

**UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE DE  
ECOSSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS  
MESTRADO EM ECOLOGIA**

**CAIO RODRIGUES NOBRE**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE MICROPLÁSTICOS EM MATRIZES AMBIENTAIS  
UTILIZANDO INVERTEBRADOS MARINHOS**

**SANTOS/SP**

**2016**

**CAIO RODRIGUES NOBRE**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE MICROPLÁSTICOS EM MATRIZES AMBIENTAIS  
UTILIZANDO INVERTEBRADOS MARINHOS**

Dissertação apresentada à Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, sob orientação do Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira

**SANTOS/SP**

**2016**

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, por qualquer que seja o processo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos.

Nobre, Caio Rodrigues.  
Avaliação da Toxicidade de Microplásticos em Matrizes Ambientais Utilizando Invertebrados Marinhos. / Caio Rodrigues Nobre - 2016. n<sup>o</sup>.73.

Orientador: Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, Santos, SP, 2016.

1. Microplástico. 2. Toxicidade. 3. Ecotoxicologia. 4. Pellets Plásticos

I. Pereira, Camilo Dias Seabra II. Avaliação da Toxicidade de Microplásticos em Matrizes Ambientais Utilizando Invertebrados Marinhos.

Elaborado pelo SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas - Unisanta

*Dedico este trabalho a duas grandes pessoas, a qual tive a honra e o prazer de conviver e aprender, uma pela grande amizade e companheirismo de trabalho e o outro por me ensinar o que é a vida, e que infelizmente não estão presentes para ver o desfecho deste trabalho.*

*Flávia obrigado por ser esta grande amiga e acreditar em mim.*

*Pai obrigado pelos seus ensinamentos, carinho, amor e me ajudar a me tornar o ser humano que sou hoje, te amo.*

## **AGRADECIMENTOS**

A gratidão é a forma mais bela de se demonstrar carinho e admiração pelas pessoas, muitas mãos, muitos pensamentos positivos, muitas palavras de conforto e encorajamento foram necessárias para a construção deste trabalho, e talvez o que esteja expresso aqui não seja o suficiente para agradecer a todos.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter colocado tantas pessoas maravilhosas no meu caminho, que me ajudaram ao longo de minha carreira acadêmica e minha vida. Agradeço aos meus pais Roberta Rodrigues e Farley Nobre (em meu coração) por toda dedicação e carinho que ajudaram a me tornar a pessoa que sou hoje, me ensinaram a respeitar o próximo, a sempre fazer meu melhor, ser ético, justo e ter bom caráter, hoje o homem que me tornei e graças a vocês e acho que sem tudo o que vocês me passaram não seria assim.

Meu irmão Max por todo auxílio na parte de língua inglesa e por ser esse grande irmão. Aos meus avós Gilda e Rubens que sempre me trataram com extremo carinho e amor, aos meus avós Neuza e Wilson que também sempre foram extremamente carinhosos e acreditaram no meu sonho de se tornar Biólogo e tornaram isso possível, meu avô por me ensinar a amar o a natureza em toda sua beleza através de suas histórias do tempo de menino em Cananéia. Também quero agradecer ao Wilson Roque Junior (meu pai) por ajudar a investir nesse sonho a qual ainda trilho, por me apoiar e acreditar em mim.

Não posso e jamais vou esquecer de você minha companheira de 9 anos Karla Lucatelli, não sei o que seria de mim e deste trabalho sem você, que sempre foi tão paciente e compreensiva com minhas ausências devido as coisas do mestrado, sempre me apoiou e acreditou em mim, inclusive brigava comigo quando eu achava que não era capaz, me ajudou inclusive a analisar as amostras devido a meu atraso mesmo não tendo obrigação, eu não poderia ter escolhido uma namorada melhor, te amo muito.

Gostaria de agradecer a estas pessoas especiais que me ajudaram e ajudam tanto na minha carreira acadêmica, primeiramente ao meu orientador Dr. Camilo Dias Seabra Pereira, por nunca ter desistido de mim, mesmo após 3 reprovadas para ingresso no

Mestrado, você nunca deixou de acreditar em mim, nunca desistiu de mim, até mesmo quando eu já não acreditava mais, obrigado por todos esses anos de paciência, ensinamentos e amizade, obrigado por ser essa grande pessoa iluminada.

Gostaria de agradecer também ao Dr. Augusto Cesar que foi meu primeiro orientador, por ter me ensinado muito sobre ética e união na pesquisa, que ninguém vai longe sozinho, e que a pesquisa deve ser compartilhada, se não, não serve de nada, obrigado também por sua amizade, ensinamentos, conselhos e por ser esta pessoa tão especial #tamojunto.

Meus agradecimentos também vão para o Dr. Rodrigo Brasil Choueri pelas grandes conversas, por me ensinar a ter uma visão mais ampla das coisas e não ficar restrito ao pensamento fechado, pelos conselhos e dicas na execução deste trabalho e pela amizade também.

Agradeço ao Dr. Aldo Ramos, pelo seu grande conhecimento químico a mim passado, seus ótimos conselhos e sabias palavras, pela sua alegria, bom humor e carinho.

E não poderia faltar o quase Dr., Msc. Fernando Sanzi Cortez, a qual sempre teve grande paciência comigo, me ensinando muito sobre a ecotoxicologia e laboratório desde de meu período de estágio até hoje.

Camilo, Augusto, Rodrigo, Tio Aldo e Fernando como disse no começo desse texto, palavras e até ações não serão suficientes para demonstrar toda a gratidão e admiração que tenho por vocês, o pesquisador a qual venho me tornando, pois ainda estou e sempre estarei em processo de formação, é graças à vocês, tem um pouco de cada um de vocês no meu jeito de fazer pesquisa, em cada pedaço dessa dissertação e cada artigo que publiquei e irei publicar, vocês são grandes exemplos a serem seguidos na vida acadêmica e na vida, obrigado por tudo de coração.

Agradeço ao Dr. Alexander Turra, pela grande parceria e colaboração nos projetos e artigos, espero que sejam muitas. Ao Dr. Denis Abessa, por me oferecer ajuda e abrir as portas de seu laboratório para a realização dos experimentos, quando tudo estava dando errado, pelas sugestões, conselhos e ideias que serviram para melhorar o trabalho e pelos ensinamentos passados, sem palavras para lhe agradecer.

À Marina Santana pela grande colaboração e parceria no artigo, espero que esse seja o primeiro de muitos, e possamos trabalhar novamente juntos.

Gostaria de agradecer demais a toda a Equipe do NEPEA da UNESP, que sempre me trataram muito bem, sempre solícitos, e fizeram me sentir em casa e muito à vontade, Bruno (sinhá), Julia (da mata), Guacira, Bruna, Gabriela, Ney e todos os demais, me desculpem se me esqueci de alguém, mas principalmente a Carol e ao Lucas Baruaem, por toda a força.

Duas pessoas que não poderia deixar de agradecer jamais e muito, Aline Vecchio e Beatriz Moreno, vocês também são responsáveis por este trabalho, sem vocês talvez esse trabalho jamais tivesse sido concluído, muito obrigado pela ajuda de vocês, pela realização dos ensaios, por toda ajuda e tudo mais, mas principalmente pela amizade de vocês.

À minha grande amiga Flávia que me auxiliou no começo dessa empreitada e é muito importante, pela sua amizade desde os tempos de graduação, e jamais será esquecida.

Auro Maluf meu parceiro de pellets, obrigado por me mostrar este mundo intrigante e fascinante dos polímeros plásticos, sem você esse trabalho jamais existiria.

O Lecotox jamais poderia ficar de fora, Binho, Dymes, Mari, Jonas, Helo, Thais, Matheus, Bianca, Larissa, Davi, como diria o grande Jonas “valeeeu feras”.

Ao Pessoal do laboratório central de biologia (B-23) Sandrão, Fernanda e todos os estagiários que deram uma força para a realização deste trabalho.

Meus singelos agradecimentos também para meus grandes amigos Wesley Mazur, Nelson Bento pela grande amizade e apoio.

Aos parceiros da UNIFESP Mayana, Tierry Medeiros (fala comigo, rs) e Felipe Duarte pelo auxílio, parceria e amizade.

À Dra. Luciane Maranhão por ter me ajudado com ótimos conselhos e ter me dado à luz que me faltava.

Ao Dr. Marcelo Pinheiro pelos bons anos de Crusta com muitas histórias, coletas, ensinamentos e muita amizade.

À Verinha por ser essa grande pessoa, por sempre me aturar esses anos todos, arrumar a zona e sujeira que eu deixava no laboratório e deixar sempre nossa segunda casa brilhando e impecável.

Quero agradecer também a Sandra e a Imaculada sempre tão solícitas, nos atendem com enorme sorriso no rosto e alegria e fazem de tudo para nos ajudar e solucionar nossos problemas.

Agradeço a todos os meus professores da Graduação e do Mestrado por terem transmitido seus conhecimentos e fazerem parte da minha formação.

Quero agradecer a todos de coração que participaram direta ou indiretamente deste trabalho, da minha vida acadêmica e minha vida pessoal.

De Coração Muito Obrigado a Todos!

“ Ninguém vai bater tão forte como a vida, mas não se trata de bater forte. Se trata de quanto você aguenta apanhar e seguir em frente, o quanto você é capaz de aguentar e continuar tentando. É assim que se consegue vencer. ”

Rocky Balboa

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 01.** Mapa da área de estudo, Brasil (A); O Estado de São Paulo e sua costa central em detalhe (B), (C) Baía de Santos indicando a localização de amostragem *pellet* na Praia do Boqueirão (ponto branco).....Pag. 30

**Figura 02.** Proporção de desenvolvimento larvar normal (%) nos três ensaios (a) Ensaio de interface *pellet*-água; (B) Ensaio elutriato, comparando o controle (água do mar), *pellets* coletados em praia e *pellets* virgens. Letras diferentes (a, b, c) representam diferenças significativas no teste a posteriori de Tukey. Para interface *pellet*-água a interação entre o tratamento e ensaio não foi significativa, e, por conseguinte, o teste de Tukey comparou a média dos valores totais (A). O teste de Tukey para o ensaio elutriato foi feita separadamente para cada ensaio, devido à interação significativa entre tratamento e ensaio (B)..... Pag. 32

**Figura 03.** Preparo do sedimento marcado para realização dos ensaios empregando os tratamentos de elutriato e sedimento integral..... Pag.44

**Figura 04.** Resultados do primeiro ensaio de toxicidade crônica sobre a reprodução do copépodo *Nitocra* sp, empregando o tratamento elutriato, comparando o controle com *pellet* virgem e *pellets* praia, apresentando suas médias reprodutivas número de proles/pelo número de fêmeas e desvio padrão respectivamente. A letra “a” indica amostras sem diferença estatística em relação controle. As letras “b” e “c” representam diferença significativa entre as amostras. .... Pag. 48

**Figura 05.** Resultados do segundo ensaio de toxicidade crônica sobre a reprodução do copépodo *Nitocra* sp, empregando o tratamento elutriato, comparando o controle com *pellet* virgem e *pellet* praia, apresentando suas médias reprodutivas número de proles/pelo número de fêmeas e desvio padrão respectivamente. A letra “a” indica amostras sem diferença estatística..... Pag. 48

