

UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL

RAPHAEL VITORINO GLORIA GIANNETTO

Avaliação da toxicidade de microplástico associado ao benzo(a)pireno sobre ostras-do-mangue, *Crassostrea gasar*

SANTOS

2024

RAPHAEL VITORINO GLORIA GIANNETTO

Avaliação da toxicidade de microplástico associado ao benzo(a)pireno sobre ostras-do-mangue, *Crassostrea gasar*

Dissertação apresentada a Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, sob orientação da Profa. Dra. Paloma Kachel Gusso-Choueri e coorientação do Prof. Dr. Caio Rodrigues Nobre

**SANTOS
2024**

571.95
G371a

Giannetto, Raphael Vitorino Gloria.
Avaliação da toxicidade de microplástico associado ao benzo(a)pireno sobre ostras-do-mangue, Crassostrea gasar / Raphael Vitorino Gloria Giannetto.
2024.
61 f.

Orientador: Dra. Paloma Kachel Gusso-Choueri.
Coorientador: Dr. Caio Rodrigues Nobre.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Santa Cecília, Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Santos, SP, 2024.

1. Microplástico. 2. Benzo(a)pireno. 3. Biomarcadores. 4. Ecotoxicologia. 5. Crassostrea gasar. I. Kachel Gusso-Choueri, Paloma . II. Avaliação da toxicidade de microplástico associado ao benzo(a)pireno sobre ostras-do-mangue, Crassostrea gasar.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que fazem e já fizeram parte da minha vida. Eu sou quem sou por carregar um pouco de cada um de vocês. Chegar até este momento não foi fácil, muito obrigado por serem meu apoio, meu impulso e minha vontade de continuar. Assim como é impossível viver uma vida solitária, esse trabalho só existe pela contribuição direta e indireta de todos vocês.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Paloma Kachel Gusso-Choueri pela orientação e suporte durante o desenvolvimento do trabalho, pela confiança, pela paciência e por entender a dificuldade de fazer ciência e trabalhar fora da universidade.

Ao Prof. Dr. Caio Nobre, por me auxiliar sempre que preciso nas análises dos biomarcadores e em dúvidas técnicas.

À Jennifer, por me acompanhar nessa trajetória do mestrado, estar disposta a me ouvir e me ajudar sempre que eu precisei,

À Dani, João e Thais por deixarem o ambiente mais descontraído e me auxiliarem sempre que preciso. Muito obrigado por me aguentarem reclamar.

Aos meus amigos Luiz, Joana e Enrique, por me incentivarem e me apoiarem desde o primeiro momento e em qualquer coisa que eu decido entrar.

À minha mãe, irmã e avô, que mesmo não entendendo absolutamente nada, estiveram presentes em todos os momentos em que precisei.

Ao meu namorado, Guilherme, pelas idas ao laboratório de noite e final de semana para me ajudar a organizar os experimentos, por me acompanhar e por sempre estar ao meu lado.

À Jaque e a Juliana, minhas companheiras de equipe e amigas, sempre dispostas a me ajudar e me ouvir reclamar.

À Aline, Chicão, Marina e Beatriz, o experimento não teria acontecido sem a ajuda de vocês.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Brasil Choueri pela excelente ajuda com as análises estatísticas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo suporte financeiro (Código de Financiamento 001) e acadêmico concedido através da bolsa de estudos. Sem o apoio da CAPES, este projeto não teria sido possível. Sou profundamente grato pela oportunidade e confiança depositadas em meu trabalho.

E por fim, a todos meus amigos que me ajudaram a enfrentar este último ano, tão desafiador, e que me ajudaram a levantar todas as vezes que eu caí. Não há como listar todos aqui, mas esse trabalho só existe por causa de vocês, minha rede de apoio.

RESUMO

Os oceanos ocupam a maior parte do nosso planeta e abrigam uma imensidão de espécies, além de estarem ligados intrinsecamente aos interesses sociais e econômicos da sociedade humana. Detritos plásticos são considerados como “poluentes onipresentes” e representam uma ameaça potencial aos oceanos e à biodiversidade marinha. Os microplásticos (MPs) são micropartículas plásticas que possuem tamanhos menores que 5 mm. Os organismos marinhos podem ser expostos a essas partículas através da ingestão direta ou indireta. Os MPs possuem a capacidade de adsorver produtos químicos hidrofóbicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), compostos que possuem baixa polaridade e são hidrofóbicos, têm propriedades carcinogênicas e capacidade de bioacumulação. O Benzo(a)Pireno (BaP) é um PAH classificado como um poluente prioritário pela agência ambiental norte-americana (USEPA). Está presente nos ambientes marinhos, incluindo a costa brasileira, e tem sido utilizado como modelo para estudos de ecotoxicidade. Pouco se sabe sobre os efeitos combinados da contaminação de microplásticos e as substâncias adsorvidas, entretanto, sabe-se que os microplásticos podem potencialmente facilitar a transferência de poluentes para a biota e, ao mesmo tempo, podem reduzir a biodisponibilidade desses contaminantes. O objetivo desse projeto foi avaliar a toxicidade dos microplásticos e do BaP, isolados e em conjunto, na ostra-do-mangue (*Crassostrea gasar*), avaliando a toxicidade e quantificando biomarcadores bioquímicos. Para tanto, os organismos foram expostos a quatro concentrações de BaP na água, na presença e na ausência de três concentrações de MP. Os resultados foram analisados estatisticamente por meio da Análise Permutacional de Variância (PERMANOVA” *main test*”), univariada e bifatorial, considerando dois fatores fixos: tratamento (BaP isolado e BaP associado a MP) e concentração. A determinação da associação entre as múltiplas variáveis analisadas foi analisada através da Extração Fatorial por Análise de Componentes Principais. E os biomarcadores foram integrados usando o índice de resposta integrada aprimorada de biomarcador. Os resultados obtidos neste estudo, demonstram que a exposição ao MP e BaP isoladamente e em conjunto apresentaram uma resposta interativa entre estes contaminantes. Com relação às respostas dos biomarcadores, GPx, GST e GSH apresentaram tendências muito similares, observando uma inibição da atividade enzimática com o aumento das concentrações de MPs. O efeito do estresse oxidativo foi avaliado através da LPO, com aumento nas concentrações intermediárias de BaP. Observou-se maior efeito genotóxicológico na presença do BaP isoladamente. No entanto, esse dano não tende a aumentar conforme se eleva a concentração desse contaminante. À medida que MPs são adicionados aos tratamentos, percebe-se uma leve tendência de redução dos danos ao DNA. Efeitos citotóxicos também foram observados neste estudo, tanto com BaP isolado quanto com BaP em conjunto com MPs. Na concentração ambientalmente relevante de MP, a presença de BaP, pode potencializar os efeitos tóxicos, dependendo da concentração e do biomarcador avaliado.

Palavras chaves: Microplástico, Benzo(a)pireno, Biomarcadores, Ecotoxicologia, *Crassostrea gasar*.

ABSTRACT

The oceans occupy most of the Earth's surface and host a vast array of species, while being intrinsically linked to human social and economic interests. Plastic debris is considered an "ubiquitous pollutant" and represents a significant threat to the oceans and marine biodiversity. Microplastics (MPs) are plastic microparticles smaller than 5 mm. Marine organisms can be exposed to these particles through direct or indirect ingestion. MPs have the capacity to adsorb hydrophobic chemicals, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), a set of compounds that are low in polarity and highly hydrophobic, have carcinogenic properties, and bioaccumulation potential. Benzo(a)pyrene (BaP) is a PAH classified as a priority pollutant by the USEPA. It is frequently found in marine environments at high concentrations, including the Brazilian coast, and has been used as a model for ecotoxicity studies. Little is known about the combined effects of microplastic contamination and adsorbed substances; however, it is known that microplastics can potentially facilitate the transfer of pollutants to biota while also reducing the bioavailability of these contaminants. Given this context, the objective of this project was to assess the toxicity of microplastics and BaP, both individually and together, in the mangrove oyster (*Crassostrea gasar*), by evaluating toxicity and quantifying biomarkers. To this end, organisms were exposed to four concentrations of BaP in water, in the presence and absence of three concentrations of MP. Results were statistically analyzed using Permutational Analysis of Variance (PERMANOVA "main test"), univariate and bifactorial, considering two fixed factors: treatment (BaP alone and BaP associated with MP) and concentration. Association between the multiple variables analyzed was determined through Factor Analysis by Principal Component Analysis. Biomarkers were integrated using the integrated biomarker response index. The results obtained so far demonstrate that exposure to MP and BaP, both individually and together, presented an interactive response between these contaminants. Regarding the biomarker responses, GPx, GST, and GSH showed very similar trends, with enzymatic activity inhibition observed with increasing MP concentrations. Oxidative stress was assessed through LPO, with an increase in intermediate concentrations of BaP. Greater genotoxic effects were noticed in the presence of BaP alone; however, this damage does not tend to increase along with higher concentrations of this contaminant. As MPs are added to the treatments, there is a slight trend towards a reduction in DNA damage. Cytotoxic effects were also observed, both with BaP alone and with BaP combined with MPs. At the environmentally relevant concentration of MP, the presence of BaP can potentiate toxic effects, depending on the concentration and biomarker evaluated.

Keywords: Microplastic, Benzo(a)Pyrene, Biomarkers, Ecotoxicology, *Crassostrea gasar*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma dos materiais e métodos.....	6
Figura 2. Quantidade de microplástico para cada concentração. A – 5 mg/L de microplástico. B – 50 mg/L de microplástico. C - 500 mg/L de microplástico.....	9
Figura 3. Diferentes concentrações de microplástico no ensaio de exposição. A – 5 mg/L de microplástico. B – 50 mg/L de microplástico. C - 500 mg/L de microplástico.....	11
Figura 4. Espectro FT-IR (ATR) do LLDPE.....	15
Figura 5. Média e desvio padrão dos níveis de glutaciona peroxidase (GPx) após 7 dias de exposição.....	17
Figura 6. Média e desvio padrão dos níveis de glutaciona s transferase (GST) após 7 dias de exposição.....	20
Figura 7. Média e desvio padrão dos níveis de glutaciona reduzida (GSH) após 7 dias de exposição.....	23
Figura 8. Média e desvio padrão dos níveis de peroxidação lipídica (LPO) após 7 dias de exposição.....	26
Figura 9. Média e desvio padrão dos níveis de dano ao DNA após 7 dias de exposição.....	30
Figura 10. Média e desvio padrão do Índice de resposta integrada aprimorada de biomarcador (Mattos et al., 2023).....	38
Figura 11. Índice de respostas de biomarcadores (IBRv2) em brânquias. Cada gráfico de radar mostra os comportamentos dos biomarcadores nos tratamentos com diferentes concentrações de BaP em 7 dias de exposição.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de BaP ($\mu\text{g L}^{-1}$) medidas na água do mar do meio experimental. 16	
Tabela 2. Resultados da PERMANOVA baseados no efeito da exposição conjunta de BaP e MP glutaciona peroxidase (GPx) das brânquias de <i>Crassostrea gasar</i> . df = graus de liberdade; MS = quadrados médios; P(perm) = valor-p permutacional; P(MC) = valor-p Monte Carlo. Valores-p significativos estão marcados em negrito. BaP: 3, 12, 21 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$; MP: 5, 50, 500 mg L^{-1} 17	17
Tabela 3. Resultados da PERMANOVA pareada (pos-hoc) comparando os níveis de um fator dentro de cada nível do outro fator para os dados de glutaciona peroxidase. p(MC) = p de Monte Carlo. Valores p(MC) significativos estão marcados em negrito. 17	17
Tabela 4. Resultados da PERMANOVA baseados no efeito da exposição conjunta de BaP e MP na glutaciona-s-transferase (GST) das brânquias de <i>Crassostrea gasar</i> . df = graus de liberdade; MS = quadrados médios; P(perm) = valor-p permutacional; P(MC) = valor-p Monte Carlo. Valores-p significativos estão marcados em negrito. BaP: 3, 12, 21 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$; MP: 5, 50, 500 mg L^{-1} 20	20
Tabela 5. Resultados da PERMANOVA pareada (pos-hoc) comparando os níveis de um fator dentro de cada nível do outro fator para os dados de glutaciona S-transferase. p(MC) = p de Monte Carlo. Valores p(MC) significativos estão marcados em negrito. 20	20
Tabela 6. Resultados da PERMANOVA baseados no efeito da exposição conjunta de BaP e MP na glutaciona reduzida (GSH) das brânquiasbrânquias de <i>Crassostrea gasar</i> . df = graus de liberdade; MS = quadrados médios; P(perm) = valor-p permutacional; P(MC) = valor-p Monte Carlo. Valores-p significativos estão marcados em negrito. BaP: 3, 12, 21 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$; MP: 5, 50, 500 mg L^{-1} 23	23
Tabela 7. Resultados da PERMANOVA pareada (pos-hoc) comparando os níveis de um fator dentro de cada nível do outro fator para os dados de glutaciona reduzida. p(MC) = p de Monte Carlo. Valores p(MC) significativos estão marcados em negrito. 24	24
Tabela 8. Resultados da PERMANOVA baseados no efeito da exposição conjunta de BaP e MP na peroxidação lipídica (LPO) das brânquiasbrânquias de <i>Crassostrea gasar</i> . df = graus de liberdade; MS = quadrados médios; P(perm) = valor-p permutacional; P(MC) = valor-p Monte Carlo. Valores-p significativos estão marcados em negrito. BaP: 3, 12, 21 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$; MP: 5, 50, 500 mg L^{-1} 27	27
Tabela 9. Resultados da PERMANOVA pareada (pos-hoc) comparando os níveis de um fator dentro de cada nível do outro fator para os dados de peroxidação líidica. p(MC) = p de Monte Carlo. Valores p(MC) significativos estão marcados em negrito. 27	27
Tabela 10. Resultados da PERMANOVA baseados no efeito da exposição conjunta de BaP e MP nos níveis de dano ao DNA nas brânquias de <i>Crassostrea gasar</i> . df = graus de liberdade; MS = quadrados médios; P(perm) = valor-p permutacional; P(MC) = valor-p Monte Carlo. Valores-p significativos estão marcados em negrito. BaP: 3, 12, 21 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$; MP: 5, 50, 500 mg L^{-1} 30	30
Tabela 11. Resultados da PERMANOVA pareada (pos-hoc) comparando os níveis de um fator dentro de cada nível do outro fator para os dados de Dano ao DNA. p(MC) = p de Monte Carlo. Valores p(MC) significativos estão marcados em negrito. 30	30
Tabela 12. Resultados da PERMANOVA baseados no efeito da exposição conjunta de BaP e MP no TRVN dos hemócitos de <i>Crassostrea gasar</i> . df = graus de liberdade; MS = quadrados médios; P(perm) = valor-p permutacional; P(MC) = valor-p Monte Carlo. Valores-p significativos estão marcados em negrito. BaP: 3, 12, 21 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$; MP: 5, 50, 500 mg L^{-1} 33	33
Tabela 13. Resultados da PERMANOVA pareada (pos-hoc) comparando os níveis de um fator dentro de cada nível do outro fator para os dados de Tempo de Retenção do Vermelho	

Neutro. $p(\text{MC}) = p$ de Monte Carlo. Valores $p(\text{MC})$ significativos estão marcados em negrito.
..... 33

Tabela 14. Loadings (coeficientes de correlação) após rotação varimax para os dois fatores obtidos na PCA (a variância dos fatores principais é dada em porcentagem da variância total na matriz de dados original). Apenas as variáveis com loadings $>0,7$ (em negrito) foram considerados componentes dos fatores 36

Tabela 15. Factor scores estimados para cada um dos tratamentos para o centroide de todos os casos dos dados originais..... 37

Tabela 16. Índice de resposta integrada aprimorada de biomarcador (IBRV1), conforme proposto por Mattos et al. (2023)..... 38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BaP	Benzo(a)Pireno
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FT-IR	Transformada de Fourier no Infravermelho
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GST	Glutaciona S-transferase
PAH	Hidrocarboneto policíclico aromático
LOD	Limite de Detecção
LPO	Peroxidação Lipídica
MC	Monte Carlo
MP	Microplástico
TRVN	Tempo de Retenção de Vermelho Neutro
UNEP	<i>United Nations Environment Programme</i>
NAS	Academia de Ciência dos Estados Unidos da América

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
2.1. Contaminantes	7
2.2. Organismo Modelo	7
2.3. Desenho Fatorial	7
2.4. Preparo da Solução.....	8
2.4.1. Água de Diluição	8
2.4.2. Solução-estoque	8
2.5. Análises químicas.....	9
2.5.1. Caracterização do Microplástico	9
2.5.2. Quantificação do BaP na água	10
2.6. Desenho Experimental	10
2.7. Biomarcadores Bioquímicos	11
2.7.1. Glutaciona Peroxidase (GPx)	12
2.7.2. Glutaciona S-Transferase (GST)	12
2.7.3. Glutaciona Reduzida (GSH)	12
2.7.4. Peroxidação Lipídica (LPO)	13
2.7.5. Danos em DNA	13
2.7.6. Estabilidade da membrana lisossômica (TRVN).....	13
2.8. Tratamento estatístico	13
3. RESULTADOS	14
3.1. Caracterização do Microplástico.....	14
3.2. Quantificação do BaP.....	15
3.3. Biomarcadores Bioquímicos	16
3.3.1. GPx.....	16
3.3.2. GST.....	19
3.3.3. GSH.....	23
3.3.4. LPO.....	26
3.3.5. Dano ao DNA.....	29
3.3.6. Vermelho Neutro	32
3.3.7. Análise Integrada	36
3.3.7.1. Análise Fatorial com extração por Análise de Componentes Principais..	36
3.3.7.2. IBR	37

4. DISCUSSÃO	41
5. CONCLUSÃO.....	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

O ambiente marinho tornou-se um destino significativo para uma variedade de poluentes, incluindo resíduos plásticos (GUZZETI et al., 2018). Dentre os poluentes existentes, os plásticos são amplamente reconhecidos como "poluentes onipresentes" e constituem uma ameaça substancial aos ecossistemas marinhos, representando um problema crítico para a conservação da biodiversidade (UNEP, 2012) devido à sua persistência ambiental, que pode se estender por séculos. Entre os resíduos plásticos, 90% deste grupo é representado nos ambientes pelos microplásticos (MPs) (ERIKSEN et al., 2014). Estudos têm mostrado a presença de microplásticos em águas marinhas em concentrações na ordem de mg L^{-1} (GILFILLAN et al., 2009; SUSSARELLU et al., 2016).

Os microplásticos são partículas plásticas que possuem tamanhos menores que 5 mm e podem ser classificados de acordo com a sua forma de geração, podendo ser de dois tipos: microplástico primários são aqueles produzidos no tamanho *micrométrico* e, microplásticos secundários são aqueles originados da fragmentação de peças plásticas de maior escala por fatores ambientais, como desgaste físico, fotooxidação e interações físico-químicas ou biológicas (XIANG et al., 2022).

Mesmo virgens, os microplásticos são fabricados com adição de compostos químicos destinados a aprimorar suas propriedades, como emolientes, corantes e antioxidantes (EPA, 1990; EPA, 1992; NOBRE et al., 2015). Esses aditivos podem estar misturados ou quimicamente ligados aos polímeros, o que pode modificar a liberação desses compostos a partir do plástico e afetar o potencial ecotoxicológico dos microplásticos (EPA, 1992). Estudos conduzidos por Nobre et al. (2015; 2022) com microplásticos virgens revelaram efeitos tóxicos significativos no desenvolvimento embriolarval do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* e alterações bioquímicas nos tecidos da ostra do mangue *Crassostrea brasiliana*. Outros efeitos na biota como ingestão e acúmulo do microplástico, interferência nas funções orgânicas e sistêmicas, processos inflamatórios e danos teciduais já foram relatados na literatura (ANBUMANI et al., 2018). Esses resultados indicam que os microplásticos virgens, por si só, podem ser suficientes para causar efeitos nocivos a organismos marinhos.

