxicidade. Investigar as interações entre herbicidas, microplásticos e organismos de água doce é essencial para compreender a dinâmica dos ecossistemas aquáticos, e assim, prever os seus potenciais impactos. Sendo assim, este trabalho avaliou o efeito isolado de microplásticos de polietileno (MP-PE) e também o efeito combinado de MP-PE com o herbicida 2,4-D, utilizando planárias da espécie *Girardia tigrina* como bioindicador. Os resultados foram divididos em dois capítulos: “Respostas comportamentais e fisiológicas de *Girardia tigrina* exposta a microplásticos de polietileno” e “Interação entre microplástico de polietileno e 2,4-D: avaliação química e ecotoxicológica com *Girardia tigrina*”, os quais descrevem as respostas comportamentais (locomoção) e fisiológicas (regeneração e reprodução) das planárias. No primeiro capítulo, foi avaliado o MP-PE puro e observou-se que nessa condição houve redução na regeneração do blastema, dos fotorreceptores e das aurículas das planárias. No capítulo 2, foi avaliada a ecotoxicidade de MP-PE tratado e MP-PE tratado + 2,4-D, sendo observadas alterações na locomoção, regeneração e reprodução das planárias. Além disso, a interação MP-PE tratado + 2,4-D apresentou maior toxicidade em todos os parâmetros avaliados quando comparados ao MP-PE tratado. De modo geral, ambos os estudos são importantes para avaliar os impactos do MP-PE no ambiente e demonstrar que há possibilidade deste contaminante transportar outros poluentes e intensificar sua ecotoxicidade.

Palavras-chaves: Ecotoxicidade; Herbicida, Impactos ambientais; Organismos aquáticos, PE.

ABSTRACT

Water sources around agricultural areas are highly exposed to pesticide contamination. The most commonly used classes of pesticides include herbicides, especially 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), the second most widely used herbicide in Brazil. In addition to pesticides, the presence of microplastics (MP) in the aquatic environment has also been reported in various parts of the world. In Brazilian rivers, both contaminants were found in high concentrations, implying a high probability of their association, which may alter their individual effects and potentially increase their toxicity. The study interactions between herbicides, microplastics and freshwater organisms is essential for understanding the dynamics of aquatic ecosystems and thus for predicting their potential impacts. Therefore, in this work, both the isolated effect of polyethylene microplastics (MP-PE) and the combined effect of MP-PE with the herbicide 2,4-D were investigated, using planarians of the species *Girardia tigrina* as bioindicator. The results were divided into two chapters: “Behavioral and physiological responses of *G. tigrina* exposed to polyethylene microplastics” and “Interaction between polyethylene microplastics and 2,4-D: chemical and ecotoxicological assessment with *G. tigrina*”, describing the behavioral responses (locomotion) and physiological responses (regeneration and reproduction) responses of the planarians. In the first chapter, pure MP-PE was evaluated, and it was found that under this condition there was a reduction in the regeneration of the blastema, photoreceptors and auricles of the planarians. In Chapter 2, the ecotoxicity of treated MP-PE and treated MP-PE + 2,4-D was investigated, and changes in planarian locomotion, regeneration and reproduction were observed. In addition, the interaction of treated MP-PE + 2,4-D show greater toxicity compared to treated MP-PE in all parameters evaluated. In general, both studies for assessing the impact of MP-PE on the environment and show that there is a possibility that this pollutant transports other pollutants and increases its ecotoxicity.

Keywords: Aquatic organisms, Ecotoxicity, Environmental impacts, Herbicide, PE.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Fígado bovino sem a fásia e o microplástico de polietileno (a), *G. tigrina* se alimentando (b), imagem do organismo utilizado no experimento (c).....41
- Figura 2-** a) *G. tigrina* alimentada com fígado misturado com MP; b) Sólido obtido após digestão com peróxido de hidrogênio de *G. tigrina* alimentada com fígado misturado com MP. Borda do quadrado 3mm..... 44
- Figura 3-** Efeito crônico dos microplásticos de polietileno sobre *G. tigrina* - locomoção (cm). Nos tratamentos: controle, 10, 50 e 100 µg/mg de MP-PE homogeneizado com fígado. *Indica diferença significativa em comparação ao tratamento controle (ASTM = 0), os dados paramétricos foram submetidos à ANOVA de um fator, com pós-teste de Dunnet ($p < 0,05$, teste *post hoc* de Dunnet). 44
- Figura 4-** a) taxa de fertilidade b) taxa de fecundidade da *G. tigrina* nos tratamentos: controle, 10, 50 e 100 µg/mg de MP-PE homogeneizado com fígado. *Indica diferença significativa em relação ao tratamento controle (ASTM = 0). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as médias dos dados não paramétricos, utilizando o teste de Dunn a 5% de probabilidade como pós-teste ($p < 0,05$, teste *post hoc* de Dunn)..... 45
- Figura 5-** a) Regeneração do blastema em 24h. b) Regeneração do blastema às 48h *G. tigrina* nos tratamentos: controle, 10, 50 e 100 µg/mg de MP-PE homogeneizado com fígado. *Indica diferença significativa em relação ao tratamento controle (ASTM = 0), os dados paramétricos foram submetidos à ANOVA de um fator, com pós-teste de Dunnet ($p < 0,05$, teste *post hoc* de Dunnet)..... 46
- Figura 6-** Regenerações, medidas em dias até formação completa das aurículas (quimiorreceptores) e fotorreceptores (8 dias de exposição) - a) Aurículas; b) Fotorreceptores. Nos tratamentos: controle, 10, 50 e 100µg /mg de MP-PE homogeneizado com fígado. *Indica diferença significativa em comparação ao tratamento controle (ASTM = 0), os dados paramétricos foram submetidos à ANOVA de um fator, com pós-teste de Dunnet ($p < 0,05$, teste *post hoc* de Dunnet). 47
- Figura 7-** Espectros de absorção no infravermelho do polietileno (a), polietileno tratado com peróxido de hidrogênio (b) e sólido obtido da digestão de *G. tigrina* (c). 49
- Figura 8-** Esquema exemplificativo da regeneração pós-exposição..... 61
- Figura 9-** Esquema exemplificativo da reprodução pós-exposição..... 62

Figura 10- Espectro Raman das amostras indicadas.	63
Figura 11- Espectro de absorção no infravermelho das amostras indicadas.	64
Figura 12- Atividade locomotora de <i>G. tigrina</i> , contagem do número de linhas de grade cruzadas ao longo de 3 minutos de exposição aos tratamentos ($F_{2,33} = 14,0$; $p < 0,0001$). Média \pm erro padrão, $n = 12$. Os asteriscos denotam diferenças significativas nas comparações com o tratamento de controle (somente ASTM), $*p < 0,0001$ (teste de Dunn).	65
Figura 13- (a) Regeneração do blastema (comprimento em mm) 24h ($F_{2,33} = 15,0$; $p < 0,0001$). (b) Regeneração do blastema (comprimento em mm) 48 h ($F_{2,33} = 30,78$; $p < 0,0001$) após a decapitação de <i>G. tigrina</i> . Média \pm erro padrão, $n = 12$. Os asteriscos denotam diferenças significativas nas comparações com o tratamento de controle (somente ASTM), $*p < 0,0001$ (teste <i>post hoc</i> de Dunn).	66
Figura 14- (a) Regeneração de aurículas ($F_{2,33} = 49,0$; $p < 0,0001$). (b) Regeneração de fotorreceptores ($F_{2,90} = 31,51$; $p < 0,0001$). Média \pm erro padrão, $n = 12$. Os asteriscos denotam diferenças significativas nas comparações com o tratamento de controle (somente ASTM), $*p < 0,0001$ (teste <i>post hoc</i> de Dunn).	67
Figura 15- Reprodução de <i>G. tigrina</i> . (a) Taxa de fecundidade ($F_{2,90} = 73,54$; $p < 0,0001$). (b) Taxa de fertilidade ($F_{2,90} = 103,1$; $p < 0,0001$). Média \pm erro padrão, $n = 12$. Os asteriscos denotam diferenças significativas nas comparações com o tratamento de controle (somente ASTM), $*p < 0,0001$ (teste <i>post hoc</i> de Dunnett).	68
Figura 16- Planária com uma deformidade no final da regeneração no tratamento MP-PE tratado + 2,4-D após a decapitação. A seta preta indica o fotorreceptor totalmente formado e a seta azul mostra malformação do segundo fotorreceptor (a). Formação de um terceiro fotorreceptor (b).	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Revisão bibliográfica relacionada a toxicidade de 2,4-D em organismos não-alvo	23
Tabela 2 - Estatísticas de todas as avaliações e valores de F e P relativos.....	48
Tabela 3 - Tentativa de atribuição das bandas Raman (cm^{-1}).....	63

LISTA DE ABREVIACÕES

2,4-D – ácido 2,4-diclorofenoxiacético

AP – Antero Posterior

ASTM – American Society for Testing and Materials

BPA – Bisfenol A

CAP – Clorantraniliprole

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CE50 – Concentração de Efeito para 50% dos organismos

CENO – Concentração de efeito não observado

CEO – Concentração de efeito observado

CL50 – Concentração Letal para 50% dos organismos

CT – Controle

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano

DL50 – Dose Letal para 50% dos organismos

FT-IR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy

FT-IR – Infravermelho com transformada de Fourier

GHS – Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos

IA – Ingrediente Ativo

MPs – Microplásticos

NPs – Nanoplásticos

NTU – Nephelometric Turbidity Unit

OD – Oxigênio Dissolvido

PBDEs – Éteres difenílicos polibromados

PCBs – Bifenilos policlorados

PE – Polietileno

pH – Potencial Hidrogeniônico

pLMV – Teste de velocidade locomotora da planária

PP – Polietileno

PS – Polietileno

PVC – Policloreto de Vinila

UFT – Universidade Federal do Tocantins

USEPA – United States Environmental Protection Agency

UV – Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta e visível

VC – Valor Crônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 Microplásticos: origem, distribuição e impactos.....	16
2.2 Herbicida ácido diclorofenoxiacético (2,4-D).....	21
2.3 <i>Girardia tigrina</i> como bioindicadora.....	23
2.3.1 Reprodução de planárias.....	24
2.3.2 Regeneração de planárias.....	24
2.3.3 Locomoção de planárias.....	26
REFERÊNCIAS.....	26
CAPÍTULO II: Respostas comportamentais e fisiológicas de <i>Girardia tigrina</i> exposta a microplásticos de polietileno.....	37
1 INTRODUÇÃO.....	37
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.1 Exposição de organismos.....	39
2.2 Regeneração após exposição.....	40
2.3 Atividade Locomotora Pós- exposição.....	41
2.4 Reprodução.....	41
2.5 Análise estatística.....	41
2.6 Espectroscopia infravermelha.....	42
3 RESULTADOS.....	43
3.1 Locomoção.....	43
3.2 Reprodução - Fecundidade e Fertilidade.....	44
3.3 Regeneração.....	44
4 DISCUSSÃO.....	48
5 CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
CAPÍTULO III: Interação entre microplástico de polietileno e 2,4-D: avaliação química e ecotoxicológica com <i>Girardia tigrina</i>.....	57
1 INTRODUÇÃO.....	57
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
2.1 Tratamento de MP-PE.....	58

2.2 Ensaio de Adsorção.....	59
2.3 Caracterização espectroscópica.....	59
2.4 Ensaio ecotoxicológico com <i>G. tigrina</i>.....	60
2.4.1 Atividade locomotora.....	60
2.4.2 Atividade de Regeneração.....	60
2.4.3 Reprodução.....	61
2.5 Análises Estatísticas.....	61
3 RESULTADOS.....	61
3.1 Velocidade locomotora da planária - <i>pLMV</i> após exposição a mistura de MP de PE com herbicida 2,4-D.....	64
3.2 Regeneração da cabeça após exposição a mistura de MP de PE com herbicida 2,4-D.....	65
3.3 Reprodução de planárias após exposição a mistura de MP de PE com herbicida 2,4-D.....	67
4 DISCUSSÃO.....	69
5 CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS.....	72

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

A avaliação ecotoxicológica no ambiente aquático, muitas vezes, concentra-se na estimativa de uma única substância, contudo, os organismos aquáticos vêm sendo constantemente expostos a misturas de contaminantes, cujos componentes podem interagir, produzindo efeitos sinérgicos ou antagônicos. Apesar do conhecimento adquirido nas últimas duas décadas sobre os efeitos e riscos dos produtos agroquímicos no meio ambiente, ainda existem lacunas de pesquisa importantes. Uma dessas questões-chave é em relação aos efeitos induzidos por misturas e os métodos para avaliá-los (Godoy et al., 2020).

A exemplo disso, os MPs podem conduzir pesticidas por longas distâncias (Camacho et al., 2019), devido a sua capacidade de sorção de poluentes orgânicos, o que pode aumentar a toxicidade desses fragmentos e acarretar implicações adversas em organismos (Luan et al., 2019). Após, a sorção de pesticidas em MPs de PE, a sua persistência no ambiente pode ser modificada, prolongando o tempo de meia-vida, especialmente para pesticidas com dose tóxica mediana (DT50) ou moderados e altos valores de coeficiente de partição octanol-água (Kow) (Wang et al., 2020).

Uma vez disponíveis no ambiente e em função da sua grande área superficial e hidrofobicidade, os MPs podem adsorver poluentes de forma hábil, como metais pesados, dicloro-difenil-tricloroetano (DDTs), bifenilas policloradas (PCBs), éteres difenílicos polibromados (PBDEs), alquilfenóis, bisfenol A (BPA) e agroquímicos, além de microrganismos, desenvolvendo assim, contaminação sinérgica e acentuando os impactos negativos sobre os organismos expostos e ao ecossistema (Li et al., 2021; Khalid et al., 2021).

Visando o monitoramento dos possíveis impactos destas substâncias, as avaliações ecotoxicológicas apresentam-se como opções para acompanhar o modo de ação destes contaminantes, seus efeitos no ecossistema e em organismos, a partir da observação comportamental, análise de biomarcadores e da atividade enzimática (Li et al., 2023).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é destacar aspectos importantes da temática da poluição por MP, do ponto de vista da química ambiental e ecotoxicologia, abordando sobre a presença deles no ambiente e discutindo também sobre a interação com agroquímicos. Para este estudo foram avaliados o microplástico de polietileno (MP-PE) e o herbicida 2,4-D, de forma isolada e combinada, por meio de ensaios ecotoxicológicos crônicos com planária de água doce da espécie *Girardia tigrina*. As planárias (*G. tigrina*) são bioindicadores utilizados em vários estudos ecotoxicológicos devido a sua eficácia no monitoramento da qualidade de ecossistemas

aquáticos (López et al., 2019; Simão et al., 2022; Dornelas et al., 2021). De acordo com relatos científicos, aspectos de sobrevivência, alimentação, regeneração e reprodução das planárias são pontos proeminentes para qualificá-las como adequados indicadores biológicos da presença de contaminantes (Ofoegbu et al., 2019; Dornelas et al., 2021; Pestana; Ofoegbu, 2021).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A primeira parte desta revisão, contextualiza o problema em nível mundial e exhibe uma discussão sobre as fontes e algumas consequências dos MPs no ambiente. A segunda, visa aprofundar o conhecimento sobre os efeitos do herbicida 2,4-D em organismos e a ecotoxicologia de agroquímicos. A terceira, explana sobre o organismo teste utilizado, a *G. tigrina*, bem como sua reprodução, regeneração e locomoção. Por fim, são compilados estudos que descrevem os efeitos observados em planárias expostas aos MPs.

2.1 Microplásticos: origem, distribuição e impactos

Os plásticos são usados universalmente devido às suas excelentes características, como versatilidade, durabilidade e boa adaptabilidade (Tang et al., 2022; Monira et al., 2021). Em cinco décadas, a produção de plástico progrediu para uma indústria global de 600 bilhões de dólares (Uheida et al., 2021). De acordo com as tendências atuais, aproximadamente 12 bilhões de toneladas de resíduos plásticos serão gerados até 2050 (Ding et al., 2021). Os plásticos são polímeros provenientes de fontes de petróleo, por isso são materiais orgânicos e que apresentam diferentes composições. O termo “plásticos” é comumente empregado para delinear inúmeros materiais sintéticos ou semissintéticos que são usados em uma larga e crescente diversidade de aplicações (Plasticseurope, 2018).

Os polímeros plásticos têm comportamento térmico durante o processo de fabricação, sendo classificado em dois grandes grupos: termoplásticos e termorrígidos. Os termoplásticos, são conhecidos por sua maleabilidade na fabricação e capacidade de serem fundidos e remodelados quase que de modo indefinido, passando pelos processos de reaquecimento, remodelagem e congelamento, frequentemente. Por estas características na produção são estimados como mecanicamente recicláveis. São exemplos desse tipo: o polipropileno, o polietileno, o polivinilcloreto, o poliestireno e policarbonato (Plasticseurope, 2019).

Os plásticos termorrígidos ou termofixos são polímeros que se solidificam durante a reação de polimerização. Estes são materiais insolúveis, que além de se não fundirem, também não são recicláveis. A baquelite, é um exemplo de polímero termorrígido. Estes possuem ligações químicas covalentes entre átomos de cadeias vizinhas, chamadas ligações cruzadas. Estas ligações impedem o deslizamento das cadeias, e assim, quando aquecidos, esses materiais queimam e se degradam (Mano; Mendes, 1999).

Os microplásticos podem ser primários e secundários, sendo os secundários derivados, exclusivamente de processos de degradação, que pode ser causada por meio de processos

físicos, químicos e biológicos, como: hidrólise, fotodegradação, oxidação térmica, abrasão mecânica e biodegradação. Enquanto que os microplásticos primários, são aqueles produzidos para serem usados em produtos farmacêuticos e de higiene pessoal, xampus, gel de banho, batons, protetores solares, máscaras, sombras para os olhos ou outras micropartículas aplicadas intencionalmente para fins específicos (Kabir et al., 2023).

Os MP são qualificados recentemente como contaminantes emergentes, seus potenciais riscos aos seres vivos, bem como os níveis da contaminação em diferentes ambientes precisam ser melhor explicados, por isso, essa nova classe tem sido foco de pesquisas no mundo todo (Richardson; Kimura, 2019).

A designação microplásticos surgiu após serem detectadas partículas micrométricas de materiais plásticos em praias britânicas, por uma equipe de ecologistas marinhos do Reino Unido. Desde então, os especialistas têm detectado microplásticos em praticamente todos os biomas, desde as águas mais profundas do oceano, passando pela comida que ingerimos, pela água que bebemos, o ar que respiramos, e na água da chuva que cai sobre as cidades e mesmo em montanhas isoladas (Lim, 2021).

Os microplásticos se tornaram um tipo de poluente crescente em vários ambientes mundiais, abrangendo ambientes marinhos (Lebreton et al., 2018), água doce (Sighicelli et al., 2018), e até mesmo em gelo, além da ingestão desses fragmentos pela fauna de água doce e salgada (Besseling et al., 2017). Dos resíduos frequentemente estudados, os plásticos têm recebido maior atenção pelos danos que ocasionam no ambiente em que são descartados (Julienne et al., 2019; Luo et al., 2019). Dentre a grande diversidade de plásticos fabricados, o MP mais comumente encontrado é o de polietileno (PE) (Nelms et al., 2018).

A presença desses materiais ocorre tanto na água quanto no solo, sendo difícil quantificar seus efeitos e impossível removê-los totalmente (Sighicelli et al, 2018). O despejo incorreto de resíduos plásticos e imediata formação de microplásticos trouxe a necessidade de estudos e soluções que possam minimizar os danos e restaurar a qualidade ambiental. Apesar da crescente ampliação de informações sobre o tema, existe pouco conhecimento sobre os microplásticos em sistemas de água doce (Sighicelli et al, 2018).

Na fragmentação, as fraturas em polímeros são iniciadas através da formação de vazios na fase amorfa. Esses vazios internos da estrutura dos polímeros podem ser procedentes do processo de fabricação, e embora essa característica não seja observada para polímeros semicristalinos, como no caso do polietileno (PE), eventos de impacto podem começar este processo (Julienne et al., 2019). Os MPs também são capazes de transportar substâncias

prejudiciais para os seres vivos, podendo ser conduzidos ao longo da cadeia alimentar até chegarem aos seres humanos (Carbery; O'connor; Palanisami, 2018).

Os crescentes estudos em torno da problemática do MP advertem que estes polímeros podem ser transferidos ao longo da cadeia alimentar (Nelms et al., 2018). Implicando em uma maior preocupação do meio científico de como essa bioacumulação pode vir a atingir a alimentação do ser humano e os efeitos que podem ser causados (Carbery; O'connor; Palanisami, 2018).

Os peixes são organismos largamente avaliados como bioindicadores de resposta aos MP (Mak et al., 2019; Malafaia et al., 2020). Muitos peixes se nutrem de organismos planctônicos, e como tática alimentar, absorvem grande volume de água para então conseguirem engolir vários itens ao mesmo tempo. No entanto, esta estratégia de captura torna-se lesiva, uma vez que os detritos plásticos dispersos no meio, podem ser engolidos acidentalmente durante o ato (Ory et al., 2018).