**Figura 06.** Resultados do terceiro ensaio de toxicidade crônica sobre a reprodução do copépodo *Nitocra* sp, empregando o tratamento elutriato, comparando o controle com pellet virgem e pellet praia, apresentando suas médias reprodutivas número de proles/pelo numero de fêmeas e desvio padrão respectivamente. A letra “a” indica amostras sem diferença estatística. .... Pag. 49

**Figura 07.** Resultados do primeiro ensaio de toxicidade crônica sobre a reprodução do copépodo *Nitocra* sp, empregando o tratamento com sedimento integral, comparando o controle com *pellet* virgem e *pellet* praia, apresentando suas médias reprodutivas número de proles/pelo numero de fêmeas e desvio padrão respectivamente. As letras “a” e “b” indicam grupos de amostras com diferença estatística.....Pag. 50

**Figura 08.** Resultados do segundo ensaio de toxicidade crônica sobre a reprodução do copépodo *Nitocra* sp, empregando o tratamento com sedimento integral, comparando o controle com *pellet* virgem e *pellet* praia, apresentando suas médias reprodutivas número de proles/pelo numero de fêmeas e desvio padrão respectivamente. A letra “a” indica amostras sem diferença estatística. .... Pag. 50

**Figura 09.** Resultados do terceiro ensaio de toxicidade crônica sobre a reprodução do copépodo *Nitocra* sp, empregando o tratamento com sedimento integral, comparando o controle com *pellet* virgem e *pellet* praia, apresentando suas médias reprodutivas número de proles/pelo numero de fêmeas e desvio padrão respectivamente. A letra “a” indica amostras sem diferença estatística. .... Pag. 50

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 01.** Redução percentual no desenvolvimento embriolarval causada pela interface *pellet* - água e elutriato, relacionadas com as condições controle (sem *pellets*) para cada ensaio, médias, e para ambas as amostras, *pellets* coletados em praia e virgem.....Pag. 32
- Tabela 02.** Resultados da ANOVA bi-fatorial comparando (1) tratamento (controle sem grânulos, *pellets* virgens, e *pellets* recolhidos na praia) e (2) ensaio (1, 2, e 3) entre ensaios (interface *pellet*-água e elutriato).....Pag. 32
- Tabela 03.** Crititérios (parâmetros e condicionantes) para realização e validação do ensaio crônico com o copépodo *Nitocra* sp.....Pag. 46
- Tabela 04.** Análises sedimentológicas referentes ao sedimento controle, tamanho do grão, classificação seguindo a escala de Wentwhorth, porcentagem dos grãos e finos (silte e argila), teor de matéria orgânica e teor de carbonato de cálcio. .... Pag. 47

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

PCB – Bifenilas Policloradas

DDE – Diclorodifenildicloroetano

HPA/PAH – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

PBDE – Éteres Difenila Polibromados

DDT– Diclorodifeniltricloroetano

Phe – Fenantreno

PS – Poliestireno

PP– Polipropileno

PE – Polietileno

PVC – Policloreto de Vinila

PET – Polietilenotereftalato

M.O – Matéria Orgânica

CaCO<sub>3</sub>– Carbonato de Cálcio

HA – Hidrocarbonetos Alifáticos

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>18</b>
<b>2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE MICROPLÁSTICOS NO DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL DO OURIÇO - DO - MAR <i>LYTECHINUS VARIEGATUS</i> (ECHINODERMATA; ECHINODEA).</b>	<b>23</b>
<b>Resumo</b>	23
<b>Abstract</b>	24
<b>2.1. Introdução</b>	24
<b>2.2. Material e Métodos</b>	27
2.2.1. <i>Pellets</i> de plástico	27
2.2.2 Ensaio ecotoxicológicos	28
<b>2.3. Resultados</b>	31
<b>2.4. Discussão</b>	33
<b>3. ESTUDO DO IMPACTO DE MICROPLÁSTICOS EM SEDIMENTOS MARINHOS.</b>	<b>38</b>
<b>Resumo</b>	38
<b>Abstract</b>	39
<b>3.1. Introdução</b>	40
<b>3.2. Material e Métodos</b>	42
3.2.1 Coleta de amostras	42
3.2.2 Análises sedimentológicas	43
3.2.4 Análise Estatística	46
<b>3.3. Resultados e Discussão</b>	47
3.3.1. Sedimentologia	47
3.3.2. Elutriato	48
3.3.3. Sedimento Integral	49
<b>3.5. Conclusão</b>	55
<b>4. CONCLUSÕES FINAIS</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>58</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, a preservação dos ambientes aquáticos, especialmente das regiões costeiras, é uma das principais preocupações mundiais. As zonas costeiras têm sido afetadas por uma variedade de pressões antropogênicas (BEBIANNI et al., 2015). Entre as pressões exercidas, um dos impactos humanos que constitui grande ameaça para a vida marinha é a poluição ocasionada por detritos plásticos (DERRAIK, 2002). Esta poluição vem sendo bem documentada, incluindo registros de acumulação em sedimentos costeiros, na zona pelágica de áreas costeiras rasas ao oceano aberto, e de mares polares aos trópicos (DOYLE et al., 2011).

Os resíduos plásticos podem ser classificados quanto a seu tamanho em megaplástico, macropástico, mesoplástico, micropástico e nanopástico (GESAMP, 2015).

Entre os resíduos plásticos, os micropásticos, representam mais da metade da contaminação total por plásticos nos oceanos.

Segundo GESAMP (2015) micropásticos são partículas que apresentam tamanho na escala de 5 mm a 1 nm, sendo subdivididos em micropásticos primários (partículas produzidas em pequena escala para o uso em indústrias de manufaturamento) e micropásticos secundários (partículas menores formadas através da fragmentação de materiais plásticos maiores). Dentro dos micropásticos primários estão inseridos os *pellets* plásticos, pequenos grânulos, geralmente com a forma cilíndrica ou de disco (< 5 mm de diâmetro), sendo compostos por uma diversidade de polímeros, como o poliestireno (PS), polipropileno (PP), poliamida (Nylon), polietileno (PE), policloreto de vinila (PVC), polietilenotereftalato (PET), entre outros (ANDRADY et al., 2011; GESAMP, 2015), sendo os de polietileno, polipropileno, poliestireno os mais comuns (OGATA et al., 2009; SHIBBER, 1982; PRUTER, 1987).

Segundo Ogata et al. (2009) grânulos plásticos podem ser involuntariamente perdidos para o meio ambiente, tanto durante a fabricação quanto durante o transporte. Desta forma pellets podem ser liberados diretamente para o meio marinho ou podem ser levados pelo escoamento superficial, riachos e águas de rio que eventualmente levam para o oceano.

A ocorrência de *pellets* plásticos tem sido registrada em ambientes costeiros ao redor do planeta (OGATA et al.,2009), como no Brasil (IVAR DO SUL et al., 2009; TURRA et al., 2014), Grécia (KARAPANAGIOTI & KLONTZA, 2008; KARAPANAGIOTI et al., 2011), Inglaterra (ASHTON et al., 2010), Japão (ENDO et al., 2005), Jordânia (ABU-HILAL & AL-NAJJAR, 2004), e Nova Zelândia (GREGORY,1978), entre outros. Esta crescente ocorrência é bastante preocupante devido aos impactos, não só estéticos, mas químicos que podem ser gerados ao ecossistema, por uma variedade de aditivos químicos presentes nos *pellets* virgens, como os retardantes de chama, plastificantes e emolientes, podendo ser liberados assim que entram em contato com o ambiente.

O processo de polimerização dos monômeros que formam os plásticos nunca é 100% completo, e os monômeros restantes do polímero, tal como estireno e bisfenol-A, juntamente com catalisadores residuais, podem migrar a partir da matriz do polímero, para o meio com os quais eles entram em contato, como por exemplo a água do mar e sedimentos, podendo ter maior ou menor lixiviação dos compostos presentes nos *pellets* devido a presença de sais ou materiais orgânicos que possuam diferentes afinidades com os mesmos (MOORE, 2008).

Nesse sentido, destacam-se alguns compostos, como éteres de difenila polibromados (PBDE do inglês polybrominated diphenyl ethers) e seus derivados, que têm sido utilizados como marcadores ambientais de contaminação química ocasionada por plástico (ROCHMAN et al., 2014), devido ao grau de ocorrência deste material nos oceanos.

Em conjunto com a determinação da ampla ocorrência de *pellets* observa-se seu potencial de contaminação, devido à sua capacidade de perder e server compostos químicos do ambiente como PCB, DDE, e HPA, (ENDO et al., 2005; FISNER et al., 2013a,b).

As taxas lentas de biodegradação não significam que os polímeros plásticos e seus aditivos não são bioativos. A variedade de tamanhos de partículas plásticas disponíveis e sua persistência no meio ambiente significam que microplásticos se tornam menores e mais tóxicos ao longo do tempo, devido a o aumento da superfície de contato (FENDALL E SEWELL,2009).

Segundo Farrel e Nelson (2013) mesmo sem a complicação de poluentes, a dessorção de compostos a partir do próprio microplástico pode ter efeitos deletérios. Carpenter & Smith (1972), já sugeriam o possível efeito e incorporação dos PCB utilizados como plastificantes à biota marinha, o que posteriormente viria a ser comprovado por uma série de estudos (VON MOOS et al., 2012; BROWNE et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; DE SÁ et al. 2014). Porém, a maioria dos trabalhos disponíveis contempla o efeito nocivo dos *pellets* causados via ingestão, de modo que ainda é insuficiente o conhecimento sobre os efeitos das partículas não ingeridas, mas que estão presentes no ambiente.

Os potenciais riscos ecológicos gerados por microplásticos são relativamente uma nova área de investigação, e existe atualmente um elevado grau de incerteza em torno desta questão (GESAMP, 2015).

Estudos ecotoxicológicos vem sendo utilizados para avaliar os possíveis efeitos dos microplásticos aos ecossistemas, Ferraz et al. (2012) afirmaram que para melhor compreensão dos riscos ambientais, as análises ecotoxicológicas vêm se mostrando uma poderosa ferramenta de avaliação para os ambientes aquáticos. De acordo com Blaise (1991) a ecotoxicologia é a ciência que estuda o efeito de uma substância (ou um conjunto delas) sobre uma população ou comunidade de organismos. Trata-se de uma ciência que tem permitido avaliar riscos e impactos ambientais por meio de bioensaios agudos e crônicos, tentando estabelecer a relação causa-efeito em diferentes níveis de organização biológica. O uso de métodos ecotoxicológicos possui uma série de vantagens, como o baixo custo, a rapidez, a simplicidade da maior parte dos métodos, e a fácil interpretação dos resultados (Chapman & Long, 1983).

Os ensaios agudos são caracterizados por apresentarem curtos períodos de exposição, e respostas severas como imobilidade e mortalidade dos organismos. Os ensaios crônicos são definidos por avaliar estágios conhecidos e específicos do ciclo de vida de diferentes espécies, por meio de distintos períodos de exposição, podendo haver variação temporal desde horas até dias ou meses, de acordo com a espécie em questão. As principais respostas crônicas são alterações morfológicas e diminuição nas taxas de crescimento e/ou reprodução.