Os organismos marinhos podem ser expostos ao microplástico através de ingestão direta ou indireta, através da cadeia trófica. Também podem ser incorporados pela respiração, já que as partículas flutuantes podem entrar no sistema do indivíduo através das brânquias (WATTS *et al.*, 2014). Quanto menores são as partículas de plástico, mais fáceis e disponíveis para serem consumidas por organismos marinhos (SILVA, 2018). MILLER *et al.* (2020) através de revisão sistemática de dados de literatura, avaliaram a contaminação de mais de 40 espécies em 5 diferentes níveis tróficos e constataram o processo de bioacumulação dos microplásticos.

Outro motivo que torna a poluição por microplástico no oceano uma crescente preocupação global é devido as suas propriedades físico-químicas que favorecem a adsorção de produtos químicos hidrofóbicos em sua superfície (ALIMBA e FAGIO 2019). Dentre os contaminantes químicos sorvidos nos microplásticos, estão os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) (TEUTEN *et al.*, 2007; ROCHMAN *et al.*, 2013; WANG e WANG, 2018), compostos orgânicos que possuem carbono e hidrogênio, além de dois ou mais anéis aromáticos juntos. Possuem baixa polaridade e são altamente insolúveis em solventes polares e, devido a isso, são persistentes, ficando disponíveis para a exposição direta e indireta de organismos marinhos.

O Benzo(a)Pireno (BaP) antropogênico é um PAH classificado pela USEPA como poluente prioritário devido à sua toxicidade, potencial genotóxico e cancerígeno. O BaP tem natureza altamente hidrofóbica, facilitando sua sorção nas partículas de microplástico (BATEL *et al.*, 2016). Encontra-se amplamente distribuído nos ambientes marinhos (DI *et al.*, 2017) incluindo as áreas costeiras brasileiras. Devido ao seu potencial tóxico, o BaP tem sido utilizado como modelo em estudos a que almejam compreender os efeitos e vias metabólicas de PAHs em organismos marinhos (LIU *et al.*, 2015).

Todavia, pouco se sabe ainda sobre a toxicidade e os efeitos combinados da exposição a microplásticos contaminados com BaP, ainda mais quando se consideram concentrações ambientalmente realísticas de micropartículas, ou seja, já reportadas nos ambientes costeiros e quando o cenário experimental simula uma co-exposição (DE MELLO SOUZA *et al.*, 2023).

DE MELLO SOUZA *et al.* (2023) observaram que a toxicidade do BaP para o desenvolvimento embriolarval da espécie de ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* e sobre a mortalidade de *Mysidopsis juniae* pode ser reduzida conforme se aumenta a concentração de microplásticos no meio experimental, concluindo que a redução nos efeitos se deve a adsorção do BaP pelos MP. Todavia é necessário se avaliar se para outros organismos as respostas podem ser similares, ainda mais quando se consideram organismos como os bivalves, que acabam ingerindo as partículas com BaP adsorvido, ainda que não intencionalmente. O sequestro dessas moléculas tóxicas hidrofóbicas pelo microplástico pode inicialmente reduzir a biodisponibilidade do contaminante, se a rota principal de exposição do contaminante for a água, mas as condições internas dos organismos, particularmente nas suas brânquias e tubo digestivo, podem alterar as ligações entre estes contaminantes e liberar o BaP. Entendendo-se que neste cenário os microplásticos podem potencialmente facilitar a transferências de poluentes orgânicos persistentes (POP) para a biota e aumentar sua toxicidade (BATEL *et al.*, 2016).

Os moluscos são frequentemente usados como bioindicadores ambientais para avaliar os efeitos de contaminantes em ecossistemas aquáticos (GUTERRES *et al.* 2021; CRUZ *et al.*, 2022). Os bivalves em geral, não possuem alimentação seletiva, e partículas de baixo valor nutricional, como os microplásticos, podem ser capturadas e ingeridas (GUZZETTI *et al.*, 2018).

Ostras são organismos testes amplamente utilizados em estudos com contaminantes no ambiente marinho e estuarino por serem organismos filtradores vulneráveis à ingestão de microplástico (GONZÁLES-SOLO *et al.*, 2019; NOBRE *et al.*, 2020). Além disso, por possuírem interesse comercial, é possível entender potencial o risco à saúde humana atrelado ao consumo desses animais impactados (HAMMADI *et al.*, 2022). Diversas espécies de ostras são empregadas globalmente para avaliar os efeitos ecotoxicológicos de contaminantes em ambientes marinhos e estuarinos (CEREJA *et al.*, 2023; CHOWDHURY *et al.*, 2023; BOREA *et al.*, 2024; FALCONI *et al.*, 2024). A revisão conduzida por LIU *et al.* (2023) revelou que a exposição prolongada ao microplástico, em diferentes espécies de ostras de diversos países, ocasionou na bioacumulação desse contaminante e induziu uma série de efeitos adversos, verificados através de biomarcadores, incluindo estresse

oxidativo, genotoxicidade, toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento, além de um aumento na mortalidade.

Crassostrea gasar, conhecida popularmente como ostra-do-mangue, pode ser encontrada em toda a costa brasileira, e por ser um organismo sésil, filtrante e capaz de acumular contaminantes, esta espécie se mostra um bom organismo sentinela para biomonitoramento de contaminantes, além de estar amplamente distribuída (ZACCHI *et al.*, 2017). FERREIRA *et al.* (2023) verificaram através de estudos genéticos a coespecificidade entre *Crassostrea brasiliiana* e *C. gasar*, sendo assim, as duas espécies são consideradas sinônimas. Ribeiro *et al.* (2023) descreveram essa espécie como um ótimo bioindicador para monitorar a contaminação por microplástico na coluna d'água.

A Academia de Ciência dos Estados Unidos da América (NAS), definiu os biomarcadores como “variações, subletais, induzidas por xenobióticos em processos celulares, bioquímicos, estruturais ou funcionais que são mensuráveis em um sistema biológico” (NATIONAL RESEARCH COUNCIL *et al.*, 1987). Biomarcadores medidos nos tecidos dos organismos (STEGEMAN *et al.*, 1992) apresentam respostas sensíveis e que permitem detectar os primeiros sinais de danos causados pelos contaminantes e que, em muitos casos, podem preceder alterações em níveis de organização biológica mais altos, como populações, comunidades e ecossistemas (ADAMS *et al.*, 2011). Além disso, biomarcadores podem ser ferramentas úteis para a compreensão dos mecanismos de ação de estressores (DONOVAN *et al.*, 2018).

Poluentes orgânicos hidrofóbicos, quando absorvidos, sofrem um processo complexo de biotransformação, envolvendo uma série de enzimas e proteínas. Essa biotransformação é geralmente dividida em duas fases: Fase 1, Ativação e Formação de metabólitos; e Fase 2, Conjugação e Detoxificação. Na fase 1 o BaP é oxidado ou reduzido pelo sistema P450, gerando metabólitos e espécies reativas de oxigênio (EROs) através dos processos de redox. Na fase 2, a enzima glutathione S-transferase (GST) promove a conjugação dos metabólitos com a glutathione reduzida (GSH) para torná-los mais solúveis e menos tóxicos. Já enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase (GPX), também estão envolvidas na proteção contra espécies reativas de oxigênio nesta fase. Quando o organismo não consegue mais detoxificar, podem ser observados distúrbios bioquímicos e fisiológicos, avaliados através de biomarcadores de efeito como peroxidação lipídica (LPO), devido as

EROs; danos ao DNA, causado pelas EROs ou pelos metabólitos formando adutos no DNA; e instabilidade da membrana lisossomal dos hemócitos.

As brânquias das ostras e outros bivalves marinhos desempenham um papel fundamental na absorção de nutrientes, na osmorregulação e troca gasosa, além disso, as ostras podem capturar e ingerir partículas de diversos tamanhos através das brânquias (VANCAUWENBERGHE *et al.*, 2015; CAPPELLO *et al.*, 2018; DE MARCO *et al.*, 2023). Desta forma, as brânquias acabam se revelando um excelente órgão alvo para a investigação de efeitos dos contaminantes ambientais, uma vez que são responsáveis pelas primeiras respostas (DE MARCO *et al.*, 2023).

Reconhecendo a necessidade de mais estudos sobre efeitos ecotoxicológicos dos microplásticos no meio marinho, considerando que BaP e microplásticos são contaminantes comuns em águas marinhas costeiras em todo o mundo, que o MP possui caráter emergente de contaminação e que ambos são capazes de causar efeitos adversos isoladamente e que, dependendo do tipo de interação, os efeitos toxicológicos podem ser sinérgicos, aditivos ou antagônicos (SYBERG *et al.*, 2015). Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito ecotoxicológico do Benzo(a)pireno (BaP) e do microplástico (MP), isolados e em conjunto, para a ostra-do-mangue (*Crassostrea gasar*), partindo-se da hipótese que os compostos interagem entre si modificando a toxicidade dos compostos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O ensaio de exposição foi realizado no laboratório de ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília, Santos – SP. A **Figura 1** apresenta um resumo dos métodos.

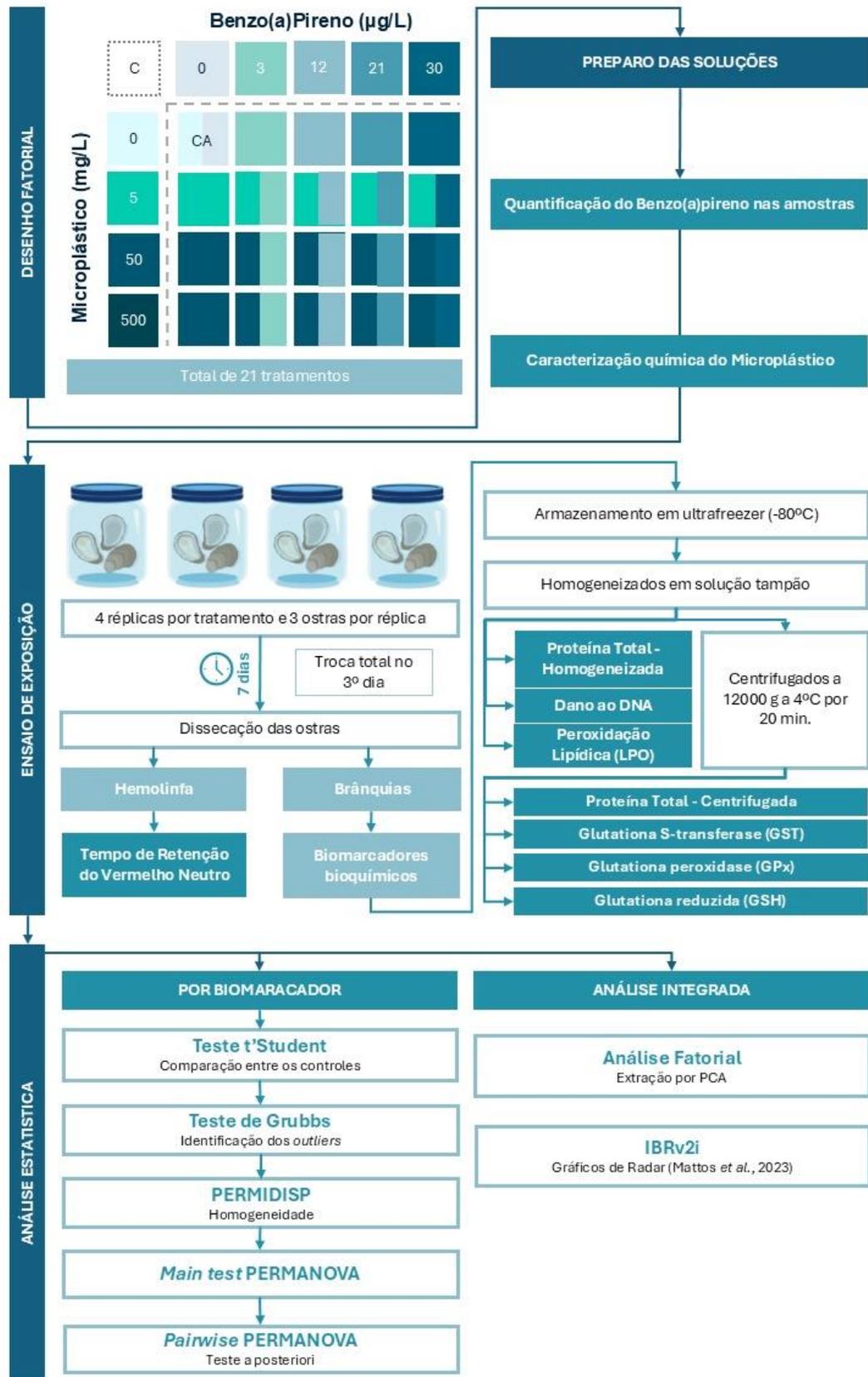


Figura 1 - Fluxograma dos materiais e métodos.

2.1. Contaminantes

O composto benzo(a)pireno foi adquirido junto à Sigma Aldrich Chemical Representações Ltda e as partículas de microplástico foram cedidas pela empresa petroquímica brasileira Braskem S.A. São micropartículas virgens, de polietileno, com tamanho aproximado de 100 a 250 μm e usadas como esfoliante e abrasivo em produtos cosméticos de cuidado pessoal.

2.2. Organismo Modelo

Para o ensaio de exposição a ostra-do-mangue, *Crassostrea gasar* (*sin. Crassostrea brasiliiana*), foi escolhida como organismo modelo. Essa espécie ocorre em estuários da costa brasileiras do estado do Maranhão até Santa Catarina (ZACCHI *et al.*, 2018; CHIOVATTO *et al.*, 2020; NOBRE *et al.*, 2020; de CAMPO *et al.*, 2022).

Devido a sensibilidade, essa espécie de molusco é cada vez mais utilizada como bioindicador para ecossistemas estuarinos, principalmente em estudos com biomarcadores (NOBRE *et al.*, 2020).

As ostras para o ensaio de exposição foram adquiridas de uma fazenda de cultivo estabelecida na Reserva Extrativista do Mandira, localizada no município de Cananéia, litoral sul do estado de São Paulo. As ostras adquiridas apresentaram comprimento médio de $75,5 \text{ mm} \pm 9,0 \text{ mm}$, largura média de $53,43 \text{ mm} \pm 10,27 \text{ mm}$ e peso médio de $72,09 \text{ mm} \pm 13,40 \text{ mm}$, sendo esses dados biométricos equivalentes ao encontrados na literatura para organismos adultos (LOPES *et al.*, 2013; LEGAT *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2019). Após a chegada ao laboratório da Universidade Santa Cecília (Santos/SP) os indivíduos foram aclimatados em tanques de 500 litros, com fatores físico-químicos controlados (temperatura a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, fotoperíodo de 12h de luz difusa, oxigênio dissolvido acima de 3 mg L^{-1} , pH entre 7.0 e 8.0, salinidade 25 ± 2 , amônia não-ionizada abaixo de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, aeração vigorosa) por cinco dias, sendo alimentados a cada 48 horas com fitoplâncton marinho.

2.3. Desenho Fatorial

Para o BaP as concentrações nominais avaliadas na água foram de 3, 12, 21 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$. As concentrações escolhidas foram determinadas a partir de valores obtidos em áreas estuarinas (ADENIJI *et al.*, 2019), em estudos de toxicidade (SIU *et al.*, 2004) e encontradas nos estuários de Santos e São Vicente (POLAKIEWICZ, 2008). Sendo assim, as concentrações avaliadas são ambientalmente relevantes.

A toxicidade do microplástico foi avaliada em uma concentração ambientalmente relevante de 5,0 mg L^{-1} , próxima à encontrada no Pacífico Norte e na Costa da Califórnia (GILFILLAN, 2009; SUSSARELLU *et al.*, 2016; e MOORE *et al.*, 2010) além de duas concentrações adicionais para medir os efeitos (50 e 500 mg L^{-1}) (**Figura 1 e Figura 2**).

O experimento foi pensado para avaliar o efeito dos dois contaminantes simultaneamente. Desta forma, os contaminantes foram testados isoladamente e de forma conjunta. Sendo 4 concentrações isoladas de BaP, 3 concentrações isoladas de MP e 12 tratamentos com as concentrações cruzadas. Além disso, foi realizado um controle apenas com água marinha e um controle com acetona. Totalizando 21 tratamentos.

Por se tratar de um composto altamente hidrofóbico ($S = 0,0038 \text{ mg L}^{-1}$) (MEIRE *et al.*, 2007), o BaP precisa ser diluído em acetona, desta forma, a acetona foi considerada um fator fixo no experimento, ou seja, todos os tratamentos, com ou sem BaP, foram normalizados com a concentração final de 150 $\mu\text{L/L}$ de acetona.

2.4. Preparo da Solução

2.4.1. Água de Diluição

A água do mar utilizada no experimento foi doada pelo AcquaMundo – Aquário do Guarujá. No laboratório da Universidade Santa Cecília a água marinha foi filtrada em um sistema de filtração à vácuo, com membrana de fibra de vidro (Whatman GF/C) (47 mm) com poro de 0,45 μm . Os parâmetros físico-químicos foram ajustados (oxigênio dissolvido acima de 3 mg L^{-1} , pH entre 7.0 e 8.0, salinidade 25 ± 2)

2.4.2. Solução-estoque

Para a solução-estoque, 0,001 g de BaP foi dissolvido em 5 mL de acetona. Posteriormente, a solução estoque foi calculada para atingir as concentrações nominais na água de 3, 12, 21 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$. As soluções-testes foram preparadas com água do mar ajustada e a concentração de acetona foi ajustada para 150 $\mu\text{L L}^{-1}$ para todos os tratamentos.

O microplástico foi pesado em balança analítica e adicionado nas soluções-testes. Para cada tratamento, foram preparadas quatro réplicas de exposição de 1L em frascos de vidro.

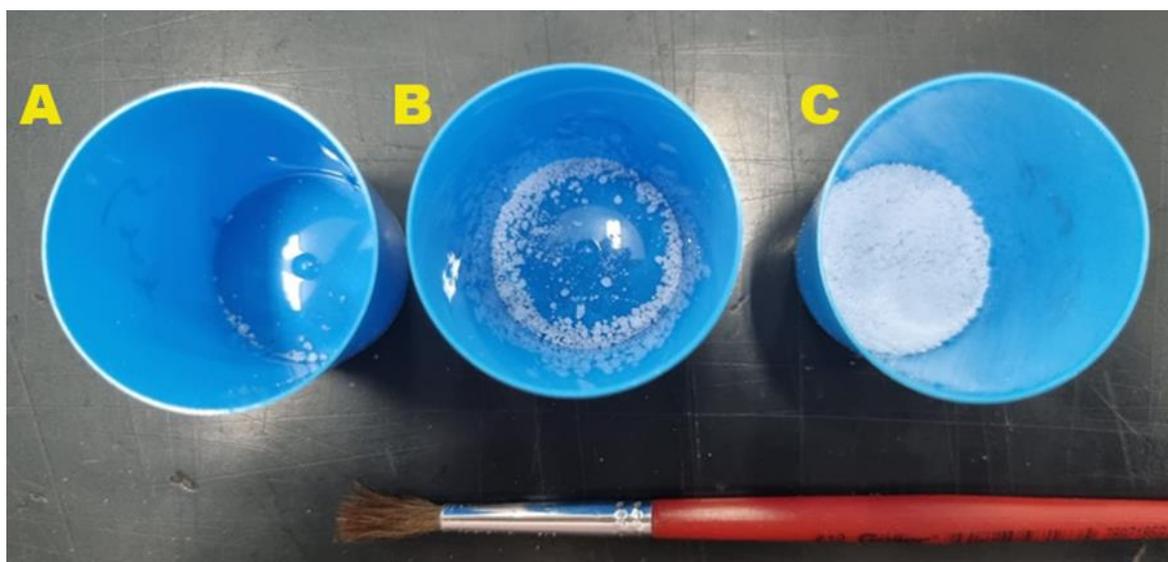


Figura 2. Quantidade de microplástico para cada concentração. A – 5 mg/L de microplástico. B – 50 mg/L de microplástico. C - 500 mg/L de microplástico.