O processo de biomagnificação também tem sido motivo de grande preocupação, pois uma vez acumulado no tecido animal, podem ser transferidos para seres de níveis tróficos mais elevados (via cadeia alimentar), abrangendo humanos, de modo que as toxinas contidas no peixe contaminado podem ser absorvidas via dieta (Miller et al., 2020).

O estudo desenvolvido por Godoy et al. (2019) revelou uma adsorção expressiva de chumbo, cromo e zinco em MP, principalmente em polietileno e cloreto de polivinil. Guo et al. (2018) constataram que a capacidade de sorção de tilosina (pureza maior que 95%) nos MP, seguiu a ordem de PE (polietileno), PP (polipropileno), PS (poliestireno) e PVC (policloreto de vinila).

Os MP também podem afetar os vegetais, quando penetram na planta, têm o potencial de comprometer a membrana celular, o ciclo celular, a clorofila e as moléculas intracelulares (Qadeer et al., 2021). Além dos impactos causados diretamente na funcionalidade dos solos, os MPs presentes nesse ambiente, podem migrar para o meio circundante, como o ar e a água, por meio de fatores naturais ou humanos, como vento, poeira, erosão e escoamento superficial, concebendo riscos substanciais para o ecossistema (Guo et al., 2020).

Vale ressaltar que a interação de MP com outros contaminantes pode potencializar os seus efeitos. Em estudos com bioindicadores de contaminação terrestre, por exemplo, Boughattas et al., (2022) observaram que o MP aumentou a absorção do 2,4-D no tecido das minhocas (*Eisenia andrei*) causando danos oxidativos.

2.2 Herbicida ácido diclorofenoxiacético (2,4-D)

O herbicida 2,4-D, ácido diclorofenoxiacético ($C_8H_6Cl_2O_3$), possui 38 produtos registrados e pode ser aplicado em onze culturas, sendo elas: arroz, aveia, café, cana-de-açúcar, centeio, cevada, milho, soja, sorgo e trigo (MAPA, 2021). O Brasil consumiu mais de 48.000 toneladas no ano de 2018 e no ano antecedente alcançou o maior consumo em 10 anos, com mais de 57.000 toneladas de 2,4-D (Brovini et al., 2021).

O herbicida 2,4-D pertence ao grupo de herbicidas que têm como mecanismo de ação a mimetização de auxinas, também denominados como auxinas sintéticas. Esse grupo é composto pelos herbicidas 2,4-D, fluroxypyr, picloram, quinclorac, triclopyr e dicamba, e se rotulam em ácido benzoico, ácido fenoxicarboxílico, ácido carboxílico e ácido quinolino carboxílico (Silva et al., 2020).

Pela classificação GHS (Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos), o 2,4-D é avaliado como perigoso, carcinogênico, tóxico e/ou até letal quando engolido, podendo ocasionar reações alérgicas na pele, lesões oculares, toxicidade para organismos-alvo específicos e perigos para a vida aquática, com implicações tardias. O 2,4-D possui solubilidade em água de 677 ppm a 25°C e 540 ppm a 20°C (Yalkowsky, 2010), densidade de 1,42 kg/m³ a 25°C (Verschueren, 2001), ponto de fusão de 138°C (O'Neil, 2013), pressão de vapor de 1,86x10⁻² mPa a 25 °C (MacBean, 2010), Log Kow: 2,18 (Hansch, 1995) e considerado como intensamente ácido.

De acordo com a *United States Environmental Protection Agency* - USEPA (2020), a adsorção aniônica de 2,4-D é afetada pela mineralogia do solo (em particular pelo teor de óxido de ferro e alumínio), pelo teor de alumínio trocável e pelo teor de fosfato do solo. A adsorção tende a se intensificar com o acréscimo do conteúdo orgânico e diminuição do pH do solo. Portanto, pode acontecer dessorção do 2,4-D em solos minerais, mas não naqueles que contêm elevada matéria orgânica.

Segundo a Portaria GM/MS N° 888, de 4 de maio de 2021, o teor aceitável de 2,4-D na água para consumo no Brasil é de 30 µg L⁻¹, enquanto na União Europeia esse limite é de apenas 0,1 µg L⁻¹ para cada herbicida, e de 0,5 µg L⁻¹ para o total de herbicida na água para consumo, como especificado pela Diretiva (UE) 2020/2184 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2020 sobre a qualidade da água destinada ao consumo humano (Brasil, 2021; UE, 2021).

Para o 2,4 D, a Resolução n° 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece para a água doce das Classes 1 e 2, o Valor Máximo Permitido (VMP)

de $4 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que para Classe 3, permite o VMP de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ (CONAMA, 2005). Também, destaca-se a Resolução nº 396/2008 (CONAMA, 2008) que estabelece para as águas subterrâneas o VMP de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ para o 2,4 D.

As implicações tóxicas do 2,4-D sobre a biota vêm sendo descritas em diversos estudos ecotoxicológicos, demonstrando: influências negativas no desempenho de natação do peixe *Danio rerio* (Moreira et al., 2021), redução da cultura e eclosão de ovos do inseto *Chironomus sancticaroli* (Pinto et al., 2021), diminuição do aumento e perdas de biomassa no anfípoda tropical *Hyaella meinerti* (Pinto et al., 2021), redução expressiva da reprodutibilidade do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* (Silva et al., 2020), além de serem prejudiciais para espécies de plantas terrestres e organismos invertebrados do solo (Triques et al., 2021).

De acordo com o documento do IBAMA que estabelece aos valores ecotoxicológicos, o 2,4-D possui um fator de bioacumulação em peixes da espécie *Danio rerio* de 1,308 e 0,987 em concentrações teste de 2,12 e 15,85 mg/L, concomitantemente. Possui uma concentração efetiva que causa 50% de efeito (CE50) de 127,63 mg/L para a espécie de alga *Selenastrum capricornutum*, Concentração Letal para 50% dos organismos (CL50) de 309,06 mg/Kg para a espécie de minhoca *Eisenia fetida* e Dose Letal para 50% dos organismos (DL50) para espécie de abelha *Apis mellifera* de 100 $\mu\text{g/abelha}$. Para a espécie de peixe *D. rerio*, possui uma CL50 de 107,02 mg/L, concentração de efeito não observado (CENO) de 3,2 mg/L, concentração de efeito observado (CEO) no valor de 5,6 mg/L e um valor crônico (VC) de 4,23 mg/L. Para a espécie de peixe *Hyphessobrycon eques* foi observado comportamento de fuga para concentração de 2000 mg i.a./L de 2,4-D (IBAMA, 2019).

Nakagome et al. (2006) também demonstraram efeitos tóxicos ao expor a espécie de cladóceros *D. magna* ao contaminante 2,4-D, registrando CE50 de 407,30 mg/L (Tabela 1). Pinto et al. (2021) realizaram ensaios de toxicidade com a espécie bentônica *C. sancticaroli* e relataram que nas maiores concentrações de 2,4-D (426 $\mu\text{g/L}$) verificou-se a redução da largura da cápsula cefálica, demonstrando ainda efeitos sinérgicos que poderiam potencializar os riscos para os ecossistemas aquáticos quando analisadas as misturas dos agrotóxicos (Tabela 1).

Tabela 1 - Revisão bibliográfica relacionada a toxicidade de 2,4-D em organismos não-alvo.

Organismos	Toxicidade do 2,4-D (CL50)	Referência Bibliográfica
Peixe <i>Danio rerio</i>	107,02 mg/L	(Moreira et al., 2021)
Alga <i>Selenastrum capricornutum</i>	127,63 mg/L	(IBAMA, 2019)
Minhoca <i>Eisenia foetida</i>	309,06 mg/Kg	(Correia; Moreira, 2010)
Abelha <i>Apis mellífera</i>	100 µg/abelha	(Lunardi, 2018)
Girino <i>Physalaemus cuvier</i>	52,5 µg/L	(Santos, 2020)
Cladóceros <i>D. magna</i>	407,30 mg/L	(Nakagome et al., 2006)
<i>C. sancticaroli</i>	426 µg/L	(Pinto et al., 2021)
Peixe <i>Hypheosobrycon eques</i>	2000 mg i.a./L	(Moreira et al., 2021)

Fonte: A autoria própria (2024).

Triques et al. (2021) demonstraram que, após exposição a doses indicadas do herbicida 2,4-D (2,35 mg/kg), a reprodução das espécies não-alvo *Raphanus sativus* var *acanthioformis* e *Allium cepa* foram afetadas em 95% e 90%, respectivamente.

2.3 *Girardia tigrina* como bioindicador

Na ecotoxicologia, o homem faz parte de um ecossistema, convivendo com outros seres, formando uma grande rede de interação mútua, conseqüentemente, qualquer efeito adverso tem impacto coletivo (Vasseur; Masfaraud; Blaise, 2021). Por definição, bioindicadores normalmente são organismos ou procedimentos biológicos usados como medida do impacto de contaminantes ambientais, também conhecidos como biomonitoramento (Al-Khazraji; Thakir; el-hadeeti, 2020). Na escolha do organismo teste, devem ser consideradas suas características fisiológicas e comportamentais, que melhor demonstrem sua sensibilidade (Al-khazraji; Thakir; el-hadeeti, 2020).

As planárias são vermes do filo Platyhelminthes pertencentes à classe Turbellaria, ordem Tricladida, vastamente distribuídas em escala global e com novas espécies frequentemente descobertas (Hellmann et al., 2022). As planárias podem ser expostas a um grande número de produtos químicos presentes em ecossistema de água doce; os quais podem estar distribuídos na coluna de água, adsorvidos aos sedimentos ou incorporados em suas presas (Alegbeleye et al., 2017). As planárias podem estar presentes em lagos, riachos, nascentes e águas subterrâneas, sendo um organismo importante em comunidades de água doce, principalmente quando controlam populações, pois apresentam comportamento predatório (Barzaghi et al., 2021).

As planárias receberam notoriedade na ecotoxicologia, sendo reconhecidas como bons bioindicadores, principalmente pela sua extraordinária capacidade de regeneração (Pestana; Ofoegbu, 2021). São animais invertebrados que se reproduzem de forma sexuada e assexuada, e tem capacidade de adaptar invariavelmente seu sistema nervoso, com base na alimentação (Poirier et al., 2019). As planárias se alimentam por meio de uma faringe muscular que elas extrudam por uma abertura bucal ventral. A faringe é a única abertura do corpo e também funciona como o ânus do animal. Os sistemas circulatório e respiratório são ausentes (Sluys; Riutort, 2018). Para além disso, planárias são organismos de simples manipulação e baixo custo para pesquisas (Poirier et al., 2019; Ofoegbu et al., 2019; Saraiva et al., 2020).

2.3.1 Reprodução de planárias

A reprodução assexuada é muito mais simples que a reprodução sexuada, pois procede em descendência geneticamente idêntica ao pai (progenitor) não acontecendo variação genotípica. Em contraste, a reprodução sexuada resulta numa prole geneticamente diferente dos pais e irmãos (Ishizuka et al., 2007). A reprodução assexuada das planárias pode ser partenogênica ou fissiparitária e aparentemente, a locomoção é importante neste modo reprodutivo, porque, para que a fissão ocorra, à extremidade posterior do animal prende-se à superfície e a metade anterior, simultaneamente, e se move para frente (Hori; Kishida, 1998).

As planárias de água doce comumente abrigam um sistema reprodutivo hermafrodita, abrangendo um par de ovários, testículos e glândulas vitelínicas ao longo de todo o eixo ântero-posterior (AP) e os órgãos copuladores na cauda (Sluys; Riutort, 2018). No entanto, a reprodução assexuada por partenogênese ou fissão/regeneração também é comum entre as planárias (Vila-farré; Rink, 2018).

Planárias de água doce têm três modos reprodutivos: assexuado, sexuada e a alternância entre esses dois modos, podem modificar em consequência de sazonalidade, alterações nas classes ambientais, sendo a temperatura e as condições da água, fatores cruciais, além de poderem ser induzidas pela alimentação (Kobayashi et al., 2009; Vowinckel, 1970). As planárias da *Girardia* sp. são fissiparitárias, isto é, comumente, sofrem fissão transversal, abaixo da faringe (Kobayashi et al., 2009), dividindo-se em duas partes que regeneram, processo denominado como arquitomia (Knakievicz; Ferreira, 2007).

2.3.2 Regeneração de planárias

Estes organismos exibem a notável aptidão de regenerar e substituir tecidos perdidos, apesar dessa capacidade variar distintamente entre as espécies (Goldman; Poss, 2020). A capacidade regenerativa de planárias de água doce é recomposta completamente por todos os seus folhetos embrionários e qualquer fragmento a partir de 1 por 279 do seu tamanho original, o que apenas ocorre devido à presença de população de células mesenquimais proliferativas, pluripotentes, denominadas neoblastos, as quais foram quantificadas por Reddien e Alvarado (2004) por meio de sua morfologia, completando aproximadamente 25% a 30% de todas as células (Reddien et al., 2022; Adler; Alvarado, 2015).

Durante a regeneração, os neoblastos proliferam em resposta a estímulos de ferimentos (Wenemoser; Reddien, 2010). Eles estão espalhados por todo o corpo, menos por duas regiões que não podem suportar a regeneração de um animal inteiro quando isoladas, a região na frente dos fotorreceptores e a faringe localizada centralmente (Reddien; Alvarado, 2004).

A aptidão de regeneração admite que os animais troquem células danificadas após doenças e ferimentos. O “blastema” é uma estrutura indicadora típica da capacidade de regeneração que é desenvolvida no coto da amputação e atua como uma fonte importante de células para repor tecidos em regeneração. Para a conclusão da regeneração tecidual bem-sucedida, a regulação espaço-temporal da atividade mitótica em células regenerativas cumpre um papel decisivo na manutenção de um certo conjunto de células de blastema (Tasaki et al., 2011).

As planárias podem regenerar novas cabeças em 1 a 2 semanas, e um animal inteiro a partir de um pequeno fragmento de corpo (Ivankovic et al., 2019). Após sofrerem lesão, essas células migram para o local acometido e promovem a formação do blastema, estrutura inicial da reconstrução tecidual (Alvarado, 2012). Os estudos de regeneração de planárias começaram com definições de Randolph (1892), colocando a ideia de neoblastos com base na coloração tradicional do tecido do verme anelídeo *Lumbriculus* durante a regeneração (Reddien et al., 2022).

Além disso, o sistema planário oferece o benefício singular de examinar animais adultos e em regeneração/desenvolvimento em paralelo com os mesmos experimentos, porque nesta espécie assexuada a única forma de neurodesenvolvimento é a neuro regeneração de uma cabeça a partir de uma cauda após a fissão. As planárias têm um grande repertório comportamental que pode ser quantificado e estudado de forma completamente automatizada, equipando diversos pontos finais distintos de função neuronal. É importante notar que o sistema nervoso planário contém a maioria dos mesmos neurotransmissores do cérebro dos mamíferos

e é considerado, estruturalmente, mais semelhante ao cérebro dos vertebrados do que outros cérebros de invertebrados (Buttarelli et al., 2008; Ross et al., 2017; Umesono et al., 2011).

2.3.3 Locomoção de planárias

O teste de velocidade locomotora de planárias (*p*LMV) criado por Talbot e Schotz (2011) é empregado utilizando a calculadora de imagens no Image J, uma imagem de uma grade com espaçamento de 1 cm será calculada com o conjunto de imagens para sobrepor uma grade em todas as imagens. As planárias são rastreadas manualmente em quadros (3000 quadros, sequência de 10 min) e cada vez que o organismo cruza uma linha de grade, a contagem é aumentada em um. O mesmo processo é repetido às cegas, sem acesso às contagens anteriores, para obter uma estimativa da precisão da contagem.

Os efeitos danosos de herbicidas à base de atrazina (ATZ) podem afetar o sistema nervoso de invertebrados, acarretando disfunções na locomoção, na coordenação motora e na resposta a estímulos externos (Demirci et al., 2018).

Após a alimentação, a locomoção e a capacidade de resposta a estímulos costumam ser reduzidas; se estressadas, as planárias podem até expelir alimentos antecipadamente ingeridos para permitir uma evasão eficiente (Deochand et al., 2018). Quando expostas a contaminantes, as planárias repetidamente suprimem a atividade locomotora e diminuem sua capacidade regenerativa, refletida também em sua alocação de energia (López et al., 2021).

REFERÊNCIAS

ADLER, C. E.; ALVARADO, A. S. Types or states? Cellular Dynamics and Regenerative Potential. **Trends in Cell Biology**, v.25, n.11, p.687- 696, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.008>

AGAMUTHU, P., MEHRAN, S. B., NORKHAIRAH, A., & NORKHAIRIYAH, A. Marine debris: A review of impacts and global initiatives. **Waste Management & Research**, v. 37, n. 10, p. 987-1002, 2019. <https://doi.org/10.1177/0734242X19845041>

ALEGBELEYE, O. O., OPEOLU, B. O., & JACKSON, V. A. Polycyclic aromatic hydrocarbons: a critical review of environmental occurrence and bioremediation. **Environmental Management**, v. 60, p. 758-783, 2017.
<https://doi.org/10.1007/s00267-017-0896-2>

AL-KHAZRAJI, H. I.; THAKIR, B. M.; EL-HADEETI, S. A. K. Bioindicators of pesticides pollution in the aquatic environment: A review. **Plant Archives**, v. 20, n. 1, p. 1607-1618, 2020. e-ISSN:2581-6063

ALVARADO, A. S. Q & A: What is regeneration, and why look to planarians for answers? **BMC Biology**, v.10, n. 88, p. 1-6, 2012. <https://doi.org/10.1186%2F1741-7007-10-88>

BESSELING, E; QUIK, J. T; SUN, M; KOELMANS, A. A. Fate of nano- and microplastic in freshwater systems: A modeling study. **Science Direct**, v. 220, p. 540-548, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.001>

BARZAGHI, B., DE GIORGI, D., PENNATI, R., MANENTI, R. Planarians, a neglected component of biodiversity in groundwaters. **Diversity**, v. 13, n. 5, p. 178, 2021.
<https://doi.org/10.3390/d13050178>

BOUGHATTAS, I., ZITOUNI, N., HATTAB, S., MKHININI, M., MISSAWI, O., HELAOUI, S., BANNI, M. Interactive effects of environmental microplastics and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) on the earthworm *Eisenia andrei*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 424, p. 127578, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127578>

BRASIL. Portaria GM/MS N° 888, de 4 de maio de 2021, que altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS n° 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 07 de maio.

Disponível em: < <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portariagm/ms-n-888-de-4-de-maio-de-2021-318461562> >. Acessado em: julho/2024.

BROVINI, E. M., DE DEUS, B. C. T., VILAS-BOAS, J. A., QUADRA, G. R., CARVALHO, L., MENDONÇA, R. F., CARDOSO, S. J. Three-best-seller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. **Science of the Total Environment**, v. 771, p. 144754, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144754>

BUTTARELLI, F. R., PELLICANO, C., & PONTIERI, F. E. Neuropharmacology and behavior in planarians: translations to mammals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 147, n.4, p. 399-408, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.01.009>

CAMACHO, M., HERRERA, A., GÓMEZ, M., ACOSTA-DACAL, A., MARTÍNEZ, I., HENRÍQUEZ-HERNÁNDEZ, L. A., LUZARDO, O. P. Organic pollutants in marine plastic debris from Canary Islands beaches. **Science of the Total Environment**, v. 662, p. 22-31, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.422>

CARBERRY, M.; O'CONNOR, W.; PALANISAMI, T. Trophic transfer of microplastics and mixed contaminants in the marine food web and implications for human health. **Environment International**, [S.l.], v. 115, p. 400–409, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.007>

CHAUDHRY, A. K., & SACHDEVA, P. 'Microplastics' origin, distribution, and rising hazard to aquatic organisms and human health: Socio-economic insinuations and management solutions. **Regional Studies in Marine Science**, v. 48, p. 102018, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.102018>

CONAMA. Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente -**CONAMA n° 357, de 18 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

CONAMA. Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - **CONAMA n° 396, de 13 de abril de 2008**. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências.