Segundo Cesar *et al.* (1997) os ensaios ecotoxicológicos constituem ferramentas importantes na avaliação e monitoramento dos efeitos biológicos provocados por compostos químicos. Sendo empregados para a verificação de impactos em diferentes matrizes ambientais como água e sedimento, devido ao grau de importância destes compartimentos, interação entre os mesmos e os processos aos quais estão envolvidos como volatilização, precipitação, absorção e liberação (MANAHAN, 2013), por meio de vias distintas, como exposição à amostra integral (água e sedimento integral) ou tratamentos empregando situações ambientais (elutriato e interface sedimento-água), podendo auxiliar na melhor compreensão dos possíveis efeitos de compostos lixiviados a partir de *pellets* plásticos a biota aquática.

Considerando a introdução de *pellets* plásticos em ambientes marinhos, sua composição, capacidade de adsorção de contaminantes, bem como efeitos, o presente estudo verificará a hipótese de ocorrência de efeitos tóxicos em organismos marinhos expostos a *pellets* virgens e coletados em praia, a partir de diferentes rotas de exposição, água e sedimento.

Para verificar esta hipótese, o presente estudo avaliará a capacidade de *pellets* virgens e coletados em praia conferir carga tóxica à água e sedimento, bem como avaliar diferentes vias de exposição de organismos planctônicos e epibentônicos. Para tanto o estudo foi dividido em duas etapas, ora apresentados como capítulos.

O Capítulo 2 apresenta os ensaios que tiveram por objetivo avaliar a toxicidade de *pellets* virgens e coletados em praia sobre organismos planctônicos, empregando o desenvolvimento embriolarval do ouriço do mar *Lytechinus variegatus* como *endpoint*. Para tanto, foi empregado o procedimento descrito na Norma ABNT 15350/2012 e foram avaliados os tratamentos elutriato e interface *pellet*-água. O tratamento elutriato consiste na agitação vigorosa da amostra a fim de representar a ressuspensão dos *pellets*, podendo haver disponibilização de seus compostos à coluna d'água, simulando situações ambientais como zonas de arrebentação ou processos de dragagem. O tratamento interface *pellet*-água reproduz a troca natural do *pellet* em repouso com a coluna d'água, sem qualquer processo de movimentação, representando condições de ambientes com baixos níveis de agitação e ressuspensão.

O Capítulo 3 apresenta os ensaios que tiveram por objetivo identificar os efeitos tóxicos em organismos bentônicos expostos a sedimento marcado com *pellets* virgens e coletados em praia, que consiste na contaminação do sedimento com grânulos plásticos (*spike sediment*), de acordo com o método descrito pela USEPA (2001) e empregando concentrações ambientalmente relevantes. Para tanto, empregou-se como organismo teste o copépodo epibentônico *Nitocra* sp., seguindo o protocolo descrito por Lotufo e Abessa (2002) e avaliando-se os tratamentos elutriato e sedimento integral. O tratamento elutriato com sedimento segue a mesma metodologia aplicada anteriormente. O tratamento com sedimento integral baseia-se na exposição dos organismos epibentônicos ao sedimento marcado.

Por fim, o Capítulo 4 apresenta as conclusões gerais do estudo, bem como recomendações para futuros trabalhos e gestão de resíduos plásticos em ambientes marinhos.

Este capítulo está publicado no periódico Marine Pollution Bulletin, Volume 92, Issues 1 – 2, 15 March 2015, Pages 99-104. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.12.050 (Anexo A)

## 2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE MICROPLÁSTICOS NO DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL DO OURIÇO - DO - MAR *LYTECHINUS VARIEGATUS* (ECHINODERMATA; ECHINODEA).

### Resumo

Além dos impactos fisiológicos em organismos marinhos causados por microplásticos ingeridos, a toxicidade causada por substâncias lixiviadas a partir dessas partículas no ambiente requer investigação. Para entender este risco potencial, foi avaliada a toxicidade de *pellets* virgem e *pellets* de plástico encalhados em praia por meio do desenvolvimento embriolarval do ouriço do mar *Lytechinus variegatus*, simulando as transferências de compostos químicos à água intersticial e coluna de água por ensaios de interface *pellet*-água e elutriato, respectivamente. Ambos os ensaios mostraram que *pellets* virgens causaram efeitos tóxicos, aumentando o desenvolvimento embrionário anômalo, 58,1% e 66,5%, respectivamente. A toxicidade dos *pellets* de praia foi inferior à dos *pellets* virgens, e foi observada apenas para o ensaio de interface *pellet*-água. Estes resultados demonstram que (i) os *pellets* de plástico atuam como um vetor de poluentes, em especial para os aditivos plásticos encontrados em partículas virgens; e que (ii) a toxicidade dos produtos químicos lixiviados a partir de sedimentos depende da via de exposição e do compartimento ambiental na qual se acumulam os *pellets*.

**Palavras-chave:** Toxicidade; Ouriço do mar; *Pellets* plásticos; Microplásticos; Poluentes; Aditivos.

## Abstract

Apart from the physiological impacts on marine organisms caused by ingesting microplastics, the toxicity caused by substances leaching from these particles into the environment requires investigation. To understand this potential risk, we evaluated the toxicity of virgin (raw) and beach-stranded plastic pellets to the development of embryos of *Lytechinus variegatus*, simulating transfers of chemical compounds to interstitial water and water column by assays of pellet–water interface and elutriate, respectively. Both assays showed that virgin pellets had toxic effects, increasing anomalous embryonic development by 58.1% and 66.5%, respectively. The toxicity of stranded pellets was lower than virgin pellets, and was observed only for pellet–water interface assay. These results show that (i) plastic pellets act as a vector of pollutants, especially for plastic additives found on virgin particles; and that (ii) the toxicity of leached chemicals from pellets depends on the exposure pathway and on the environmental compartment in which pellets accumulate.

**Keywords:** Toxicity; Sea urchin; Plastic pellets; Microplastics; Pollutants; Additives.

### 2.1. Introdução

Fragmentos plásticos representam mais da metade do lixo do oceano (Derraik, 2002) e os microplásticos (partículas de plástico com um diâmetro igual ou inferior a 5 mm; COLE et al, 2011) vêm recebendo a atenção de agências internacionais (GESAMP, 2010) e da comunidade científica (WRIGHT et al, 2013; IVAR do Sul e COSTA, 2014), por causa das incertezas em relação aos seus efeitos ambientais. *Pellets* de plástico, ou *nibs*, são uma forma de matéria-prima para a fabricação de vários objetos de plástico (EPA, 1990). Eles são pequenos (65 mm) e acabam em ambientes marinhos por perdas durante os processos de produção, transporte e fabricação (THOMPSON et al., 2005). Grandes quantidades de *pellets* de plástico estão sendo encontrados nas zonas costeiras e outros sistemas marinhos (COLE et al., 2011), e adicionado aos seus potenciais impactos ecológicos e tendência de aumento na produção, pellets de plástico tornaram-se um item de especial preocupação para os ambientes marinhos (EPA, 1990).

Os *pellets* mais comuns são derivados a partir de polipropileno, polietileno e poliestireno (EPA, 1992), e compostos químicos (tais como emolientes, corantes e antioxidantes) são normalmente adicionados a eles de modo a melhorar o seu desempenho (EPA, 1990, 1992; TEUTEN et al., 2009). De acordo com Ananthaswamy (2001), muitos destes aditivos são tóxicos e os seus efeitos sobre os organismos podem ser graves.

Browne et al. (2013) mostraram que os aditivos podem contaminar, a partir da ingestão de microplásticos (PVC), os corpos de poliquetas, reduzindo sua atividade alimentar e mostrando efeitos mais severos do que outros poluentes antropogênicos persistentes. No entanto, ainda há controvérsia sobre a liberação desses aditivos e, portanto, seus impactos biológicos (THOMPSON et al., 2004; TEUTEN et al., 2009). Os aditivos podem ser misturados com, ou ligados quimicamente aos polímeros, que poderiam alterar substancialmente a sua capacidade de lixiviação e a toxicidade potencial dos *pellets* de plástico (EPA, 1992).

Polímeros plásticos, incluindo *nibs*, também podem agir como veículos para compostos hidrofóbicos tóxicos absorvidos do ambiente (COLE et al., 2011; FISNER et al., 2013a), aumentando potencialmente a disponibilidade desses poluentes para a biota (GESAMP, 2010; Teuten et al., 2009; BROWNE et al., 2013). DDT, PCB, PAH, nonilfenol e outras substâncias não polares podem ser adsorvidas por superfícies de plástico (Ward e Kach, 2009; FISNER et al., 2013 a,b), tornando-se disponíveis para os animais, principalmente através da ingestão (TEUTEN et al., 2009; BROWNE et al., 2013; CHUA et al., 2014). A maioria destes poluentes é tóxica e bioacumulativa, e se lixiviados do *pellet* e assimilado pelo organismo, podem ser introduzidos na cadeia alimentar, aumentando a sua persistência no meio ambiente (BROWNE et al., 2013; CHUA et al., 2014).

*Pellets* de plástico têm o potencial para acumular estes tipos de moléculas, em concentrações mais elevadas do que a água do mar, e que podem aumentar de acordo com o tempo de exposição, do tipo de resina e suas características (MATO et al., 2001; MCDERMID e MCMULLEN, 2004; HIRAI et al., 2011).

Microplásticos afetam muitas espécies de organismos marinhos, desde suspensívoros e filtradores, até comedores de depósito (Cole et al., 2011, 2013; WRIGHT et al., 2013).

No entanto, os seus riscos não envolvem apenas ingerir o plástico em si (um perigo físico), mas também considerar a contaminação de organismos por poluentes químicos adsorvidos sobre eles (um potencial risco químico). Devido aos riscos ecológicos e efeitos toxicológicos, os microplásticos têm recebido crescente atenção (VON MOOS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012a,b), mas esses esforços geralmente envolvem organismos propensos a ingerir partículas de plástico, gerando uma falta de informação sobre organismos que não são susceptíveis de ingeri-los, mas tê-los em seus arredores.

Microplásticos vêm sendo investigados unicamente como um vetor de compostos químicos (aditivos de polímeros e outros poluentes absorvidos a partir do ambiente) para a biota marinha e os riscos estariam diretamente relacionados à capacidade destes compostos serem desorvidos (lixiviados) a partir deles. Através deste mecanismo, um maior número de organismos marinhos poderia ser afetado pela poluição dos microplásticos, tais como organismos da meiofauna e microfítobentos (que vivem na água intersticial, onde *pellets* afundam e tendem a acumular) e seus estágios de desenvolvimento planctônicos (que vivem na coluna de água, onde *pellets* de plástico permanecem desde a sua entrada no meio marinho até a sua remoção por deposição, ingestão ou degradação).

O uso de larvas planctônicas para avaliar a toxicidade química do microplásticos é importante para ajudar na compreensão dos impactos sobre processos biológicos críticos, tais como o desenvolvimento larval, o que poderia alterar a estrutura de populações e comunidades.