2.5. Análises químicas

2.5.1. Caracterização do Microplástico

Para a confirmação da composição polimérica do microplástico, as microesferas foram caracterizadas, pelo Prof. Fábio Ruiz Simões, no Instituto do Mar da Universidade Federal de São Paulo, utilizando um Espectrofotômetro de Transformada de Fourier no Infravermelho (FT-IR), *Perkin Elmer* modelo *Spectrum Two*, com o acessório de Reflexão Atenuada Universal (ATR). O equipamento possui um detetor de tantalato de lítio (LiTaO_3), uma fonte de infravermelhos médios (MIR) e é controlado pelo software *Spectrum 10*. Antes das medições, o cristal de diamante ATR foi limpo com acetona e foi registrada uma leitura de fundo. As amostras de microplásticos foram então comprimidas contra o cristal de diamante

ATR com uma força de 95 N para garantir um contacto ótimo. O procedimento, foi realizado em modo de transmitância, envolvendo 24 leituras para cada amostra, cobrindo a gama espectral de 550 a 4000 cm^{-1} . As análises foram efetuadas em triplicada, tendo sido aplicada uma correção da linha de base aos espectros obtidos.

2.5.2. Quantificação do BaP na água

Para a purificação das amostras e quantificação do BaP nas amostras de água superficial foi utilizado o método USEPA 1694 (USEPA, 2007). De forma resumida, 100 ml das amostras foram filtradas em um sistema de filtração à vácuo, com membrana de fibra de vidro (Whatman GF/C) (47 mm) com poro de 1,2 μm . Após a filtragem da amostra, 2ml de metanol foram filtrados na mesma membrana para remover as substâncias retidas no filtro. Imediatamente após essa etapa, o pH das amostras filtradas foi ajustado para 7,0 e posteriormente as amostras foram submetidas ao procedimento de extração de fase sólida descrito na USEPA (2007), utilizando uma coluna SPE Chromabond HR-X 85 μm , 3 mL 200 mg^{-1} (Macherey-Nagel).

A determinação da concentração de BaP nas amostras foi realizada na Universidade Federal da Bahia, em cooperação com a Prof. Ana Cecília de Albergaria-Barbosa através do protocolo descrito por GUIMARÃES *et al.* (2020) com a utilização de cromatógrafo gasoso (Agilent 7890B) acoplado a um espectrômetro de massa Agilent (5977A) operando no modo de monitoramento de íon único (SIM). O limite de detecção (LOD) do método foi definido como o ponto de calibração mais baixo dentro da curva analítica (calculado pelo volume de água extraída, 100 ml), que foi de 0,005 ng ml^{-1} . Como a mesma solução de BaP foi usada para todos os experimentos, apenas os tratamentos sem MPs foram analisados quimicamente. Os tratamentos contendo microplásticos sem contaminação e os controles também foram analisados.

2.6. Desenho Experimental

Foi avaliada toxicidade do BaP, tanto isolado quanto associado aos MPs, para a *Crassostrea gasar*. (Figura 3). O ensaio teve duração de 7 dias, com troca total de

água e contaminantes presentes no meio, no terceiro dia. Foram utilizados recipientes de vidro previamente descontaminados como unidades experimentais, contendo 1 L de água marinha com salinidade de 25. Em cada unidade experimental, foram colocados 3 indivíduos, totalizando 12 indivíduos por tratamento. As unidades experimentais foram mantidas com aeração constante e fotoperíodo de 12 horas de luz difusa, os organismos foram alimentados a cada 48 horas com fitoplâncton marinho e os parâmetros de qualidade da água (OD, pH e salinidade) foram medidos no início e no final do ensaio, além de a cada 48 horas. Simultaneamente foram realizados dois controles com i) água do mar livre de contaminação e ii) controle de solvente (água do mar livre de contaminação com adição de acetona). Cada tratamento foi realizado com quatro réplicas.

Ao término do período de exposição, os organismos foram anestesiados em gelo, medidos com paquímetro e pesados em balança semianalítica e amostras de hemolinfa de oito organismos por tratamento foram imediatamente coletadas para análise da estabilidade da membrana lisossômica através do corante vermelho neutro. Para a análise dos biomarcadores bioquímicos, os mesmos organismos foram dissecados e amostras de brânquias foram coletadas.



Figura 3. Diferentes concentrações de microplástico no ensaio de exposição. A – 5 mg/L de microplástico. B – 50 mg/L de microplástico. C - 500 mg/L de microplástico.

2.7. Biomarcadores Bioquímicos

Após a coleta, os tecidos foram armazenados em ultrafreezer a -80 °C. Os tecidos foram então homogeneizados em uma solução tampão composta por 50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 50 mM de sacarose e 150 mM de KCl,

com pH ajustado para 7,6, diluída em água Milli-Q. Para inibir proteases, 1 mM de PMSF diluído em etanol foi adicionado à solução tampão. O homogenato das brânquias foi preparado utilizando um homogeneizador de tecidos e alíquotas sem centrifugação foram reservadas para análise de danos ao DNA, determinação da peroxidação lipídica (LPO) e concentração de proteínas totais. O restante das amostras foi então centrifugado a 12.000g por 20 minutos a 4°C, e alíquotas do sobrenadante foram separadas para medir as atividades da glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e os níveis de glutathione reduzida (GSH). A quantificação total de proteínas totais também foi realizada nessa fração utilizando o método de Bradford (1976), para padronização dos biomarcadores.

2.7.1. Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi medida conforme o protocolo de Sies *et al.* (1979), utilizando 1 mM de hidroperóxido de cumeno como substrato e monitorando a diminuição da absorbância de NADPH a 340 nm. A atividade enzimática foi expressa em nmol de NADPH oxidado por minuto por mg de proteína total.

2.7.2. Glutathione S-Transferase (GST)

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi avaliada utilizando o método descrito por Keen *et al.* (1976), empregando 42 nM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e 1 nM de GSH como substrato. A absorbância foi monitorada a 340 nm, e os resultados foram expressos em nmol de produto formado por minuto por mg de proteína total.

2.7.3. Glutathione Reduzida (GSH)

Os níveis de glutathione reduzida (GSH) foram determinados seguindo o método de Sedlak e Lindsay (1968), que utiliza 0,01 nM de 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) e um tampão Tris 0,4 M, pH 8,9. A absorbância foi medida a 415 nm, com os resultados expressos em nmol de GSH por minuto por mg de proteína total.

2.7.4. Peroxidação Lipídica (LPO)

O estresse oxidativo foi mensurado por meio do ensaio de peroxidação lipídica, conforme o protocolo de Wills (1987). As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram diluídas em uma solução de homogeneização, e a fluorescência foi medida utilizando um comprimento de onda de excitação de 516 nm e um comprimento de onda de emissão de 600 nm. Os resultados foram expressos em μM de TBARS por mg de proteína total.

2.7.5. Danos em DNA

O dano ao DNA foi quantificado através do método de precipitação alcalina, conforme descrito por Olive (1988), utilizando uma curva padrão de DNA de esperma de salmão para a calibração. A luminescência foi induzida pela solução de Hoechst 33342, e a fluorescência foi medida com comprimento de onda de excitação de 360 nm e emissão de 450 nm. Os resultados foram expressos em μg de DNA danificado por mg de proteína total.

2.7.6. Estabilidade da membrana lisossômica (TRVN)

A estabilidade da membrana lisossômica de células presentes na hemolinfa das ostras foi avaliada por meio da análise do em lisossomos de hemócitos, conforme protocolo descrito por Martínez-Gómez *et al.* (2015). Neste ensaio, o tempo de retenção do corante vermelho neutro nos lisossomos é obtido pela estimativa da proporção de células exibindo o extravasamento dos lisossomos para o citosol e/ou exibindo anormalidades no tamanho e cor dos lisossomos.

2.8. Tratamento estatístico

Os resultados dos dois tratamentos de controle, com água do mar e com o solvente, foram comparados estatisticamente pelo teste t'Student, para verificar se há uma possível toxicidade associada a Acetona.

Os *outliers* foram identificados através do teste de Grubbs e quando necessário, foram removidos. A significância das diferenças entre os tratamentos pertencentes aos testes de toxicidade foi avaliada por meio da Análise de Variância Permutacional

Univariada ("teste principal" ou "*main test*" PERMANOVA) (ANDERSON *et al.*, 2017), considerando dois fatores fixos: tratamento (BaP sozinho e BaP associado a MP) e concentração. Quando o teste principal apresentou resultado significativo ($p < 0,05$) foi aplicado o teste *a posteriori* ("teste de comparações múltiplas pareadas" ou "*pairwise multiple comparisons test*") para identificar quais níveis serão diferentes entre si. A homogeneidade das variâncias foi analisada usando PERMDISP.

Os efeitos exercidos sobre cada biomarcador, consequência da exposição a BaP, a microplástico, e da interação entre BaP e microplásticos, foram testados através de Análise de Variância permutacional (PERMANOVA) por violarem a premissa de normalidade exigida para testes paramétricos (ANDERSON *et al.*, 2017). Os testes de PERMANOVA foram realizados sobre matrizes de similaridade (obtidas a partir de distância Euclidiana). Testes *a posteriori* pareados de comparações múltiplas foram realizados quando indicado efeito significativo de algum fator ou do termo de interação entre os fatores. Quando detectado número de permutações abaixo de 50, serão utilizados valores "p" de Monte Carlo (ANDERSON *et al.*, 2017). Os resíduos foram permutados usando permutação irrestrita dos dados originais. Para todos os testes estatísticos, foi estabelecido um nível de significância de 5% ($\alpha = 0.05$). A determinação da associação entre as múltiplas variáveis analisadas, com o intuito de avaliar as relações dose-resposta entre benzo(a)pireno e microplásticos, foi realizada através de Análise Fatorial com extração por Análise de Componentes Principais (GUSSO-CHOUERI *et al.*, 2015; 2016).

Em seguida, os dados sobre biomarcadores foram integrados usando o índice de resposta integrada aprimorada de biomarcador (IBR) proposto por Mattos *et al.* (2023). Os resultados são apresentados em gráficos de estrelas criados na versão 2013 do Microsoft Excel.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização do Microplástico

A **Figura 4** apresenta o espectro FT-IR das microesferas de polietileno. As bandas de transmitância nos comprimentos de onda 2915 cm^{-1} e 2848 cm^{-1} foram atribuídas, respectivamente, ao estiramento assimétrico e simétrico das ligações CH₂. As bandas em 1472 cm^{-1} e 1463 cm^{-1} foram atribuídas ao curvamento CH₂, já as bandas em 730 cm^{-1} e 720 cm^{-1} foram atribuídas aos curvamentos de *rocking*

CH₂. Amostras de polímeros cristalinos podem apresentar no espectro FT-IR picos divididos, como observado nas bandas nos comprimentos de onda 1472 cm⁻¹ e 1463 cm⁻¹ e 730 cm⁻¹ e 720 cm⁻¹, indicando a presença de polietileno de alta densidade (HDPE). As bandas observadas em 1372 cm⁻¹ e 1350 cm⁻¹ foram atribuídas aos curvamentos simétricos e *wagging* dos grupos metila (CH₃), indicando a presença de polietileno de baixa densidade (LDPE) (GULMINE *et al.*, 2002). No entanto, o polietileno linear de baixa densidade (LLDPE) apresenta pequenos picos do grupo metila no comprimento de onda 1378 cm⁻¹ provenientes das cadeias laterais e picos divididos resultantes dos modos de estiramento e curvamento do CH₂. O LLDPE é fabricado com cadeias laterais, mas todas são grupos etílicos curtos em comparação com os grupos laterais hexílicos típicos no LDPE. Esses grupos etílicos são curtos o suficiente para permitir uma orientação paralela e regiões cristalinas, resultando, portanto, nos picos divididos. Sendo assim, as amostras são de polietileno linear de baixa densidade (LLDPE), conforme informado pelo fabricante (SMITH, 2021).

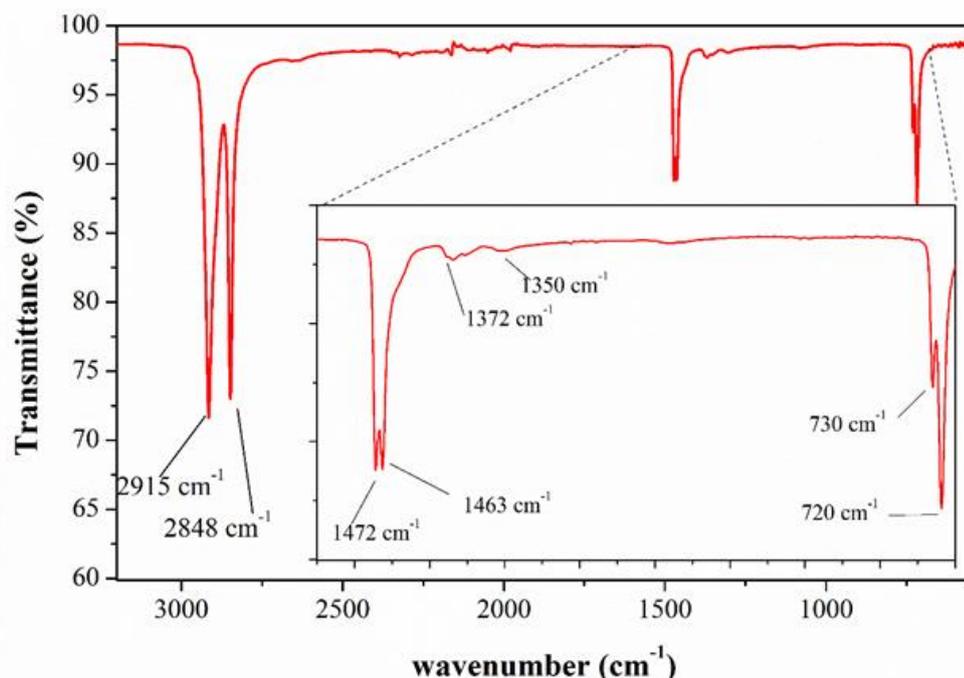


Figura 4. Espectro FT-IR (ATR) do LLDPE.

3.2. Quantificação do BaP

A **Tabela 1** apresenta as concentrações encontradas na água do experimento. O controle contendo apenas água do mar, o controle contendo acetona e os controles contendo acetona e microplásticos apresentaram concentrações de BaP semelhantes ($\leq 1,10E^{-04}$). Os tratamentos com 3,0 e 12,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BaP apresentaram concentrações medidas próximas das concentrações nominais, enquanto o tratamento com 21 $\mu\text{g L}^{-1}$ o valor medido excedeu a concentração nominal. Devido a perda da amostra, não foi determinada a concentração do tratamento 30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para os ensaios estatísticos dos resultados e cálculos de efeitos foram consideradas as concentrações nominais.

Tabela 1. Concentrações de BaP ($\mu\text{g L}^{-1}$) medidas na água do mar do meio experimental.

Concentrações nominais de BaP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	BaP ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Controle	1,10E ⁻⁰⁴
Controle Acetona	3,00E ⁻⁰⁵
5 mg L ⁻¹ MP	3,21E ⁻⁰⁵
50 mg L ⁻¹ MP	4,63E ⁻⁰⁶
500 mg L ⁻¹ MP	8,10E ⁻⁰⁵
3	5,5
12	7,2
21	55,3
30	ND

Legenda: ND – Não Determinado

3.3. Biomarcadores Bioquímicos

3.3.1. GPx

Os resultados da glutatona peroxidase (GPx) das brânquias de *Crassostrea gasar* expressos na **Figura 5**. A **Tabela 2** apresenta o resumo das análises estatísticas e a **Tabela 3**. Resultados da PERMANOVA pareada (pos-hoc) comparando os níveis de um fator dentro de cada nível do outro fator para os dados de glutatona peroxidase. p(MC) = p de Monte Carlo. Valores p(MC) significativos estão marcados em negrito. apresenta os resultados da PERMANOVA pareada (pos-hoc).

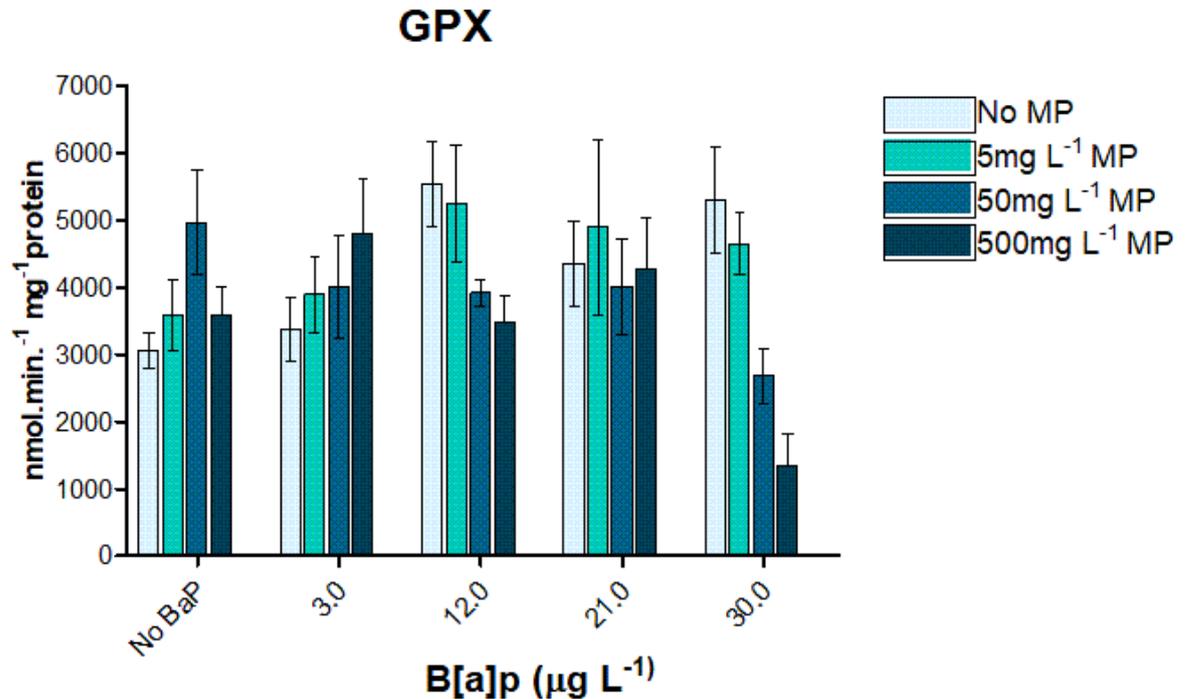


Figura 5. Média e desvio padrão dos níveis de glutatona peroxidase (GPx) após 7 dias de exposição.

Tabela 2. Resultados da PERMANOVA baseados no efeito da exposição conjunta de BaP e MP glutatona peroxidase (GPx) das brânquias de *Crassostrea gasar*. df = graus de liberdade; MS = quadrados médios; P(perm) = valor-p permutacional; P(MC) = valor-p Monte Carlo. Valores-p significativos estão marcados em negrito. BaP: 3, 12, 21 e 30 µg L⁻¹; MP: 5, 50, 500 mg L⁻¹.