DAR, M. A., HAMID, B., KAUSHIK, G. Temporal trends in the use and concentration of organophosphorus pesticides in Indian riverine water, toxicity, and their risk assessment. **Regional Studies in Marine Science**, v. 59, p. 102814, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2023.102814>

DEOCHAND, N., COSTELLO, M.S., DEOCHAND, M.E. Behavioral research with planaria. **Perspectives on Behavior Science**, v. 41, n. 2, p. 447-464, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.012>

DEMIRCI, Ö. Evaluation of toxic effect of insecticide, herbicide and fungicide as single and mixture on *Gammarus lacustris* using biochemical markers. **Chemistry and Ecology**, v. 38, n. 3, p. 195-210, 2022. Doi/abs/10.1080/02757540.2022.2045973

DING, J., SUN, C., HE, C., LI, J., JU, P., LI, F. Microplastics in four bivalve species and basis for using bivalves as bioindicators of microplastic pollution. **The Science of the Total Environment**, v. 782, n.15, p. 146830. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146830>

DORNELAS, A.S.P; SARMENTO, R.A; SARAIVA, A.S.; BARBOSA, R.S.; VIEIRA, M.M.; GRAVATO, C.; SOARES, A.M. Effects of two biopesticides and salt on behaviour, regeneration and sexual reproduction of the freshwater planarian *Girardia tigrina*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 404, p. 124089, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124089>

GAMBINO, G., FALLENI, A., NIGRO, M., SALVETTI, A., CECCHETTINI, A., IPPOLITO, C., GUIDI, P., ROSSI, L. Dynamics of interaction and effects of microplastics on planarian tissue regeneration and cellular homeostasis. **Aquatic Toxicology**, v. 218, p. 105354, 2020 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105354>

GAO, T., SUN, B., XU, Z., CHEN, Q., YANG, M., WAN, Q., SONG, L., CHEN, G., JING, C., ZENG, E.Y., YANG, G. Exposure to polystyrene microplastics reduces regeneration and growth in planarians. **Journal of Hazardous Materials**, v. 432, p. 128673, 2022. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2022.128673>

GODOY, A.A.; DOMINGUES, I.; CARVALHO, L.B.; OLIVEIRA, A.C.; AZEVEDO, C.C.J.; TAPARO, J.M.; ASSANO, P.K.; MORI, V.; HIDALGO, V.A.V.; NOGUEIRA, A.J.A.; KUMMROW, F. Assessment of the ecotoxicity of the pharmaceuticals bisoprolol, sotalol and ranitidine using standard and behavioral endpoints. **Environmental Science Pollution Research**, v. 27, p.5469–5481, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07322-0>

GODOY, V.; BLAZQUEZ, G.; CALERO, M.; QUESADA, L. MARTIN-LA M. A. The potential of microplastics as carriers of metals. **Environmental Pollution**, v. 255, p. 113363, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113363>

GUO, J. J.; HUANG, X. P.; XIANG, L.; WANG, Y. Z.; LI, Y. W.; et al.; Source, migration and toxicology of microplastics in soil. **Environment International**, v. 137, p. 105263., 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105263>

GUO, X.; PANG, J.; CHEN, S.; JIA, H. Sorption properties of tylosin on four different microplastics. **Chemosphere**, v. 209, p. 240-245, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.100>

HANSCH, C. LEO, A., & HOEKMAN, D **Exploring QSAR: hydrophobic, electronic, and steric constants**. Washington, DC: American Chemical Society, 1995.

HELLMANN, L., FERREIRA, R. L., RABELO, L., LEAL-ZANCHET, A. M. Enhancing the still scattered knowledge on the taxonomic diversity of freshwater triclads (Platyhelminthes: Dugesiidae) in caves from two Brazilian Biomes. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v.57, n. 2, p. 148-163, 2022. <https://doi.org/10.1080/01650521.2020.1829901>

HORI, I.; KISHIDA, Y. A fine structural study of regeneration after fission in the planarian *Dugesia japonica*. **Hydrobiologia**, v. 383, n.1-3, p.131-6, 1998. <https://doi.org/10.1023/A:1003415105630>

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. **Relatório de comercialização de agrotóxicos**. 2019. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acessado em 04 jan. 2024.

ISHIZUKA, H., MAEZAWA, T., KAWAUCHI, J., NODONO, H., HIRAO, Y., NISHIMURA, O., MATSUMOTO, M. The *Dugesia ryukyuensis* database as a molecular resource for studying switching of the reproductive system. **Zoological Science**, v. 24, n. 1, p. 31- 7, 2007. <http://dx.doi.org/10.2108/zsj.24.31>

IVANKOVIC M, HANECKOVA R, THOMMEN A, GROHME M.A, VILA-FARRÉ M, WERNER S, RINK J.C. Model systems for regeneration: planarians. **Development**, v. 146, n. 17, p. dev167684, 2019. <https://doi.org/10.1242/dev.167684>

ITOH, M. T.; SHINOZAWA, T; SUMI, Y. **Old and new records of turbellarians from the central areas of Spain Circadian rhythms of melatonin-synthesizing enzyme activities and melatonin levels in planarians**. Brain research, 830, 1999. Doi: 10.1016/s0006-8993(99)01418-3

JULIENNE, F.; DELORME, N.; LAGARDE, F. From macroplastics to microplastics: Role of water in the fragmentation of polyethylene. **Chemosphere**, v. 236, p. 124409, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124409>.

KABIR, M. S.; WANG, H.; LUSTER-TEASLEY, S.; ZHANG, L.; ZHAO, R. Microplastics in landfill leachate: Sources, detection, occurrence, and removal. **Environmental Science and Ecotechnology**, v. 16, n. 16, p.100256, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ese.2023.100256>

KENK, R., Sexual and asexual reproduction in *Euplanaria tigrina* (Girard). **The Biological Bulletin**, v. 73, n. 2, p. 280-294, 1937.

KHALID, N.; AGEEL, M.; NOMAN, A.; HASHEM, M.; MOSTAFA, Y. S.; Linking effects of microplastics to ecological impacts in marine environments. **Chemosphere**, v. 264, n. 2, p. 128541, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128541>

KNAKIEVICZ, T.; FERREIRA, H. B. **Caracterização da biologia de populações de planárias do gênero *Girardia* nativas do Rio Grande do Sul**. 2007. 130 f. Monografia (Especialização) - Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

KOBAYASHI, K.; ARIOKA, S.; HOSHI, M.; MATSUMOTO, M. Production of asexual and sexual offspring in the triploid sexual planarian *Dugesia ryukyuensis*. **Integrative Zoology**, 2009.

LEBRETON, L; SLAT, B; FERRARI, F; SAIN TE-ROSE, B; MARTHOUSE, R; HAJBANE, S; CUNSOLO, S. Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. **Scientific Reports**, v. 8, p. 4666, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22939-w>

LI, X., JIANG, N., YAO, X., WANG, Q., LV, H., WANG, C., & WANG, J. Evaluation of soil ecological health after exposure to environmentally relevant doses of Di (2-ethylhexyl) phthalate: Insights from toxicological studies of earthworms at different ecological niches. **Environmental Pollution**, v. 322, p. 121204, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121204>

LI, C. C.; GAN, Y.; ZHANG, C.; HE, H.; GANG, J.H.; et al.; “Microplastic communities” in different environments: Differences, links, and role of diversity index in source analysis. **Water Research**, v. 188, p. 116574, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116574>

LIM, X. Microplastics are everywhere – but are they harmful? **Nature**, v. 593, p. 22-25, 2021. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-01143-3>

LÓPEZ, A. M. C., SARAIVA, A. D. S., GRAVATO, C., SOARES, A. M., SARMENTO, R. A. Behavioral Parameters of Planarians (*Girardia tigrina*) as Fast Screening, Integrative and

Cumulative Biomarkers of Environmental Contamination: Preliminary Results. **Water**, v. 13, n. 8, p. 1077, 2021. <https://doi.org/10.3390/w13081077>

LUAN, L., WANG, X., ZHENG, H., LIU, L., LUO, X., & LI, F. Differential toxicity of functionalized polystyrene microplastics to clams (*Meretrix meretrix*) at three key development stages of life history. **Marine Pollution Bulletin**, v. 139, p. 346-354, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.01.003>

LUO, E.; SU, L.; CRAIG, N. Comparison of microplastic pollution in different water bodies, from urban streams to coastal Waters. **Environmental Pollution**, v. 246, p.174-182, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.081>.

MACBEAN, C. e-Pesticide Manual. ver. 5.1, Alton, UK; British Crop Protection Council. **Vinclozolin (50471-44-8)**, (p. 20080, 2010).

MACÊDO, L. P. R., DORNELAS, A. S. P., VIEIRA, M. M., DE JESUS FERREIRA, J. S., SARMENTO, R. A., & CAVALLINI, G. S. Comparative ecotoxicological evaluation of peracetic acid and the active chlorine of calcium hypochlorite: use of *Dugesia tigrina* as a bioindicator of environmental pollution. **Chemosphere**, v. 233, p. 273-281, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.286>

MAK, C. W., YEUNG, K. C. F., & CHAN, K. M. Acute toxic effects of polyethylene microplastic on adult zebrafish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.182, p. 109442, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109442>

MALAFAIA, G., DE SOUZA, A. M., PEREIRA, A. C., GONÇALVES, S., DA COSTA ARAÚJO, A. P., RIBEIRO, R. X., & ROCHA, T. L. Developmental toxicity in zebrafish exposed to polyethylene microplastics under static and semi-static aquatic systems. **Science of The Total Environment**, v. 700, p. 134867, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134867>

MANO, E.B.; MENDES, L.C. **Introdução a polímeros**. 2ed, São Paulo: Edgard Blucher, p.191, 1999.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Relatório Produtos Formulados**. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acessado em: 04 jan. 2024.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **ATO Nº 82, DE 25 DE NOVEMBRO DE 2019** - DOU - Imprensa Nacional. www.in.gov.br. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/ato-n-82-de-25-de-novembro-de-2019-229899956>.

MILLER, M. E., HAMANN, M., KROON, F. J. Bioaccumulation and biomagnification of microplastics in marine organisms: A review and meta-analysis of current data. **Plos ONE**, v. 15, n. 10, p. e0240792, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240792>

MONIRA, S., BHUIYAN, M. A., HAQUE, N., PRAMANIK, B. K. Assess the performance of chemical coagulation process for microplastics removal from stormwater. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 155, p. 11-16, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2021.09.002>

MOREIRA, R. A., ARAÚJO, C. V., DA SILVA PINTO, T. J., DA SILVA, L. C. M., GOULART, B. V., VIANA, N. P., ESPINDOLA, E. L. G. Fipronil and 2, 4-D effects on tropical fish: Could avoidance response be explained by changes in swimming behavior and neurotransmission impairments? **Chemosphere**, v. 263, p. 127972, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127972>

NAKAGOME, F. K; NOLDIN, J. A; RESGALLA JR, C. Toxicidade aguda e análise de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura do arroz irrigado sobre o cladóceros *Daphnia magna*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, [s. l.], v. 16, 2006. doi: 10.5380/pes.v16i0.7483.

NELMS, S. E.; GALLOWAY, T. S.; GODLEY, B. J.; JARVIS, D. S.; LINDEQUE, P. K. Investigating microplastic trophic transfer in marine top predators. **Environmental Pollution**, Plymouth, v. 238, p. 999-1007, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.016>

OFOEGBU, P. U., CAMPOS, D., SOARES, A. M., PESTANA, J. L. Combined effects of NaCl and fluoxetine on the freshwater planarian, *Schmidtea mediterranea* (Platyhelminthes: Dugesiiidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 11326-11335, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04532-4>

O'NEIL, Maryadele J. (Ed.). **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. RSC Publishing, 2013.

ORY, N. C., GALLARDO, C., LENZ, M., & THIEL, M. Capture, swallowing, and egestion of microplastics by a planktivorous juvenile fish. **Environmental Pollution**, v.240, p. 566-573, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.093>.

PESTANA, J.L.T.; OFOEFBU, P.U. Ecotoxicity Assays Using Freshwater Planarians. In: Palmeira, C. M. M.; Oliveira, D. P.; Dorta, D. J. (eds) *Methods in Molecular Biology. Springer Protocols* [s. l.], v. 2, n.240, p. 125-137, 2021. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1091-6>

PINTO, T. J., MOREIRA, R. A., DA SILVA, L. C. M., YOSHII, M. P. C., GOULART, B. V., FRAGA, P. D., ESPINDOLA, E. L. G. Toxicity of fipronil and 2, 4-D formulations (alone and in a mixture) to the tropical amphipod *Hyaella meinerti*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 38308-38321, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13296-9>

PLASTICSEUROPE. **What are plastics?** 2018. Disponível em: <<https://www.plasticseurope.org/en/about-plastics/what-are-plastics>>. Acesso em: 05 de março de 2024.

POIRIER, L., GHIGO, É., DAUDE, D., CHABRIERE, E. Planarian, an emerging animal model for toxicology studies. **Medicine Sciences: M/S**, v. 35, n. 6-7, p. 544-548, 2019. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019110>

QADEER, A.; AJMAL, Z.; USMAN, M.; ZHAO, X.; CHANG S. Agricultural plastic mulching as a potential key source of microplastic pollution in the terrestrial ecosystem and consequences. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 175, p. 105855, 2021. <https://doi.org/ez52.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.resconrec.2021.105855>

RANDOLPH, H.A. The regeneration of the tail in lumbriculus. **Journal of Morphology**. v. 7 n.3, p. 317–344, 1892. Doi: 10.1002/jmor.1050070304.

REDDIEN, P. W. Positional information and stem cells combine to result in planarian regeneration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 14, n. 4, p. a040717, 2022. doi: [10.1101/cshperspect.a040717](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040717)

REDDIEN, P. W.; ALVARADO, A. S. Fundamentals of planarian regeneration. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.20, p.725-57, 2004. doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.095114.

RINK, J. C. Stem cell systems and regeneration in planaria. **Development Genes and Evolution**, v. 223, n.1-2, p.67–84, 2004. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.095114>

RICHARDSON, S. D., KIMURA, S. Y. Water analysis: emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 1, p. 473-505, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05269>

RODRIGUES, A.C.M., GRAVATO, C., QUINTANEIRO, C., GOLOVKO, O., ŽLÁBEK, V., BARATA, C., SOARES, A.M.V.M., PESTANA, J.L.T. Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. **Science of the Total Environment**, v. 508, p. 506-513, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.021>

ROSS, K. G., CURRIE, K. W., PEARSON, B. J., & ZAYAS, R. M. Nervous system development and regeneration in freshwater planarians. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v.6, n.3, p. e266, 2017. <https://doi.org/10.1002/wdev.266>

RUUSKANEN, S., FUCHS, B., NISSINEN, R., PUIGBÒ, P., RAINIO, M., SAIKKONEN, K., HELANDER, M. Ecosystem consequences of herbicides: the role of microbiome. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 38, n. 1, p. 35-43, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2022.09.009>

SARAIVA, A. S., SARMENTO, R. A., GRAVATO, C., RODRIGUES, A. C., CAMPOS, D., SIMAO, F. C., SOARES, A. M. Strategies of cellular energy allocation to cope with paraquat-induced oxidative stress: Chironomids vs Planarians and the importance of using different species. **Science of the Total Environment**, v. 741, p. 140443, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140443>

SARAIVA, A. S., SARMENTO, R. A., GOLOVKO, O., RANDAK, T., PESTANA, J. L., SOARES, A. M. Lethal and sub-lethal effects of cyproconazole on freshwater organisms: a case study with *Chironomus riparius* and *Dugesia tigrina*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p.12169-12176, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1180-y>

SIGHICELLI, M., PIETRELLI, L., LECCE, F., IANNILLI, V., FALCONIERI, M., COSCIA, L., ZAMPETTI, G. Microplastic pollution in the surface waters of Italian Subalpine Lakes. **Environmental Pollution**, v. 236, p. 645-651, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.008>

SILVA, L. C., MOREIRA, R. A., PINTO, T. J., OGURA, A. P., YOSHII, M. P., LOPES, L. F., ESPINDOLA, E. L. Acute and chronic toxicity of 2,4-D and fipronil formulations (individually and in mixture) to the Neotropical Cladocera *Ceriodaphnia silvestrii*. **Ecotoxicology**, v. 29, p. 1462-1475, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02275-4>

SLUYS, R., RIUTORT, M. **Planarian Regeneration: Methods and Protocols**, 2018.

SOUSA, R. R., VASCONCELOS, R. B., BARBOSA, R. S., SARMENTO, R. A., PEREIRA, D. H., SOUZA, N. L. G. D., CAVALLINI, G. S. Behavioral and physiological responses of *Girardia tigrina* exposed to polyethylene microplastics. **Environmental Science and Pollution Research**, v.1, p. 1-9, 2024. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-34304-8>

SYAFRUDIN, M., KRISTANTI, R. A., YUNIARTO, A., HADIBARATA, T., RHEE, J., AL-ONAZI, W. A., AL-MOHAIMMED, A. M. Pesticides in drinking water: a review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 2, p. 468, 2021. <https://www.mdpi.com/1660-4601/18/2/468#>

TALBOT, J., SCHÖTZ, E. M. Quantitative characterization of planarian wild-type behavior as a platform for screening locomotion phenotypes. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n.7, p.1063-1067, 2011. <https://doi.org/10.1242/jeb.052290>

TANG, W., XU, J., FAN, Q., LI, W., ZHOU, H., LIU, T., WANG, Q. Rheological behavior and mechanical properties of ultra-high-filled wood fiber/polypropylene composites using waste wood sawdust and recycled polypropylene as raw materials. **Construction and Building Materials**, v. 351, p. 128977, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2022.128977>

TASAKI, J., SHIBATA, N., NISHIMURA, O., ITOMI, K., TABATA, Y., SON, F., SUZUKI, N., ARAKI, R., ABE, M., AGATA, K., UMESONO, Y. ERK signaling controls blastema cell differentiation during planarian regeneration. **Development**, v.138, n.12, p.2417-2427, 2011. <https://doi.org/10.1242/dev.060764>

TODD, O. E., FIGUEIREDO, M. R., MORRAN, S., SONI, N., PRESTON, C., KUBEŠ, M. F., GAINES, T. A. Synthetic auxin herbicides: finding the lock and key to weed resistance. **Plant Science**, v. 300, p. 110631, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110631>

TRIQUES, M. C., OLIVEIRA, D., GOULART, B. V., MONTAGNER, C. C., ESPÍNDOLA, E. L. G., & DE MENEZES-OLIVEIRA, V. B. Assessing single effects of sugarcane pesticides fipronil and 2, 4-D on plants and soil organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111622, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111622>

UHEIDA, A., MEJÍA, H. G., ABDEL-REHIM, M., HAMD, W., & DUTTA, J. Visible light photocatalytic degradation of polypropylene microplastics in a continuous water flow system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 406, p. 124299, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124299>

UMESONO, Y., TASAKI, J., NISHIMURA, K., INOUE, T., & AGATA, K. Regeneration in an evolutionarily primitive brain—the planarian *Dugesia japonica* model. **European Journal of Neuroscience**, v.34, n.6, p. 863-869, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07819.x>

UNIÃO EUROPEIA. The European Parliament and the Council of the European Union. Directive (EU) 2020/2184 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2020 on the quality of water intended for human consumption. **Official Journal of the European Union**, 16 de dez. Disponível em: < <https://eurlex.europa.eu/eli/dir/2020/2184/oj> >. Acesso em: julho/2024.

USEPA - Environmental Protection Agency. United states department of agriculture. **Distributed Structure-Searchable Toxicity (DSSTox) Database**. USA/OOPT. 2020. Disponível em: <https://www.epa.gov/chemical-research/distributed-structuresearchable-toxicity-dsstox-database>. Acesso em: 04 jan. 2024.

VASSEUR, P.; MASFARAUD, J. F.; BLAISE, C. Ecotoxicology, revisiting its pioneers. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 4, p. 3852–3857, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11236-7>

VELLINGIRI, B., CHANDRASEKHAR, M., SABARI, S. S., GOPALAKRISHNAN, A. V., NARAYANASAMY, A., VENKATESAN, D., DEY, A. Neurotoxicity of pesticides—A link to neurodegeneration. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 243, p. 113972, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113972>

VERSCHUEREN, Karel. **Handbook of environmental data on organic chemicals: Vol. 1**. 2001.

VILA-FARRÉ, M.; C RINK, J. The ecology of freshwater planarians. Planarian regeneration: **Methods and Protocols**, v. 1774, p. 173-205, 2018. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7802-1_3

VOWINCKEL, C. The role of illumination and temperature in the control of sexual reproduction in the planarian *Dugesia tigrina* (Girard). **The Biological Bulletin**, [s.l.], v. 138, n. 1, p.77-87, 1970.

WANG, F., GAO, J., ZHAI, W., LIU, D., ZHOU, Z., WANG, P. The influence of polyethylene microplastics on pesticide residue and degradation in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v.394, p.122517, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122517>

WENEMOSER, D., & REDDIEN, P. W. Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence. **Developmental Biology**, v. 344, n. 2, p. 979-991, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.06.017>

YALKOWSKY, Samuel H.; HE, Yan; JAIN, Parijat. **Handbook of Aqueous Solubility Data**. CRC press, 2016.

ZHANG, X., & HAN, R. Adsorption of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid by UiO-66-NH₂ obtained in a green way. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 60, p. 90738-90751, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22127-4>

CAPITULO II

Respostas comportamentais e fisiológicas de *Girardia tigrina* exposta a microplásticos de polietileno

RESUMO

As partículas de microplásticos surgem em grande abundância e variedade nos ecossistemas de água doce em todo o mundo, abrangendo lagos e rios, promovendo uma exposição cada vez mais frequente aos organismos aquáticos. Estudos sobre os mecanismos de eventuais efeitos das partículas plásticas ainda são escassos, principalmente em relação à capacidade regenerativa da biota, para a qual não existe um organismo modelo estabelecido, porém, as planárias têm demonstrado sensibilidade para avaliar esses riscos ao ambiente aquático. Assim o presente estudo teve como objetivo investigar as respostas comportamentais e de regeneração da planária de água doce *Girardia tigrina* exposta a microplásticos (MPs) de polietileno (PE) incorporados em sua fonte alimentar. O maior efeito para a regeneração da planária, foi observado na concentração de 10 µg MP-PE /mg de fígado. A reprodução e a fertilidade das planárias foram afetadas na concentração de 50 µg MP-PE /mg de fígado, entretanto, a locomoção das planárias não foi afetada nas concentrações avaliadas. A caracterização físico-química dos MPs foi realizada por Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e possibilitou identificar o MP-PE ingerido pelas planárias. No geral, os resultados sugerem que o microplástico podem causar alterações nas características fisiológicas de *Girardia tigrina*.