O presente estudo avaliou a toxicidade de *pellets* de plástico no desenvolvimento embrionário do ouriço do mar *Lytechinus variegatus*, usando ambos os grânulos virgens e coletados de praias arenosas. Nossa hipótese é que *pellets* virgens seriam mais tóxicos devido à lixiviação de aditivos, do que *pellets* coletados em praia, já que seus aditivos teriam sido lixiviados, apesar de sua concentração potencialmente maior de poluentes orgânicos hidrofóbicos absorvidos. A outra hipótese é de que a via de exposição, isto é, a liberação de poluentes para a coluna de água e água intersticial, irão influenciar a toxicidade através da biodisponibilidade dos compostos químicos à biota.

## 2.2. Material e Métodos

Para avaliar a toxicidade externa de *pellets* de plástico, considerando uma via não-ingerida e, portanto, os efeitos por lixiviação de aditivos e absorção de poluentes na água, embriões de *L. variegatus* foram expostos a grânulos virgens e coletados em praia. As partículas virgens foram utilizadas para analisar a toxicidade potencial de aditivos de lixiviação (HALDEN, 2010; LITHNER et al, 2011.), enquanto que os obtidos em praia foram escolhidos devido à sua potencial toxicidade, decorrente da dessorção de poluentes hidrofóbicos sorvidos do ambiente (OGATA et al., 2009; FRIAS et al., 2010; FISNER et al., 2013a, b).

### 2.2.1. *Pellets* de plástico

Grânulos de polietileno virgens foram obtidos a partir de uma empresa petroquímica e os coletados em praia foram amostrados aleatoriamente por peneiramento da areia de superfície na baía de Santos, na costa sudeste do Estado de São Paulo, Brasil (Fig. 1). Os pellets foram armazenados em frascos de vidro selados e mantidos no escuro à temperatura ambiente até a realização dos ensaios (24-48 h).

A Região Metropolitana de Santos é uma área densamente urbanizada e poluída de grande importância econômica. Além dos poluentes provenientes da área urbana (esgotos domésticos e queima de combustíveis fósseis, por exemplo), Santos é o maior porto da América Latina (Porto de Santos) e está diretamente ligado a um dos mais importantes complexos industriais no Brasil, o pólo petroquímico de Cubatão (FISNER et al., 2013b). O acesso ao pólo se dá através do estuário de Santos, que aumenta a entrada de poluentes na área marinha (HORTELLANI et al., 2008). Devido ao transporte de grânulos plásticos pelo porto de Santos, que é responsável por 50.000 toneladas de grânulos / mês (FISNER et al., 2013b), uma grande quantidade de *pellets* foi reportada anteriormente nesta baía (TURRA et al., 2014). *Pellets* de cores diferentes, que vão desde translúcido, semelhantes às virgens, para *pellets* escuros com maiores concentrações de poluentes hidrofóbicos (ENDO et al, 2005;. FISNER, 2012) foram encontrados ao longo de suas margens e em

camadas de sedimentos profundos (MANZANO, 2009). Outros estudos relatam a contaminação de *pellets* por HPA nesta área (FISNER et al., 2013a, b).

### 2.2.2 Ensaio ecotoxicológicos

Os ensaios (interface *pellet* - água e elutriato) seguiram os protocolos descritos por CESAR et al. (2004), EPA (2002) e adaptado por ABNT NBR 15350 (2012), e foram empregados a fim de identificar possíveis alterações na toxicidade ocasionada por *pellet* a partir de sua origem (coluna de água) ou deposição (água intersticial de praia), respectivamente.

O ensaio de interface *pellet*-água avaliou a toxicidade da amostra submetida a movimentos ascendentes de água intersticial e da conseqüente remobilização de contaminantes a partir de sedimentos (FERRAZ, et al. 2012). O ensaio elutriato avaliou a toxicidade dos *pellets* após episódios de re-suspensão causados por eventos naturais (por exemplo, ondas) ou atividades humanas (por exemplo, de dragagem). Para ambos os ensaios, três experimentos foram realizados com três tratamentos (controle de água do mar, *pellets* virgens e *pellets* coletados em praia) e empregou quatro repetições para cada tratamento. Para cada ensaio e replica, 100 larvas foram contadas aleatoriamente e analisadas com um microscópio de luz (400x) observando a ocorrência de desenvolvimento anômalo, o que resulta numa frequência relativa (%) do normal (ou a redução em condições normais) desenvolvimento causada pelos compostos lixiviados a partir dos *pellets*.

Para a interface *pellet*-água, foi adaptado a partir do método de Cesar et al. (2004). Nessa preparação, 2 mL de *pellets* plásticos (virgem ou coletados em praia) foram adicionados em tubos e presos com auxílio de rede de plâncton com um anel de plástico, onde 8 ml de água do mar foi adicionado. O sistema permaneceu estático durante 24 h, posteriormente os ovos fertilizados foram colocados nos tubos. Depois de um período de desenvolvimento embrionário de cerca de 24 h, as larvas foram fixadas por adição formaldeído 4% de para posterior análise.

O tratamento elutriato foi adaptado a partir ABNT NBR 15350 (2012), 200 ml de pellets foram colocados em béqueres de 1 L e completados com 800 ml de água do mar filtrada.

A solução foi agitada no aparelho de Jar-teste durante 30 min e deixou-se repousar durante 24 horas (condição estática). Após este período, 4 alíquotas de 10 ml cada foram recolhidas a partir do sobrenadante e colocados em tubos de ensaio, onde também foram adicionados os ovos fertilizados. Como realizada para a interface *pellet*-água, depois de um período de desenvolvimento das larvas normais, o conteúdo dos tubos de ensaio foi fixado com formaldeído a 4% e depois analisado.

Temperatura, oxigênio dissolvido, pH e salinidade foram monitorados em todos os ensaios, seus níveis estavam dentro dos padrões exigidos para o desenvolvimento normal de embriões de *L. variegatus*, de acordo com a ABNT NBR 15350 (2012).

Com os dados satisfazendo os pressupostos necessários para a análise de variância (ANOVA), uma ANOVA bi-fatorial foi realizada para cada ensaio separadamente, comparando tratamentos (controle sem *pellets*, *pellets* virgens, e *pellets* coletados em praia) e ensaios (1, 2) e as diferenças entre a toxicidade da virgem e recolhidos e 3). O teste de Tukey a posteriori foi realizado para identificar as diferenças significativas entre *pellets*. Para a execução da ANOVA bi-fatorial sobre os possíveis efeitos *pellet*-água (diferenças entre o controle e os tratamentos expostos), os dados foram transformados por meio de raiz quadrada.

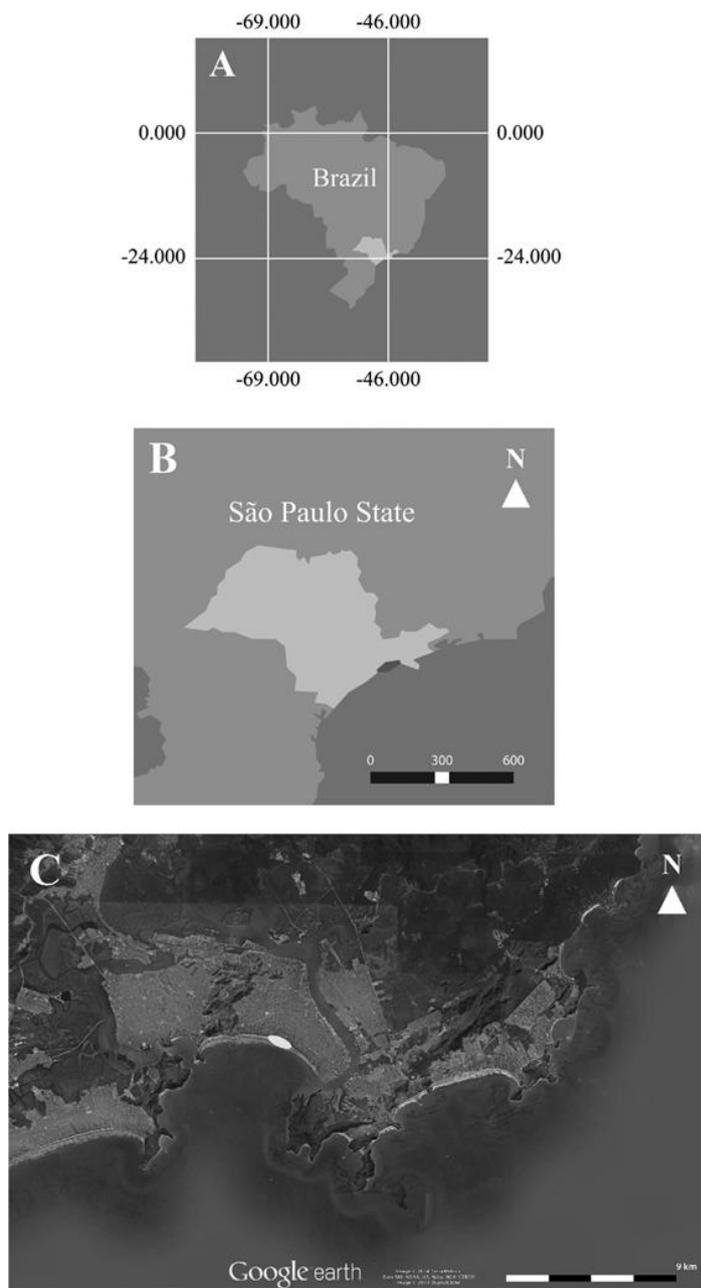


Fig. 1. A área de estudo. (A) Brasil. (B) O Estado de São Paulo e sua costa central em detalhe. (C) Baía de Santos indicando a localização de amostragem de *pellet* na Praia do Boqueirão (ponto branco).

### 2.3. Resultados

A exposição a *pellets* de plástico induziu efeitos tóxicos sobre os embriões de ouriços do mar. Para o ensaio de interface *pellet*-água, houve aumento no desenvolvimento anômalo de larvas em relação ao controle (%), *pellets* recolhidos em praia variaram de 17,2% a 53,3%, com uma média de 34,6% para todos os estudos (Tabela 1). Para o mesmo ensaio, os tratamentos com grânulos virgens tiveram um aumento de 55,2% a 61,9% dos embriões com o desenvolvimento anormal, e uma média de 58,1% (Tabela 1).

No ensaio elutriato, as diferenças entre os tipos de *pellets* (virgem e praia) foram maiores do que os resultados obtidos no ensaio de interface *pellet*-água ( $p < 0,001$ , ANOVA 2 vias), enquanto as diferenças entre os estudos foram menos evidente ( $P > 0,05$ , ANOVA 2 vias). Os *pellets* coletados em praia tiveram um efeito menor sobre o desenvolvimento larval, e em comparação o número de embriões anômalos encontrados foi inferior ao no controle. Neste caso, o aumento anômalo de larvas em relação ao controle (%) variou de 3,0% a 10,1%, com uma média de 4,8% para todos os ensaios (Tabela 1). Os *pellets* virgens, no entanto, causaram aumento das frequências de desenvolvimento anômalo de 52,0% para 84,6%, e uma média de 66,5% em relação ao controle (Tabela 1).