Main Test	Df	MS	Pseudo-F	P(Perm)	P(MC)
BaP	4	6,49E+06	1,3243	0,248	0,253
MP	3	1,77E+07	3,6034	0,015	0,014
Interação BaP x MP	12	4,90E+06	1,7568	0,058	0,071

Tabela 3. Resultados da PERMANOVA pareada (pos-hoc) comparando os níveis de um fator dentro de cada nível do outro fator para os dados de glutatona peroxidase. p(MC) = p de Monte Carlo. Valores p(MC) significativos estão marcados em negrito.

Factor 1	Comparison of levels	Factor 2	t	Unique perms	p(MC)
Within level '0' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	1	764	0,199
	0 vs. 12.0	BaP	1	911	0,623
	0 vs. 21.0	BaP	1	699	0,379
	0 vs. 30.0	BaP	1	923	0,587
	3.0 vs. 12.0	BaP	2,8972	930	0,011
	3.0 vs. 21.0	BaP	2	723	0,15

Factor 1	Comparison of levels	Factor 2	t	Unique perms	p(MC)
	3.0 vs. 30.0	BaP	2	926	0,065
	12.0 vs. 21.0	BaP	1	909	0,215
	12.0 vs. 30.0	BaP	0	917	0,844
	21.0 vs. 30.0	BaP	1	892	0,441
Within level '5' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	0	928	0,681
	0 vs. 12.0	BaP	2	918	0,107
	0 vs. 21.0	BaP	1	919	0,347
	0 vs. 30.0	BaP	1,5889	841	0,142
	3.0 vs. 12.0	BaP	1	934	0,198
	3.0 vs. 21.0	BaP	1	754	0,477
	3.0 vs. 30.0	BaP	1	755	0,285
	12.0 vs. 21.0	BaP	0,20298	910	0,849
	12.0 vs. 30.0	BaP	1	830	0,588
	21.0 vs. 30.0	BaP	0	752	0,867
Within level '50' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	1	929	0,431
	0 vs. 12.0	BaP	1	912	0,182
	0 vs. 21.0	BaP	0,88053	911	0,396
	0 vs. 30.0	BaP	2,5347	854	0,03
	3.0 vs. 12.0	BaP	0,13882	936	0,905
	3.0 vs. 21.0	BaP	0	914	0,997
	3.0 vs. 30.0	BaP	1,3972	858	0,194
	12.0 vs. 21.0	BaP	0	917	0,877
	12.0 vs. 30.0	BaP	3,0893	840	0,006
	21.0 vs. 30.0	BaP	1,4821	852	0,192
Within level '500' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	1	932	0,216
	0 vs. 12.0	BaP	0,20082	928	0,843
	0 vs. 21.0	BaP	1	929	0,486
	0 vs. 30.0	BaP	3,5729	917	0,003
	3.0 vs. 12.0	BaP	1	923	0,153
	3.0 vs. 21.0	BaP	0	920	0,63
	3.0 vs. 30.0	BaP	3,7167	917	0,002
	12.0 vs. 21.0	BaP	1	924	0,381
	12.0 vs. 30.0	BaP	3,529	919	0,003
	21.0 vs. 30.0	BaP	3	928	0,005
Within level '0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	1	929	0,201
	0 vs. 50	MP	1	912	0,438
	0 vs. 500	MP	1	746	0,225
	5 vs. 50	MP	2	933	0,166
	5 vs. 500	MP	0	933	0,989
	50 vs. 500	MP	2	929	0,134
Within level '3.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	1	764	0,51
	0 vs. 50	MP	1	930	0,493
	0 vs. 500	MP	1	925	0,158
	5 vs. 50	MP	0,12537	921	0,908
	5 vs. 500	MP	1	921	0,392

Factor 1	Comparison of levels	Factor 2	t	Unique perms	p(MC)
	50 vs. 500	MP	1	921	0,503
Within level '12.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	0	921	0,711
	0 vs. 50	MP	2,7945	918	0,017
	0 vs. 500	MP	3	920	0,009
	5 vs. 50	MP	2	927	0,121
	5 vs. 500	MP	2	919	0,054
	50 vs. 500	MP	1,0213	915	0,327
Within level '21.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	0,30394	716	0,765
	0 vs. 50	MP	1	907	0,644
	0 vs. 500	MP	0	907	0,822
	5 vs. 50	MP	0,6228	941	0,547
	5 vs. 500	MP	0	925	0,697
	50 vs. 500	MP	0	924	0,815
Within level '30.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	1	864	0,528
	0 vs. 50	MP	2,6729	847	0,025
	0 vs. 500	MP	4,3113	922	0,001
	5 vs. 50	MP	4	412	0,006
	5 vs. 500	MP	5	844	0,002
	50 vs. 500	MP	2,0341	828	0,059

A análise PERMDISP revelou que a variância entre os tratamentos com MP e BaP é homogênea.

A análise estatística (PERMANOVA) indicou efeitos significativos ($p < 0,05$) apenas para o fator MP. Os tratamentos com 50 e 500 mg L⁻¹ de MP apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controle. Na interação entre os contaminantes, os tratamentos com BaP e sem MP não apresentaram efeito significativo em relação ao controle, a menor concentração (3 µg L⁻¹ de BaP) se diferenciou das concentrações 12 e 30 µg L⁻¹ de BaP. Na concentração ambiental de MP, só tratamento com 12 µg L⁻¹ de BaP mostrou efeito significativo. Nos tratamentos com 50 mg L⁻¹ de MP, todas as concentrações de BaP apresentaram a diferença significativa, já para e o tratamento com 500 mg L⁻¹ de MP, apenas a menor concentração de BaP não apresentou diferença significativa.

3.3.2. GST

Os resultados da glutathione S transferase (GST) sobre as brânquias de *Crassostrea gasar* expressos na **Figura 6**. A **Tabela 4** apresenta o resumo das

análises estatísticas e a **Tabela 5** apresenta os resultados da PERMANOVA pareada (pos-hoc).

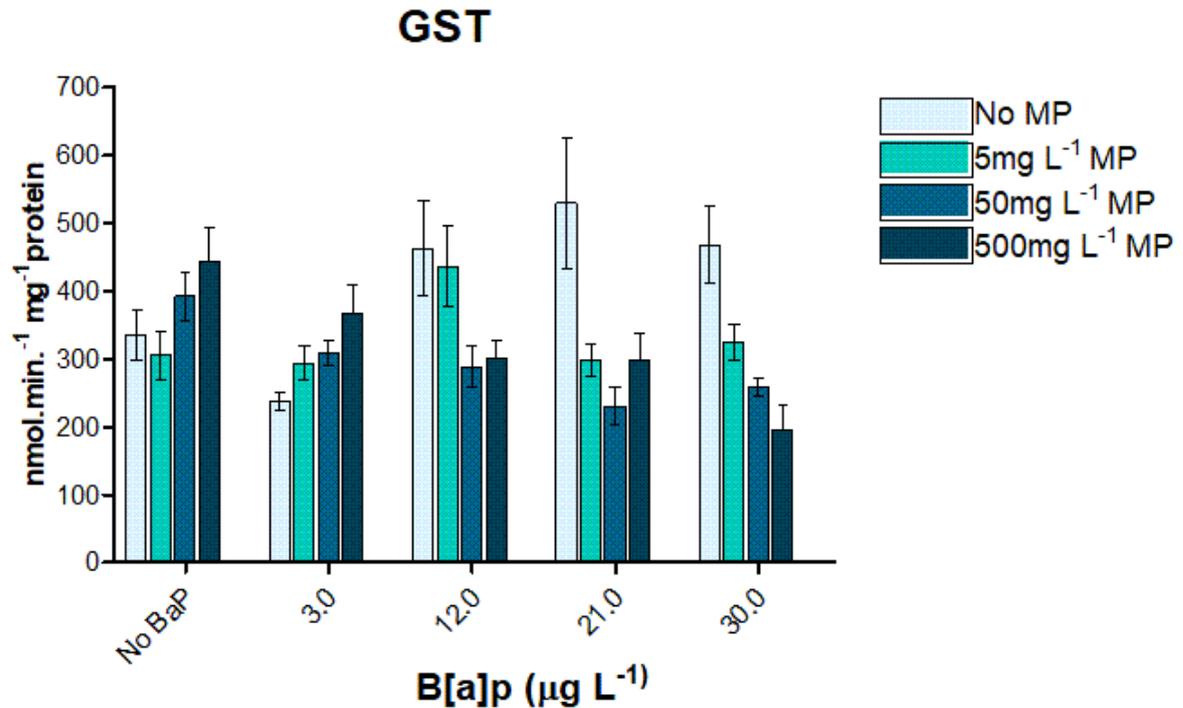


Figura 6. Média e desvio padrão dos níveis de glutiona s transferase (GST) após 7 dias de exposição.

Tabela 4. Resultados da PERMANOVA baseados no efeito da exposição conjunta de BaP e MP na glutiona-s-transferase (GST) das brânquias de *Crassostrea gasar*. df = graus de liberdade; MS = quadrados médios; P(perm) = valor-p permutacional; P(MC) = valor-p Monte Carlo. Valores-p significativos estão marcados em negrito. BaP: 3, 12, 21 e 30 µg L⁻¹; MP: 5, 50, 500 mg L⁻¹

Main Test	df	MS	Pseudo-F	P(Perm)	P(MC)
BaP	4	1,18E+05	4,069	0,002	0,007
MP	3	2,12E+05	7,3127	0,001	0,001
Interação BaP x MP	12	6,04E+04	2,0759	0,014	0,027

Tabela 5. Resultados da PERMANOVA pareada (pos-hoc) comparando os níveis de um fator dentro de cada nível do outro fator para os dados de glutiona S-transferase. p(MC) = p de Monte Carlo. Valores p(MC) significativos estão marcados em negrito.

Factor 1	Comparison of levels	Factor 2	t	Unique perms	p(MC)
Within level '0' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	2	652	0,06
	0 vs. 12.0	BaP	1	929	0,351
	0 vs. 21.0	BaP	1	772	0,406
	0 vs. 30.0	BaP	1	925	0,371
	3.0 vs. 12.0	BaP	2,9526	891	0,015

Factor 1	Comparison of levels	Factor 2	t	Unique perms	p(MC)
	3.0 vs. 21.0	BaP	3	652	0,006
	3.0 vs. 30.0	BaP	4	874	0,002
	12.0 vs. 21.0	BaP	0	932	0,894
	12.0 vs. 30.0	BaP	0	928	0,958
	21.0 vs. 30.0	BaP	0	915	0,948
Within level '5' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	0	923	0,791
	0 vs. 12.0	BaP	2	931	0,064
	0 vs. 21.0	BaP	0	906	0,91
	0 vs. 30.0	BaP	0,4088 1	854	0,69
	3.0 vs. 12.0	BaP	2	926	0,041
	3.0 vs. 21.0	BaP	0	662	0,844
	3.0 vs. 30.0	BaP	1	751	0,417
	12.0 vs. 21.0	BaP	2,2144	891	0,037
	12.0 vs. 30.0	BaP	2	851	0,113
	21.0 vs. 30.0	BaP	1	663	0,484
Within level '50' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	2	918	0,043
	0 vs. 12.0	BaP	2	925	0,029
	0 vs. 21.0	BaP	4,0453	933	0,001
	0 vs. 30.0	BaP	3,486	855	0,003
	3.0 vs. 12.0	BaP	0,5713 2	922	0,584
	3.0 vs. 21.0	BaP	2	925	0,023
	3.0 vs. 30.0	BaP	1,9707	850	0,071
	12.0 vs. 21.0	BaP	1	918	0,177
	12.0 vs. 30.0	BaP	0,7953 5	850	0,415
	21.0 vs. 30.0	BaP	0,8984 5	857	0,382
Within level '500' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	1	931	0,266
	0 vs. 12.0	BaP	2,5963	914	0,02
	0 vs. 21.0	BaP	2	937	0,041
	0 vs. 30.0	BaP	4,1174	925	0,003
	3.0 vs. 12.0	BaP	1	915	0,227
	3.0 vs. 21.0	BaP	1	925	0,278
	3.0 vs. 30.0	BaP	3,1352	915	0,01
	12.0 vs. 21.0	BaP	0	924	0,956
	12.0 vs. 30.0	BaP	2,4167	928	0,029
	21.0 vs. 30.0	BaP	2	937	0,08
Within level '0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	2	914	0,107
	0 vs. 50	MP	1	917	0,215
	0 vs. 500	MP	1	743	0,344
	5 vs. 50	MP	2	929	0,084
	5 vs. 500	MP	2	908	0,044
	50 vs. 500	MP	1	920	0,448
Within level '3.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	2	648	0,073

Factor 1	Comparison of levels	Factor 2	t	Unique perms	p(MC)
	0 vs. 50	MP	3	890	0,01
	0 vs. 500	MP	3	886	0,011
	5 vs. 50	MP	0,4668	934	0,631
	5 vs. 500	MP	1	916	0,191
	50 vs. 500	MP	1	931	0,217
Within level '12.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	0	922	0,753
	0 vs. 50	MP	2,2806	918	0,037
	0 vs. 500	MP	2	926	0,042
	5 vs. 50	MP	2	925	0,029
	5 vs. 500	MP	2	912	0,045
	50 vs. 500	MP	0,3237 1	912	0,756
Within level '21.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	2,2961	673	0,043
	0 vs. 50	MP	3	917	0,003
	0 vs. 500	MP	2	919	0,055
	5 vs. 50	MP	2,1327	888	0,057
	5 vs. 500	MP	0	886	0,951
	50 vs. 500	MP	1	933	0,181
Within level '30.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	2	860	0,061
	0 vs. 50	MP	3,1058	849	0,008
	0 vs. 500	MP	4,0774	920	0,003
	5 vs. 50	MP	2	409	0,044
	5 vs. 500	MP	3	847	0,02
	50 vs. 500	MP	1,495	857	0,145

A análise PERMDISP revelou que a variância entre os tratamentos com BaP é homogênea; no entanto, os tratamentos com MP apresentaram heterogeneidade ($F = 5,8752$, $p(\text{perm}) = 0,002$). A partir dos resultados apresentados no gráfico, conclui-se que a heterogeneidade das amostras não compromete os resultados da PERMANOVA.

A análise estatística (PERMANOVA) indicou efeitos significativos ($p < 0,05$) tanto dos fatores MP quanto BaP, bem como uma interação significativa entre eles. Os tratamentos com 3, 21 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BaP apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controle. Com relação ao MP, todas as concentrações de exposição mostraram diferença significativa em relação ao controle.

Na interação entre os contaminantes, os tratamentos com BaP e sem MP não apresentaram efeito significativo em relação ao controle, apenas a concentração ambiental (3 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BaP) se diferenciou das demais concentrações. Na

concentração ambiental de MP, só tratamento com 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BaP mostrou efeito significativo, assim como observado para GPx.

Nos tratamentos com 50 mg L^{-1} de MP, todas concentrações de BaP diferiram estatisticamente do controle. Observa-se no gráfico uma diminuição da atividade da GST com o aumento da concentração de BaP. A mesma tendência é observada nos tratamentos com 500 mg L^{-1} de MP.

3.3.3. GSH

Os resultados da glutathiona reduzida (GSH) sobre as brânquias de *Crassostrea gasar* expressos na **Figura 7**. A **Tabela 6** apresenta o resumo das análises estatísticas e a **Tabela 7** apresenta os resultados da PERMANOVA pareada (pos-hoc).

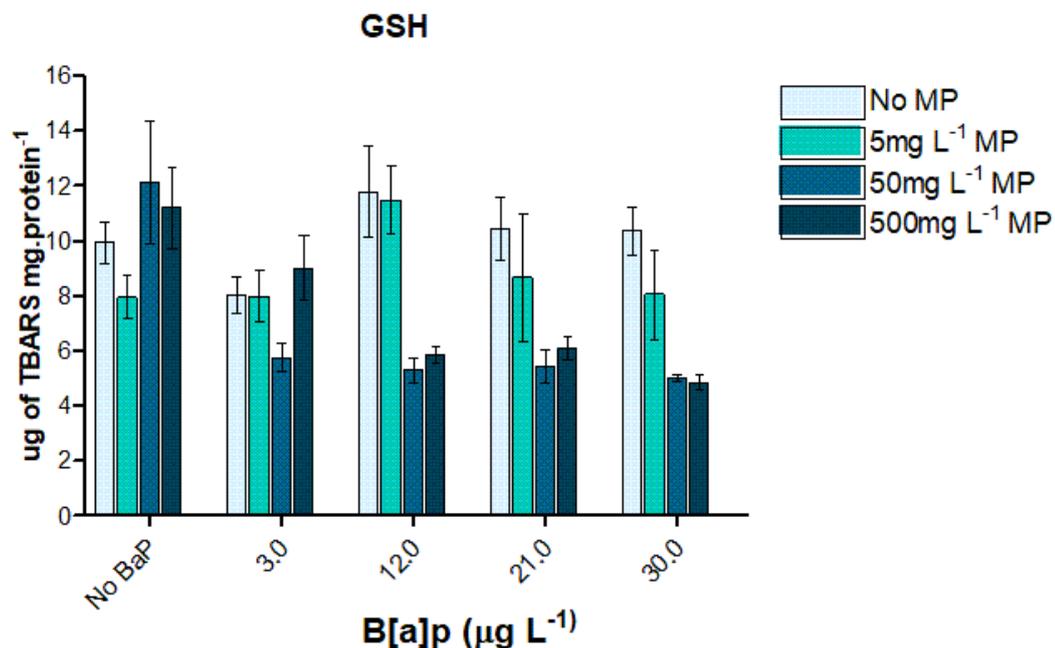


Figura 7. Média e desvio padrão dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) após 7 dias de exposição.

Tabela 6. Resultados da PERMANOVA baseados no efeito da exposição conjunta de BaP e MP na glutathiona reduzida (GSH) das brânquiasbrânquias de *Crassostrea gasar*. df = graus de liberdade; MS = quadrados médios; P(perm) = valor-p permutacional; P(MC) = valor-p Monte Carlo. Valores-p significativos estão marcados em negrito. BaP: 3, 12, 21 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$; MP: 5, 50, 500 mg L^{-1}

Main Test	df	MS	Pseudo-F	P(Perm)	P(MC)
BaP	4	182,79	8,1482	0,001	0,001

MP	3	232,86	10,38	0,001	0,001
Interação BaP x MP	12	43,568	1,9421	0,037	0,043

Tabela 7. Resultados da PERMANOVA pareada (pos-hoc) comparando os níveis de um fator dentro de cada nível do outro fator para os dados de glutatona reduzida. p(MC) = p de Monte Carlo. Valores p(MC) significativos estão marcados em negrito.