Palavras-chave: Efeito crônico, Ecotoxicologia, Plástico.

1 INTRODUÇÃO

Os plásticos referem-se a um conjunto de polímeros provenientes de fontes petrolíferas, compostos por diversos contaminantes químicos (Rochman et al., 2019). Em relação ao tamanho, muitos estudos categorizam os MP com dimensões inferiores a 5 mm (Sighicelli et al., 2018). As formas mais comuns de MP incluem polipropileno (PP), polietileno (PE), poliestireno (PS), polietileno de baixa densidade (PEBD) e polietileno de alta densidade (PEAD), sendo diferentes dos produtos químicos, como por exemplo, plastificantes (para melhorar plasticidade e viscosidade), repetidamente, adicionados pelos fabricantes para modificar e alcançar as propriedades plásticas desejadas (Wong et al., 2020).

A presença de MP ocorre tanto na água quanto no solo, sendo difícil quantificar seus efeitos e impossível removê-los completamente (Sighicelli et al., 2018; Peng et al., 2020). O crescente despejo incorreto de resíduos plásticos e a formação imediata de MP justificam a necessidade de estudos e soluções que possam minimizar os danos e restaurar a qualidade ambiental. Apesar da crescente informação sobre o assunto, há pouco conhecimento sobre MP em sistemas de água doce (Sighicelli et al., 2018).

Os crescentes estudos em torno do problema das MPs alertam que estes polímeros podem ser transferidos ao longo da cadeia alimentar (Nelms et al., 2018). Esta implicação leva a uma maior preocupação na comunidade científica sobre como esta bioacumulação pode atingir a alimentação humana e os efeitos que podem ser causados (Carbery; O'Connor; Palanisami, 2018).

A presença dos MP no meio ambiente torna-os acessíveis aos seres vivos em todos os níveis tróficos, desde produtores primários até predadores de topo de cadeia, como os humanos. Mais de 44.000 casos de contato entre polímeros e organismos vivos de mais de 1.400 espécies foram citados (Agamuthu et al., 2019). Portanto, há necessidade de compreender as implicações da exposição a esses poluentes.

Nesse sentido, em ecossistemas tropicais de água doce, a planária de água doce *G. tigrina* é importante para o biomonitoramento do impacto causado pelos MP por meio de testes ecotoxicológicos agudo e crônicos controlados (Cesarini et al., 2023). Aspectos de sobrevivência, alimentação, regeneração e reprodução das planárias são pontos relevantes para qualificá-las como bons indicadores biológicos da presença de contaminantes (Ofoegbu, 2019).

Estudos anteriores sobre planárias, especificamente *Dugesia japonica*, expostas a microesferas de polietileno (MP-PE), <10 µm/mg e microfibras de tereftalato de polietileno (MP-PET), 14 µm de largura e 5/6 µm de comprimento, em concentrações de 12 µg a 60 µg MP-PET /mg de fígado, não apresentaram alterações na sua capacidade de locomoção, ingestão alimentar e regeneração (Gao et al., 2022).

Outro estudo com *D. japonica* revelou uma redução em suas áreas corporais e no blastema após exposição a microesferas de poliestireno (MP-PS), com dimensões de 0,1-1-10 µm, em concentrações de 10, 50 e 100 µg MP-PS / mg de fígado, indicando um atraso no seu crescimento e regeneração (Gao et al., 2022). MP-PS de aproximadamente 1 µm de diâmetro, na concentração de 100 µg MP-PS /mg de fígado, induziram estresse oxidativo em *D. japonica* alterando significativamente os níveis de enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase, catalase e glutatona S-transferase (Han et al., 2022).

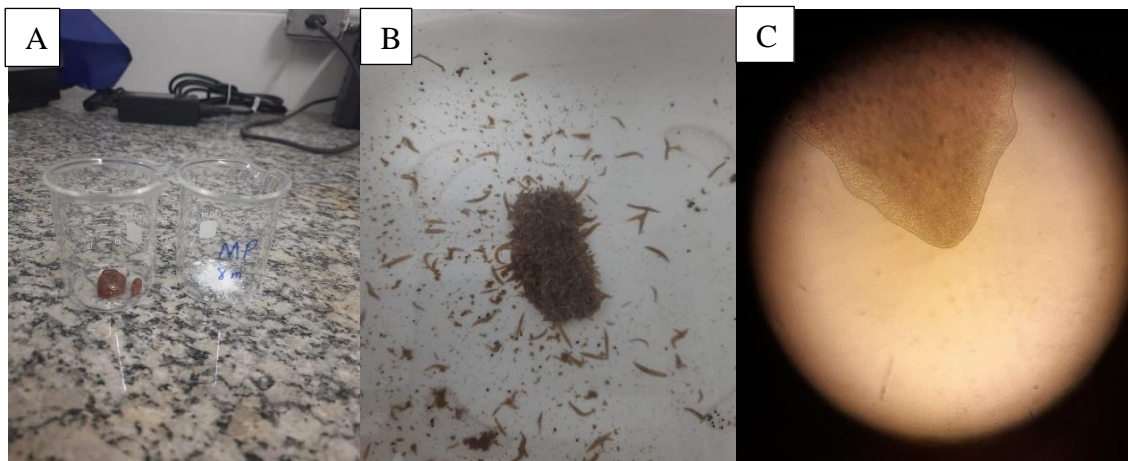
Assim o presente estudo tem como objetivo avaliar a toxicidade crônica (efeito subletal) da MP-PE na locomoção, regeneração e reprodução utilizando o organismo teste *G. tigrina* para prever os impactos decorrentes deste contaminante nos ecossistemas de água doce contribuindo para valores de referência e para a proteção ambiental.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Exposição de organismos

O microplástico de polietileno, número de referência (434272), foi obtido comercialmente da Empresa Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, United States (US) (34-50 μm). Foram selecionadas planárias medindo 8 mm de comprimento, as quais foram privadas de alimentação 7 dias antes dos experimentos. O alimento utilizado foi fígado bovino sem a fásia e cortado em pedaços de aproximadamente 1×1 cm e triturado em liquidificador de alta velocidade e homogeneizado com o PE de acordo com cada concentração (10, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de fígado) (Adaptado de Merryman et al., 2018) (Figura 1).

Figura 1 - Fígado bovino sem a fásia e o microplástico de polietileno (a), *Girardia tigrina* se alimentando (b), imagem do organismo utilizado no experimento (c).



Fonte: Autoria própria, 2025.

As planárias foram alimentadas regularmente com 1 mg de fígado com PE (0, 10, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$) em placas de Petri contendo planárias e solução ASTM (American Society for Testing and Materials) (Adaptado de Gao et al., 2022). As placas de Petri foram mantidas em câmara escura a 25°C , sendo a solução nas placas substituída após 12 h. Foram realizadas dez repetições para cada tratamento, incluindo o controle, com cada uma contendo 5 organismos. Após os 8 dias de exposição estática, os organismos foram transferidos para placas de Petri com meio ASTM limpo e alocados aleatoriamente para avaliação da regeneração e efeitos de locomoção.

2.2 Regeneração após exposição

Seis planárias foram utilizadas para avaliar a regeneração de fotorreceptores e aurículas durante 7 dias seguidos. Os efeitos do PE na regeneração das planárias foram avaliados 8 dias após a seleção e decapitação com um único corte atrás das aurículas com lâmina de bisturi esterilizada. Após a decapitação, cada *G. tigrina* foi colocada em placa de Petri ($\varnothing=90$ mm) com 20 mL de meio ASTM (Adaptado de Macêdo et al., 2019). O comprimento (em mm) do blastema foi avaliado 24 horas e 48 horas após a decapitação (Adaptado de Dornelas et al., 2020). A ausência ou presença de fotorreceptores e aurículas foi registrada em cada repetição, e os resultados foram apresentados como uma média de dias necessários para a formação.

2.3 Atividade Locomotora Pós-Exposição

A atividade de locomoção de *G. tigrina* foi avaliada após exposição ao MP por 8 dias; seis planárias por concentração foram colocadas individualmente em um recipiente de 75 cm de diâmetro contendo uma folha de papel com linhas de grade (0,1 cm de distância) no fundo e meio ASTM em quantidade que auxiliasse na locomoção do organismo. Os organismos foram colocados no centro do recipiente e cada linha cruzada e recruzada foi contada e a *pLMV* (Velocidade Locomotora da Planária) foi determinada ao final de 3 min de avaliação (Adaptado de Barbosa et al., 2022; Dornelas et al., 2020, 2022).

2.4 Reprodução

A fecundidade foi avaliada pelo número de casulos depositados e a fertilidade pelo número de filhotes emergidos. Planárias adultas em idade reprodutiva precoce ($1,5 \pm 0,1$ cm de comprimento) foram utilizadas para o teste de reprodução. O desenho experimental contemplou três quantidades mássicas de microplásticos (10, 50 ou 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$), misturadas com 1 mg de fígado em cada concentração homogeneizada utilizada para os testes de locomoção e regeneração, e um tratamento controle com solução ASTM.

As planárias foram mantidas em recipientes de vidro com 300 mL de solução teste por 21 dias, três repetições por tratamento e 10 organismos por repetição. Os organismos foram expostos e a avaliação do número de casulos dividido pelo número de planárias expostas em cada repetição, foi realizada diariamente para determinar a fecundidade das planárias.

Cada casulo foi separado em um microtubo de 1,5 mL (tubos de microcentrífuga Eppendorf® LoBind) contendo meio ASTM. A eclosão das planárias foi acompanhada até 3

semanas após a postura dos ovos (Knakievicz et al., 2006). Em seguida, a fertilidade também foi avaliada diariamente e determinada pelo número de planárias que eclodiram dividido pelo número de casulos (Knakievicz et al., 2006; López et al., 2019; Saraiva et al., 2020; Dornelas et al., 2020; Dornelas et al., 2020, 2021, 2022).

2.5 Análise estatística

Para os ensaios de toxicidade crônica foi realizada ANOVA (análise de variância), seguida do teste *post hoc* de Dunnet para comparação com o controle. Antes da realização da ANOVA foram atendidos seus pressupostos, a saber: análise de homogeneidade de variância, teste de Bartlett; e normalidade dos resíduos, teste de Kolmogorov-Smirnov (independência das observações). Os dados de reprodução (fertilidade e fecundidade) não atenderam aos pressupostos da ANOVA e o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as médias dos dados não paramétricos, utilizando o teste de Dunn como pós-teste (ambos a 5% de probabilidade). Para todos os testes estatísticos, o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Todos os dados foram analisados utilizando o software estatístico GraphPad Prism versão 9.3.1 para Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla California USA).

2.6 Espectroscopia de absorção no infravermelho

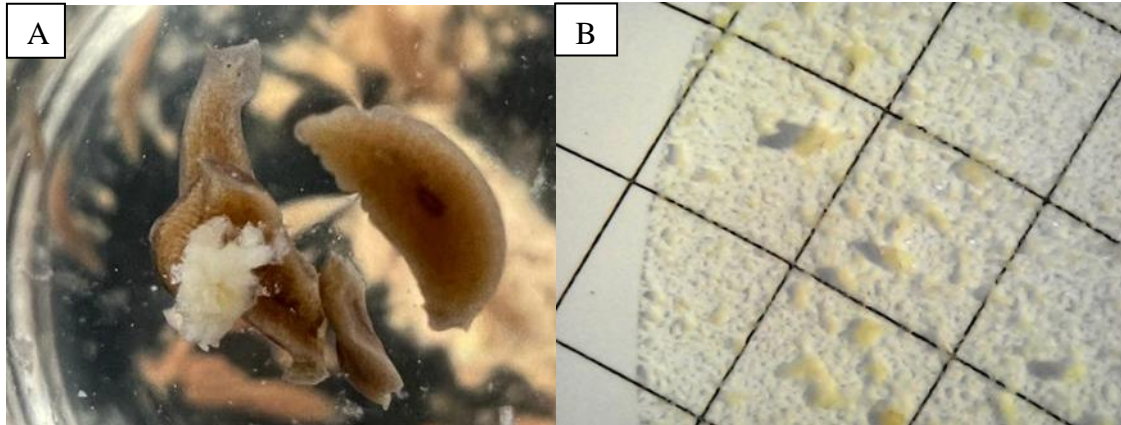
No trabalho de Gao et al. (2022), foi avaliado poliestireno (PS) com tamanho de 1 a 10 μm . No presente trabalho foi utilizado MP-PE de tamanhos maiores (34 a 50 μm), portanto foi necessário avaliar no Laboratório de Química Ambiental da Universidade Federal do Tocantins – UFT, se as planárias poderiam ingerir MP dessas dimensões. Este teste foi realizado digerindo planárias após contato com MP-PE misturado com alimento (fígado).

Para comprovar que as planárias eram capazes de se alimentar de MP, foi realizado um teste com 25 planárias, que foram alimentadas com 1 g de fígado bovino triturado misturado com 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MP (Figura 2a). Imediatamente após as planárias terem sido alimentadas com fígado misturado com MP, elas foram digeridas com peróxido de hidrogênio 30% a 65 °C por 24 horas. Após a digestão, a amostra foi filtrada através de membrana de nitrato de celulose de 0,45 μm e seca à temperatura ambiente (Figura 2b). O sólido obtido foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho.

Os espectros infravermelhos das amostras (Figura 7) (a) polietileno padrão, (b) polietileno tratado com peróxido de hidrogênio e (c) sólido obtido da digestão de *G. tigrina*

foram obtidos em espectrômetro Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) da marca Perkin Elmer, na região de $4000-400\text{ cm}^{-1}$ com resolução de 4 cm^{-1} e média de 32 varreduras.

Figura 2- a) *Girardia tigrina* alimentada com fígado misturado com MP; b) Sólido obtido após digestão com peróxido de hidrogênio de *G. tigrina* alimentada com fígado misturado com MP. Borda do quadrado 3mm.



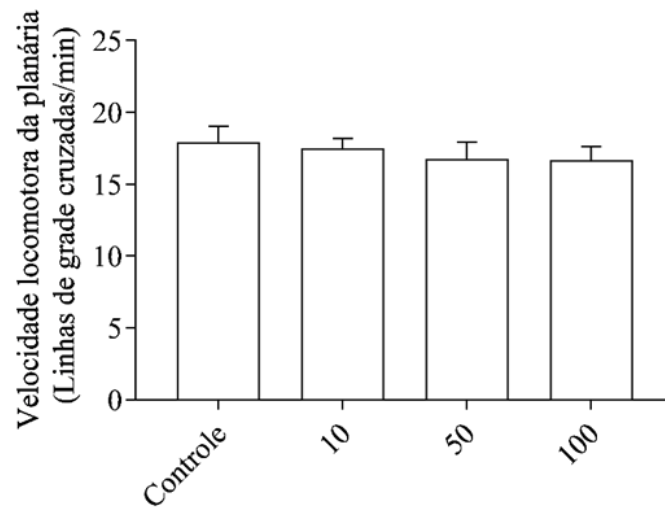
Fonte: Autoria própria, 2025.

3 RESULTADOS

3.1 Locomoção

Os resultados referentes à locomoção das planárias são apresentados na Figura 3 e não foram observados efeitos significativos nas concentrações avaliadas.

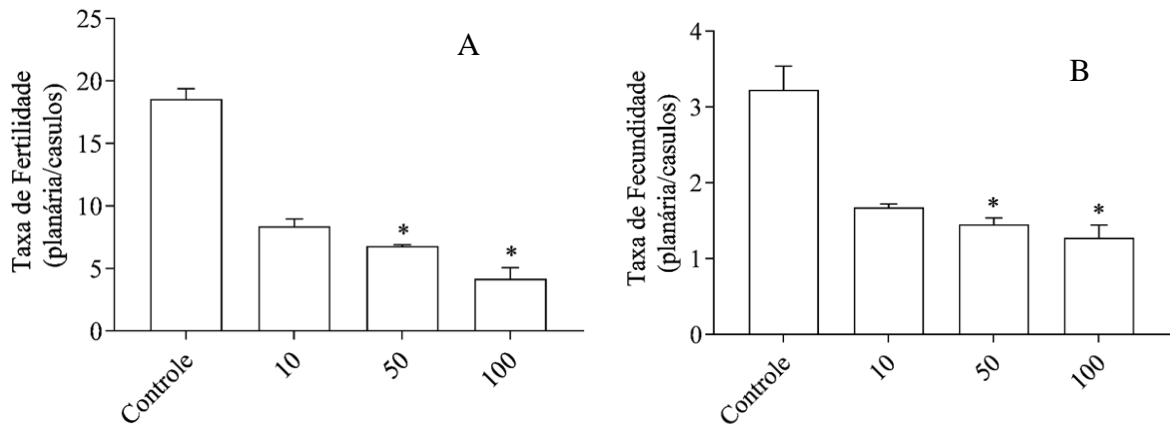
Figura 3- Efeito crônico dos microplásticos de polietileno sobre *Girardia tigrina* - locomoção (cm). Nos tratamentos: controle, 10, 50 e $100\text{ }\mu\text{g}/\text{mg}$ de MP-PE homogeneizado com fígado. Os dados paramétricos foram submetidos à ANOVA de um fator, com pós-teste de Dunnet ($p < 0,05$, teste *post hoc* de Dunnet).



3.2 Reprodução – Fecundidade e Fertilidade

À medida que o período de exposição aumentou, a taxa de fecundidade foi reduzida. A taxa de fertilidade de *G. tigrina* após a exposição ao MP-PE (Fig. 4a) foi reduzida na concentração de 50 µg/mg e comparado com a concentração 100 µg/mg houve uma redução na fertilidade de 10,9%.

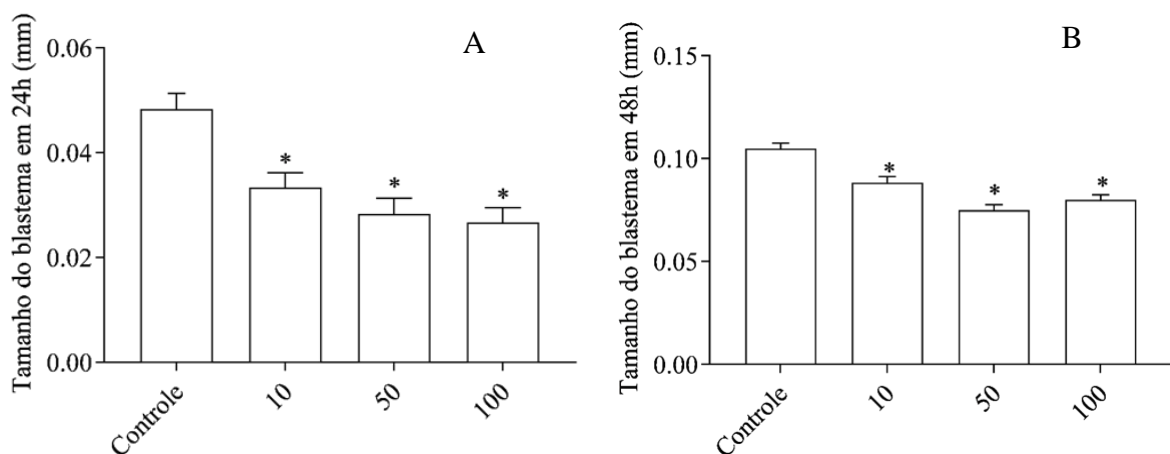
Figura 4- a) taxa de fertilidade b) taxa de fecundidade da *Girardia tigrina* nos tratamentos: controle, 10, 50 e 100 µg/mg de MP-PE homogeneizado com fígado. *Indica diferença significativa em relação ao tratamento controle (ASTM = 0). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as médias dos dados não paramétricos, utilizando o teste de Dunn a 5% de probabilidade como pós-teste ($p < 0,05$, teste *post hoc* de Dunn).