O ensaio de interface *pellet*-água mostrou um impacto significativo para ambos os tipos de *pellets* em todos os ensaios, com diferenças em relação a tratamentos (desenvolvimento anormal: controle < coletado em praia < virgem, Tabelas 1 e 2, Fig. 2A). Para o tratamento elutriato, no entanto, houve uma interação significativa entre tratamento e ensaio ( $p < 0,001$ , Tabela 1, Fig. 2B) e os efeitos adversos foram encontrados apenas para os *pellets* virgens, com uma diferença notável do controle em todos os ensaios (desenvolvimento anômalo: controle = pellets coletados em praia < virgem, Tabelas 1 e 2, Fig. 2B). Embora não houvesse uma diferença entre os testes ( $p < 0,001$ , Tabela 2, Fig. 2B), isso não afeta o efeito significativo que os *pellets* virgens causam ao desenvolvimento embriolarval do ouriço do mar.

Tabela 1

Redução percentual no desenvolvimento embrionário causada pela interface *pellet* - água e elutriato, relacionadas com as condições controle (sem *pellets*) para cada ensaio, médias, e para ambas as amostras *pellets* coletados em praia e virgem.

Ensaio/tratamento	Ensaio 1 (%)	Ensaio 2 (%)	Ensaio 3 (%)	Média dos Ensaios (%)
Interface pellet-água Pellets coletados em praia	53.3	31.2	17.2	34.6
Pellets virgens	55.2	61.9	57.4	58.1
Elutriato Pellets coletados em praia	10.1	6.7	3.0	4.8
Pellets virgens	52.0	84.7	64.2	66.5

Tabela 2

Resultados da ANOVA bi-fatorial comparando (1) tratamento (controle sem grânulos, *pellets* virgens, e *pellets* recolhidos na praia) e (2) ensaio (1, 2, e 3) entre ensaios (interface *pellet*-água e elutriato).

ANOVA 2 vias	SS	df	MS	F	p
<b>Tratamento</b>					
Interface pellet-água	75.993	2	37.997	20.084	<0.001
Ensaio	0.570	2	0.285	0.151	0.861
Tratamento/Ensaio	10.414	4	2.603	1.376	0.268
<b>Tratamento</b>					
Elutriato	25,835.056	2	12,917.528	620.041	<0.001
Ensaio	1,276.389	2	638.194	30.633	<0.001
Tratamento/Ensaio	1,066.611	4	266.653	12.799	<0.001

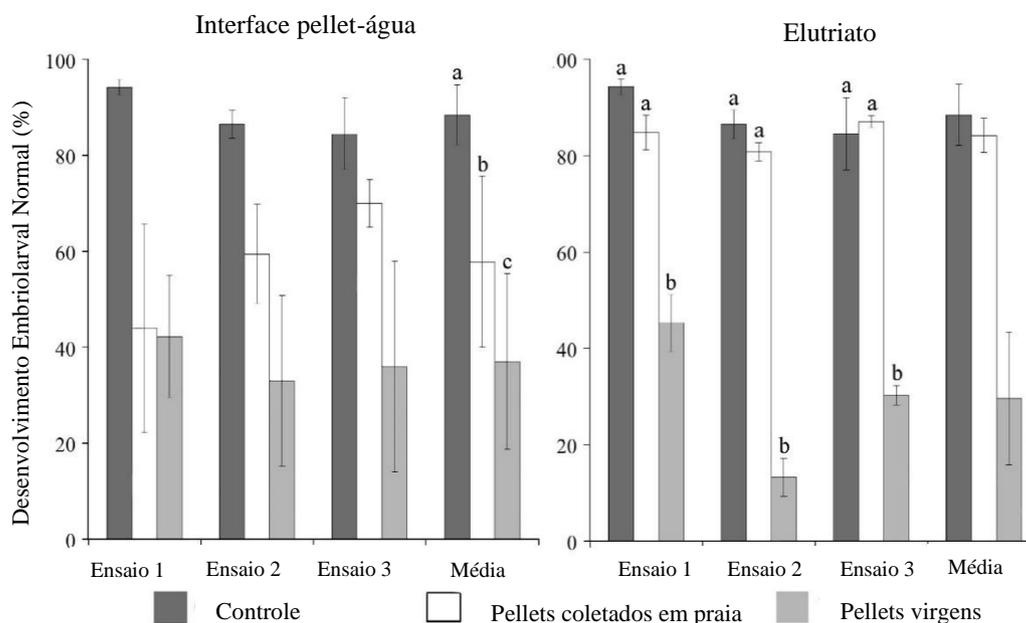


Fig. 2. Proporção de desenvolvimento larvar normal (%) nos três ensaios (a) Ensaio de interface *pellet*-água; (B) Ensaio elutriado, comparando o controle (água do mar), *pellets* coletados em praia e *pellets* virgens. Letras diferentes (a, b, c) representam diferenças significativas no teste a posteriori de Tukey. Para interface *pellet*-água a interação entre o tratamento e ensaio não foi significativa, e, por conseguinte, o teste de Tukey comparou a média dos valores totais (A). O teste de Tukey para o ensaio elutriado foi feita separadamente para cada ensaio, devido à interação significativa entre tratamento e ensaio (B).

## 2.4. Discussão

Para ambos os tratamentos, *pellets* virgens provaram ser tóxicos em todos os ensaios, ao contrário dos grânulos coletados na praia em Santos, que não apresentam toxicidade perceptível no ensaio de interface *pellet*-água. Esta diferença sugere que *pellets* recolhidos na praia tendem a ter uma menor toxicidade do que os *pellets* virgens, embora a toxicidade de *pellets* virgens possa variar em função dos diferentes aditivos utilizados na sua composição.

Juntamente com o uso generalizado de produtos de plástico pela sociedade contemporânea, as preocupações científicas e governamentais sobre os seus aditivos químicos também surgem (MEEKER et al., 2009). No entanto, não se sabe muito sobre os riscos para o ambiente marinho e biota. Ingestão de microplásticos por organismos marinhos pode transmitir aditivos plásticos (CHUA et al., 2014; Browne et al., 2013) e estes aditivos são geralmente tóxicos, causando efeitos fisiológicos quando assimilado pela biota (EPA, 1992; Teuten et al., 2009; BROWNE et al., 2013).

Os nossos resultados são consistentes com os achados de Browne et al. (2013), que também observaram que os aditivos, aparentemente, causam mais danos para os organismos que outros poluentes que podem ser absorvidos por polímeros plásticos. Neste estudo, no entanto, os poliquetas assimilaram maiores quantidades de poluentes (poluentes orgânicos persistentes e aditivos de plástico) através da ingestão de microplásticos contaminados, ao invés de partículas de sedimentos, enquanto os nossos resultados acrescentam a possibilidade de efeitos fisiológicos não de ingestão, mas a partir da absorção de compostos lixiviados a partir de *pellets* de plástico através da parede do corpo. Embora dessorção simulada de poluentes orgânicos de microplástico à água do mar

mostrou-se menor do que em organismos que ingeriram pellets (BAKIR et al., 2014), o presente estudo mostrou que os compostos lixiviados de *pellets* de plástico representam uma via tóxica adicional para as larvas do ouriço – do - mar *L. variegatus*.

No entanto, devido às políticas do setor de privado, não temos informações adicionais sobre o tipo e a concentração de aditivos plásticos aplicadas nos grânulos de polietileno virgem utilizada no presente estudo, dificultando as discussões.

Uma vez que alguns aditivos plásticos, tais como ftalatos, ao serem lixiviados a partir da matéria em partículas podem ser facilmente biodegradados no meio marinho (Teuten et al., 2009), este pode ter um efeito rápido quando aditivos são liberados de suas partículas carreadoras (i.e. pellets) para a água do mar. Esta possibilidade enfatiza a importância de se evitar a perda direta de *pellets* de plástico virgens em habitats marinhos durante a fabricação e transporte.

A toxicidade causada por *pellets* encontrados no ambiente costeiro, por sua vez, pode estar relacionada com os poluentes hidrofóbicos sorvidos sobre eles, e sua biodisponibilidade (capacidade de dessorção e assimilação por parte dos organismos). Em áreas intensamente urbanizadas e industrializadas, as muitas fontes de poluentes facilitam a presença de contaminantes orgânicos na coluna de água (KARAPANAGIOTI et al., 2011; MATO et al., 2002), e as características apolares dos *pellets* de plástico tornam-os transportadores eficientes destas substâncias (OGATA et al., 2009). Na verdade, altas concentrações de poluentes orgânicos têm sido registradas em grânulos recolhidos em praias (por exemplo, MATO et al., 2002; ENDO et al., 2005; FISNER et al., 2013a, b) e evidências mostram que alguns desses poluentes são preferencialmente sorvidos nos fragmentos de plástico em vez de no sedimento (Teuten et al., 2007). No entanto, a distribuição de compostos orgânicos dentro (KARAPANAGIOTI e KLONTZA, 2008) e entre (ENDO et al., 2005; FISNER et al., 2013a,b) pellets não está bem esclarecida, e esta distribuição pode ser relacionada com as diferenças significativas encontrada entre os ensaios.

Teuten et al. (2009) observaram que os processos de sorção e dessorção desempenham um papel importante na distribuição e os impactos dos contaminantes. A toxicidade potencial de *pellets* de plástico pode ser influenciada por processos de adsorção e

dessorção, que por sua vez irão variar devido a diferentes características, tais como (i) a afinidade dos poluentes para o polímero plástico, e para a solução de lixiviação (considerando o seu comportamento isolado e também como uma mistura complexa); e (ii) o período de tempo em que o plástico persiste no meio ambiente, isto é, a sua degradabilidade.

As propriedades dos polímeros plásticos podem influenciar a qualidade e quantidade dos poluentes absorvidos sobre eles (KARAPANAGIOTI et al., 2011; HIRAI et al., 2011; FISNER, 2012; BAKIR et al., 2012.), o que poderia estar relacionado com a taxa de sorção destes compostos em função das propriedades da resina (FRIES e ZARFL, 2012).

Embora isto possa resultar em concentrações elevadas de poluentes orgânicos em alguns grânulos de plástico, mas também pode diminuir a sua biodisponibilidade, como sugerido pelos resultados de Browne et al. (2013) e CHUA et al. (2014).

Os estudos sobre *pellets* de polipropileno indicam que a distribuição de compostos dentro dos polímeros depende da composição química da solução de contato dos *pellets* o que torna claro que a cinética é um fator de influência para o grânulo de plástico (KARAPANAGIOTI e KLONTZA, 2008; BAKIR et al., 2014). Considerando que os poluentes orgânicos estão presentes no ambiente como uma mistura, o seu comportamento competitivo para sorção em partículas hidrofóbicas também deve ser considerado (BAKIR et al., 2012), como demonstrado para o fenantreno (Phe) e o DDT.