Factor 1	Comparison of levels	Factor 2	t	Unique perms	p(MC)
Within level '0' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	2	741	0,1
	0 vs. 12.0	BaP	1	903	0,202
	0 vs. 21.0	BaP	1	754	0,197
	0 vs. 30.0	BaP	2	921	0,133
	3.0 vs. 12.0	BaP	2,005	919	0,056
	3.0 vs. 21.0	BaP	2	780	0,092
	3.0 vs. 30.0	BaP	2	921	0,063
	12.0 vs. 21.0	BaP	1	931	0,537
	12.0 vs. 30.0	BaP	1	915	0,465
	21.0 vs. 30.0	BaP	0	920	0,957
Within level '5' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	0	916	0,971
	0 vs. 12.0	BaP	2	928	0,03
	0 vs. 21.0	BaP	1	927	0,348
	0 vs. 30.0	BaP	0,07067 2	849	0,941
	3.0 vs. 12.0	BaP	2	929	0,047
	3.0 vs. 21.0	BaP	1	761	0,383
	3.0 vs. 30.0	BaP	0	764	0,97
	12.0 vs. 21.0	BaP	2,9991	921	0,012
	12.0 vs. 30.0	BaP	2	837	0,123
	21.0 vs. 30.0	BaP	1	760	0,483
Within level '50' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	3	924	0,015
	0 vs. 12.0	BaP	3	924	0,013
	0 vs. 21.0	BaP	3,2263	921	0,007
	0 vs. 30.0	BaP	2,7424	832	0,019
	3.0 vs. 12.0	BaP	0,68571	915	0,503
	3.0 vs. 21.0	BaP	1	927	0,172
	3.0 vs. 30.0	BaP	1,2206	840	0,261
	12.0 vs. 21.0	BaP	1	921	0,49
	12.0 vs. 30.0	BaP	0,52235	843	0,608
	21.0 vs. 30.0	BaP	0,32099	851	0,728
Within level '500' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	2	925	0,054
	0 vs. 12.0	BaP	3,77	909	0,002
	0 vs. 21.0	BaP	4	939	0,002
	0 vs. 30.0	BaP	4,5293	917	0,003
	3.0 vs. 12.0	BaP	4	926	0,004
	3.0 vs. 21.0	BaP	3	925	0,014
	3.0 vs. 30.0	BaP	5,4281	927	0,001
	12.0 vs. 21.0	BaP	0	926	0,686

Factor 1	Comparison of levels	Factor 2	t	Unique perms	p(MC)
	12.0 vs. 30.0	BaP	2,3756	936	0,033
	21.0 vs. 30.0	BaP	3	916	0,022
Within level '0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	2	909	0,069
	0 vs. 50	MP	1	939	0,226
	0 vs. 500	MP	1	756	0,209
	5 vs. 50	MP	2	903	0,101
	5 vs. 500	MP	2	929	0,06
	50 vs. 500	MP	0	924	0,738
Within level '3.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	0	746	0,977
	0 vs. 50	MP	3	929	0,023
	0 vs. 500	MP	0	903	0,956
	5 vs. 50	MP	2,1806	935	0,061
	5 vs. 500	MP	0	927	0,947
	50 vs. 500	MP	3	923	0,006
Within level '12.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	0	915	0,89
	0 vs. 50	MP	3,7975	921	0,003
	0 vs. 500	MP	4	923	0,001
	5 vs. 50	MP	5	923	0,001
	5 vs. 500	MP	4	925	0,002
	50 vs. 500	MP	1,0353	929	0,325
Within level '21.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	2,5478	766	0,031
	0 vs. 50	MP	5	917	0,001
	0 vs. 500	MP	4	924	0,001
	5 vs. 50	MP	2,2497	927	0,041
	5 vs. 500	MP	1	914	0,432
	50 vs. 500	MP	2	938	0,026
Within level '30.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	1	856	0,187
	0 vs. 50	MP	5,0696	854	0,001
	0 vs. 500	MP	5,8735	904	0,001
	5 vs. 50	MP	2	411	0,1
	5 vs. 500	MP	2	843	0,05
	50 vs. 500	MP	0,53099	837	0,612

A análise PERMDISP revelou que a variância entre os tratamentos com BaP é homogênea; no entanto, os tratamentos com MP apresentaram heterogeneidade ($F = 5,8752$, $p(\text{perm}) = 0,002$). A partir dos resultados apresentados no gráfico, conclui-se que a heterogeneidade das amostras não compromete os resultados da PERMANOVA.

A análise estatística (PERMANOVA) indicou efeitos significativos ($p < 0,05$) tanto dos fatores MP quanto BaP, bem como uma interação significativa entre eles.

Todos os tratamentos do BaP e MP mostraram diferença significativa em relação ao controle.

Na interação entre os contaminantes, nos tratamentos com BaP e sem MP, apenas a menor concentração ($3 \mu\text{g L}^{-1}$ de BaP) apresentou efeito significativo em relação ao controle. Na concentração ambiental de MP, só tratamento com $12 \mu\text{g L}^{-1}$ de BaP mostrou efeito significativo, assim como observado para GPx e GST.

Nos tratamentos com 50 mg L^{-1} de MP, todas concentrações de BaP diferiram estatisticamente do controle. Assim como observado na GST, uma diminuição da atividade da GSH com o aumento da concentração de BaP. A mesma tendência é observada nos tratamentos com 500 mg L^{-1} de MP.

3.3.4. LPO

Os resultados dos níveis de peroxidação lipídica (LPO) sobre as brânquias de *Crassostrea gasar* expressos na **Figura 8**. A **Tabela 8** apresenta o resumo das análises estatísticas e a **Tabela 9** apresenta os resultados da PERMANOVA pareada (pos-hoc).

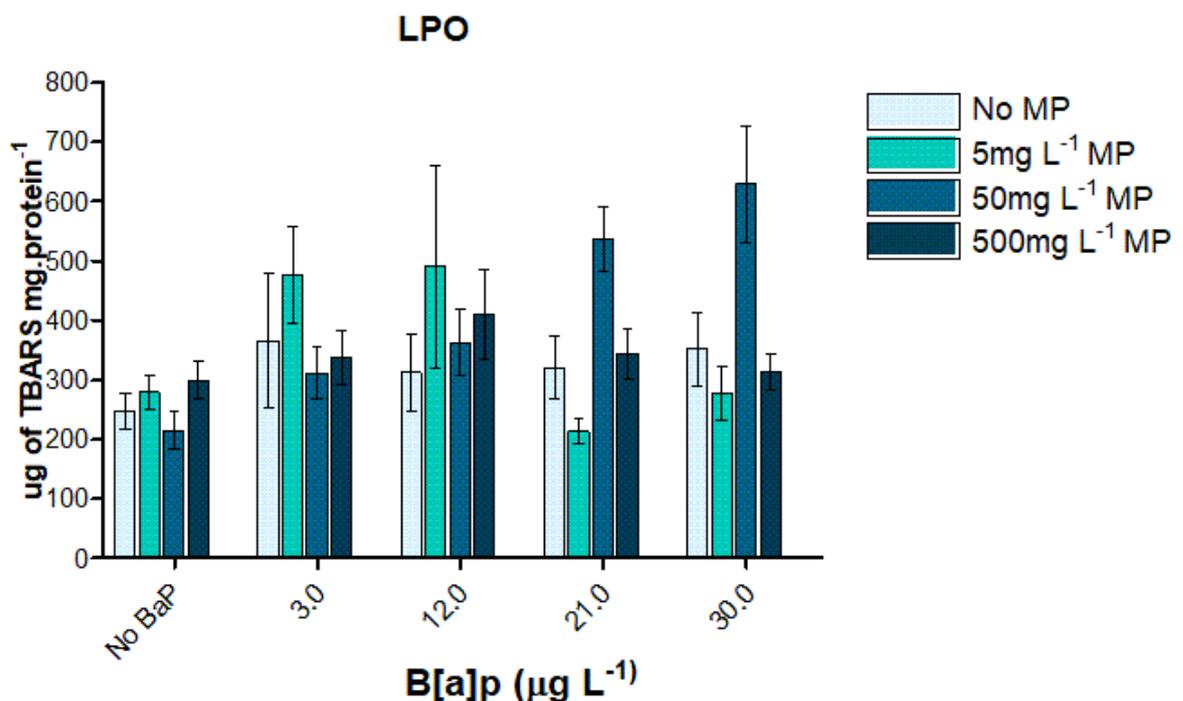


Figura 8. Média e desvio padrão dos níveis de peroxidação lipídica (LPO) após 7 dias de exposição.

Tabela 8. Resultados da PERMANOVA baseados no efeito da exposição conjunta de BaP e MP na peroxidação lipídica (LPO) das brânquiasbrânquias de *Crassostrea gasar*. df = graus de liberdade; MS = quadrados médios; P(perm) = valor-p permutacional; P(MC) = valor-p Monte Carlo. Valores-p significativos estão marcados em negrito. BaP: 3, 12, 21 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$; MP: 5, 50, 500 mg L^{-1}

Main Test	df	MS	Pseudo-F	P(Perm)	P(MC)
BaP	4	3,28E+05	4,0151	0,002	0,005
MP	3	2,73E+05	4,4597	0,004	0,006
Interação BaP x MP	12	9,56E+05	3,906	0,001	0,001

Tabela 9. Resultados da PERMANOVA pareada (pos-hoc) comparando os níveis de um fator dentro de cada nível do outro fator para os dados de peroxidação líidica. p(MC) = p de Monte Carlo. Valores p(MC) significativos estão marcados em negrito.

Factor 1	Comparison of levels	Factor 2	t	Unique perms	p(MC)
Within level '0' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	1	760	0,372
	0 vs. 12.0	BaP	1	922	0,259
	0 vs. 21.0	BaP	1	747	0,229
	0 vs. 30.0	BaP	2	912	0,116
	3.0 vs. 12.0	BaP	0,52165	936	0,598
	3.0 vs. 21.0	BaP	1	754	0,52
	3.0 vs. 30.0	BaP	1	936	0,296
	12.0 vs. 21.0	BaP	0	920	0,938
	12.0 vs. 30.0	BaP	0	930	0,637
	21.0 vs. 30.0	BaP	0	919	0,674
Within level '5' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	2	922	0,029
	0 vs. 12.0	BaP	1	922	0,327
	0 vs. 21.0	BaP	2	923	0,088
	0 vs. 30.0	BaP	0,026468	846	0,979
	3.0 vs. 12.0	BaP	1	910	0,245
	3.0 vs. 21.0	BaP	3	755	0,01
	3.0 vs. 30.0	BaP	2	768	0,084
	12.0 vs. 21.0	BaP	1,9614	917	0,057
	12.0 vs. 30.0	BaP	1	860	0,37
	21.0 vs. 30.0	BaP	1	751	0,219
Within level '50' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	2	927	0,094
	0 vs. 12.0	BaP	2	916	0,035
	0 vs. 21.0	BaP	5,1952	922	0,001
	0 vs. 30.0	BaP	4,5876	863	0,001
	3.0 vs. 12.0	BaP	0,71713	911	0,495
	3.0 vs. 21.0	BaP	3	915	0,009
	3.0 vs. 30.0	BaP	3,2836	834	0,005
	12.0 vs. 21.0	BaP	2	922	0,039
	12.0 vs. 30.0	BaP	2,5335	846	0,029
	21.0 vs. 30.0	BaP	0,89058	856	0,367
Within level '500' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	0	923	0,887

Factor 1	Comparison of levels	Factor 2	t	Unique perms	p(MC)
	0 vs. 12.0	BaP	2,0638	928	0,062
	0 vs. 21.0	BaP	1	921	0,406
	0 vs. 30.0	BaP	0,3401	918	0,753
	3.0 vs. 12.0	BaP	2	916	0,085
	3.0 vs. 21.0	BaP	1	937	0,555
	3.0 vs. 30.0	BaP	0,12593	915	0,9
	12.0 vs. 21.0	BaP	1	923	0,161
	12.0 vs. 30.0	BaP	1,9566	930	0,062
	21.0 vs. 30.0	BaP	1	935	0,544
Within level '0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	1	936	0,271
	0 vs. 50	MP	0	928	0,854
	0 vs. 500	MP	1	775	0,18
	5 vs. 50	MP	2	925	0,156
	5 vs. 500	MP	0	926	0,622
	50 vs. 500	MP	2	935	0,064
Within level '3.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	2	749	0,039
	0 vs. 50	MP	1	913	0,524
	0 vs. 500	MP	1	934	0,579
	5 vs. 50	MP	1,8487	917	0,085
	5 vs. 500	MP	2	923	0,081
	50 vs. 500	MP	0	937	0,941
Within level '12.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	0	925	0,669
	0 vs. 50	MP	0,58597	927	0,555
	0 vs. 500	MP	2	927	0,137
	5 vs. 50	MP	0	930	0,902
	5 vs. 500	MP	1	899	0,297
	50 vs. 500	MP	1,0373	935	0,3
Within level '21.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	1,6514	772	0,146
	0 vs. 50	MP	3	915	0,018
	0 vs. 500	MP	0	909	0,723
	5 vs. 50	MP	5,3305	918	0,001
	5 vs. 500	MP	3	922	0,016
	50 vs. 500	MP	3	930	0,01
Within level '30.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	1	838	0,375
	0 vs. 50	MP	2,52	849	0,026
	0 vs. 500	MP	0,55494	926	0,587
	5 vs. 50	MP	3	397	0,013
	5 vs. 500	MP	1	842	0,519
	50 vs. 500	MP	3,4988	856	0,006

A análise PERMDISP revelou que a variância entre os tratamentos com MP é homogênea; no entanto, os tratamentos com BaP apresentaram heterogeneidade ($F = 2,5955$, $p(\text{perm}) = 0,03$). A partir dos resultados apresentados no gráfico, conclui-

se que a heterogeneidade das amostras não compromete os resultados da PERMANOVA.

A análise estatística (PERMANOVA) indicou efeitos significativos ($p < 0,05$) tanto dos fatores MP quanto BaP, bem como uma interação significativa entre eles. Todos os tratamentos do BaP e MP mostraram diferença significativa em relação ao controle.

Na interação entre os contaminantes, nos tratamentos com BaP e sem MP nenhuma concentração apresentou efeito significativo em relação ao controle. Na concentração ambiental de MP, só tratamento com $3 \mu\text{g L}^{-1}$ de BaP mostrou efeito significativo. Nos tratamentos com 50 mg L^{-1} de MP, apenas a menor concentração de BaP não apresentou efeito significativo em relação ao controle. Nos tratamentos com a maior concentração de microplástico (500 mg L^{-1} de MP), nenhuma concentração de BaP apresentou diferença significativa.

3.3.5. Dano ao DNA

Os resultados dos níveis de dano ao DNA sobre as brânquias de *Crassostrea gasar* expressos na **Figura 9**. A **Tabela 10** apresenta o resumo das análises estatísticas e a **Tabela 11** apresenta os resultados da PERMANOVA pareada (post-hoc).

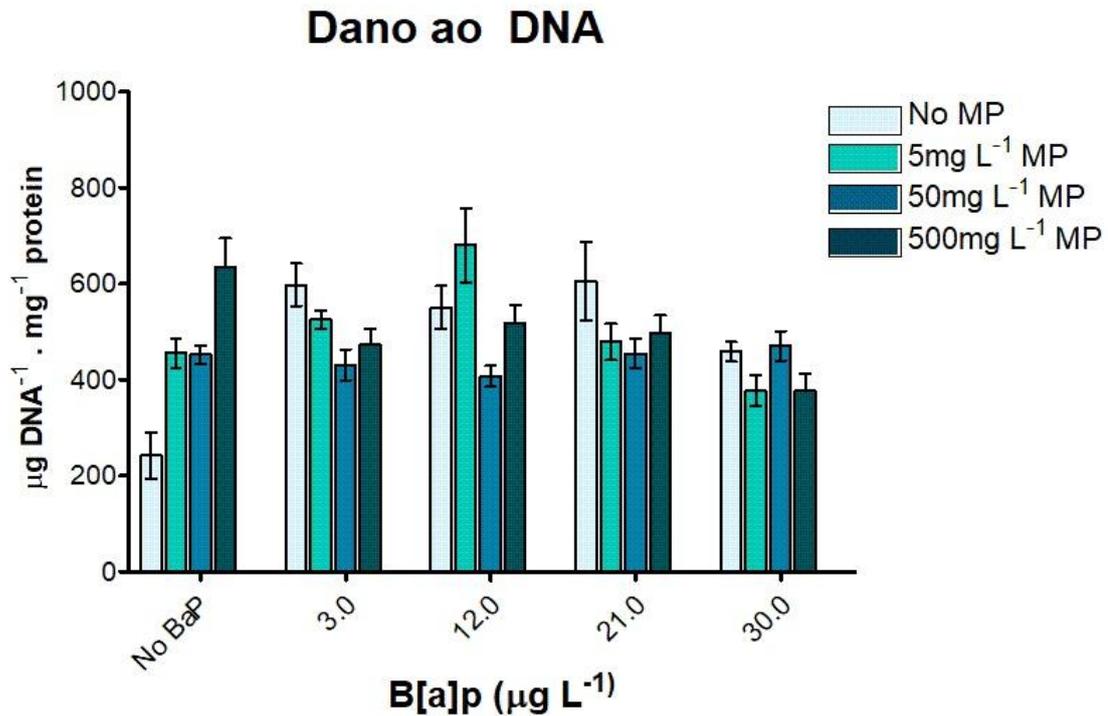


Figura 9. Média e desvio padrão dos níveis de dano ao DNA após 7 dias de exposição.

Tabela 10. Resultados da PERMANOVA baseados no efeito da exposição conjunta de BaP e MP nos níveis de dano ao DNA nas brânquias de *Crassostrea gasar*. df = graus de liberdade; MS = quadrados médios; P(perm) = valor-p permutacional; P(MC) = valor-p Monte Carlo. Valores-p significativos estão marcados em negrito. BaP: 3, 12, 21 e 30 µg L⁻¹; MP: 5, 50, 500 mg L⁻¹.

Main Test	df	MS	Pseudo-F	P(Perm)	P(MC)
BaP	4	2,09E+05	4,3914	0,002	0,002
MP	3	1,39E+05	3,889	0,018	0,010
Interação BaP x MP	12	5,79E+05	4,0417	0,001	0,001

Tabela 11. Resultados da PERMANOVA pareada (pos-hoc) comparando os níveis de um fator dentro de cada nível do outro fator para os dados de Dano ao DNA. p(MC) = p de Monte Carlo. Valores p(MC) significativos estão marcados em negrito.

Factor 1	Comparison of levels	Factor 2	t	Unique perms	p(MC)
Within level '0' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	4	662	0,001
	0 vs. 12.0	BaP	2	920	0,037
	0 vs. 21.0	BaP	2	727	0,092
	0 vs. 30.0	BaP	1	931	0,196
	3.0 vs. 12.0	BaP	0,8228	902	0,435
	3.0 vs. 21.0	BaP	0	658	0,994
	3.0 vs. 30.0	BaP	4	881	0,006
	12.0 vs. 21.0	BaP	0	930	0,63
	12.0 vs. 30.0	BaP	2	919	0,079
	21.0 vs. 30.0	BaP	2	934	0,131

Factor 1	Comparison of levels	Factor 2	t	Unique perms	p(MC)
Within level '5' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	2	880	0,065
	0 vs. 12.0	BaP	3	913	0,012
	0 vs. 21.0	BaP	0	920	0,648
	0 vs. 30.0	BaP	1,7217	854	0,106
	3.0 vs. 12.0	BaP	2	894	0,079
	3.0 vs. 21.0	BaP	1	677	0,274
	3.0 vs. 30.0	BaP	5	658	0,001
	12.0 vs. 21.0	BaP	2,4007	927	0,029
	12.0 vs. 30.0	BaP	4	859	0,005
	21.0 vs. 30.0	BaP	2	763	0,082
Within level '50' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	1	933	0,606
	0 vs. 12.0	BaP	2	924	0,134
	0 vs. 21.0	BaP	0,10282	935	0,903
	0 vs. 30.0	BaP	0,82184	851	0,428
	3.0 vs. 12.0	BaP	0,59798	944	0,561
	3.0 vs. 21.0	BaP	1	926	0,608
	3.0 vs. 30.0	BaP	1,01	856	0,344
	12.0 vs. 21.0	BaP	1	915	0,239
	12.0 vs. 30.0	BaP	1,977	861	0,055
	21.0 vs. 30.0	BaP	0,48312	840	0,642
Within level '500' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	2	904	0,03
	0 vs. 12.0	BaP	1,7651	913	0,101
	0 vs. 21.0	BaP	2	912	0,061
	0 vs. 30.0	BaP	3,7802	931	0,002
	3.0 vs. 12.0	BaP	1	937	0,363
	3.0 vs. 21.0	BaP	0	936	0,651
	3.0 vs. 30.0	BaP	2,0994	926	0,062
	12.0 vs. 21.0	BaP	0	932	0,732
	12.0 vs. 30.0	BaP	2,8566	922	0,018
	21.0 vs. 30.0	BaP	2	918	0,035
Within level '0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	1	922	0,445
	0 vs. 50	MP	1	922	0,309
	0 vs. 500	MP	3	773	0,003
	5 vs. 50	MP	0	929	0,915
	5 vs. 500	MP	3	916	0,014
	50 vs. 500	MP	3	918	0,016
Within level '3.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	2	562	0,101
	0 vs. 50	MP	3	890	0,008
	0 vs. 500	MP	3	903	0,021
	5 vs. 50	MP	2,5861	881	0,025
	5 vs. 500	MP	2	904	0,141
	50 vs. 500	MP	1	917	0,324
Within level '12.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	2	920	0,176
	0 vs. 50	MP	2,8615	911	0,02
	0 vs. 500	MP	1	924	0,577

Factor 1	Comparison of levels	Factor 2	t	Unique perms	p(MC)
	5 vs. 50	MP	4	937	0,003
	5 vs. 500	MP	2	933	0,055
	50 vs. 500	MP	2,7273	922	0,01
Within level '21.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	1,1951	744	0,24
	0 vs. 50	MP	2	915	0,154
	0 vs. 500	MP	1	922	0,281
	5 vs. 50	MP	0,50215	927	0,636
	5 vs. 500	MP	0	916	0,752
	50 vs. 500	MP	1	925	0,411
Within level '30.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	2	865	0,029
	0 vs. 50	MP	0,54483	854	0,608
	0 vs. 500	MP	2,0359	911	0,074
	5 vs. 50	MP	2	409	0,034
	5 vs. 500	MP	0	845	0,94
	50 vs. 500	MP	2,0691	854	0,066

A análise PERMDISP revelou que a variância entre os tratamentos com MP e BaP é homogênea. A PERMANOVA demonstrou efeitos significativos dos fatores MP e BaP, bem como uma interação significativa entre eles.