3.3 Regeneração

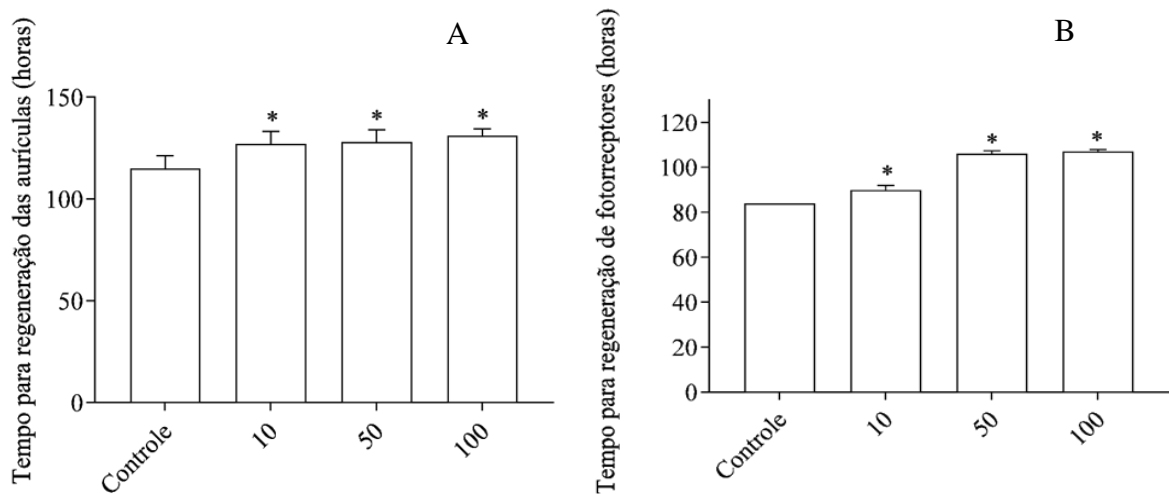
Em relação à regeneração do blastema (Figura 5a), foi observado um atraso de 25,7% em 24h na concentração de 50 µg/mg, e em 48h, uma redução de 12,4% na mesma concentração em relação ao controle (Figura 5b).

Figura 5- a) Regeneração do blastema em 24h. b) Regeneração do blastema às 48h *tigrina* nos tratamentos: controle, 10, 50 e 100 µg/mg de MP-PE homogeneizado com fígado. *Indica diferença significativa em relação ao tratamento controle (ASTM = 0), os dados paramétricos foram submetidos à ANOVA de um fator, com pós-teste de Dunnet ($p < 0,05$, teste *post hoc* de Dunnet).



A regeneração das aurículas e dos fotorreceptores (teste *post-hoc* de Dunnet), (Fig. 6), comparado ao tratamento controle, foi significativamente afetada na dose de 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Quanto ao aparecimento dos fotorreceptores após exposição nas concentrações de MP-PE de 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$, foi observado atraso de 5,94% e 19,06% (Fig. 6b). O atraso no aparecimento das aurículas ocorreu após exposição de MP nas concentrações de MP de 10 e 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$, atingindo 6% e 7,33% em comparação com os tratamentos controle, respectivamente (Fig. 6a).

Figura 6- Regenerações, medidas em dias até formação completa das aurículas (quimiorreceptores) e fotorreceptores (8 dias de exposição) - a) Aurículas; b) Fotorreceptores. Nos tratamentos: controle, 10, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MP-PE homogeneizado com fígado. *Indica diferença significativa em comparação ao tratamento controle (ASTM = 0), os dados paramétricos foram submetidos à ANOVA de um fator, com pós-teste de Dunnet ($p < 0,05$, teste *post hoc* de Dunnet).



A Tabela 2 apresenta as estatísticas de todos os tratamentos e os valores de F e p relativos.

Tabela 2 - Estatísticas de todas as avaliações e valores de F e p relativos.

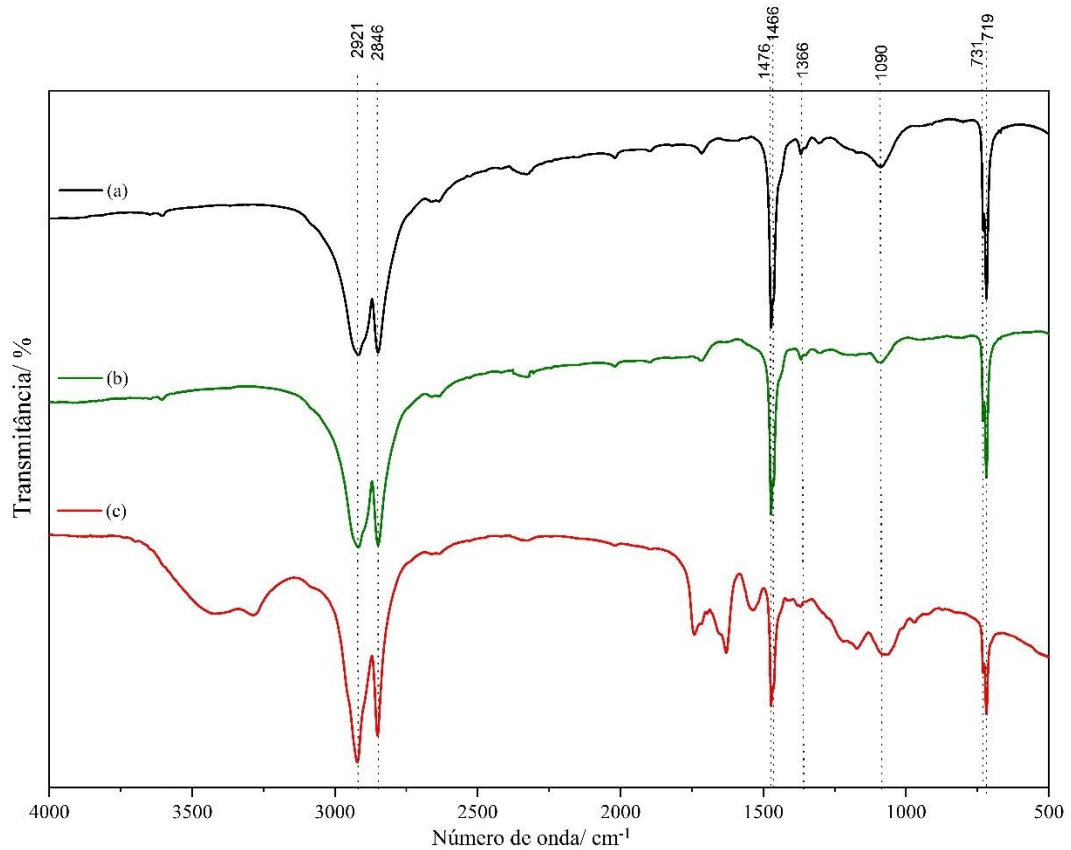
Avaliações	F (DFn, DFd)	p-valor
Locomoção	$F_{3,44} = 0,3561$	0,7849
Regeneração 24h	$F_{3,44} = 11,49$	<0,0001
Regeneração 48h	$F_{3,44} = 24,24$	<0,0001
Fotorreceptores	$F_{3,44} = 87,29$	<0,0001
Aurículas	$F_{3,44} = 19,31$	<0,0001
Fecundidade	$H = 11,9$	0,0077
Fertilidade	$H = 13,87$	<0,0001

A Figura 7 mostra o espectro de absorção no infravermelho do polietileno (microplástico) (a) e do sólido obtido após digestão com peróxido de hidrogênio de *G. tigrina* alimentado com fígado misturado com MP (c). O espectro MP (a) apresenta bandas em 2921, 2846, 1476/1466, 1366, 1090 e 731/719 cm^{-1} , características deste material e atribuídas respectivamente a $\nu_a(\text{CH}_2)$, $\nu_s(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$, $\nu(\text{CC})$ e $\rho(\text{CH}_2)$ (Bredács et al., 2021; Wong; Gan; Aishah, 2011).

O espectro do sólido obtido após a digestão (b) mostra a presença de todas as bandas de PE, o que indica que quando *G. tigrina* se alimenta do fígado, também consome o microplástico. Finalmente, no espectro do sólido proveniente da digestão do organismo (c), pode-se observar o aparecimento de bandas entre 3650 e 3140 e em 1741, 1630 e 1538 cm^{-1} , que não estão presentes no espectro do PE sem (a) e com (b) oxidação com peróxido de hidrogênio. Portanto, pode-se inferir que essas bandas estão relacionadas ao resíduo de matéria orgânica ainda presente após o processo de digestão da *G. tigrina*.

Neste contexto, as bandas em 1741 cm^{-1} podem ser atribuídas ao $\nu(\text{C}=\text{O})$ dos lipídios, as bandas em 1630 e 1538 cm^{-1} associadas à proteína, e atribuídas respectivamente ao $\nu(\text{C}=\text{O}) + \nu(\text{CN}) + \nu(\text{NH})$ (modo amida I) e para o $\nu(\text{CN}) + \nu(\text{NH})$ (modo amida II). A banda entre 3650-3140 cm^{-1} pode ser atribuída ao $\nu(\text{OH})/ \nu(\text{NH})$ e relacionados a proteínas e polissacarídeos (Gault et al., 2005; Guo; Wang; Liu, 2016). Porém, apesar da presença dessas bandas, fica claro no espectro mostrado na (Figura 7c) que o sólido obtido a partir da digestão do organismo contém polietileno, ou seja, a planária ingeriu o MP.

Figura 7- Espectros de absorção no infravermelho do polietileno (a), polietileno tratado com peróxido de hidrogênio (b) e sólido obtido da digestão de *G. tigrina* (c).



Fonte: Autoria própria, 2025.

4 DISCUSSÃO

O PE é um polímero comum, que tem sido utilizado, por exemplo, em embalagens, produtos de higiene e cuidados pessoais (Plasticseurope, 2019). Como resultado, a concentração de MPs tende a aumentar ao longo de toda a cadeia trófica, levando à bioacumulação e, posteriormente, à biomagnificação destas frações nos níveis superiores da cadeia alimentar, contribuindo em última análise para a exposição em humanos (Rochman, Brookson et al., 2019).

A absorção desses fragmentos por humanos pode levar ao estresse oxidativo, promovendo um potencial dano celular e o aumento de distúrbios neuronais, hepáticos e digestivos, sendo o trato gastrointestinal humano o local mais plausível de exposição ao MP, provocando disfunção da barreira intestinal e inflamação (Menéndez-Pedriza; Jaumot; Bedia, 2022; Banerjee; Billey; Shelver, 2021).

As avaliações realizadas neste trabalho são muito relevantes para estimar o efeito comportamental e reprodutivo causado pela MP-PE na espécie *Girardia tigrina*. Notavelmente, os resultados crônicos que afetam a dinâmica populacional – sobrevivência a curto e longo prazo, bem como a reprodução – podem resultar de uma fecundidade e fertilidade prejudicadas, o que também pode afetar negativamente o comportamento predatório, a alimentação e a capacidade de escapar dos predadores (Saraiva et al., 2020).

Por outro lado, parâmetros comportamentais (especificamente para locomoção), fisiológicos (regeneração) e reprodutivos (fecundidade) significam possíveis danos neurotóxicos alterados pela exposição de planárias de água doce às concentrações ambientalmente relevantes de MPs, embora o dano causado não tenha sido letal e imediato.

As planárias têm um sistema nervoso central estrutural parecido ao dos humanos, por isso têm sido frequentemente utilizadas em estudos de neurotoxicidade (Poirier et al., 2019) e sabe-se que a aptidão de regeneração das planárias pode ser afetada devido à ação do MP no sistema nervoso central, alterando a atividade dos neurônios e confundindo a comunicação celular, essencial para que a regeneração seja hábil (Ge et al., 2022). A capacidade de regeneração das planárias é uma habilidade complexa resultante da ação de células totipotentes (células-tronco – neoblastos) presentes em seus tecidos (Pearson, 2022).

A habilidade regenerativa das planárias está associada à sua reprodução assexuada, portanto, o atraso na regeneração da cabeça de *G. tigrina* pode definitivamente afetar a dinâmica populacional dos organismos (Saraiva et al., 2020). A redução das atividades reprodutivas e o atraso na regeneração podem ser justificados pelos custos energéticos associados ao estresse causado pela ingestão e contato com o MP (Zhang et al., 2022). Além disso, o atraso na formação dos fotorreceptores, assim como das aurículas, enfraquece a função fundamental de detectar a direção da luz (Saraiva et al., 2020).

Outros estudos como de Lu et al. (2021), demonstraram que o NP-PET, na concentração de 2 µg/L, prejudicou o crescimento populacional de *Daphnia*. Enquanto Rani-Borges et al. (2022), observaram que MP de polietileno de baixa densidade (PEBD) (2 mg/L) afetaram a velocidade de natação de *Gammarus fasciatus*.

Cesarini et al. (2023) avaliaram a exposição de *G. tigrina* a nanoplásticos, observando diminuição no comprimento do blastema e atraso na regeneração da cabeça, e para maiores concentrações de NP, observaram o aumento no tempo de regeneração de fotorreceptores e aurículas em comparação aos tratamentos controle.

Cesarini et al. (2023) não observaram malformação ao final dos 8 dias adicionais de exposição aos NP (período de regeneração). A partir de 10 µg/mg de MP-PE foram apresentados

atrasos mais significativos na formação do blastema, fotorreceptores e aurículas. Segundo Gambino et al. (2020), o tamanho e a forma do MP-PE são importantes, pois esferas maiores que 10 µm e fibras maiores que 14 µm de largura e 5/6 µm de comprimento são expelidas em poucas horas por *Dugesia japonica* após a ingestão. Porém, no presente estudo, foram observados efeitos crônicos na regeneração, fecundidade e reprodução com tamanhos maiores de PE para *G. tigrina*, demonstrando que partículas maiores também têm um efeito negativo nas planárias.

Os efeitos ecotoxicológicos de MP em planárias foram avaliados por Gambino et al. (2020) com PE e por Gao et al. (2022) com PS, e ocasionalmente observaram que micropartículas, principalmente em concentrações mais elevadas, aglomeravam-se e aderiam ao corpo da planária, o que gerava complicações, principalmente reprodutivas. Kolandhasamy et al. (2018) e Sendra et al. (2020) também observaram que além da ingestão, outra via de transferência de MP e NP em planárias é a adesão ao tecido dos organismos e a internalização.

Resultados de neurotoxicidade, cardiotoxicidade, implicações teratogênicas e morfotoxicidade externa foram estudados em embriões de peixe zebra (*Danio rerio*) expostos a diferentes concentrações de MP (Malafaia et al., 2020). Neste estudo os autores utilizaram MP-PE com diâmetro médio de 38 µm e examinaram diferentes concentrações: 6,2, 12,5, 25,0, 50,0, e 100 mg/L por 144 horas. Ao final do estudo, ficou evidenciado que os MPs são capazes de causar efeitos nocivos ao desenvolvimento de embriões e larvas de *D. rerio*, mesmo em baixas concentrações e em curto tempo de exposição.

Nosso estudo tem grande importância em demonstrar que concentrações encontradas no ambiente podem causar efeitos na capacidade reprodutiva e regenerativa das planárias que poderiam, no ambiente natural, impactar no funcionamento dos ecossistemas tropicais de água doce. Portanto, além de demonstrar a potencial toxicidade crônica dos MPs-PE sobre *G. tigrina*, nosso estudo revela o potencial deste organismo em testes ecotoxicológicos com contaminantes emergentes, como os microplásticos.

O espectro FT-IR do MP-PE padrão é caracterizado por várias bandas de absorção típicas, que são atribuídas a diferentes vibrações moleculares, incluindo vibrações de estiramento C-H vibrações de deformação CH e vibrações de estiramento C-C. Os picos de absorção são identificados pela sua posição no espectro, medida em número de onda, e pela sua intensidade relativa (Hosseini; Jafari, 2020).

A Figura 6 mostra as características espectrais observadas nos compostos de PE citados por Hahn et al. (2019), onde o espectro MP-PE mostra as bandas em 2921, 2846, 1476/1466, 1366 e 1090 e as bandas em 731/719 cm⁻¹ que representaram o padrão de vibração oscilante do

grupo CH₂. Pela análise de FT-IR foi possível analisar os MPs após a digestão das planárias e assim como no MP-PE puro, foi observado o aparecimento de bandas entre 3650 e 3140 e em 1741, 1630 e 1538 cm⁻¹.

5 CONCLUSÕES

As atividades de regeneração do blastema, dos fotorreceptores e das aurículas são parâmetros analisados individualmente e ambos foram expressivamente afetados por exposições únicas de MP-PE.

Exposições crônicas a concentrações ambientalmente relevantes de microplástico de polietileno prejudicaram significativamente as taxas de fecundidade e fertilidade de planárias. Além disso, os níveis de toxicidade seguiram um aumento dependente da concentração.

A simplicidade de aferir uma ampla gama de respostas a contaminantes evidencia ainda mais a utilidade das planárias de água doce *Girardia tigrina* para pesquisa ecotoxicológica.

REFERÊNCIAS

- AGAMUTHU P., MEHRAN S.B., NORKHAIRAH A., NORKHAIRIYAH A. Marine debris: a review of impacts and global initiatives. **Waste Management & Research**, v. 37, n. 10, p. 987-1002, 2019. <https://doi.org/10.1177/0734242X19845041>
- BANERJEE, A., BILLEY, L. O., SHELVER, W. L. Uptake and toxicity of polystyrene micro/nanoplastics in gastric cells: Effects of particle size and surface functionalization. **PLoS ONE**, v. 16, n. 12, p. e0260803, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260803>
- BARBOSA R.S., ROTILI E.A., SANTOS A.M.A., RIBEIRO F., DORNELAS A.S.P, PEREIRA D.H., CAVALLINI G.S., SOARES, A.M.V.M., SARMENTO, R.A., GRAVATO, C. Eco (toxicological) assessment of the neonicotinoid formulation Actara® using planarian *Girardia tigrina* as model organism. **Pollutants**, v.2, p. 546–555, 2022. <https://doi.org/10.3390/pollutants2040035>
- BREDÁCS, M., BARRETTA, C., CASTILLON, L.F., FRANK, A., ORESKI, G., PINTER, G., GERGELY, S. Prediction of PE density from FTIR and Raman spectroscopy using multivariate data analysis. **Polymer Testing**, v. 104, p. 107406, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2021.107406>
- CARBERRY, M., O’CONNOR, W., PALANISAMI, T. Trophic transfer of MPs and mixed contaminants in the marine food web and implications for human health. **Environment International**, v. 115, p. 400-409, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.007>
- CARPENTER, E.J., SMITH, K., L. Plastics on the Sargasso Sea surface. **Science**, v. 175, n. 4027, p. 1240–1241, 1972. <https://doi.org/10.1126/science.175.4027.1240>
- CESARINI, G., COPPOLA, F., CAMPOS, D., VENDITTI, I., BATTOCCHIO, C., DI GIULIO, A., MUZZI, M., PESTANA, J.L.T., SCALICI, M. Nanoplastic exposure inhibits feeding and delays regeneration in a freshwater planarian. **Environmental Pollution**, v. 332, p. 121959, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121959>
- DEOCHAND, N., COSTELLO, M.S., DEOCHAND, M.E. Behavioral research with planaria. **Perspectives on Behavior Science**, v. 41, n. 2, p. 447-464, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.012>
- DORNELAS, A.S.P., SARMENTO, R.A., CAVALLINI, G.S., BARBOSA, R.S., VIEIRA, M.M., SARAIVA, A.S., BORDALO, M.D., SOARES, A.M.V.M., PESTANA, J.L.T. Lethal and sublethal effects of the saline stressor sodium chloride on *Chironomus xanthus* and *Girardia tigrina*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 27, p. 34223-34233, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09556-9>

DORNELAS, A.S.P., DE JESUS FERREIRA, J.S., SILVA, L.C.R., DE SOUZA SARAIVA, A., CAVALLINI, G.S., GRAVATO, C.A.S., ALMEIDA SARMENTO, R. The sexual reproduction of the nontarget planarian *Girardia tigrina* is affected by ecologically relevant concentrations of difenoconazole: new sensitive tools in ecotoxicology. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, p.0123456789, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18423-0>

FALASCO, C.F. **Avaliação da presença de partículas insolúveis e microplásticos em sais de origem marinha do Brasil**. 2019. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-24032022-150650/>. Acesso em: 10 out. 2023.