O desgaste de grânulos de plástico também pode influenciar a sorção de poluentes (ENDO et al., 2005). Maiores concentrações de PCB e HPA foram identificadas em *pellets* mais escuros em comparação com os mais claros, uma vez que as suas cores estão relacionadas com o período de exposição à luz solar e fontes de contaminação (ENDO et al., 2005; FRIAS et al., 2010; FISNER, 2012). Devido ao elevado estado de degradação dos *pellets* de plástico devido a idade (tais como o aumento da área de superfície devido a marcas de abrasão), Endo et al. (2005) e Ogata et al. (2009) sugeriram igualmente que estas partículas tendem a ter uma maior capacidade de sorção. Outros pesquisadores, no entanto, descobriram que as concentrações de HPA adsorvido por *pellets* de plástico recolhidos na baía de Santos variam ao longo da costa (FISNER et al., 2013b) e com a profundidade (FISNER et al., 2013a), e sugerem que o processo de sorção para *pellets* de

plástico é influenciado não só pelas suas características e período de persistência no ambiente, mas também pelo nível local de contaminação.

Uma vez que todas estas inferências não foram previstas, a maneira aleatória com que os grânulos foram coletados na praia pode ter resultado na presença de uma grande variedade de poluentes químicos lixiviados nos ensaios de elutriato. Esta heterogeneidade pode explicar a interação entre os tratamentos e os ensaios de elutriato. Outra razão que explicaria porque apenas os *pellets* virgens apresentaram toxicidade nos elutrios pode ser pelo fato de alguns compostos adsorvidos às partículas volatilizam mais rapidamente quando submetidos a processos de mistura turbulenta (CESAR et al., 2004; Moore, 2008).

O ensaio elutriato simula os potenciais riscos para os organismos na coluna d'água, e por isso a solução experimental (*pellets* em água do mar) foi agitada. Esta agitação, no entanto, pode ter aumentado a velocidade de volatilização de alguns poluentes lixiviados a partir dos *pellets* coletados, sugerindo que os *pellets* que permanecem na coluna de água por períodos mais longos (tal como polietileno de baixa densidade) são mais susceptíveis de perder seus compostos adsorvidos e tornam-se menos tóxicos do que aqueles que afundam rapidamente. Em última análise, essa diferença entre *pellets*, demonstra que aqueles encontrados em praias representam o risco ambiental mais provável no que diz respeito aos impactos ambientais relacionados com a não ingestão. Não menos importante, ela também mostra que a metodologia de exposição pode influenciar as conclusões da avaliação dos riscos ambientais, destacando a importância do uso de mais de um ensaio ecotoxicológico para avaliar a toxicidade de microplásticos, incluindo os diferentes compartimentos ambientais.

Este estudo avaliou a toxicidade da exposição externa para *pellets* de plástico e, por inferência, outros microplásticos, aumentando a nossa compreensão dos efeitos adversos deste poluente na biota aquática. Em nossos experimentos, *pellets* virgens (devido a lixiviação de aditivos) foram mais prejudiciais, em seguida, *pellets* de plástico já presentes no ambiente marinho, complementando as conclusões de Browne et al. (2013) para microplásticos ingeridos, que denota a capacidade dos grânulos de causarem danos imediatamente após a sua introdução em habitats marinhos. A toxicidade variável observada para os *pellets* recolhidos em praia é relacionada com as concentrações

altamente variáveis de hidrocarbonetos absorvidos a partir do ambiente e pela capacidade de dessorção destes poluentes a partir dos *pellets*. Isto poderia ser diferente dos *pellets* virgens, uma vez que as suas concentrações de aditivos (obtidos a partir de uma fábrica) devem ser aproximadamente as mesmas por *pellet*. Com base nestes dois diferentes ensaios, podemos concluir que os *pellets* depositados no ambiente podem causar mais danos a água intersticial do que quando ressuspensos, podendo lixiviar para a coluna d'água. O uso de larvas como modelos sugere que a toxicidade externa também pode ser uma questão importante para avaliar ameaças em ambientes marinhos onde *pellets* virgens são liberados.

### 3. ESTUDO DO IMPACTO DE MICROPLÁSTICOS EM SEDIMENTOS MARINHOS.

#### Resumo

A poluição devida ao lixo marinho tem recebido grande atenção nos últimos anos, e resíduos plásticos têm sido considerados responsáveis por mais da metade da sua composição. Dentre esses resíduos encontram-se os pellets, grânulos plásticos de diferentes polímeros oriundos da indústria, utilizados como matéria prima para fabricação de diferentes objetos. Atualmente, há uma crescente ocorrência desse material no ambiente marinho oriundo de atividades portuárias e industriais. Devido à sua porosidade, apresenta alta capacidade de associação a contaminantes, principalmente orgânicos, atuando como um carreador químico propiciando o transporte e exposição de poluentes à organismos marinhos. Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a toxicidade de pellets plásticos na matriz ambiental sedimento por meio de ensaios ecotoxicológicos empregando o copépodo harpacticóida epibentônico *Nitocra* sp. Foram avaliados efeitos crônicos em organismos expostos aos tratamentos elutriato e sedimento integral por meio de sedimentos marcados com *pellets* virgens e *pellets* de praia. Foi observada toxicidade no tratamento com sedimento integral marcado com *pellets* virgens e *pellets* coletados em praia, o que pode estar associado aos aditivos oriundos do processo de fabricação de *pellets* de polipropileno e à diversa quantidade de compostos sorvidos a partir do ambiente, no caso dos *pellets* de praia.

**Palavras-chave:** Nitocra; Inibição reprodutiva; Pellets Plásticos; Sedimento; Toxicidade.

**Abstract**

The pollution due to marine litter has received huge attention in the last years, and plastic wastes have been responsible for more than half of its composition. Among these residues, pellets, plastic beads of different polymers from industry, have been used as raw material for the manufacture of different products. Currently, there is an increasing occurrence of this material in the marine environment, which is associated to port and industrial activities. Due to their porosity, plastic pellets have a high capacity of adsorbing contaminants, especially organic, acting as a chemical carrier that can transport and facilitate the exposure of marine organisms to such pollutants. In this context, this study aims to evaluate the toxicity of plastic pellets in marine sediment, through ecotoxicological tests employing the harpacticoid epibenthic copepod *Nitocra* sp. Chronic effects on organisms exposed to different treatments (elutriate and whole sediment) were evaluated, considering sediments marked with virgin and beach-stranded plastic pellets. The sediments treated with both pellets induced chronic toxicity to the copepods, which can be associated with additives derived from polypropylene pellets manufacturing process and varying the amount of sorbed compounds from the environment.

**Keywords:** *Nitocra*, Reproductive inhibition, Plastic Pellets, Sediment, Toxicity.

### 3.1. Introdução

Historicamente, o desenvolvimento econômico e tecnológico tem levado ao surgimento de novos produtos. Um dos setores que apresentou grande desenvolvimento nesse período foi o relacionado com a extração, transporte, refino e comercialização do petróleo (setor petrolífero ou de petróleo e gás). Devido à grande diversidade de usos do petróleo e seus derivados, o petróleo se tornou essencial para o ser humano, tanto em suas atividades industriais, como em atividades cotidianas. Entre os materiais derivados do petróleo mais utilizados estão os polímeros plásticos. Segundo Wang et al. (2016) plásticos são considerados os materiais mais versáteis já inventados pelo homem, pois quase todos os produtos usados no cotidiano o contêm, tornando-se assim uma parte essencial do estilo de vida moderno (PLASTIC EUROPE, 2012).

Devido às suas diversas propriedades úteis, o plástico levou a inúmeros avanços tecnológicos, a economia de energia, a melhoria da saúde do consumidor, e com custos de transporte reduzidos fizeram com que os plásticos se tornassem um dos fatores de impacto mais drásticos e observáveis no ambiente (ZARLF et al., 2010), devido ao alto descarte inadequado e a perda dos mesmos durante os processos de produção, termomoldagem e transporte.

Polímeros sintéticos têm sido inseridos no meio marinho, em quantidades que acompanham proporcionalmente seu nível de produção ao longo do último meio século. No entanto, nas últimas duas décadas do século 20, a taxa de deposição no ambiente acelerou e ultrapassou a taxa de produção, devido à disposição inadequada dos resíduos, e os plásticos são agora um dos poluentes mais comuns e persistentes em águas oceânicas e praias ao redor do mundo (MOORE, 2008; BARBOZA et al., 2015).

Desde a década de 1970, diversos estudos relacionados à ocorrência de polímeros plásticos em ambientes marinhos vêm sendo publicados (CARPENTER & SMITH, 1972; CARPENTER et al., 1972; KARTAR et al., 1973; HAYS & CORMONS, 1974; SHIBBER, 1979), em várias localidades ao redor do mundo, demonstrando o alcance e o grande impacto do microplástico ao ambiente marinho. Mais recentemente, estudos visando

caracterizar quimicamente esses microplásticos também passaram a ser realizados (MATO et al., 2001; ENDO et al., 2005; OGATA et al., 2009; FISNER et al. 2013a,b).

Em um estudo realizado no Atlântico Sul, no qual foram coletadas amostras de água e peixes e feitas análises de éteres de difenila polibromados (PBDE, do inglês polybrominated diphenyl ethers), Rochman et al. (2014) afirmaram que a presença desses compostos e seus congêneres é indicativa da contaminação química oriunda de materiais plásticos, de modo que os PBDE poderiam ser considerados marcadores da poluição por plásticos.

Segundo Zarlf et al. (2011) programas de monitoramento de poluição por plástico têm sido implementados em escalas global e local, entre eles destaca-se o *International Pellet Watch* que vem monitorando a ocorrência e o nível de contaminantes sorvidos em *pellets* plásticos encontrados ao longo de praias do mundo todo. Turner & Holmes, (2011) afirmam que as fontes de pellets são tanto de origem terrestre quanto marinha havendo perdas significativas ao longo do manuseio, transferência e transporte.

A maioria dos *pellets* plásticos é composta por polímeros de baixa densidade, porém Van Cauwenberghe et al. (2015) afirmaram que plásticos com uma densidade que excede a da água do mar ( $> 1,02 \text{ g cm}^{-3}$ ) afundam e podem se acumular nos sedimentos. No entanto, através da modificação da densidade por meio de processos de sorção e acúmulo de compostos e formação de biofilme, *pellets* de baixa densidade aumentam sua massa, e têm se depositado em sedimentos de praia e de fundo dos oceanos. Sendo assim, podem se tornar onipresentes no ambiente marinho, onde há evidência de que os sedimentos são um importante sumidouro deste material (VAN CAUWENBERGHE et al., 2015).

Recentemente diversos estudos têm demonstrado os impactos do microplástico sobre a biota, principalmente via ingestão (VON MOOS et al., 2012; BROWNE et al., 2013; DE SÁ et al., 2014; VAN CAUWENBERGHE et al., 2015), mas são poucos os estudos que avaliam os impactos por exposição externa ou não ingestão, via coluna d'água ou sedimento.

Sedimentos são uma importante matriz do ambiente aquático, sendo compostos por misturas de materiais particulados como silte, argila e areias, e também matéria orgânica viva e morta. São reservatórios de uma variedade de resíduos biológicos, químicos e poluentes em corpos hídricos (Manahan, 2013). De acordo com Abessa (2002), o sedimento constitui importante compartimento dos ecossistemas aquáticos, sendo

reconhecido como o principal destino para as substâncias introduzidas nos oceanos e por acumular estes compostos em níveis muito mais elevados que aqueles observados na coluna de água adjacente. Além disso, inúmeros processos químicos, físicos e biológicos podem ocasionar a liberação dos contaminantes dos sedimentos para a coluna de água, produzindo riscos para a biota.