Apenas o tratamento com 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BaP, apresentou diferença estatística em relação ao controle. Com relação ao MP, apenas o tratamento 50 mg L^{-1} apresentou diferença significativa em relação ao controle.

Na interação entre os contaminantes, os tratamentos com 3 (concentração ambiental) e 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BaP e sem MP apresentaram efeito significativo em relação ao controle. Na concentração ambiental de MP, só tratamento com 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BaP mostrou diferença significativa. Apesar de não apresentar diferença significativa pelos critérios utilizados ($P(\text{MC}) < 0,05$), o tratamento com 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BaP apresentou relevante diferença estatística ($P(\text{MC}) = 0,065$), indicando efeito.

Nos tratamentos com 50 mg L^{-1} de MP, todas concentrações de BaP não diferiram estatisticamente do controle. Já no tratamento com 500 mg L^{-1} de MP, as concentrações 3 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BaP apresentaram diferença significativa.

3.3.6. Vermelho Neutro

Os resultados do tempo de retenção de vermelho neutro (TRVN) na hemolinfa das Ostras estão expressos na **Figura 9**. A **Tabela 12** apresenta o resumo das

análises estatísticas e a **Tabela 13** apresenta os resultados da PERMANOVA pareada (pos-hoc).

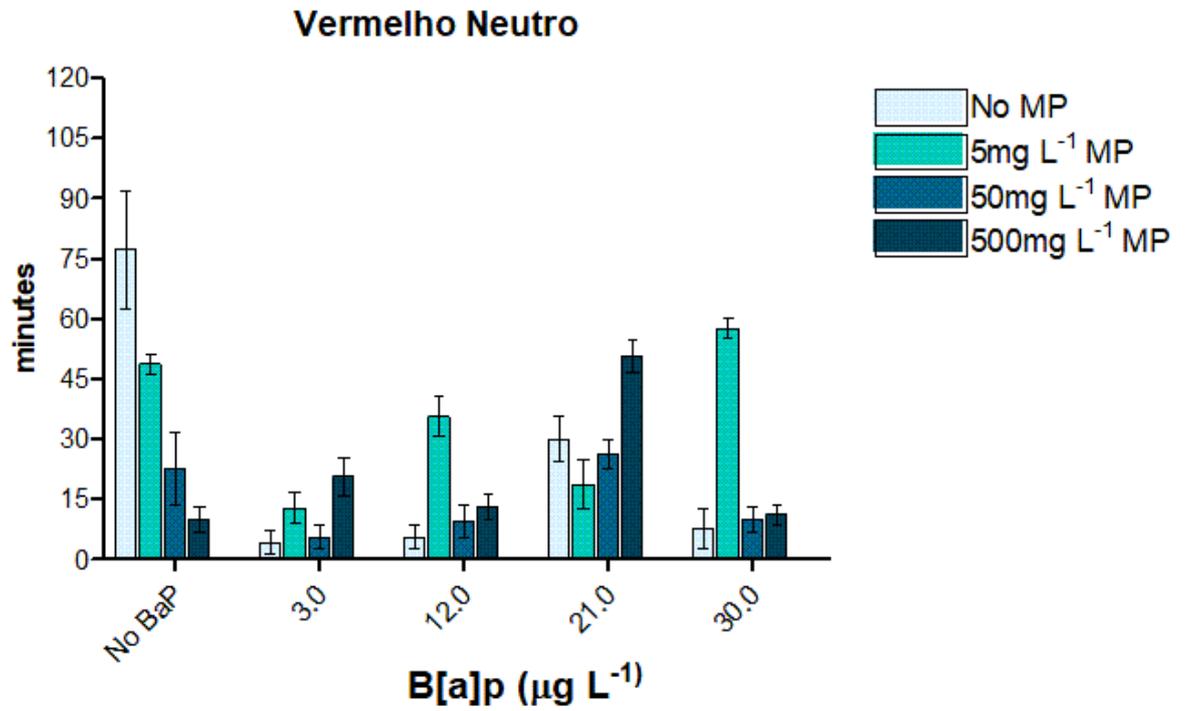


Figura 9. Média e desvio padrão do Tempo de Retenção do Vermelho Neutro (TRVN) após 7 dias de exposição.

Tabela 12. Resultados da PERMANOVA baseados no efeito da exposição conjunta de BaP e MP no TRVN dos hemócitos de *Crassostrea gasar*. df = graus de liberdade; MS = quadrados médios; P(perm) = valor-p permutacional; P(MC) = valor-p Monte Carlo. Valores-p significativos estão marcados em negrito. BaP: 3, 12, 21 e 30 µg L⁻¹; MP: 5, 50, 500 mg L⁻¹.

Main Test	df	MS	Pseudo-F	P(Perm)	P(MC)
BaP	4	1,66E+04	19,244	0,001	0,001
MP	3	8,33E+03	12,879	0,001	0,001
Interação BaP x MP	12	2,99E+04	11,564	0,001	0,001

Tabela 13. Resultados da PERMANOVA pareada (pos-hoc) comparando os níveis de um fator dentro de cada nível do outro fator para os dados de Tempo de Retenção do Vermelho Neutro. p(MC) = p de Monte Carlo. Valores p(MC) significativos estão marcados em negrito.

Factor 1	Comparison of levels	Factor 2	t	Unique perms	p(MC)
Within level '0' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	5	17	0,001
	0 vs. 12.0	BaP	5	32	0,001
	0 vs. 21.0	BaP	3	14	0,01
	0 vs. 30.0	BaP	4	30	0,004
	3.0 vs. 12.0	BaP	0,34222	6	0,711

Factor 1	Comparison of levels	Factor 2	t	Unique perms	p(MC)
	3.0 vs. 21.0	BaP	4	7	0,002
	3.0 vs. 30.0	BaP	2	10	0,065
	12.0 vs. 21.0	BaP	4	13	0,002
	12.0 vs. 30.0	BaP	2	6	0,072
	21.0 vs. 30.0	BaP	1	14	0,234
Within level '5' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	8	16	0,001
	0 vs. 12.0	BaP	2	5	0,034
	0 vs. 21.0	BaP	4	14	0,004
	0 vs. 30.0	BaP	2,4495	4	0,034
	3.0 vs. 12.0	BaP	4	13	0,002
	3.0 vs. 21.0	BaP	1	5	0,311
	3.0 vs. 30.0	BaP	9	19	0,001
	12.0 vs. 21.0	BaP	1,7886	13	0,084
	12.0 vs. 30.0	BaP	4	7	0,005
	21.0 vs. 30.0	BaP	5	16	0,001
Within level '50' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	2	7	0,085
	0 vs. 12.0	BaP	1	8	0,206
	0 vs. 21.0	BaP	0,38592	8	0,714
	0 vs. 30.0	BaP	1,1573	13	0,28
	3.0 vs. 12.0	BaP	0,78019	5	0,463
	3.0 vs. 21.0	BaP	4	6	0,002
	3.0 vs. 30.0	BaP	1,0445	4	0,302
	12.0 vs. 21.0	BaP	3	6	0,007
	12.0 vs. 30.0	BaP	0,11711	7	0,907
	21.0 vs. 30.0	BaP	3,1607	9	0,004
Within level '500' of factor 'MP'	0 vs. 3.0	BaP	2	8	0,109
	0 vs. 12.0	BaP	0,53971	6	0,614
	0 vs. 21.0	BaP	8	18	0,001
	0 vs. 30.0	BaP	0,14539	5	0,877
	3.0 vs. 12.0	BaP	1	5	0,205
	3.0 vs. 21.0	BaP	5	9	0,002
	3.0 vs. 30.0	BaP	1,7222	4	0,087
	12.0 vs. 21.0	BaP	7	11	0,001
	12.0 vs. 30.0	BaP	0,44721	3	0,67
	21.0 vs. 30.0	BaP	8	11	0,001
Within level '0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	2	20	0,075
	0 vs. 50	MP	3	31	0,01
	0 vs. 500	MP	4	15	0,001
	5 vs. 50	MP	3	10	0,015
	5 vs. 500	MP	10	14	0,001
	50 vs. 500	MP	1	13	0,293
Within level '3.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	2	4	0,103
	0 vs. 50	MP	0	6	0,732
	0 vs. 500	MP	3	11	0,019
	5 vs. 50	MP	1,5441	8	0,134

Factor 1	Comparison of levels	Factor 2	t	Unique perms	p(MC)
	5 vs. 500	MP	1	9	0,258
	50 vs. 500	MP	3	6	0,018
Within level '12.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	5	8	0,001
	0 vs. 50	MP	0,78019	5	0,453
	0 vs. 500	MP	2	4	0,114
	5 vs. 50	MP	4	8	0,004
	5 vs. 500	MP	4	7	0,004
	50 vs. 500	MP	0,72008	5	0,458
Within level '21.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	1	7	0,353
	0 vs. 50	MP	1	10	0,572
	0 vs. 500	MP	3	13	0,015
	5 vs. 50	MP	0,66868	10	0,518
	5 vs. 500	MP	4	16	0,003
	50 vs. 500	MP	4	7	0,001
Within level '30.0' of factor 'BaP'	0 vs. 5	MP	5	19	0,001
	0 vs. 50	MP	1,1368	5	0,253
	0 vs. 500	MP	1,1282	5	0,275
	5 vs. 50	MP	12	9	0,001
	5 vs. 500	MP	13	17	0,001
	50 vs. 500	MP	0,31755	5	0,744

A análise PERMDISP revelou que a variância entre os tratamentos com microplásticos (MP) é homogênea; no entanto, os tratamentos com BaP apresentaram heterogeneidade ($F = 6,8045$, $p(\text{perm}) = 0,001$). A partir dos resultados apresentados no gráfico, conclui-se que a heterogeneidade das amostras não compromete os resultados da PERMANOVA.

A análise estatística (PERMANOVA) indicou efeitos significativos ($p < 0,005$) tanto dos fatores MP quanto BaP, bem como uma interação significativa entre eles. Ambos os fatores influenciaram o tempo de retenção do corante, com efeitos dependentes um do outro.

Com exceção do tratamento com $21 \mu\text{g L}^{-1}$ de BaP, todas as concentrações testadas deste contaminante mostraram diferenças estatísticas em relação ao controle, indicando um efeito significativo. Quando considerados os efeitos das micropartículas, estatisticamente, apenas os tratamentos com 50 mg L^{-1} de MP apresentaram diferença significativa em comparação ao controle; no entanto, observou-se um efeito sutil nos tratamentos com 5 mg L^{-1} de MP. Na interação entre os dois contaminantes, até os tratamentos com 50 mg L^{-1} de MP mostraram uma

diminuição do efeito do BaP paralela ao aumento da concentração de MP, evidenciada pelo aumento do p-valor (MC).

3.3.7. Análise Integrada

3.3.7.1. Análise Fatorial com extração por Análise de Componentes Principais

Com base na análise fatorial com extração por análise de componentes principais a matriz de dados foi sintetizada em 2 fatores, representando 71,5% da variância total dos dados (**Tabela 14**). O fator 1 foi responsável por 48,6% das variâncias, destacando a relação positiva entre GST, GPx, GSH e DNA, essa associação foi observada majoritariamente nos tratamentos contendo MPs de forma isolada (50 e 50 mg L⁻¹) BaP isoladamente (12, 21 e 30 µg L⁻¹) (**Tabela 15**). O fator 2 representou 22,9% das variâncias e apresentou uma relação negativa entre LPO e TRCVN, ou seja, maiores concentrações de LPO e menores tempos de TRCVN. Estas associações foram observadas nos tratamentos contendo maiores concentrações de MPs (500 mg L⁻¹), menores concentrações de BaP isoladas (3 e 12 µg L⁻¹) e também nos organismos expostos aos dois contaminantes de forma associada (5 mg L⁻¹ de MP e 3 e 12 µg L⁻¹ de BAP 50 mg L⁻¹ de MP e 3 e 12 µg L⁻¹ de BAP e 500 mg L⁻¹ de MP e 12 µg L⁻¹ de BAP) (**Tabela 15**)

Tabela 14. Loadings (coeficientes de correlação) após rotação varimax para os dois fatores obtidos na PCA (a variância dos fatores principais é dada em porcentagem da variância total na matriz de dados original). Apenas as variáveis com loadings >0,7 (em negrito) foram considerados componentes dos fatores

Análise Fatorial		
	Fator 1	Fator 2
Variância (%)	48,62158	22,90004
GSH	0,901200	0,241416
GPX	0,751259	0,145197
GST	0,925193	0,103751
LPO	-0,355933	-0,701686
Vermelho Neutro	-0,034268	-0,809916
DNA	0,695810	-0,456392

Tabela 15. Factor scores estimados para cada um dos tratamentos para o centroide de todos os casos dos dados originais

BaP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	MP (mg L^{-1})	Factor	Factor
0	0	-0,405	2,288
0	5	-0,446	1,139
0	50	0,879	0,899
0	500	1,255	-0,759
3	0	-0,066	-0,797
12	0	1,619	-0,474
21	0	1,301	-0,115
30	0	1,004	0,091
3	5	-0,142	-1,102
12	5	1,662	-0,369
21	5	-0,023	0,541
30	5	-0,365	1,789
3	50	-0,525	-0,212
12	50	-0,819	-0,241
21	50	-1,078	-0,755
30	50	-1,231	-1,783
3	500	0,282	0,167
12	500	-0,499	-1,018
21	500	-0,426	0,665
30	500	-1,978	0,048

3.3.7.2. IBR

Os resultados dos biomarcadores foram integrados através do IBRv2 (Mattos *et al.*, 2023) e são apresentados na **Tabela 13** e na **Figura 10**. Os gráficos de radar estão apresentados na **Figura 11**.

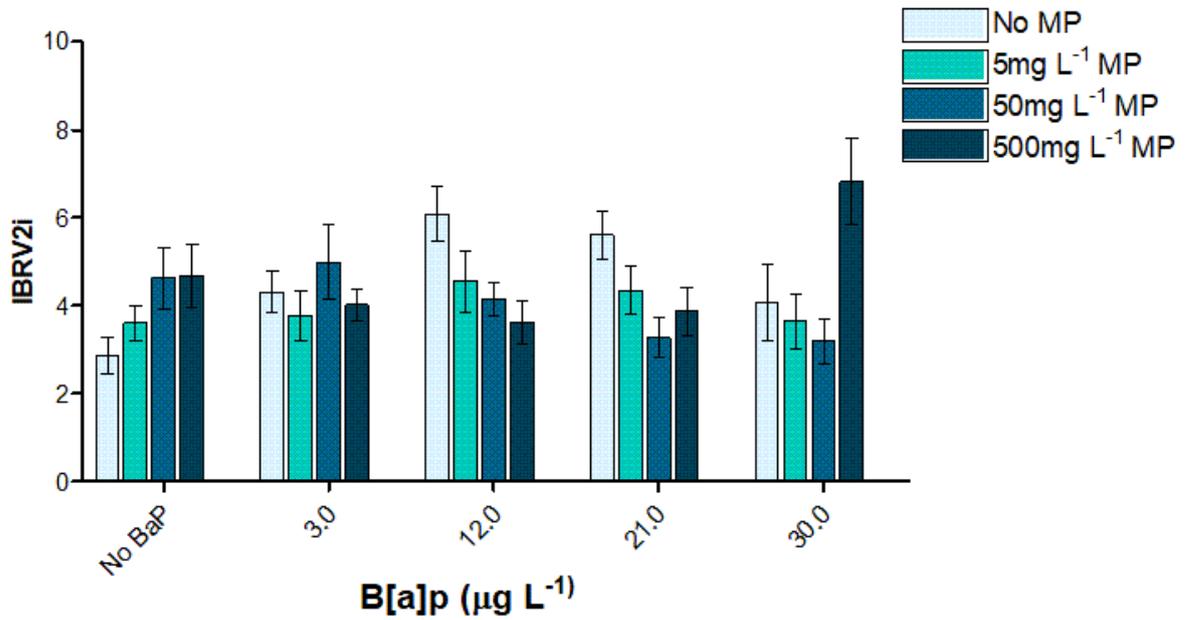


Figura 10. Média e desvio padrão do Índice de resposta integrada aprimorada de biomarcador (Mattos *et al.*, 2023).

Tabela 16. Índice de resposta integrada aprimorada de biomarcador (IBRV1), conforme proposto por Mattos *et al.* (2023).

BaP (µg L ⁻¹)	MP (mg L ⁻¹)	IBRV2 Média
0	0	2,87
0	5	3,60
0	50	4,63
0	500	4,68
3	0	4,32
12	0	6,09
21	0	5,61
30	0	4,08
3	5	3,78
12	5	4,56
21	5	4,34
30	5	3,64
3	50	4,99
12	50	4,14
21	50	3,33
30	50	3,07
3	500	4,02
12	500	3,64
21	500	3,88
30	500	6,83

Quando analisados os valores do IBRV2, é possível classificar os resultados em 4 grupos, no primeiro grupo com valores entre ~ 7 e 6 estão o tratamento contendo os valores mais elevados de BaP e MPs (30 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BaP e 500 mg L^{-1} de MP). Os gráficos da figura 11 demonstram que os principais biomarcadores que refletem essa resposta são GPX, GST, GSH e Dano em DNA, todos com valores aumentados. Esta resposta também é verificada no fator 1 da FA/PCA. Os tratamentos contendo os valores intermediários de BaP isoladamente (12 e 21 $\mu\text{g L}^{-1}$) também apresentam um padrão similar de resposta, mas com uma maior LPO.