GAMBINO, G., FALLENI, A., NIGRO, M., SALVETTI, A., CECCHETTINI, A., IPPOLITO, C., GUIDI, P., ROSSI, L. Dynamics of interaction and effects of MPs on planarian tissue regeneration and cellular homeostasis. **Aquatic Toxicology**, v. 218, p. 105354, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105354>

GAO, T., SUN, B., XU, Z., CHEN, Q., YANG, M., WAN, Q., SONG, L., CHEN, G., JING, C., ZENG, E.Y., YANG, G. Exposure to polystyrene MPs reduces regeneration and growth in planarians. **Journal of Hazardous Materials**, v. 432, p. 128673, 2022. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2022.128673>

GAULT, N., RIGAUD, O., PONCY, J.L., LEFAIX, J.L. Infrared microspectroscopy study of γ -irradiated and H₂O₂-treated human cells. **International Journal of Radiation Biology**, v. 81, n. 10, p. 767-779, 2005. <https://doi.org/10.1080/09553000500515368>

GE, X.Y., HAN, X., ZHAO, Y.L., CUI, G.S., YANG, Y.G. An insight into planarian regeneration. **Cell Proliferation**, v. 55, n. 9, p. e13276, 2022. <https://doi.org/10.1111/cpr.13276>

GUO, X., WANG, X., LIU, J. Composition analysis of fractions of extracellular polymeric substances from an activated sludge culture and identification of dominant forces affecting microbial aggregation. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28391, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep28391>

HAHN, A., GERDTS, G., VÖLKER, C., NIEBÜHR, V. Using FTIRS as prescreening method for detection of MP in bulk sediment samples. **Science of the Total Environment**, v. 689, p. 341-346, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.227>

HAN, Y., ZHANG X., LIU, P., XU, S., CHEN, D., LIU, J.N., XIE, W. MPs exposure causes oxidative stress and microbiota dysbiosis in planarian *Dugesia japonica*. **Environmental**

Science and Pollution Research, v. 29, n. 19, p. 28973-28983, 2022.
<https://doi.org/10.1007/S11356-022-18547-X>

HOSSEINI, H., & JAFARI, S. M. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy of nanoencapsulated food ingredients. **Characterization of Nanoencapsulated Food Ingredients**, v. 4, p. 347, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815667-4.00011-0>

JULIENNE, F., DELORME, N., LAGARDE, F. From macroplastics to MPs: role of water in the fragmentation of PE. **Chemosphere**, v. 236, p. 124409, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124409>

KNAKIEVICZ, T., VIERA, S.M., ERDTMANN, B., FERREIRA, H.B. Reproductive modes and life cycles of freshwater planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicula) from southern Brazil. **Invertebrate Biology**, v.125, p. 212–221, 2006.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2006.00054.>

KOLANDHASAMY, P., SU, L., LI, J., QU, X., JABEEN, K., SHI, H. Adherence of microplastics to soft tissue of mussels: a novel way to uptake microplastics beyond ingestion. **Science of the Total Environment**, v. 610, p. 635–640, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.053>

LEBRETON, L., SLAT, B., FERRARI, F., SAINTE-ROSE, B., AITKEN, J., MARTHOUSE, R., REISSER, J. Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 4666, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22939-w>

LU, S., LIU, L., YANG, Q., DEMISSIE, H., JIAO, R., AN, G., WANG, D. Removal characteristics and mechanism of microplastics and tetracycline composite pollutants by coagulation process. **Science of the Total Environment**, v. 786, p. 147508, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147508>

MACÊDO, L. P. R., DORNELAS, A. S. P., VIEIRA, M. M., DE JESUS FERREIRA, J. S., SARMENTO, R. A., CAVALLINI, G. S. Comparative ecotoxicological evaluation of peracetic acid and the active chlorine of calcium hypochlorite: use of *Dugesia tigrina* as a bioindicator of environmental pollution. **Chemosphere**, v. 233, p. 273-281, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.286>

MALAFAIA, G., DE SOUZA, A. M., PEREIRA, A. C., GONÇALVES, S., DA COSTA ARAÚJO, A. P., RIBEIRO, R. X., ROCHA, T. L. Developmental toxicity in zebrafish exposed to polyethylene microplastics under static and semi-static aquatic systems. **Science of the Total Environment**, v. 700, p. 134867, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134867>

MENÉNDEZ-PEDRIZA, A., JAUMOT, J., BEDIA, C. Lipidomic analysis of single and combined effects of polyethylene microplastics and polychlorinated biphenyls on human hepatoma cells. **Journal of Hazardous Materials**, v. 421, p. 126777, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126777>

MERRYMAN, M. S., ALVARADO, A. S., JENKIN, J. C. Culturing planarians in the laboratory. **Planarian Regeneration: Methods and Protocols**, v. 1174, p. 241-258, 2018. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7802-1_5

NELMS, S. E., GALLOWAY, T. S., GODLEY, B. J., JARVIS, D. S., & LINDEQUE, P. K. Investigating microplastic trophic transfer in marine top predators. **Environmental Pollution**, v. 238, p. 999-1007, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.016>

OFOEGBU, P. U., CAMPOS, D., SOARES, A. M., & PESTANA, J. L. Combined effects of NaCl and fluoxetine on the freshwater planarian, *Schmidtea mediterranea* (Platyhelminthes: Dugesiiidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 11326-11335, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04532-4>

PEARSON, B.J. Finding the potency in planarians. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 970, 2022. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03905-9>

PENG, G., BELLERBY, R., ZHANG, F., SUN, X., LI, D. The ocean's ultimate trashcan: Hadal trenches as major depositories for plastic pollution. **Water Research**, v. 168, p. 115121, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115121>

PLASTICSEUROPE. **Plastics 2030**: committed to Circularity. 2019. Disponível em: <https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/10/2019-Plastics-the-facts.pdf>. Acesso em: 18 de julho de 2023.

POIRIER, L., GHIGO, É., DAUDE, D., & CHABRIERE, E. Planarian, an emerging animal model for toxicology studies. **Medecine Sciences: M/S**, v. 35, n. 6-7, p. 544-548, 2019. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019110>

RANI-BORGES, B., MEITERN, R., TEESALU, P., RAUDNA-KRISTOFFERSEN, M., KREITSBERG, R., HEINLAAN, M., IVASK, A. Effects of environmentally relevant concentrations of microplastics on amphipods. **Chemosphere**, v. 309, p. 136599, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136599>

ROCHMAN, C. M., BROOKSON, C., BIKKER, J., DJURIC, N., EARN, A., BUCCI, K., HUNG, C. Rethinking microplastics as a diverse contaminant suite. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 703-711, 2019. <https://doi.org/10.1002/etc.4371>

SARAIVA, A. S., SARMENTO, R. A., GRAVATO, C., RODRIGUES, A. C., CAMPOS, D., SIMAO, F. C., SOARES, A. M. Strategies of cellular energy allocation to cope with paraquat-induced oxidative stress: Chironomids vs Planarians and the importance of using different species. **Science of the Total Environment**, v. 741, p. 140443, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.>

SENDRA, M., SPARAVENTI, E., BLASCO, J., MORENO-GARRIDO, I., ARAUJO, C. V. Ingestion and bioaccumulation of polystyrene nanoplastics and their effects on the microalgal feeding of *Artemia franciscana*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 188, p. 109853, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109853>

SIGHICELLI, M., PIETRELLI, L., LECCE, F., IANNILLI, V., FALCONIERI, M., COSCIA, L., ZAMPETTI, G. Microplastic pollution in the surface waters of Italian Subalpine Lakes. **Environmental Pollution**, v. 236, p. 645-651, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.008>

WONG, J. K. H., LEE, K. K., TANG, K. H. D., & YAP, P. S. Microplastics in the freshwater and terrestrial environments: Prevalence, fates, impacts and sustainable solutions. **Science of the Total Environment**, v. 719, p. 137512, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137512>

WONG, J. X., GAN, S. N., & AISHAH, M. J. Chromium (III) based Ziegler-Natta catalysts for olefin polymerization. **Sains Malaysiana**, v. 40, n. 7, p. 771-779, 2011. http://www.ukm.my/jsm/pdf_files/SM-PDF40-7-2011/16%20J.X.%20Wong.pdf

ZHANG, Y. Q., LYKAKI, M., MARKIEWICZ, M., ALRAJOUA, M. T., KRAAS, C., STOLTE, S. Environmental contamination by microplastics originating from textiles: Emission, transport, fate and toxicity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 430, p. 128453, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128453>

CAPÍTULO III

Interação entre microplástico de polietileno e 2,4-D: avaliação química e ecotoxicológica com *Girardia tigrina*

RESUMO

A presença de microplásticos (MPs) nos ecossistemas aquáticos e terrestres, e suas consequências à biota têm recebido muita atenção nos últimos anos. No entanto, os efeitos da interação destes materiais com outros poluentes ainda são pouco relatados. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de microplásticos de polietileno (MP-PE) tratado (oxidado) e adsorvido com o herbicida 2,4-D (MP tratado + 2,4-D), utilizando como organismo teste a planária (*Girardia tigrina*). O tratamento foi realizado para simular o desgaste natural do material, o qual foi realizado por oxidação química e irradiação solar. Os efeitos crônicos: locomoção, regeneração e reprodução em *G. tigrina* foram avaliados após a ingestão de MP tratado e MP tratado + 2,4-D homogeneizados no fígado. A exposição MP-PE tratado tanto individualmente quanto após a adsorção de 2,4-D impactou negativamente em todos os parâmetros testados. Tanto MP-PE tratado como MP tratado + 2,4-D demonstraram toxicidade em *G. tigrina*, porém quando comparados, o MP tratado + 2,4-D foi mais tóxico, apresentando aumento de velocidade de locomoção, atraso de regeneração e diminuição reprodutiva das planárias. Esses resultados, demonstraram que a interação entre MPs e poluentes orgânicos ocorre após o envelhecimento do MP-PE e essa combinação promove maior toxicidade a este contaminante.

Palavras-chave: Ecotoxicidade; Planárias de água doce; Poluição plástica.

1 INTRODUÇÃO

Uma parte abundante dos detritos plásticos presentes no ambiente é constituída por microplásticos (< 5mm) secundários, que são formados a partir de macrolásticos submetidos ao intemperismo e degradação no ambiente, predominantemente por irradiação ultravioleta (UV) (Cai et al., 2018; Sun et al., 2022). A alteração dos MP, influenciada pelo envelhecimento, pode contribuir para sua interação com poluentes ambientais (Liu et al., 2022; Mao et al., 2020), o que afeta ainda mais o comportamento de ingestão e o risco de MP para organismos (Cai et al., 2018; Liu et al., 2022). A maior parte dos MP apresenta difícil biodegradabilidade, limitando-se a fragmentar-se no ambiente e permanecendo por muitos anos (Chen et al., 2018).

A crescente presença de MP e pesticidas no ambiente tem motivado estudos sobre suas interações em solo e água. Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar o MP de polietileno (PE), frequentemente observado em compartimentos ambientais (Schwarz et al., 2019) e sua interação com o herbicida 2,4-D. Devido a sua alta solubilidade na água, o 2,4-D tem sido comumente detectado em águas superficiais, subterrâneas e abastecimento em todo o

planeta e pode promover um risco para os organismos, desde bactérias até humanos (Brovini et al., 2021; Syafrudin et al., 2021). Dessa forma, o sistema composto de MP-PE adsorvido com 2,4-D foi usado para o estudo ecotoxicológico, utilizando o bioindicador de água doce, *Girardia tigrina*, planária.

As planárias têm sido empregadas em estudos ecotoxicológicos devido às suas características fisiológicas e comportamentais distintas (Dornelas et al., 2021; Saraiva et al., 2018). Suas características são almejavéis para fins de teste, pois servem como predadores e presas e podem ser facilmente monitoradas em ambientes laboratoriais (López et al., 2019). A regeneração e o comportamento das planárias podem ser pontos sensíveis para aferir as implicações de concentrações subletais de poluidores ambientais e desordens crônicas em seus resultados de reprodução sexual, incluindo a importância de seu uso como modelo no aspecto ecológico (Dornelas et al., 2020; Saraiva et al., 2018).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Tratamento do MP-PE

O tratamento do MP-PE puro (Sigma-Aldrich) foi realizado pelo processo de oxidação avançada utilizando o persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), para simular o processo de envelhecimento que ocorre aos MP no ambiente. A metodologia adotada foi descrita por Nakatani et al. (2022). Foi adicionado em um tubo de digestão, 10 g de MP-PE puro, tamanho da partícula 34-50 μm em 400 mL de solução recém preparada de persulfato de potássio (100 mmol. L^{-1}) e ajustado o pH para 7,0 com hidróxido de sódio ($0,1 \text{ mol. L}^{-1}$). O tubo foi aquecido em banho seco termostático à temperatura constante de $70^\circ C$. O persulfato de potássio (100 mmol. L^{-1}) foi adicionado à suspensão a cada 12 h, devido ao consumo do oxidante no processo. Para evitar o acúmulo de persulfato de potássio na solução, o MP-PE foi separado da suspensão por meio de filtração a vácuo a cada 2 dias e lavado 3 vezes com água, sendo novamente introduzido em uma nova solução persulfato de potássio (100 mmol. L^{-1}). O MP-PE foi tratado continuamente até se completar 30 dias.

Após este processo o MP-PE foi lavado com água destilada e filtrado. O MP-PE lavado e filtrado foi adicionado em 500 mL de água de rio em uma garrafa PET e exposto à radiação solar por 8 meses com intensidades médias de radiação entre 800 a 900 W.m^{-2} , monitoradas por um radiômetro portátil com espectro de medida entre 400 a 1000 nm .

A água de rio utilizada apresentou as seguintes características físico-químicas: Demanda

Bioquímica de oxigênio (DBO) de 2 mg. L⁻¹; Turbidez = 12 NTU; pH = 7,87 e Oxigênio dissolvido (OD) = 6,79 mg. L⁻¹.

2.2 Ensaio de adsorção

A adsorção do 2,4-D em MP-PE tratados foi realizada em um frasco contendo 1,0 g da amostra e 10 mL de solução do pesticida (0,1772 g.L⁻¹). Em seguida, o frasco foi agitado a 120 rpm, a 25 °C por 24 h. Em seguida uma alíquota foi retirada para quantificação do 2,4 D. A quantificação do 2,4 D foi realizada conforme a metodologia descrita por Sazali et al., (2020), que utiliza a espectroscopia no UV-vis no comprimento de onda de 283 nm. Foi utilizado um espectrômetro da marca PG Instruments modelo T-70 e a curva de calibração foi preparada a partir de soluções com concentração de 0,0972; 0,0778; 0,0583; 0,0388; 0,0350 g L⁻¹ de 2,4 D. A determinação da concentração das amostras foi realizada a partir da curva de calibração: $y = 0,0095x + 0,000007$ com R² de 0,9933.

2.3 Caracterizações espectroscópicas

Os espectros no infravermelho das amostras foram de MP-PE puro e MP-PE tratado (oxidado) obtidos em um espectrômetro FTIR da Marca Perkin Elmer, na região de 4000-400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹, média de 32 varreduras e utilizando pastilha de KBr. Os espectros Raman foram conduzidos utilizando um espectrômetro RFS 100 (Bruker, Ettlingen, Alemanha), equipado com um laser Nd⁺³/YAG operando em 1064 nm na região do infravermelho próximo, e um detector refrigerado de germânio (Ge) com resolução espectral de 4 cm⁻¹. Cada espectro foi obtido com a média de 512 acumulações.

2.4 Ensaio ecotoxicológico com *G. tigrina*

Para avaliação ecotoxicológica utilizando planárias foram realizados os testes de locomoção, regeneração e reprodução, após a ingestão do MP-PE. As planárias foram expostas a três condições diferentes, sendo: (1) Controle (CT): Solução ASTM e 1g fígado bovino; (2) MP-PE tratado: 100 µg/mg MP-PE tratado misturado em 1g de fígado; (3) MP-PE tratado + 2,4-D: 100 µg/mg MP-PE tratado + 2,4 D misturados em 1g de fígado.

O fígado bovino sem a fásia foi cortado em pedaços de aproximadamente 1 × 1 cm e triturado em liquidificador de alta velocidade e homogeneizado com os tratamentos (Merryman et al., 2018). Os testes foram conduzidos à temperatura de 22 ± 1°C, sob condições escuras e as soluções ASTM do ensaio foram renovadas a cada três dias.

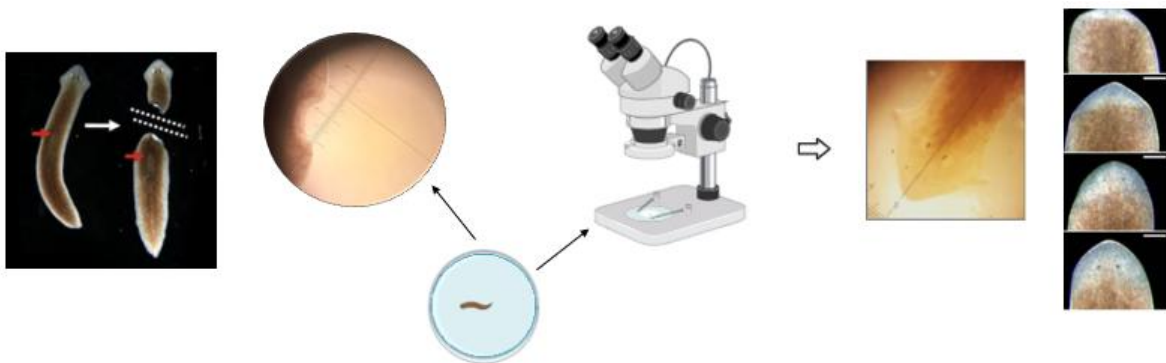
2.4.1 Atividade locomotora

Para o teste de locomoção foram utilizadas 4 planárias de $1,0 \pm 0,2$ cm de comprimento total para cada condição avaliada, sendo os testes realizados em triplicata e com 100 mL de solução ASTM. Sete dias após a ingestão do fígado nas condições 1, 2 e 3, as planárias foram colocadas individualmente (um organismo por réplica) em placas de Petri ($\varnothing = 7,5$ cm) para determinação da velocidade locomotora (*p*LMV). A avaliação da *p*LMV foi feita usando papel milimetrado (0,5 cm de espaçamento entre as linhas de grade), em recipiente circular, com diâmetro e quantidade de solução ASTM suficiente para o livre deslocamento da planária. Após alocação e adequação (1 min.), os organismos expostos foram observados em 2 minutos para avaliar o deslocamento das planárias em centímetros (adaptado de López et al., 2019; Saraiva et al., 2018; Pestana; Ofoegbu, 2021).

2.4.2 Atividade de regeneração

A regeneração de planárias foi avaliada em 8 dias após a seleção e decapitação com um único corte atrás das aurículas, usando uma lâmina de bisturi esterilizada. Após a decapitação, cada planária foi colocada em uma placa de Petri ($\varnothing = 90$ mm) com 20 mL de meio ASTM. A cada 12 h após a decapitação, os organismos foram verificados individualmente em um estereomicroscópio para verificar a formação de fotorreceptores e aurículas até que sua formação estivesse completa. Às 24 h e 48 h após a decapitação, o comprimento (em mm) do blastema também foi medido (Figura 8) (adaptado de López et al., 2019; Saraiva et al., 2018; Pestana; Ofoegbu, 2021).

Figura 8- Esquema exemplificativo da regeneração pós-exposição.

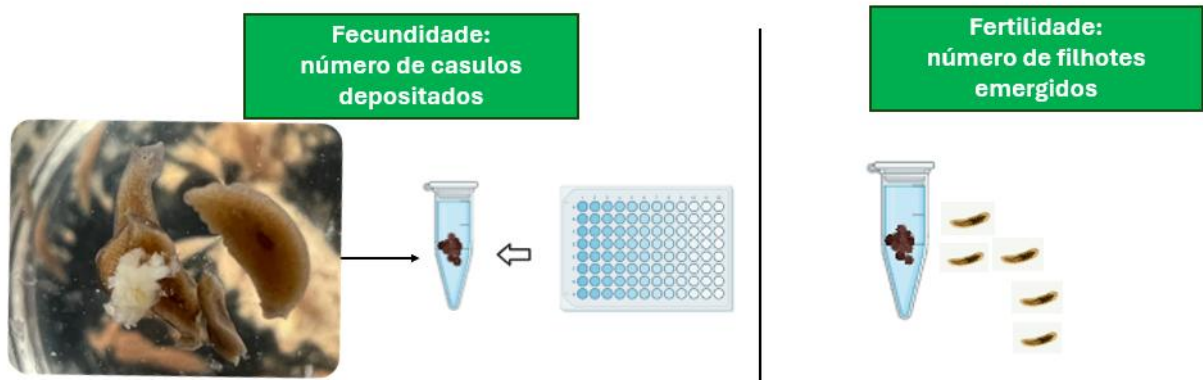


Fonte: Autoria própria, 2025.

2.4.3 Reprodução

A taxa de fertilidade foi avaliada pelo número de casulos produzidos por dia dividido pelo número de planárias expostas. A taxa de fecundidade foi determinada pelo número de descendentes (planárias nascidas dos casulos), dividido pelo número de casulos depositados (adaptado de López et al., 2019) (Figura 9).

Figura 9- Esquema exemplificativo da reprodução pós-exposição.



Fonte: Autoria própria, 2025.

2.5 Análises Estatísticas

Para avaliar os parâmetros de toxicidade crônica, foram realizadas análises de variância (ANOVA) para os resultados obtidos. Posteriormente, o teste post hoc de Dunnett foi aplicado para avaliar diferenças significativas entre as condições 2, 3 e o controle. Para verificar se os dados atendiam aos critérios para aplicação da ANOVA, os dados de locomoção e reprodução foram submetidos a testes de homogeneidade das variâncias e normalidade usando os testes de Bartlett e Kolmogorov–Smirnov, respectivamente. Os dados de regeneração em 24 e 48h e regeneração dos quimiorreceptores e fotorreceptores não atenderam aos critérios da análise ANOVA. Portanto, foi necessário usar o método estatístico não paramétrico: teste de Kruskal–Wallis (teste *post hoc* de Dunn). As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism versão 9.3.1 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

3 RESULTADOS

A Figura 10 apresenta o espectro Raman do polietileno puro e após o processo de oxidação, com a intensidade das bandas normalizadas. A Tabela 3, apresenta a atribuição

vibracional das bandas de acordo com a literatura (Hiejima et al., 2018). Comparando os dois espectros observa-se alterações espectrais que indicam alterações na conformação espacial das cadeias poliméricas. As bandas em 1462 e 1130 cm^{-1} tem a intensidade diminuída e aumentada, respectivamente, isso indica que as cadeias na fase amorfa são convertidas em cadeias na conformação trans (Jin et al., 2017).