Por sua capacidade de acumular contaminantes ao longo do tempo e pela sua importância ecológica, os sedimentos têm sido utilizados como importantes indicadores da saúde dos ecossistemas aquáticos, sendo hoje considerados tão importantes em avaliações ambientais quanto a coluna d'água ou a bioacumulação em organismos marinhos (Abessa, 2002).

Nesse contexto, o presente estudo visa identificar os efeitos tóxicos em organismos bentônicos expostos a sedimento marcado com *pellets* virgens e coletados em praia em concentrações ambientalmente relevantes. Para tanto, empregou-se como organismo teste o copépodo epibentônico *Nitocra* sp exposto a elutriato e sedimento integral durante 10 dias, e posterior avaliação da sua performance reprodutiva.

## **3.2. Material e Métodos**

### 3.2.1 Coleta de amostras

O sedimento controle para realização dos ensaios foi obtido na praia do Engenho d'Água, localizada no município de Ilhabela, no litoral norte de SP, local este escolhido por se apresentar como ótima área de referência, conforme estudos preteritos realizado por Fenilli (2012) onde o sedimento local apresentou maiores taxas de reprodução para copepodas quando comparados a outras áreas controle, além disso este local já vem sendo utilizado por diversos estudos (ABESSA, 2002; ABESSA et al, 2005) como área controle. Após coletado o sedimento foi transferido para saco plástico, levado a laboratório e colocado em refrigeração a 4°C, até sua utilização.

Em laboratório a matriz sedimentar foi seca em estufa a 60°C e separada em 2 frações sendo uma para controle e preparação das amostras para teste, com pellets de praia, obtidos na praia do Boqueirão, localizada no município de Santos, litoral centro de SP e pellets virgens (polipropileno), obtidos a partir de uma indústria, e a segunda fração para a realização das análises de sedimento.

### 3.2.2 Análises sedimentológicas

A análise granulométrica foi realizada a partir do método descrito por MCCAVE & SYVITSKI (1991) onde foram pesadas 3 alíquotas de 100 g de sedimento seco em estufa, para a realização do peneiramento, foi utilizado um conjunto de peneiras de diferentes diâmetros (seguindo a escala de phi), após o peneiramento foram pesados os sedimentos retidos em cada malha e posteriormente foram classificados segundo a escala de Wentworth (1922).

Para a determinação teor de matéria orgânica (M.O) ASTM (2000) foram pesadas 3 alíquotas de 10 g de sedimento seco, em cadinhos de porcelana secos e pesados, em seguida os mesmos foram colocados em mufla a 500°C por um período de 3 horas, posteriormente essas amostras foram deixadas em dessecador para resfriar, e após atingirem temperatura ambiente as mesmas foram pesadas, a diferença de peso obtida entre o peso inicial e o peso final é o teor de matéria orgânica da amostra.

O teor de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) foi determinado a partir do método descrito por HIROTA & SZYPER (1975), sendo pesadas 3 alíquotas de 30 g de sedimento seco, após pesagem foi adicionado ácido clorídrico (HCl) 15% cobrindo toda amostra por um período de 24 h, posteriormente a amostra foi lavada em papel filtro (seco em estufa e pesado em balança anteriormente) com água destilada e colocada em estufa a 60 °C para secar por um período de 48 h, após estes procedimentos o papel filtro com a amostra foi pesado, a diminuição de peso da amostra inicial para a final após a digestão ácida, é o teor de  $\text{CaCO}_3$  das amostras.

### 3.2.3 Ensaios Ecotóxicológicos

Para realização dos experimentos foram preparadas amostras de sedimento marcado com pellets (figura 3), seguindo metodologia “*spiked*” adaptada da USEPA (2001), onde houve a mistura do sedimento com os pellets com o auxílio de um aparelho de *jar-rolling* por 15 minutos, baseado em concentrações ambientalmente relevantes (3 *pellets* : 140g de sedimento) obtidas a partir do trabalho realizado por Turra et al. (2014), onde foram encontrados valores acumulados de 25.000 *pellets*/m<sup>3</sup>, após a marcação, os mesmos ficaram em repouso por 7 dias em câmara fria e escura para que os contaminantes presentes no sedimento entrassem em equilíbrio, havendo a troca entre os *pellets* e o sedimento, para a posterior realização dos ensaios empregando os tratamentos de elutriato e sedimento integral.

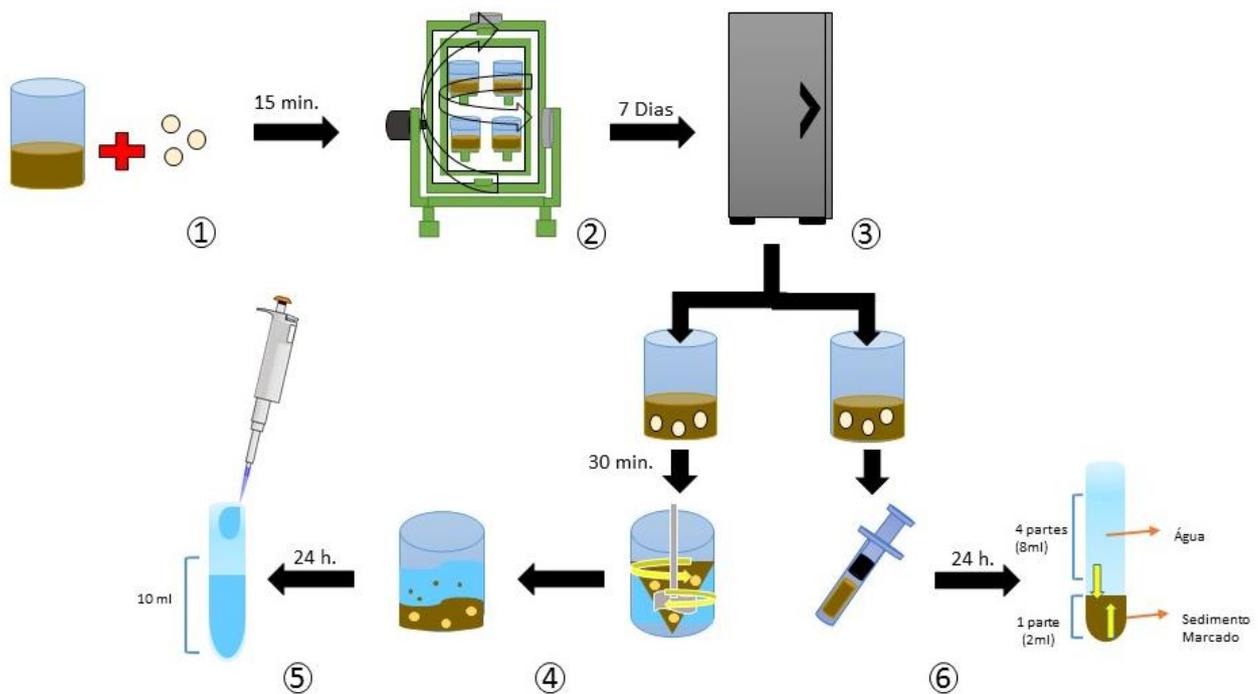


Figura 3 – Preparo do sedimento marcado para realização dos ensaios empregando os tratamentos de elutriato e sedimento integral.

O tratamento elutriato foi realizado seguindo o protocolo descrito pela USEPA (2003), sendo as amostras colocadas em béquer na proporção de 1 parte de sedimento

marcado para 4 partes de água do mar (salinidade 17, filtrada em membrana de 0,45 µm e autoclavada), sofrendo agitação por 30 minutos e deixada em repouso por 24h. Após esse período são retirados 10 ml do sobrenadante de cada amostra (controle, *pellet* virgem e *pellet* praia) e colocado em 4 réplicas de tubos de ensaio para a realização do mesmo.

Para a realização do tratamento com sedimento integral as amostras (controle, *pellet* virgem e *pellet* praia) foram dispostas em 4 tubos de ensaio cada, sendo 2ml de amostra e 8 ml de água do mar (salinidade 17, filtrada em membrana de 0,45 µm e autoclavada) e deixadas em repouso por 24h em câmara fria para que as mesmas entrem em equilíbrio para posterior exposição dos organismos.

Os ensaios com uso do organismo *Nitocra* sp seguiram a metodologia proposta por Lotufo e Abessa (2002) (tabela 2). Para o ensaio crônico, foram adicionadas 5 fêmeas ovadas em 4 réplicas por tratamento, onde ficam expostas por um período de dez dias em câmara de germinação com fotoperíodo de 12/12h e são alimentados no quinto dia de ensaio, para que os organismos não morram por falta de alimento. O ensaio é encerrado com a adição de 125 µl de formol e 1ml do corante rosa de bengala para posterior contagem dos indivíduos jovens (náuplios e copepoditos), avaliando a taxa de reprodução dos organismos (prole/fêmea).

Tabela 3 - Critérios (parâmetros e condicionantes) para realização e validação do ensaio crônico com o copépodo *Nitocra* sp.

<b>Ensaio Crônico</b>	
<i>Nitocra</i> sp. (Lotufo & Abessa, 2002)	
<b>Parâmetros</b>	<b>Condições</b>
Temperatura	25 ± 2°C
Fotoperíodo	12 h / 12h
Sistema de Ensaio	estático
Recipientes - teste	tubos de vidro
Volume Total	10 ml
Réplicas	4
Estágio de vida	adulto
Organismos/Réplica	5 fêmeas ovadas
Critério de aceitação	reprodução no controle
Salinidade	17 - 35 ppm
Água de diluição	água marinha natural filtrada (0,45 µm) e autoclavada
Duração do ensaio	10 dias
Leitura	contagem de náuplios e copepoditos

### 3.2.4 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados quanto a normalidade através do teste de Chi-quadrado ( $X^2$ ) e homogeneidade e variância por meio do teste de Bartlett's. Após terem sido aprovados nos pré-requisitos, foi aplicada análise de variância (ANOVA) 2 vias, separadamente para cada tratamento (elutriato e sedimento integral), comparando a possível diferença entre as amostras (controle, *pellet* virgem e *pellet* praia) a fim de

identificar o tratamento que apresentou diferença significativa em relação ao controle, e ensaios (1, 2 e 3), posteriormente foi aplicado teste de Bonferroni para comparação de médias a fim de identificar diferença entre as amostras.

### 3.3. Resultados e Discussão

#### 3.3.1. Sedimentologia

A análise granulométrica demonstrou predominância de areia fina (33,3 %) e areia muito fina (49%), apresentando uma porcentagem de finos (silte e argila) de 13,69 %. Nas análises de matéria orgânica e carbonato de cálcio foram obtidos os teores de 3 % e 8,10 % respectivamente conforme apresentado na tabela 4.

Tabela 4 – Análises sedimentológicas referentes ao sedimento controle, tamanho do grão, classificação seguindo a escala de Wentworth, porcentagem dos grãos e finos (silte e argila), teor de matéria orgânica (%) e teor de carbonato de cálcio (%).