O segundo grupo (valores ~ 5) contempla os tratamentos com maiores concentrações de MPs isoladamente (50 e 500 mg L^{-1}) e os tratamentos em mistura de 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BaP e 5 mg L^{-1} de MPs e 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BaP e 50 mg L^{-1} de MPs. Os tratamentos contendo somente MPS demonstram principalmente alterações na GSH e no TRVN, já nos demais tratamentos a GSH aumenta em conjunto com o Dano em DNA (Figura 11).

No terceiro grupo (~4) estão os valores extremos de BaP isoladamente (3 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$) e a maioria dos tratamentos contendo o BaP em associação com as MPs (principalmente nas concentrações 5 e 500 mg L^{-1} de MPs). No último grupo com valores ~ a 3 estão o tratamento controle e os tratamentos com maiores concentrações de BaP (21 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$) testados em associação a 50 mg L^{-1} de MPs.



Figura 11. Índice de respostas de biomarcadores (IBRV2) em brânquias. Cada gráfico de radar mostra os comportamentos dos biomarcadores nos tratamentos com diferentes concentrações de BaP em 7 dias de exposição.

Conforme apresentado nos gráficos de Radar (Figura 11), nos tratamentos contendo somente MPs, observa-se um aumento do Dano em DNA e menor tempo de retenção do vermelho neutro nas maiores concentrações de MP. Nos tratamentos com $3 \mu\text{g L}^{-1}$ de BaP, o tempo de retenção de vermelho neutro (TRVN), aumentou com o aumento da concentração de microplástico, entretanto, no tratamento com 500 mg L^{-1} de MP o TRVN diminuiu. Todos os tratamentos diferenciaram do controle de maneira parecida para LPO. O tratamento com 500 mg L^{-1} de MP apresentou inibição para GSH e GST e aumento da atividade para GPX.

Observando os tratamentos com $12 \mu\text{g L}^{-1}$ de BaP, nota-se uma diminuição significativa no TRVN para os tratamentos contendo BaP isoladamente e com 50 mg L^{-1} de MP também isoladamente, mas os demais tratamentos também tiveram o tempo reduzido comparado com o controle. Todos os tratamentos apresentaram indução do Dano ao DNA e da LPO em relação ao controle. O tratamento com BaP isoladamente apresentou indução da atividade GSH e da GST, enquanto o tratamento com a maior concentração de MP apresentou uma leve inibição desses biomarcadores.

Nos tratamentos com $21 \mu\text{g L}^{-1}$ de BaP, o tratamento com BaP Isoladamente apresentou diferença significativa no Dano ao DNA e na LPO em relação ao controle e aos demais tratamentos, além de aumento da atividade da GSH e GST. O tratamento com a concentração ambiental de microplástico (5 mg L^{-1} de MP) apresentou redução do TRVN, indução da GPx, GSH e LPOe inibição da GST.

Já o tratamento com a maior concentração de BaP ($30 \mu\text{g L}^{-1}$ de BaP), o tratamento com BaP isoladamente apresentou indução da da GPX e da LPO e redução do TRVN. A concentração ambiental de microplástico (5 mg L^{-1} de MP) apresentou elevação da atividade de GSH, dano ao DNA e LPO e inibição da GST e GPX.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos até o momento neste estudo demonstram que as exposições ao microplástico (MP) e ao benzo(a)pireno (BaP), tanto isoladamente quanto em conjunto, geraram uma resposta interativa entre esses contaminantes

nas brânquias dos indivíduos expostos. Estas respostas são relevantes, visto que as brânquias dos bivalves são a interface primária entre o organismo e o ambiente, sendo extremamente importantes para avaliar os efeitos e presença de contaminantes na água (JOSHY *et al.*, 2022). Além disso, as brânquias são constituídas de estruturas filamentosas e lamelares, fornecendo uma grande área de superfície para contato direto e contínuo com a água e, conseqüentemente, com contaminantes, tornando-as particularmente suscetíveis a danos induzidos por BaP (DE ALMEIDA COSTA *et al.*, 2023) e MP (BRINGER *et al.*, 2021). BRINGER *et al.* (2021) constataram que a presença de MP nas brânquias causa danos físicos e interferem nas trocas gasosas.

A exposição às diferentes concentrações de MP isolados (virgens) demonstrou o aumento do efeito com o aumento da concentração, isso foi observado na maioria dos biomarcadores avaliados. Deste modo, os dados obtidos até o momento revelam que os MP, a partir das concentrações ambientalmente relevantes (5 mg L⁻¹ de MP), já podem causar efeitos bioquímicos e celulares em *C. gasar*. REVEL *et al.* (2019) avaliaram a exposição de mexilhões azuis (*Mytilus spp.*) durante 10 dias em três concentrações de microplástico virgens (8,0E⁻⁶, 0,01 e 0,1 mg L⁻¹) e constataram presença de MP na glândula digestiva dos mexilhões, além de aumento significativo de Superóxido dismutase e catalase, nas duas menores concentrações na glândula digestiva, e na maior concentração na brânquia, além disso um aumento significativo no dano ao DNA foi observado em mexilhões expostos a 0,01 e 0,1 mg L⁻¹. BRANDTS *et al.* (2018) avaliaram a exposição de mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) a cinco concentrações de nanoplastico de poliestireno (0,005, 0,05, 0,5, 5 e 50 mg L⁻¹) por 96 horas e observaram que mesmo nas concentrações mais baixas, a partir de 0,05 mg L⁻¹, houve aumento do estado oxidativo, inibição da atividade da colinesterase na hemolinfa e redução a integridade do DNA.

De fato, REVEL *et al.* (2020) realizaram o mesmo ensaio descrito por REVEL *et al.* (2019) com a ostra *Crassostrea gigas* e verificaram a absorção dos MP pelas ostras, ainda que estes organismos tenham sido capazes de regular sua capacidade oxidante. NOBRE *et al.* (2020) também observaram alterações fisiológicas nas brânquias, glândula digestiva e hemolinfa de ostras da mesma espécie testada no presente estudo, estes autores expuseram seus organismos pelo mesmo tempo e

utilizaram concentrações de 250 mg L⁻¹ de MP, relativamente similares a concentração intermediária de MPs utilizada neste estudo.

Já, em contrapartida, e como esperado, os bivalves do presente estudo responderam de maneira diferente ao MP virgem que os invertebrados marinhos testados por DE MELLO SOUZA *et al.* (2023). Esses autores avaliaram o desenvolvimento embriolarval de ouriços do mar e a exposição de misidáceos em concentrações de 5 e 50 mg L⁻¹ MP e para estas espécies não se observou efeito do microplástico virgem. Muito provavelmente estas diferentes respostas biológicas podem estar associadas a maior capacidade de filtração dos bivalves que favorece um maior contato com os produtos lixiviados destas micropartículas e devido ao maior estresse mecânico destas partículas provocado pelo atrito com as brânquias.

Os resultados dos estudos pretéritos com microplásticos virgens juntos aos resultados desenvolvidos neste estudo demonstram que a concentração de efeito do microplástico para bivalves adultos está na ordem de mg L⁻¹ e que a forma de exposição do organismo ao microplástico influencia diretamente nos efeitos avaliados, já que organismos filtradores como ostras e mexilhões parecem ser mais sensíveis que o zooplâncton. É importante destacar que, apesar de que a concentração considerada ambientalmente relevante de MP (5 mg L⁻¹) seja um pouco mais alta que as concentrações comumente reportadas na maioria dos ambientes costeiros (DE MELLO SOUZA *et al.*, 2023) ela está na mesma ordem de grandeza de concentrações já encontradas no ambiente marinho (MOORE *et al.*, 2001; SUSSARELLU *et al.*, 2016; GILFILLAN *et al.*, 2009).

Além de causar efeito isoladamente, os microplásticos tem a capacidade de interagir e adsorver diversos outros contaminantes químicos presentes no ambiente aquático, principalmente substâncias hidrofóbicas (RIOS *et al.*, 2007; COLE *et al.*, 2013; ROCHMAN *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2022). Diversos trabalhos já evidenciaram a ocorrência de BaP adsorvido em MP (ABOUDA *et al.*, 2022) assim como efeitos adversos da exposição isolada e conjunta em diferentes espécies, como misídeos (DE MELLO SOUZA *et al.*, 2023), ouriço do mar (DE MELLO SOUZA *et al.*, 2023), poliquetas (BANNI *et al.*, 2009), peixes (BATEL *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2023) e mexilhões (GONZALES-SOTO *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2023) sendo estes achados corroborados pelo presente estudo.

Diferente deste estudo, trabalhos pretéritos utilizaram diferentes concentrações de BaP na exposição conjunta a microplástico, entretanto, a maioria dos experimentos é realizada com apenas uma concentração (GONZALES-SOTO *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2023; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2024), dificultando a visualização da interação desses dois contaminantes. As concentrações nominais de BaP utilizadas no presente estudo foram selecionadas com base em concentrações já encontradas áreas estuarinas, tornando-as ambientalmente relevantes e reforçando o caráter aplicado dos resultados encontrados. Foram encontrados níveis de BaP de $10,3 \mu\text{g L}^{-1}$ e $37,8 \mu\text{g L}^{-1}$ nos estuários de Santos e São Vicente, respectivamente (POLAKIEWICZ, 2008). Outros estudos realizaram exposição conjunta de MP e BaP com concentrações próximas às encontradas nos ambientes estuarinos, OLIVEIRA *et al.* (2013), constataram que o MP retardou a morte induzida pelo BaP em juvenis de *P. microps*; KIM *et al.* (2023), verificaram que a exposição conjunta aumentou o dano no DNA do peixe *Carassius auratus*; DE MELLO SOUZA *et al.* (2023) descreveram que as concentrações de MP diminuíram o efeito ecotoxicológico do BaP nas larvas de ouriço do mar e em misídaceos; já MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.* (2024) relataram que a exposição conjunta regulou positivamente biomarcadores no fígado do zebra fish (*Danio rerio*).

Neste estudo se percebe que o BaP sozinho causou efeito aos organismos, e, em algumas situações, seus efeitos são acentuados na presença dos MPs. ABOUDA *et al.* (2022) também constataram efeito sinérgico nocivo da exposição conjunta de MP e BaP para poliquetas com concentrações de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ de BaP e 1mg kg^{-1} de MP. KIM *et al.* (2023) observaram efeito sinérgico medido como dano em DNA em peixes, na exposição a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de BaP e 10 e 100 partículas L^{-1} de MP. BEBIANNO *et al.* (2022) relataram efeito combinado da exposição conjunta a saúde de amêijoas, enquanto OLIVEIRA *et al.* (2013) constataram que a presença de MP aumentou a concentração de metabólitos de BaP na bile de peixes, retardando a morte induzida pelo BaP em juvenis, em diferentes concentrações de BaP (20 e $200 \mu\text{g L}^{-1}$) e MP (0 , $18,4$ e $184 \mu\text{g L}^{-1}$).

Já nos organismos testados por DE MELLO SOUZA *et al.* (2023), larva de ouriço-do-mar e misídáceo, observou-se que as concentrações de MP reduzem a toxicidade do BaP. Os estudos pretéritos descritos demonstram a diversidade de respostas e efeitos causados pela exposição conjunta de MP e BaP, reforçando a

complexidade do tema e a necessidade de pesquisas com diferentes organismos para esses contaminantes.

Com relação às respostas dos biomarcadores, as atividades da GPx e da GST, assim como a GSH apresentaram tendências muito similares. Pode-se constatar dois padrões: primeiro, o tratamento contendo a menor concentração de BaP ($3 \mu\text{g L}^{-1}$) apresentou uma indução na atividade dessas enzimas com o aumento da concentração de microplásticos (MPs). Já conforme as concentrações de BaP foram aumentadas (12, 21 e $30 \mu\text{g L}^{-1}$), observa-se uma inibição da atividade enzimática com o aumento das concentrações de MPs. A GPx desempenha um papel crucial na proteção das membranas contra danos causados pela peroxidação lipídica (LPO), visto que seu principal papel de detoxificação é a redução dos hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados, combatendo os efeitos tóxicos da LPO (JABLONSKA *et al.*, 2015). O aumento da atividade enzimática na menor concentração BaP pode indicar uma adaptação ao estresse oxidativo, enquanto a inibição das atividades nas demais concentrações pode sugerir uma redução da capacidade antioxidante (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

A GST também atua na defesa contra o dano oxidativo e os produtos peroxidativos de DNA e de lipídios (VAN DER OOST, 2003). No entanto, sua função mais relevante é a conjugação da glutationa (GSH) com xenobióticos em reações de fase II (HAYES *et al.*, 2005). Ela tem sido amplamente utilizada como biomarcador em estudos ecotoxicológicos, devido ao seu papel essencial na desintoxicação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), metabólitos reativos ao DNA e produtos de estresse oxidativo resultantes da oxidação de lipídios, ácidos nucleicos e proteínas (SCHLENK *et al.*, 2008). Dessa forma, o aumento da atividade da GST observada neste estudo pode ser alterada em resposta à exposição a contaminantes como o BaP e os MPs, devido ao aumento de radicais livres e à biotransformação desses poluentes. A biotransformação de compostos orgânicos pode levar a um desequilíbrio entre a produção de compostos pró-oxidantes e antioxidantes celulares, culminando em estresse oxidativo (ALTENBURGER *et al.*, 2003).

A GSH é um tripeptídeo, que atua em conjunto com a GPX para a proteção contra o estresse oxidativo, na detoxificação de xenobióticos e espécies reativas de oxigênio (EROS) (SILVA *et al.*, 2022). Assim como o observado na atividade da GST e da GPx, observa-se uma diminuição da concentração de GSH com o aumento da

concentração de MP conforme a concentração de BaP foi aumentada (12, 21 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Através das análises de LPO, observou-se estresse oxidativo, apenas em algumas situações; na concentração ambiental de microplástico em conjunto com as concentrações 3 e 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BaP, e nos tratamentos com 50 mg L^{-1} de MP e 21 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BaP. Indicando possível efeito sinérgico ou aditivo dos dois contaminantes em conjunto. O estresse oxidativo pode ocorrer através de reações e mecanismos diretos e indiretos de uma rede de resposta do organismo (REGOLI *et al.*, 2014). Nos demais tratamentos, não foi observado estresse oxidativo. Percebe-se uma indução de GST e GPx, além do comportamento similar da concentração de GSH,

A análise multivariada reforçou estes achados fornecendo uma abordagem mais mecanística, ressaltado que as principais respostas são observadas nas concentrações mais altas de MP e BaP e nos valores intermediários de BaP devido a associações entre a GPX, GST, GSH e Dano em DNA. De maneira geral, pode-se inferir que os mecanismos antioxidantes foram eficientes para proteger as brânquias dos indivíduos e culminaram na diminuição da peroxidação lipídica (MATTSON, 2008) e na supercompensação dos contaminantes (CALABRESE, 2010, mas os indivíduos não conseguem mitigar o dano em DNA.

O BaP é um composto orgânico e sua biotransformação é dividida em duas fases, envolvendo diversas enzimas e proteínas, para proteger o organismo contra espécies reativas de oxigênio geradas nestes processos. Entretanto, quando a capacidade de detoxificação é excedida, distúrbios como os danos no DNA podem ocorrer (VAN DEER OOST *et al.*, 2003).

Com relação aos danos ao DNA, observa-se um maior dano nos organismos na presença do BaP isoladamente, fato reforçado pelas análises FA/PCA. O BaP, individualmente, é conhecido pelos efeitos genotóxico em organismos marinhos (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998; SHUGART, 1988). No entanto, esse dano não tende a aumentar conforme se eleva a concentração desse contaminante. A formação de adutos de DNA por metabólitos eletrofílicos de PAHs e a indução de estresse oxidativo são mecanismos reconhecidos de toxicidade de PAHs (CHING *et al.*, 2001; BAIRD *et al.*, 2005). As ostras possuem sistemas de biotransformação

capazes de converter PAHs em derivados solúveis em água, facilitando sua excreção. Contudo, nesse processo, podem ser gerados metabólitos tóxicos eletrofílicos que afetam o DNA, podendo levar à mutagênese, carcinogênese e imunossupressão, resultando em efeitos adversos no desenvolvimento e na reprodução desses organismos. À medida que MPs são adicionados aos tratamentos, percebe-se uma leve tendência de redução desses danos ao DNA.

Efeitos citotóxicos também foram observados neste estudo, por meio dos resultados do Teste de Retenção de Vermelho Neutro (TRVN), que revelaram alterações na integridade das membranas lisossomais. Houve uma diminuição no tempo de retenção do corante em todas as concentrações testadas, tanto com BaP e MP isolado quanto com BaP em conjunto com MPs. Esses resultados são preocupantes, pois esse biomarcador é considerado um indicador de bem-estar celular, e qualquer dano à integridade lisossomal representa um sinal precoce de efeitos adversos mais graves (BINELLI *et al.*, 2009; MOORE *et al.*, 2007). A estabilidade e a integridade das membranas lisossomais estão associadas a impactos negativos em diferentes níveis de organização biológica, desde o subcelular (MOORE *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2007, 2011, 2012) até os níveis populacionais e comunitários. Efeitos em maior escala decorrem da relação direta entre anormalidades lisossomais, perda de viabilidade de gametas (RINGWOOD *et al.*, 2004) e atrofia do tecido reprodutivo, resultando em uma redução do potencial reprodutivo (MOORE E VIARENGO, 1987; ALLEN E MOORE, 2004). Além disso, é relevante destacar a toxicidade dos MPs virgens, ou seja, sem contaminantes adsorvidos do meio. Provavelmente, essa resposta ocorre porque tanto os aditivos liberados quanto os microplásticos e seus metabólitos são incorporados ao corpo por meio de processos de endocitose e disponibilizados na hemolinfa. Embora a hemolinfa não esteja diretamente envolvida no acúmulo de materiais, ela desempenha um papel crucial no sistema imunológico do organismo (MATOZZO *et al.*, 2016; BURGOS ACEVES *et al.*, 2021).

A análise integrada, revelou também uma relação entre o aumento da concentração de LPO e a diminuição do TRVN, esta associação ocorreu tanto na ausência do MP (nas duas concentrações iniciais de BaP; 3 e 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BaP), quanto na presença das micropartículas, ocorrendo na menor concentração de microplástico (5 mg L^{-1}) associado com estas duas concentrações de BaP, na maior

concentração de MP (500 mg L^{-1}) com a segunda concentração de BaP ($12 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de BaP) e nas concentrações intermediárias de MPs (5 mg L^{-1}) mas associado as maiores concentrações de BaP (21 e $30 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de BaP). As membranas celulares e das organelas são suscetíveis às ações das EROs, sofrendo alterações na estrutura e na sua permeabilidade (BHARDWAJ *et al.*, 2023), sendo assim, esses biomarcadores podem estar diretamente associados (AZENABOR e MAHONY, 2000).

O IBRv2 auxiliou a identificar quais foram os tratamentos com maior efeito observado, classificado como o pior cenário tem-se o tratamento com maior concentração de BaP e de MPs. Em sequência observam-se os tratamentos contendo as concentrações intermediárias de BaP e os microplásticos sozinhos nas maiores concentrações (50 e 500 mg L^{-1}). Também é importante observar que os animais expostos as concentrações ambientalmente relevantes de microplásticos (5 mg L^{-1}) também integram uma categoria bastante afetada.

Estes resultados obtidos são relevantes, pois reforçam que as partículas de microplástico (MP), já em concentrações ambientais, podem interagir com o benzo(a)pireno (B[a]P) na água do mar, alterando sua toxicidade para os bivalves. Poucos são os estudos que investigam os efeitos dos MPs em concentrações já observadas no ambiente (PANNETIER *et al.*, 2020; IZAR *et al.*, 2019; IZAR *et al.*, 2022; BOUR *et al.*, 2020, de MELLO SOUZA *et al.*, 2023). Assim, os resultados deste estudo podem também contribuir para investigações sobre os riscos ecológicos que os microplásticos representam para a biota marinha.