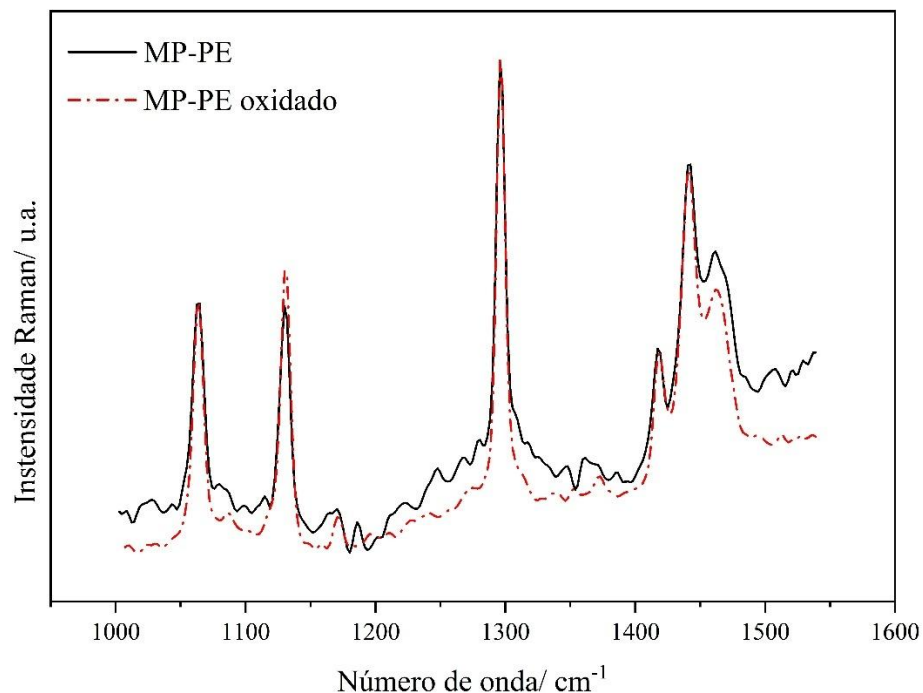
O polietileno cristalino consiste em cadeias totalmente na forma trans, sem dobras nas cadeias (Meier, 2002). A mudança da cristalinidade pode ser relacionada a textura da superfície de microplásticos. O aumento da cristalinidade o torna mais resistente, porém mais quebradiço, o que pode levar a formação de microplásticos menores (Mckeen, 2012).

Tabela 3 - Tentativa de atribuição das bandas Raman (cm^{-1}).

Bandas	Modo vibracional *	Fase
1461	δ (CH_2)	Amorfo
1442	δ (CH_2)	Amorfo trans
1417	δ (CH_2) + ω (CH_2)	Cristalino (ortorrômbico)
1296	τ (CH_2)	Cadeia trans
1130	ν (C – C)	Cadeia trans
1064	vas (C – C)	Cadeia trans

* ν , alongamento; ν_{as} , alongamento antissimétrico; ν_{s} , alongamento simétricos; τ , torção; δ , flexão, ω , oscilação.

Figura 10- Espectro Raman das amostras indicadas.

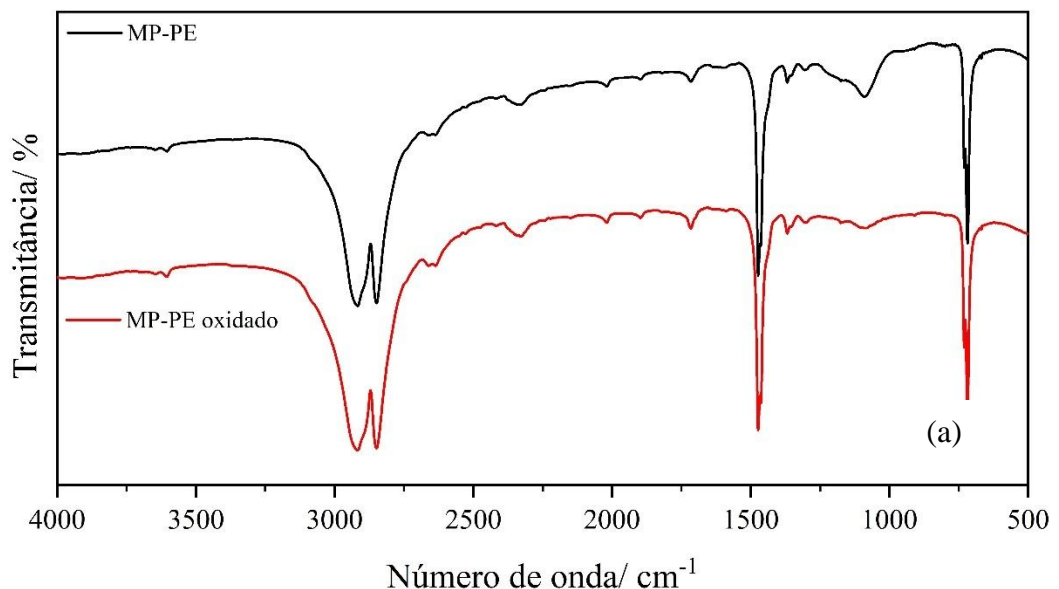


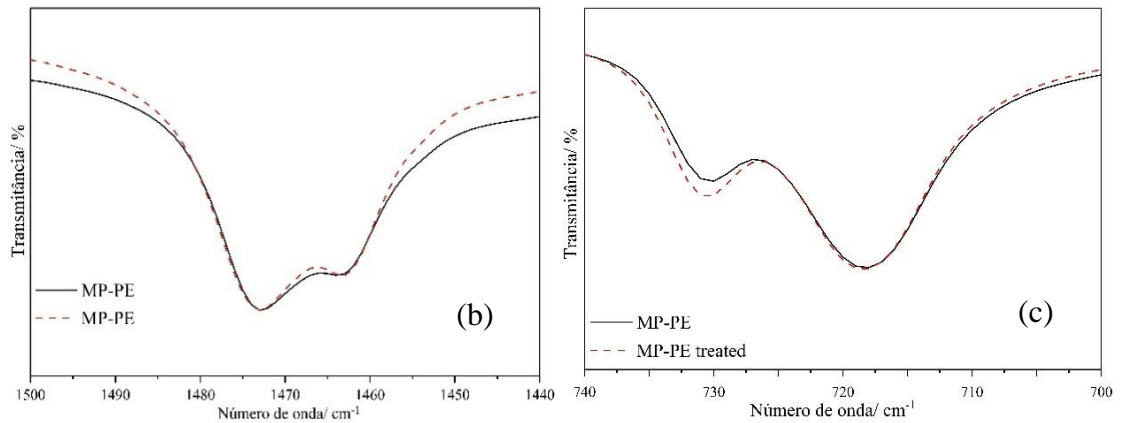
Fonte: Autoria própria, 2025.

A Figura 11a representa o espectro de absorção no infravermelho do microplástico de polietileno antes e após o processo de oxidação. A região entre 2920-2800 e as bandas em 1472/1460/730/719 cm^{-1} são atribuídas aos modos de estiramento C-H e deformação C-H (Smak et al., 2024). As bandas em 1369 cm^{-1} podem ser atribuídas a deformação assimétrica do CH_3 e indica a presença de ramificações na cadeia polimérica (Hamzah et al., 2018; Konar; Ghosh, 1988). Por fim, a banda em 1087 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento C-C (Charles, 2009).

Comparando os espectros antes e após o processo de oxidação não foi possível observar nenhum indicativo da formação de novos grupos funcionais, apenas o indicativo da alteração da conformação espacial das cadeias poliméricas. Nesse contexto, as bandas em 719/1460 e 730/1472 cm^{-1} são relacionadas, respectivamente, aos domínios amorfos e cristalinos do polímero (Hamzah et al., 2018). A Figura 11b e Figura 11c, mostram essas regiões espectrais, sendo possível verificar um aumento da intensidade da banda em 730 cm^{-1} e uma pequena diminuição de intensidade entre as bandas 1472 e 1460, o que indica um aumento da cristalinidade do polímero, assim como observado pela espectroscopia Raman.

Figura 11- Espectro de absorção no infravermelho das amostras indicadas.





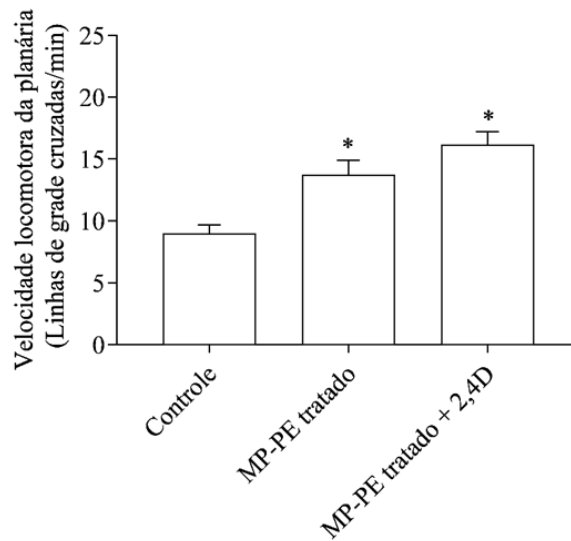
Fonte: Autoria própria, 2025.

O material denominado MP-PE tratado foi obtido após o ensaio de oxidação de MP-PE com persulfato de sódio, adição da água de rio e a exposição à radiação, o qual foi submetido ao processo de adsorção de 2,4-D. O processo de adsorção resultou em uma capacidade de adsorção de 0,3432 mg de 2,4-D por g de MP-PE tratado.

3.1 Atividade locomotora da planária após exposição a mistura de MP-PE com herbicida 2,4-D

As planárias que foram alimentadas com fígado com MP-PE tratado e MP-PE tratado + 2,4-D apresentaram aumento significativo na sua capacidade locomotora (Fig. 12). Comparado ao ensaio controle, o MP-PE tratado e MP-PE tratado + 2,4-D apresentaram aumento de 52,77% e 79,55%, respectivamente.

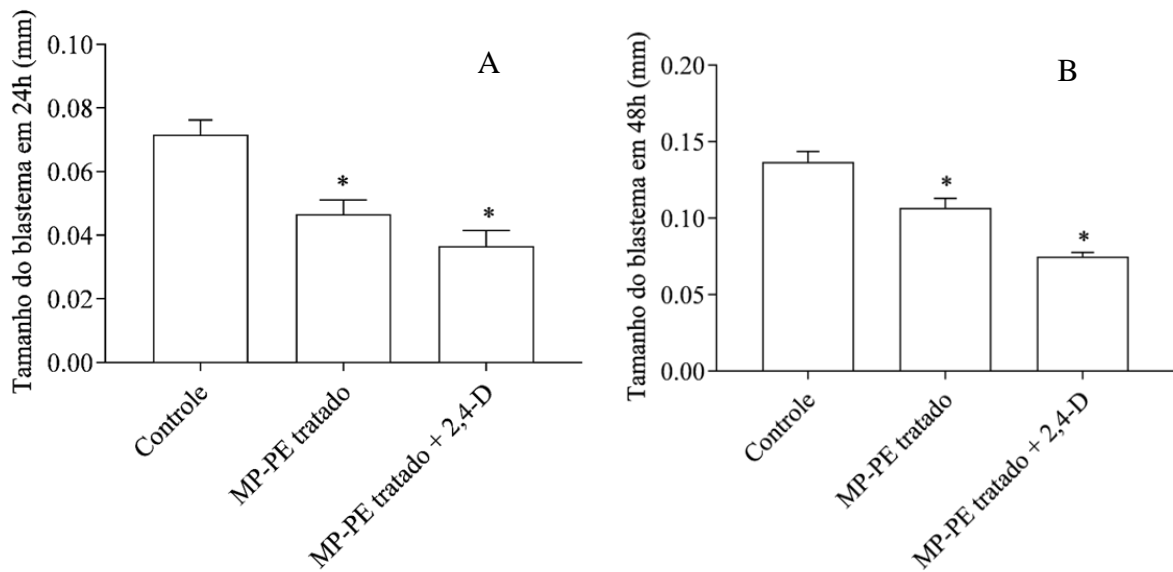
Figura 12- Atividade locomotora de *G. tigrina*, contagem do número de linhas de grade cruzadas ao longo de 3 minutos de exposição aos tratamentos ($F_{2,33} = 14,0$; $p < 0,0001$). Média \pm erro padrão, $n = 12$. Os asteriscos denotam diferenças significativas nas comparações com o tratamento de controle (somente ASTM), $*p < 0,0001$ (teste de Dunn).



3.2 Regeneração da cabeça após exposição a mistura de MP de PE com herbicida 2,4-D

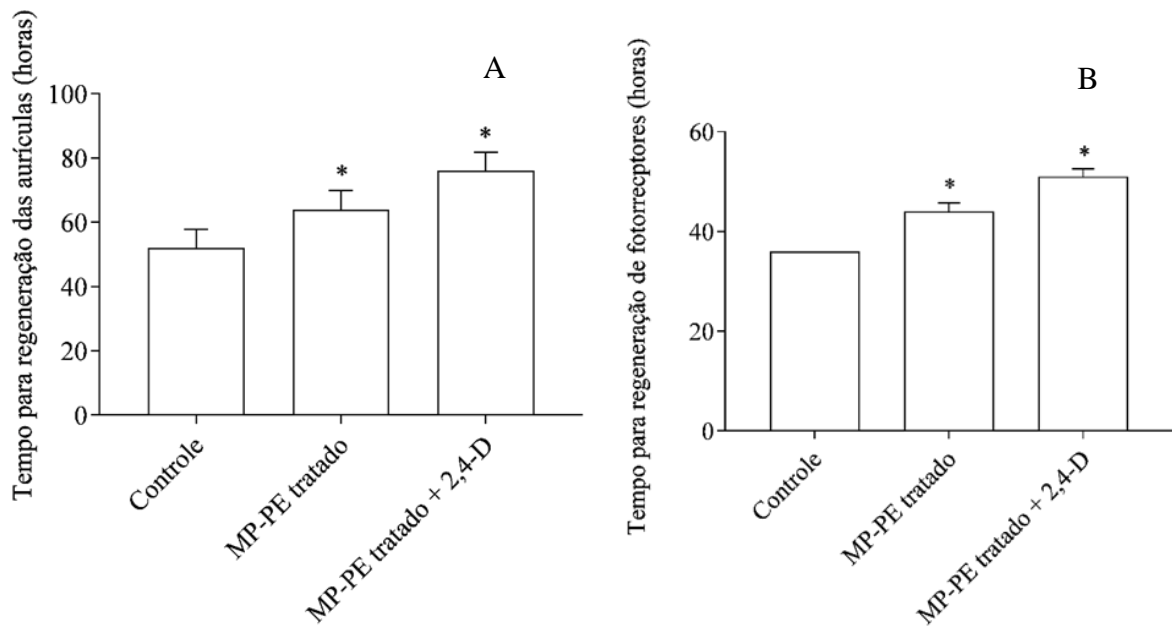
O comprimento do blastema de *G. tigrina* foi significativamente afetado pela exposição aos MP-PE tratado e MP-PE tratado + 2,4-D após 24h e 48h (Figura 13a – 13b), em 24 horas foi registrado um atraso de 42,85% e 57,14%, respectivamente, e em 48 horas de 23,07% e 30,76% em relação ao controle (Figura 13a - 13b).

Figura 13- (a) Regeneração do blastema (comprimento em mm) 24h ($F_{2,33} = 15,0$; $p < 0,0001$). (b) Regeneração do blastema (comprimento em mm) 48 h ($F_{2,33} = 30,78$; $p < 0,0001$) após a decapitação de *Girardia tigrina*. Média \pm erro padrão, $n = 12$. Os asteriscos denotam diferenças significativas nas comparações com o tratamento de controle (somente ASTM), $*p < 0,0001$ (teste *post hoc* de Dunn).



Em relação à regeneração, a ingestão de fígado com MP-PE tratado resultou em atraso na formação das aurículas e também dos fotorreceptores. Este atraso foi ainda maior com a ingestão de MP-PE tratado + 2,4-D (Fig. 14a – 14b). Em relação ao aparecimento dos fotorreceptores após à exposição MP-PE tratado e MP-PE tratado + 2,4-D, foram observados, respectivamente, um atraso de 22,22% e 41,66% (Figura 14b), e quanto ao aparecimento das aurículas, foi registrado um atraso de 23,07% e 46,15% em relação ao controle (Figura 14a).

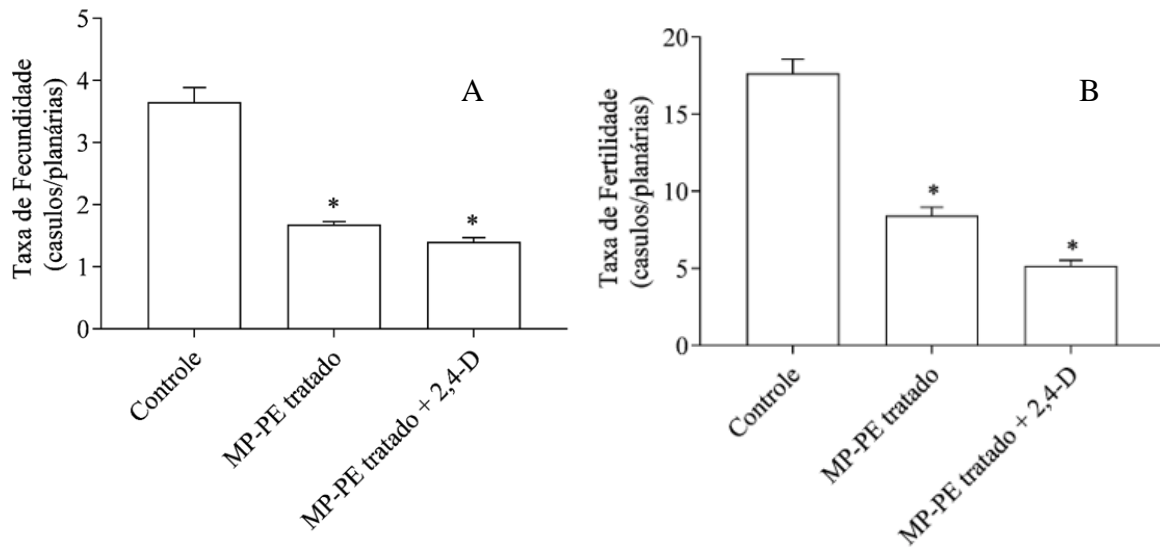
Figura 14- (a) Regeneração de aurículas ($F_{2,33} = 49,0$; $p < 0,0001$). (b) Regeneração de fotorreceptores ($F_{2,90} = 31,51$; $p < 0,0001$). Média \pm erro padrão, $n = 12$. Os asteriscos denotam diferenças significativas nas comparações com o tratamento de controle (somente ASTM), $*p < 0,0001$ (teste *post hoc* de Dunn).



3.3 Reprodução de Planárias após exposição a mistura de MP de PE com herbicida 2,4-D

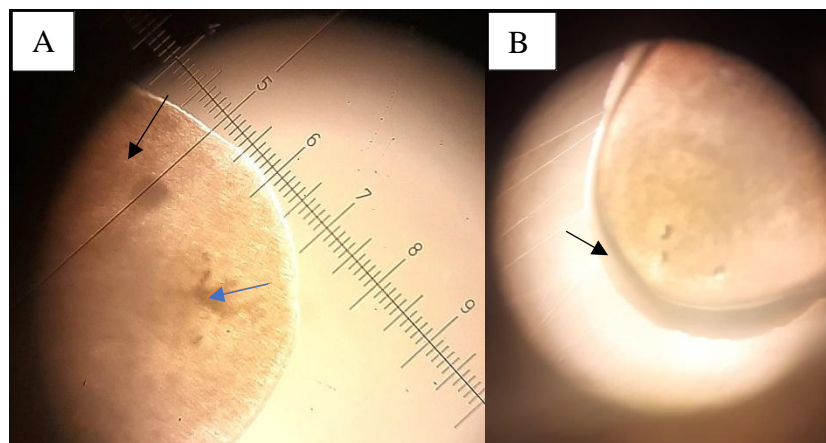
A taxa de fecundidade foi reduzida 54,2% para MP-PE tratado e 61,6% para MP-PE tratado + 2,4-D (Figura 15a), enquanto a fertilidade foi reduzida em 52,12% para MP-PE tratado e 70,7% para MP-PE tratado + 2,4-D (Figura 15b), quando comparadas ao teste controle.

Figura 15- Reprodução de *G. tigrina*. (a) Taxa de fecundidade ($F_{2,90} = 73,54$; $p < 0,0001$). (b) Taxa de fertilidade ($F_{2,90} = 103,1$; $p < 0,0001$). Média \pm erro padrão, $n = 12$. Os asteriscos denotam diferenças significativas nas comparações com o tratamento de controle (somente ASTM), $*p < 0,0001$ (teste *post hoc* de Dunnett).