5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que a exposição das ostras a microplásticos (MP) e benzo(a)pireno (BaP), tanto isoladamente quanto em conjunto, provoca respostas interativas entre esses contaminantes. Em termos mecanísticos, observou-se que os biomarcadores GPX, GST e GSH apresentam uma forte relação com os danos ao DNA, especialmente nos indivíduos expostos isoladamente ao BaP e aos MPs nas concentrações mais altas. O dano oxidativo (LPO) parece ser, em grande parte, contido pelo aumento das respostas antioxidantes nesses organismos. A maior

concentração de LPO está associada a uma diminuição na integridade das membranas lisossomais, um efeito que se intensifica na exposição conjunta ao BaP e aos MPs.

O cenário de exposição mais prejudicial, ou seja, aquele que resulta no maior nível de danos, conforme indicado pelo índice IBRV2, ocorre quando os organismos são expostos a uma alta concentração de BaP associada a uma elevada concentração de MPs ($30 \mu\text{g L}^{-1}$ de BaP e 500mg L^{-1} de MPs). A concentração ambientalmente relevante de MP (5mg L^{-1}), quando combinada com o BaP, também provoca efeitos nos organismos, embora em menor escala, evidenciando a necessidade de avaliar as concentrações reais desses contaminantes no ambiente. Além disso, quando os contaminantes são analisados isoladamente, efeitos significativos são observados em decorrência da exposição ao microplástico virgem nas maiores concentrações e ao BaP nas concentrações intermediárias.

A importância das brânquias como interface primária entre os bivalves e o ambiente foi confirmada, destacando sua vulnerabilidade a danos induzidos por MPs e BaP. Os achados deste estudo também reforçam que espécies diferentes respondem de forma diferente a exposição combinada entre BaP e MPs, sendo os filtradores, como as outras, ainda mais sensíveis.

Por fim, este estudo ressalta a necessidade de compreender melhor os riscos associados aos microplásticos e suas interações com outros contaminantes aquáticos. Os resultados reforçam a complexidade das respostas biológicas a esses poluentes e a urgência de monitorar, regular e controlar sua presença nos ecossistemas aquáticos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUDA, Siwar et al. Toxicological impact of environmental microplastics and benzo [a] pyrene in the seaworm *Hediste diversicolor* under environmentally relevant exposure conditions. **Environmental Pollution**, v. 310, p. 119856, 2022.

ADAMS, W.J., BLUST, R., BORGMANN, U., BRIX, K.V., DEFOREST, D.K., GREEN, A.S., MEYER, J.S., MCGEER, J.C., PAQUIN, P.R., RAINBOW, P.S., WOOD, C.M., 2011. Utility of tissue residues for predicting effects of metals on aquatic organisms. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7, 75–98. doi:10.1002/ieam.108

ALIMBA, C.G., FAGGIO, C., 2019. Microplastics in the marine environment: Current trends in environmental pollution and mechanisms of toxicological profile. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 68, 61–74. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.03.001>

ALTENBURGER, Rolf; SEGNER, Helmut; VAN DER OOST, Ron. Biomarkers and PAHs—prospects for the assessment of exposure and effects in aquatic systems. **PAHs: an ecotoxicological perspective**, p. 297-328, 2003.

ANBUMANI, Sadasivam; KAKKAR, Poonam. Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 14373-14396, 2018.

AZENABOR, Anthony A.; MAHONY, James B. Generation of reactive oxygen species and formation of membrane lipid peroxides in cells infected with *Chlamydia trachomatis*. **International journal of infectious diseases**, v. 4, n. 1, p. 46-50, 2000.

BAIRD, William M.; HOOVEN, Louisa A.; MAHADEVAN, Brinda. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 45, n. 2-3, p. 106-114, 2005.

BATEL, A., LINTI, F., SCHERER, M., ERDINGER, L., BRAUNBECK, T., 2016. Transfer of benzo[a]pyrene from microplastics to *Artemia nauplii* and further to

zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 1656–1666. <https://doi.org/10.1002/etc.3361>

BATEL, Annika et al. Transfer of benzo [a] pyrene from microplastics to *Artemia nauplii* and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 35, n. 7, p. 1656-1666, 2016.

BEBIANNO, M. J. et al. Effects of microplastics alone and with adsorbed benzo (a) pyrene on the gills proteome of *Scrobicularia plana*. **Science of the Total Environment**, v. 842, p. 156895, 2022.

BEIRÃO, ANDRÉ PANNON; MARQUES, MIGUEL; RUSCHEL, ROGERIO RAUPP. **O valor do mar: uma visão integrada dos recursos do oceano do Brasil**. Essential Idea Editora, 2020.

BINELLI, Andrea et al. In vivo experiments for the evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of Triclosan in Zebra mussel hemocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 91, n. 3, p. 238-244, 2009.

BHARDWAJ, Monika et al. Lysosomal lipid peroxidation regulates tumor immunity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 133, n. 8, 2023.

BOREA, Isabella Isabella. Impacts of petroleum exposure on DNA integrity and gene expression in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. 2024.

BOUR, Agathe et al. Synthetic microfiber and microbead exposure and retention time in model aquatic species under different exposure scenarios. **Frontiers in Environmental Science**, v. 8, p. 83, 2020.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRANDTS, I. et al. Effects of nanoplastics on *Mytilus galloprovincialis* after individual and combined exposure with carbamazepine. **Science of the total environment**, v. 643, p. 775-784, 2018.

BRINGER, Arno et al. Evidence of deleterious effects of microplastics from aquaculture materials on pediveliger larva settlement and oyster spat growth of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Science of the Total Environment**, v. 794, p. 148708, 2021.

CALABRESE, Edward J. Hormesis is central to toxicology, pharmacology and risk assessment. **Human & experimental toxicology**, v. 29, n. 4, p. 249-261, 2010.

CAPPELLO, Tiziana et al. Baseline levels of metabolites in different tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 26, p. 32-39, 2018.

CEREJA, Rui et al. Short-Term Biochemical Biomarkers of Stress in the Oyster *Magallana angulata* Exposed to *Gymnodinium catenatum* and *Skeletonema marinoi*. **Sci**, v. 5, n. 3, p. 30, 2023.

CHOWDHURY, Afsana; RAHMAN, Md Saydur. Molecular and biochemical biomarkers in the American oyster *Crassostrea virginica* exposed to herbicide Roundup® at high temperature. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 41, p. 94757-94778, 2023.

COLE, Matthew et al. Microplastic ingestion by zooplankton. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 12, p. 6646-6655, 2013.

CRUZ, A.C.F., PAULY, G.F.E., ARAUJO, G.S. ET AL. 2021. Metal Bioaccumulation by the Neotropical Clam *Anomalocardia flexuosa* to Estimate the Quality of Estuarine Sediments. **Bull Environ Contam Toxicol** 107, 106–113. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-03062-x>

DE ALMEIDA COSTA, Gisely Karla et al. Concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and histological changes in *Anomalocardia brasiliensis* and *Crassostrea rhizophorae* from Pernambuco, Brazil after the 2019 oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 192, p. 115066, 2023.

DE MARCO, Giuseppe et al. Short-term exposure to polystyrene microplastics hampers the cellular function of gills in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 264, p. 106736, 2023.

DE MELLO SOUZA, Tawany et al. Interactive effects of microplastics and benzo [a] pyrene on two species of marine invertebrates. **Marine Pollution Bulletin**, v. 193, p. 115170, 2023.

DI, Y., AMINOT, Y., SCHROEDER, D.C., READMAN, J.W., JHA, A.N., 2017. Integrated biological responses and tissue-specific expression of p53 and ras genes in marine mussels following exposure to benzo(a)pyrene and C60 fullerenes, either alone or in combination. *Mutagenesis* 32, 77-90. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew049> (PMID: 28011749)

DONOVAN, S., MESTRE, N.C., ABEL, S., FONSECA, T.G., CARTENY, C.C., CORMIER, B., KEITER, S.H., BEBIANNO, M.J., 2018. Ecotoxicological effects of chemical contaminants adsorbed to microplastics in the Clam *Scrobicularia plana*. *Front. Mar. Sci.* 5, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00143>

DOUBEN, 2003. P.E.T. Douben. Introduction. P.E.T. Douben (Ed.), PAHs: an Ecotoxicological Perspective, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK (2003), pp. 1-6

ERIKSEN, Marcus et al. Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e111913, 2014.

EPA, 1990. Methods to Manage and Control Plastic Wastes (Report to the Congress) – EPA/530-SW-89-051. **Environmental Protection Agency**, Washington, DC.

EPA, 1992. Plastics Pellets in the Aquatic Environment (Final Report) – EPA/842-B-92-010, **Environmental Protection Agency**, Washington, DC.

FERREIRA, João Paulo Ramos et al. A historical and integrative taxonomic account of mangrove oyster species native to the Atlantic American coast: A re-evaluation of Brazilian *Crassostrea* species. **Zoologischer Anzeiger**, v. 305, p. 52-81, 2023.

GILFILLAN, L. R., OHMAN, M. D., DOYLE, M. J., AND WATSON, W. (2009). Occurrence of plastic micro-debris in the Southern California Current system Cal. Coop. Ocean. Fish. 50, 123–133.

GONZÁLEZ-SOTO, N., HATFIELD, J., KATSUMITI, A., DUROUDIER, N., LACAVE, J.M., BILBAO, E., ORBEA, A., NAVARRO, E., CAJARAVILLE, M.P., 2019. Impacts of dietary exposure to different sized polystyrene microplastics alone and with sorbed benzo[a]pyrene on biomarkers and whole organism responses in mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Sci. Total Environ.* 684, 548–566. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.161>

GONZÁLEZ-SOTO, Nagore et al. Impacts of dietary exposure to different sized polystyrene microplastics alone and with sorbed benzo [a] pyrene on biomarkers and whole organism responses in mussels *Mytilus galloprovincialis*. **Science of the Total Environment**, v. 684, p. 548-566, 2019.

GOMES, Carlos Henrique Araújo de Miranda et al. Crescimento e reprodução de duas espécies de ostras do gênero *Crassostrea* no litoral catarinense. 2019.

GUILIO RICHARD, T.; HINTON, David E. The toxicology of Fishes. CRC Press. 2008.

GUIMARÃES, Lucas Medeiros et al. Historical inputs of polycyclic aromatic hydrocarbons in the preserved tropical estuary of the Itapicuru River, Bahia, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 156, p. 111218, 2020.

GULMINE, J. V. et al. Polyethylene characterization by FTIR. **Polymer testing**, v. 21, n. 5, p. 557-563, 2002.

GUTERRES, Bruna de Vargas. **Moluscos bivalves como biossensores de poluição aquática**. 2021. Dissertação de Mestrado.

GUZZETTI, E., SUREDA, A., TEJADA, S., FAGGIO, C., 2018. Microplastic in marine organism: environmental and toxicological effects. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 64, 164–171

HAYES, John D.; FLANAGAN, Jack U.; JOWSEY, Ian R. Glutathione transferases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 45, n. 1, p. 51-88, 2005.

IZAR, G. M. et al. Quantitative analysis of pellets on beaches of the São Paulo coast and associated non-ingested ecotoxicological effects on marine organisms. **Regional Studies in Marine Science**, v. 29, p. 100705, 2019.

IZAR, Gabriel Mendes et al. Plastic pellets make *Excirolana armata* more aggressive: intraspecific interactions and mortality in field and laboratory ecotoxicological assays. **Marine Pollution Bulletin**, v. 185, p. 114325, 2022.

JABLONSKA, Ewa et al. Lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity relationship in breast cancer depends on functional polymorphism of GPX1. **BMC cancer**, v. 15, p. 1-12, 2015.

JOSHY, Aswathy et al. Histopathological evaluation of bivalves from the southwest coast of India as an indicator of environmental quality. **Aquatic Toxicology**, v. 243, p. 106076, 2022.

KIM, Jin A. et al. Micro-polystyrene plastic and benzo [a] pyrene exposure affects the endocrine system and causes physiological stress in *Carassius auratus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 271, p. 109695, 2023.

LEGAT, J.F.A. Reprodução, crescimento e sobrevivência da ostra nativa *Crassostrea gasar* cultivada nos estados do Maranhão e Santa Catarina. 2015. Tese. 120p. (Doutorado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina.

LIU, T., PAN, L., JIN, Q., CAI, Y., 2015. Differential gene expression analysis of benzo(a)pyrene toxicity in the clam, *Ruditapes philippinarum*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 115, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.007>

LIU, Yu et al. An overview of microplastics in oysters: Analysis, hazards, and depuration. **Food Chemistry**, v. 422, p. 136153, 2023.

LOPES, Gustavo Ruschel et al. Growth of *Crassostrea gasar* cultured in marine and estuary environments in Brazilian waters. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 975-982, 2013.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, Ignacio et al. Effects of polystyrene nano-and microplastics and of microplastics with sorbed polycyclic aromatic hydrocarbons in adult zebrafish. **Science of The Total Environment**, v. 927, p. 172380, 2024.

MATTSON, Mark P. Hormesis defined. **Ageing research reviews**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2008.

MILLER, MICHAELA E.; HAMANN, MARK; KROON, FREDERIEKE 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.

MOORE, Michael N. et al. Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 1, p. 80-91, 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL Biological markers in environmental health research. Committee on Biological Markers of the National Research Council. **Environmental health perspectives**, v. 74, p. 3–9, 1987.

NOBRE, C. R. et al. Assessment of microplastic toxicity to embryonic development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). **Marine pollution bulletin**, v. 92, n. 1-2, p. 99-104, 2015.

NOBRE, C.R., MORENO, B.B., ALVES, A.V., DE LIMA ROSA, J., DA ROSA FRANCO, H., ABESSA, D.M. DE S., MARANHO, L.A., CHOUERI, R.B., GUSSO-CHOUERI, P.K., PEREIRA, C.D.S., 2020. Effects of Microplastics Associated with Triclosan on the Oyster *Crassostrea gasar*: An Integrated Biomarker Approach. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 79, 101–110. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00729-8>

NOBRE, CR; MORENO, BB; ALVES, AV; ROSA, JL; FONTES, MK; CAMPOS, BG ; SILVA, LF; DUARTE, LFA; ABESSA, DMS ; CHOUERI, RB ; GUSSO-CHOUERI, PK ; PEREIRA, CDS. 2022. Combined effects of polyethylene spiked with the antimicrobial triclosan on the swamp ghost crab (*Ucides cordatus*; Linnaeus, 1763). *Chemosphere*, p. 135169.

OLIVE, Peggy L. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 11, n. 4, p. 487-495, 1988.

OLIVEIRA, M. et al. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). **Ecological indicators**, v. 34, p. 641-647, 2013.

PANNETIER, Pauline et al. Environmental samples of microplastics induce significant toxic effects in fish larvae. **Environment international**, v. 134, p. 105047, 2020.

PEREIRA, Camilo Dias Seabra et al. Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 26, n. 3, p. 462-469, 2007.

PEREIRA, Camilo Dias Seabra et al. Integrated biomarker responses as environmental status descriptors of a coastal zone (São Paulo, Brazil). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 5, p. 1257-1264, 2011.

PEREIRA, Camilo Dias Seabra et al. Chronic contamination assessment integrating biomarkers' responses in transplanted mussels—A seasonal monitoring. **Environmental Toxicology**, v. 27, n. 5, p. 257-267, 2012.

POLAKIEWICZ, Lilian. Estudo de Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nos estuários de Santos e São Vicente—SP utilizando diatomito como material adsorvente. **IPEN. Autarquia Associada à Universidade de São Paulo. Universidade de São Paulo**, 2008.

REGOLI, Francesco et al. A multidisciplinary weight of evidence approach for environmental risk assessment at the Costa Concordia wreck: integrative indices from Mussel Watch. **Marine environmental research**, v. 96, p. 92-104, 2014.

REVEL, Messika et al. Realistic environmental exposure to microplastics does not induce biological effects in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Marine pollution bulletin**, v. 150, p. 110627, 2020.

ROCHMAN, Chelsea M. et al. Polystyrene plastic: a source and sink for polycyclic aromatic hydrocarbons in the marine environment. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 24, p. 13976-13984, 2013.

ROCHMAN, Chelsea M.; HENTSCHEL, Brian T.; TEH, Swee J. Long-term sorption of metals is similar among plastic types: implications for plastic debris in aquatic environments. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e85433, 2014.

SCHLENK, Daniel et al. Biotransformation in Fishes 1. In: **Toxicology of fishes**. CRC press, 2008. p. 60-120.

SEDLAK, Jozef; LINDSAY, Raymond H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SILVA, A. C. M.; GUIMARÃES, S. S.; OLIVEIRA, O. M. C.; MOREIRA, I. T. A.; TRIGÜIS, J. A.; CRUZ, M. J. M. Sensibilidade do copépode *Nitokra* sp. À exposição ao agregado óleo-material particulado em suspensão (OSA). **Geochimica Brasiliensis**, v. 32, n. 1, p. 47-61, 2018.

SILVA, Natália Eduarda da et al. Biomarcadores de estresse oxidativo no camarão *Macrobrachium amazonicum*: (Heller, 1862) avaliação em uma área de preservação ambiental na Amazônia/Brasil. 2022.

SMITH, Brian. The infrared spectra of polymers II: polyethylene. 2021.

SONG, Xiaocheng et al. Interactions of microplastics with organic, inorganic and bio-pollutants and the ecotoxicological effects on terrestrial and aquatic organisms. **Science of The Total Environment**, v. 838, p. 156068, 2022.

STEGEMAN, J.J., et al., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.M., Bergman, P.M. (eds.) *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress*, Lewis Publishers, Boca Raton

SUSSARELLU, R., SUQUET, M., THOMAS, Y., LAMBERT, C., FABIoux, C., PERNET, M. E. J., ET AL. (2016). Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 2430–2435. doi: 10.1073/pnas.1519019113

SYBERG, K., KHAN, F.R., SELCK, H., PALMQVIST, A., BANTA, G.T., DALEY, J., SANO, L., DUHAIME, M.D, 2015. Microplastics: Addressing ecological risk through lessons learned. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 945-953. <https://doi.org/10.1002/etc.2914>

TEUTEN, Emma L. et al. Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. **Environmental science & technology**, v. 41, n. 22, p. 7759-7764, 2007.

UNEP, 2011. UNEP Year Book: Emerging Issues in our Global Environment. (79 p). United Nations Environmental Programme, Nairobi.

USEPA, ENGLERT, Brian. Method 1694: Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS. **US environmental protection agency (EPA)**, p. 1-72, 2007.

VAN CAUWENBERGHE, Lisbeth et al. Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. **Environmental pollution**, v. 199, p. 10-17, 2015.

WANG, Jianlong; WANG, Shizong. Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: a review. **Journal of environmental management**, v. 182, p. 620-640, 2016.

WANG, Ying et al. Polystyrene microplastics alleviate adverse effects of benzo [a] pyrene on tissues and cells of the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 256, p. 106430, 2023.

WANG, Wenfeng; WANG, Jun. Comparative evaluation of sorption kinetics and isotherms of pyrene onto microplastics. **Chemosphere**, v. 193, p. 567-573, 2018.

WATTS, Andrew JR et al. Uptake and retention of microplastics by the shore crab *Carcinus maenas*. **Environmental science & technology**, v. 48, n. 15, p. 8823-8830, 2014.

WILLS, E. D. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. **Biochemical toxicology: a practical approach**, 1987.

WORLD REGISTER OF MARINE SPECIES. WoRMS. Disponível em: <https://marinespecies.org/>. Acesso em 26 jul. 2022.

XIANG, YUJIA et al. Microplastics and environmental pollutants: key interaction and toxicology in aquatic and soil environments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 422, p. 126843, 2022.