Algumas malformações foram observadas no final dos 8 dias adicionais de exposição ao MP-PE tratado + 2,4-D (período de regeneração) (Fig. 16). Especificamente, fotorreceptores de tamanhos diferentes no mesmo indivíduo foram observados e deformações.

Figura 16- Planária com uma deformidade no final da regeneração no tratamento MP-PE tratado + 2,4-D após a decapitação. A seta preta indica o fotorreceptor totalmente formado e a seta azul mostra malformação do segundo fotorreceptor (a). Formação de um terceiro fotorreceptor (b).



Fonte: Autoria própria, 2025.

4 DISCUSSÃO

O MP-PE tratado em todas as configurações avaliadas apresentou menor toxicidade do que MP-PE tratado + 2,4-D. Nobre et al. (2020), observaram um efeito adverso, em que o efeito genotóxico na ostra *Crassostrea brasiliiana* após exposição ao MP-PE (150-250 μm) e triclosan foi menor em comparação à exposição apenas às partículas de MP-PE.

As planárias apresentaram uma mudança evidente no comportamento quando expostas a um estímulo prejudicial (físico ou químico) (Reho et al., 2022). Tais alterações no comportamento podem envolver aumento na produção de muco, o que pode ter contribuído para o aumento da velocidade das planárias.

No presente estudo, o maior número de linhas de grade cruzadas por planárias que se alimentaram do MP-PE tratado + 2,4-D foi decorrente de movimentos em direções aleatórias, enquanto no controle, a movimentação foi predominantemente na mesma direção. O aumento na atividade de locomoção também pode ser resultado de processos de obstrução e/ou devido a movimentos peristálticos tentando eliminar partículas, como notado no trabalho de Silva et al. (2021) que utilizou também MP-PE.

Os resultados corroboraram com estudos de Rodrigues et al. (2016), os quais relataram que a exposição ao clorantraniliprole (CAP) em outra espécie de planária de água doce, *D. subtentaculata*, causou alterações na pLMV. Freitas et al. (2019), notaram, em girinos, a diminuição da taxa de respiração e a velocidade da natação após a exposição crônica ao 2,4-D.

Os resultados mostraram um atraso na regeneração das planárias expostas, sendo o maior atraso observado em MP-PE tratado + 2,4-D, tanto para blastema como para aurícula de *G. tigrina*. A regeneração tardia da cabeça das planárias pode ter implicações negativas nas planárias tanto no nível do organismo quanto no nível populacional.

Portanto, qualquer atraso na regeneração das aurículas pode afetar sua capacidade de encontrar presas e se alimentar, enquanto um atraso na regeneração dos fotorreceptores pode interromper sua capacidade de perceber com precisão a intensidade da luz e respostas fototáticas negativas. Além disso, o 2,4-D, por meio dos seus efeitos neurotóxicos no desenvolvimento, pode ter modificado as atividades neurais durante a regeneração dos fotorreceptores, o que resultou no atraso observado (Wu; Li, 2018). De fato, as planárias detectam a presença de presas próximas utilizando suas aurículas, que têm funções quimiotáticas (Almazan; Ryan; Rouhana, 2021).

Os efeitos da exposição crônica foram visivelmente demonstrados pela avaliação da reprodução, com redução significativa nas taxas de fecundidade e fertilidade. Sousa et al. (2024)

relataram que 100 µg/mg de MP-PE puro também apresentou toxicidade, no entanto, a porcentagem de fertilidade e fecundidade após a exposição à mistura ao MP-PE tratado + 2,4-D foi menor do que a resultante da exposição ao MP-PE puro.

A reprodução reduzida indica que o MP na fonte de alimento representa um estresse fisiológico para as planárias e, portanto, as planárias induzem uma estratégia de alocação de energia, ou seja, revertendo mais energia para conservar o metabolismo/sobrevivência em vez da reprodução, dessa forma, a diminuição da reprodução é uma tática de enfrentamento do estresse (Cao et al., 2020).

Gallagher e Di Giulio (1991) afirmam que o 2,4-D pode ocasionar distintas alterações metabólicas e necrose no tecido de organismos não-alvo, compreendendo membros importantes da cadeia alimentar, por isso, estudos toxicológicos advertem que este herbicida apresenta impactos negativos no solo e na biota aquática (Gaaied et al., 2019). Também foi relacionado ao 2,4-D efeitos de citotoxicidade, estresse oxidativo e efeitos genotóxicos em minhocas (Lazurick et al., 2017) e peixe-zebra (Gaaied et al., 2019).

Em suma, este estudo destaca que exposições a MP-PE envelhecido e sua combinação com 2,4-D podem prejudicar o comportamento, a capacidade de regeneração e a reprodução de *G. tigrina*. Esses resultados são, portanto, preocupantes em relação à dinâmica populacional natural, uma vez que o desenvolvimento e a reprodução das planárias podem ser diminuídos, levando a alterações nas comunidades de água doce. As planárias ocupam uma posição intermediária nas cadeias alimentares de água doce; logo, mudanças em seu comportamento de predação e fuga podem afetar a sobrevivência do organismo, gerando desequilíbrio na cadeia alimentar (Wang et al., 2022).

5 CONCLUSÕES

A interação entre MP-PE e 2,4-D promovem alterações em relação aos efeitos ecotoxicológicos em planárias, promovida por fatores ambientais, como à radiação solar, e o seu envelhecimento.

As avaliações comportamentais provaram ser sensíveis, detectando decorrências mais tóxicas quando o MP-PE adsorveu o herbicida 2,4-D, comprovando que o MP-PE pode ser um vetor potencial de poluentes orgânicos.

Além disso, este estudo mostra que misturas dos xenobióticos selecionados (MP-PE tratado + 2,4-D) causaram inibição da reprodução e atrasos na regeneração da *G. tigrina* e danos maiores do que os observados no MP-PE tratado.

Investigações futuras podem envolver a exploração de diferentes concentrações, períodos de exposição e/ou avaliação da recuperação pós-exposição para avaliar a reversibilidade potencial dos efeitos observados, proporcionando uma compreensão mais abrangente do impacto de substâncias tóxicas na fisiologia e no comportamento das planárias.

REFERÊNCIAS

ALMAZAN, E. M. P., RYAN, J. F., & ROUHANA, L. Regeneration of planarian auricles and reestablishment of chemotactic ability. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v.9, p. 777951, 2021. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.777951>

ASTM E-729-80; Standard Practice for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. **American Standards for Testing and Materials**: Corvallis, Oregon, USA, 1980.

ATUGODA, T., WIJESEKARA, H., WERELLAGAMA, D. R. I. B., JINADASA, K. B. S. N., BOLAN, N. S., VITHANAGE, M. Adsorptive interaction of antibiotic ciprofloxacin on polyethylene microplastics: Implications for vector transport in water. **Environmental Technology & Innovation**, v. 19, p. 100971, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100971>

BENLI, A. Ç. K., SARIKAYA, R., SEPICI-DINCEL, A., SELVI, M., ŞAHİN, D., ERKOÇ, F. Investigation of acute toxicity of (2, 4-dichlorophenoxy) acetic acid (2, 4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 296-299, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.01.004>

BILAL, M.; TAJ, M.; UL HASSAN, H.; YAQUB, A.; SHAH, M.I.A.; SOHAIL, M.; RAFIQ, N.; ATIQUE, U.; ABBAS, M.; SULTANA, S. First Report on Microplastics Quantification in Poultry Chicken and Potential Human Health Risks in Pakistan. **Toxics**, v.11, p.612, 2023. <https://doi.org/10.3390/toxics11070612>

CAI, L., WANG, J., PENG, J., WU, Z., & TAN, X. Observation of the degradation of three types of plastic pellets exposed to UV irradiation in three different environments. **Science of the Total Environment**, v. 628, p. 740-747, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.079>

CAO, Z., LIU, H., ZHAO, B., PANG, Q., & ZHANG, X. Extreme Environmental Stress-Induced Biological Responses in the Planarian. **BioMed Research International**, v. 2020, n. 1, p. 7164230, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/7164230>

CETESB. **Mortandade de Peixes**: Oxigênio Dissolvido. São Paulo: CETESB, 2022. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/mortandade-peixes/alteracoes-fisicasequimicas/oxigenio-dissolvido/>. Acesso em: 23 julho 2024.

CHARLES, Julie. Qualitative analysis of high-density polyethylene using FTIR spectroscopy. **Asian Journal of Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 4477–4484, 2009. <https://asianpubs.org/index.php/ajchem/article/view/18190>

CHEN, W., OUYANG, Z. Y., QIAN, C., YU, H. Q. Induced structural changes of humic acid by exposure of polystyrene microplastics: A spectroscopic insight. **Environmental Pollution**, v. 233, p. 1-7, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.027>

CHEN, Y., LIU, X., LENG, Y., WANG, J. Defense responses in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to low-density polyethylene microplastics in soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 187, p.109788, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109788>

CHOWDHURY, S., DUBEY, V. K., CHOUDHURY, S., DAS, A., JEENGAR, D., SUJATHA, B., KUMAR, V. Insects as bioindicator: A hidden gem for environmental monitoring. **Frontiers in Environmental Science**, v. 11, p. 1146052, 2023. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2023.1146052>

DORNELAS, A. S., SARMENTO, R. A., SARAIVA, A. S., BARBOSA, R. S., VIEIRA, M. M., GRAVATO, C., SOARES, A. M. Effects of two biopesticides and salt on behavior, regeneration and sexual reproduction of the freshwater planarian *Girardia tigrina*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 404, p. 124089, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124089>

DORNELAS, A.S.P.; SARMENTO, R.A.; CAVALLINI, G.S.; DA SILVA BARBOSA, R.; VIEIRA, M.M.; DE SOUZA SARAIVA, A.; BORDALO, M.D.; SOARES, A.M.V.M.; PESTANA, J.L.T. Lethal and Sublethal Effects of the Saline Stressor Sodium Chloride on *Chironomus xanthus* and *Girardia tigrina*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 27, p. 34223-34233, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09556-9>

FAN, J., ZOU, L., DUAN, T., QIN, L., QI, Z., SUN, J. Occurrence and distribution of microplastics in surface water and sediments in China's inland water systems: a critical review. **Journal of Cleaner Production**, v. 331, p. 129968, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.129968>

FELTEN, V., TOUMI, H., MASFARAUD, J. F., BILLOIR, E., CAMARA, B. I., & FÉRARD, J. F. Microplastics enhance *Daphnia magna* sensitivity to the pyrethroid insecticide deltamethrin: Effects on life history traits. **Science of the Total Environment**, v. 714, p. 136567, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136567>

FREITAS, J. S., GIROTTO, L., GOULART, B. V., ALHO, L. DE O. G., GEBARA, R. C., MONTAGNER, C. C., ESPÍNDOLA, E. L. G. Effects of 2,4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, p. 109446, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109446>

GALLAGHER, E.; DI GIULIO, R. Effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and picloram on biotransformation, peroxisomal and serum enzyme activities in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Toxicology Letters**, v. 57, n. 1, p. 65-72, 1991. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(91\)90120-U](https://doi.org/10.1016/0378-4274(91)90120-U)

HAMZAH, M., KHENFOUCH, M., RJEB, A., SAYOURI, S., HOUSSAINI, D. S., DARHOURI, M., SRINIVASU, V. V. Surface chemistry changes and microstructure evaluation of low-density nanocluster polyethylene under natural weathering: A spectroscopic investigation. In: **Journal of physics: Conference series**. IOP Publishing, v. 984, p. 012010, 2018. Doi:10.1088/1742-6596/984/1/012010

HIEJIMA, Y., KIDA, T., TAKEDA, K., IGARASHI, T., & NITTA, K. H. Microscopic structural changes during photodegradation of low-density polyethylene detected by Raman spectroscopy. **Polymer Degradation and Stability**, v. 150, p. 67-72, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.02.010>

HUANG, W., SONG, B., LIANG, J., NIU, Q., ZENG, G., SHEN, M., ZHANG, Y. Microplastics and associated contaminants in the aquatic environment: A review on their ecotoxicological effects, trophic transfer, and potential impacts to human health. **Journal of Hazardous Materials**, v. 405, p. 124187, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124187>

KNOPP, D.; SCHILLER, F. Oral and dermal application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid sodium and dimethylamine salts to male rats: Investigations on absorption and excretion as well as induction of hepatic mixed-function oxidase activities. **Archives of Toxicology**, v. 66, n.3, p. 170-174, 1992. <https://doi.org/10.1007/BF01974010>

KONAR, J.; GHOSH, R. Oxidative degradation of polyethylene in the presence of phase transfer catalyst: Part I—Infrared studies. **Polymer Degradation and Stability**, v. 21, n. 3, p. 263-275, 1988. [https://doi.org/10.1016/0141-3910\(88\)90032-8](https://doi.org/10.1016/0141-3910(88)90032-8)

JIN, Y., KOTULA, A. P., SNYDER, C. R., HIGHT WALKER, A. R., MIGLER, K. B., & LEE, Y. J. Raman identification of multiple melting peaks of polyethylene. **Macromolecules**, v. 50, n. 16, p. 6174-6183, 2017. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.macromol.7b01055>

LIU, L., XU, M., YE, Y., ZHANG, B. On the degradation of (micro) plastics: Degradation methods, influencing factors, environmental impacts. **Science of the Total Environment**, v. 806, p. 151312, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151312>

LÓPEZ, A. M. C., SARMENTO, R. A., DE SOUZA SARAIVA, A., PEREIRA, R. R., SOARES, A. M., & PESTANA, J. L. Exposure to Roundup® affects behaviour, head regeneration and reproduction of the freshwater planarian *Girardia tigrina*. **Science of The Total Environment**, v. 675, p. 453-461, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.234>

MAO, R., LANG, M., YU, X., WU, R., YANG, X., GUO, X. Aging mechanism of microplastics with UV irradiation and its effects on the adsorption of heavy metals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 393, p. 122515, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122515>

MARIA, M. A., LANGE, L. C., CASTRO, S. R., MIRANDA, R. L., & MAMÃO, M. A. Efeito do Herbicida Roundup Original® a base de glifosato em organismos não alvo utilizando modelo mesocosmo. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v.13, n.1, 279-300, 2020. Doi:10.17765/2176-9168.2020v13n1p279-300

MCKEEN, Laurence. Introduction to the physical, mechanical, and thermal properties of plastics and elastomers. **The Effect of Sterilization Methods on Plastics and Elastomers; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands**, p. 57-84, 2012.

MEIER, R. J. Studying the length of trans conformational sequences in polyethylene using Raman spectroscopy: a computational study. **Polymer**, v. 43, n. 2, p. 517-522, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(01\)00416-5](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(01)00416-5)

MERRYMAN, MS, ALVARADO, AS E JENKIN, JC. Culturing planarians in the laboratory. **Planarian regeneration: Methods and Protocols**, p. 241-258, 2018. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7802-1_5

MESNAGE, R., BRANDSMA, I., MOELIJKER, N., ZHANG, G., & ANTONIOU, M. N. Genotoxicity evaluation of 2, 4-D, dicamba and glyphosate alone or in combination with cell reporter assays for DNA damage, oxidative stress and unfolded protein response. **Food and Chemical Toxicology**, v. 157, p. 112601, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112601>

MUÑIZ-GONZÁLEZ, A. B., SILVA, C. J., SILVA, A. L. P., CAMPOS, D., PESTANA, J. L., & MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L. Sub organismal responses of the aquatic midge *Chironomus riparius* to polyethylene microplastics. **Science of the Total Environment**, v. 783, p. 146981, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146981>

NJOKU, V. O., ISLAM, M. A., ASIF, M., & HAMEED, B. H. Adsorption of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid by mesoporous activated carbon prepared from H₃PO₄-activated langsat empty fruit bunch. **Journal of Environmental Management**, v. 154, p. 138-144, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.02.002>

NOBRE, C. R., MORENO, B. B., ALVES, A. V., DE LIMA ROSA, J., DA ROSA FRANCO, H., ABESSA, D. M. D. S., PEREIRA, C. D. S. Effects of microplastics associated with triclosan on the oyster *Crassostrea brasiliana*: an integrated biomarker approach. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 79, p. 101-110, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00729-8>

PESTANA, J. L. T., & OFOEGBU, P. U. Ecotoxicity assays using freshwater planarians. **Toxicity Assessment: Methods and Protocols**, v. 2240, p. 125-137, 2021. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1091-6_11

PUBCHEM. National Library of Medicine National. Center for Biotechnology Information. **2,4-Dichlorophenoxyacetic acid**. 2022. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1486#section=LogP>. Acesso em: 04 jan. 2024.

REHO, G.; LELIÈVRE, V.; CADIOU, H. Planarian nociception: Lessons from a scrunching flatworm. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v.15, p. 935918, 2022. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.935918>

ROCHMAN, C. M., BROOKSON, C., BIKKER, J., DJURIC, N., EARN, A., BUCCI, K., HUNG, C. Rethinking microplastics as a diverse contaminant suite. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 703-711, 2019. <https://doi.org/10.1002/etc.4371>

RODRIGUES, A. C., HENRIQUES, J. F., DOMINGUES, I., GOLOVKO, O., ŽLÁBEK, V., BARATA, C., PESTANA, J. L. Behavioral responses of freshwater planarians after short-term exposure to the insecticide chlorantraniliprole. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 371-376, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.018>

SARAIVA, A.S.; SARMENTO, R.A.; GOLOVKO, O.; RANDAK, T.; PESTANA, J.L.T.; SOARES, A.M.V.M. Lethal and Sub-Lethal Effects of Cyproconazole on Freshwater Organisms: A Case Study with *Chironomus riparius* and *Dugesia tigrina*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 12169-12176, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1180-y>

SAZALI, N.; HARUN, Z.; SAZALI, N. A Review on Batch and Column Adsorption of Various Adsorbent Towards the Removal of Heavy Metal. **Journal of Advanced Research in Fluid Mechanics and Thermal Sciences**, v. 67, p. 66-88. 2020. ISSN 2289-7879. Disponível em: <http://eprints.uthm.edu.my/6542/>. Acesso em: 20 out. 2023.

SCHWARZ, A. E., LIGTHART, T. N., BOUKRIS, E., VAN HARMELEN, T. Sources, transport, and accumulation of different types of plastic litter in aquatic environments: a review study. **Marine Pollution Bulletin**, v. 143, p. 92-100, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.04.029>

SMAK, T. J., DE PEINDER, P., VAN DER WAAL, J. C., ALTINK, R., VOLLMER, I., & WECKHUYSSEN, B. M. Oxidative Conversion of Polyethylene Towards Di-Carboxylic Acids: A Multi-Analytical Approach. **ChemSusChem**, v. 17, n. 7, p. e202301198, 2024.

<https://doi.org/10.1002/cssc.202301198>

SILVA, C. J., SILVA, A. L. P., GRAVATO, C., PESTANA, J. L. Ingestion of small-sized and irregularly shaped polyethylene microplastics affect *Chironomus riparius* life-history traits. **Science of the Total Environment**, v. 672, p. 862-868, 2019.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.017>

SILVA, C. J., SILVA, A. L. P., CAMPOS, D., MACHADO, A. L., PESTANA, J. L., GRAVATO, C. Oxidative damage and decreased aerobic energy production due to ingestion of polyethylene microplastics by *Chironomus riparius* (Diptera) larvae. **Journal of Hazardous Materials**, v. 402, p.123775, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123775>

SOUZA, G. C. **Efeitos de herbicidas na sobrevivência e comportamento de *scaptotrigona aff. Xanthotricha* (apidae, meliponini)**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Oeste do Pará.

SUN, J., ZHENG, H., XIANG, H., FAN, J., JIANG, H. The surface degradation and release of microplastics from plastic films studied by UV radiation and mechanical abrasion. **Science of the Total Environment**, v. 838, p. 156369, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156369>

WAGNER, M; LAMBERT, S. **Freshwater microplastics: emerging environmental contaminants?** Springer Nature, 2018. Doi: 10.1007/978-3-319-61615-5

WANG, Q., SUN, X., XIAO, J., KONG, Z., PANG, L., DONG, Z., LIU, D. Djptpn11 is indispensable for planarian regeneration by affecting early wound response genes expression and the Wnt pathway. **Biochimie**, v. 201, p. 184-195, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.07.007>

WU, J. P., & LI, M. H. The use of freshwater planarians in environmental toxicology studies: advantages and potential. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, p. 45-56, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.057>

WU, X.; ZHONG, C.; WANG, T.; ZOU, X.; ZANG, Z.; LI, Q.; CHEN, H. Occurrence and distribution of microplastics on recreational beaches of Haichow Bay, China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 5, p. 6132- 6145, 2021.

<https://doi.org/10.1007/s11356-020-10987-7>

ZHANG, S., WANG, J., LIU, X., QU, F., WANG, X., WANG, X., SUN. Microplastics in the environment: A review of analytical methods, distribution, and biological effects. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 111, p. 62-72, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.002>

ZUANAZZI, N. R.; DE CASTILHOS GHISI, N.; OLIVEIRA, E. C. Analysis of global trends and gaps for studies about 2, 4-D herbicide toxicity: a scientometric review. **Chemosphere**, v. 241, p. 125016, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125016>