<b>Análises sedimentológicas</b>				
<b>Ø (mm)</b>	<b>Escala de Wentworth</b>	<b>%</b>	<b>% M.O</b>	<b>% CaCO<sub>3</sub></b>
2,00 - 1,00	Areia Muito Grossa	0, 23		
1,00 - 0,50	Areia Grossa	1, 54		
0,50 - 0,25	Areia Média	2, 13	3,00	8,10
0,25 - 0,125	Areia Fina	33, 30		
0,125 - 0,075	Areia Muito Fina	49, 00		
> 0,075	Silte e Argila	13, 69		

As análises sedimentológicas demonstraram um sedimento com predomínio de areia muito fina, apresentando uma porcentagem de finos (silte e argila) de 13,69 %, com 3 % de teor de matéria orgânica e 8,10 % de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>), evidenciando um sedimento com características que propiciam maior afinidade com compostos orgânicos hidrofóbicos.

### 3.3.2. Elutriato

Para os 3 ensaios de elutriato não foram observadas diferenças significativas dos tratamentos em relação ao controle como demonstra a figura 4, 5 e 6, contudo o ensaio 1 apresentou diferença entre a amostra com *pellet* virgem e a amostra com *pellet* coletados em praia, tendo a primeira amostra apresentado menor taxa de reprodução comparado a segunda respectivamente ( $p < 0,05$ ).

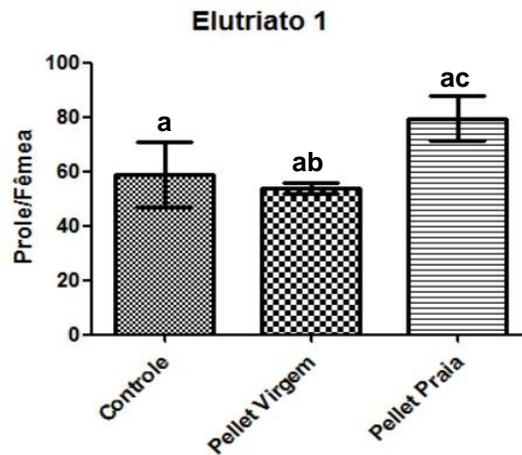


Figura 4 – Resultados do primeiro ensaio de toxicidade crônica sobre a reprodução do copépodo *Nitocra* sp, empregando o tratamento elutriato, comparando o controle com pellet virgem e pellets praia, apresentando suas médias reprodutivas número de proles/pelo número de fêmeas e desvio padrão respectivamente. A letra “a” indica amostras sem diferença estatística em relação controle. As letras “b” e “c” representam diferença significativa entre as amostras.

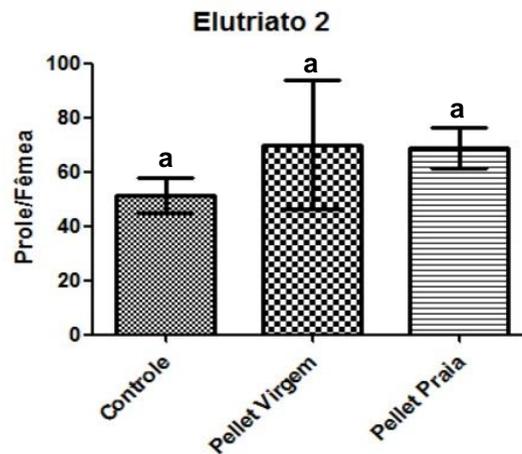


Figura5 – Resultados do segundo ensaio de toxicidade crônica sobre a reprodução do copépodo *Nitocra* sp, empregando o tratamento elutriato, comparando o controle com pellet virgem e pellet praia, apresentando suas médias reprodutivas número de proles/pelo numero de fêmeas e desvio padrão respectivamente. A letra “a” indica amostras sem diferença estatística.

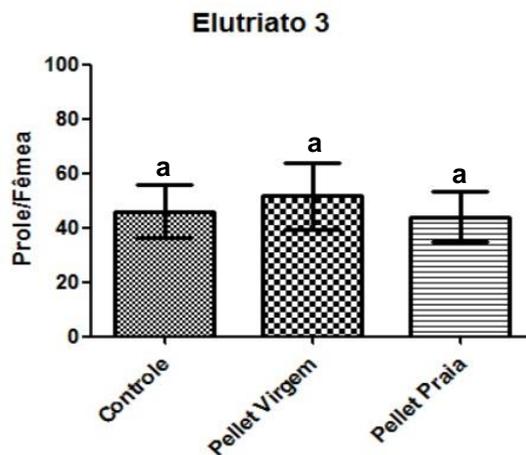


Figura 6 – Resultados do terceiro ensaio de toxicidade crônica sobre a reprodução do copépodo *Nitocra* sp, empregando o tratamento elutriato, comparando o controle com pellet virgem e pellet praia, apresentando suas médias reprodutivas número de proles/pelo numero de fêmeas e desvio padrão respectivamente. A letra “a” indica amostras sem diferença estatística.

### 3.3.3. Sedimento Integral

Foram realizados 3 ensaios com sedimento integral, no ensaio 1 (figura 7) foi observada toxicidade para a amostra contendo *pellets* virgens ( $p < 0,01$ ), e *pellets* coletados em praia ( $p < 0,05$ ) apresentaram diferença em relação ao controle. No ensaio 2 (figura 8) não foram observadas toxicidade em ambos os tratamentos. Para o ensaio 3 (figura 9) não se encontrou diferença estatística das amostras em relação ao controle.

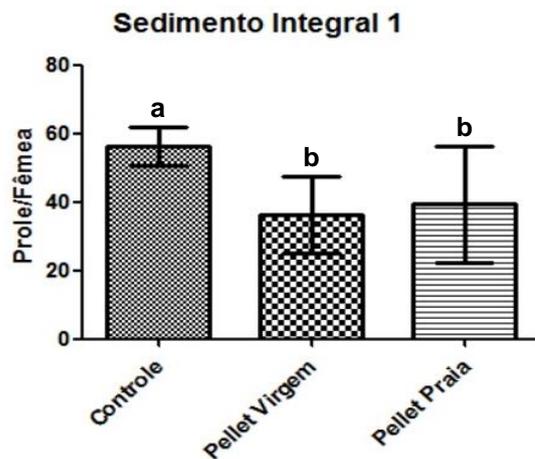


Figura 7 – Resultados do primeiro ensaio de toxicidade crônica sobre a reprodução do copépodo *Nitocra* sp, empregando o tratamento com sedimento integral, comparando o controle com *pellet* virgem e *pellet* praia, apresentando suas médias reprodutivas número de proles/pelo numero de fêmeas e desvio padrão respectivamente. As letras “a” e “b” indicam grupos de amostras com diferença estatística.

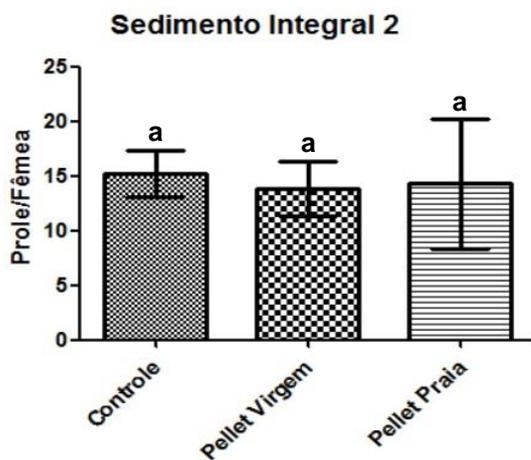


Figura 8 – Resultados do segundo ensaio de toxicidade crônica sobre a reprodução do copépodo *Nitocra* sp, empregando o tratamento com sedimento integral, comparando o controle com *pellet* virgem e *pellet* praia, apresentando suas médias reprodutivas número de proles/pelo numero de fêmeas e desvio padrão respectivamente. A letra “a” indica amostras sem diferença estatística.

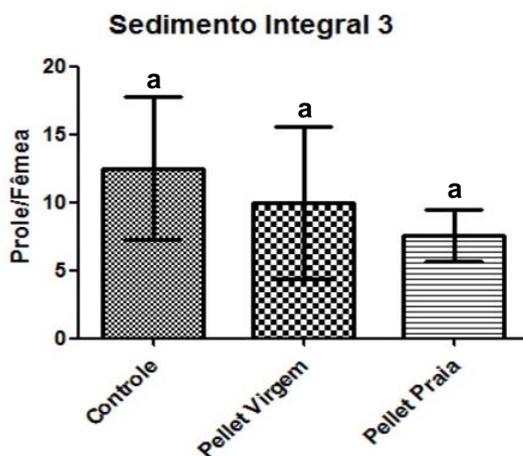


Figura 9 – Resultados do terceiro ensaio de toxicidade crônica sobre a reprodução do copépodo *Nitocra* sp, empregando o tratamento com sedimento integral, comparando o controle com *pellet* virgem e *pellet* praia, apresentando suas médias reprodutivas número de proles/pelo numero de fêmeas e desvio padrão respectivamente. A letra “a” indica amostras sem diferença estatística.

Uma questão que deve ser considerada diz respeito à composição dos *pellets* virgens testados no presente estudo. Os *pellets* virgens são de polipropileno, segundo Brandon et al. (2016) tendem a se tornar mais frágeis em condicionantes ambientais quando comparados a outros polímeros como o polietileno de alta e baixa densidade, aumentando sua capacidade de adsorver ou liberar contaminantes nas matrizes ambientais. Mato et al. (2001) afirmam que pellets plásticos de polipropileno encontrados em ambientes marinhos tem concentrações de PCB e DDE de 100.000 a 1.000.000 de vezes maiores que águas marinhas ao seu entorno.

Um fato relevante é que muito dos aditivos encontrados em microplásticos como os ftalatos (Di-n-butilftalato, Di-etilftalato e Di-metilftalato), alquifenóis (nonilfenól 500 à 3300 mg/g e), bisfenol-a (BPA), retardantes de chama bromados (PBDE 5 à 30 % do peso total do plástico) e triclosan (0,1 à 5 % do peso total do plástico) (ASCER, 2015; INOUE et al., 2001; DARNERUD et al., 2001; BRAID & WALE,2002), são desreguladores endócrinos, que são compostos conhecidos por gerar anomalias nos sistemas reprodutivos e alterações no processo de vitelogênese de animais (Bila & Dezotti, 2007), podendo estar associado a diminuição das taxas de reprodução observadas no presente estudo.

Um fator que dificulta uma avaliação mais precisa dos *pellets* virgens, é que não se sabe ao certo quais compostos são adicionados, e em quais concentrações, esses aspectos variam conforme o polímero e sua aplicação final, sendo a composição destes aditivos mantidas em sigilo pelas indústrias (ASCER, 2015).

Microplásticos introduzidos no ambiente marinho podem sorver compostos orgânicos hidrofóbicos exógenos por uma série de fatores, como tipo de polímero e condicionantes ambientais, que influenciam na sua capacidade de sorção. Um dos grandes desafios na

avaliação dos potenciais impactos dos compostos orgânicos hidrofóbicos sorvidos pelos microplásticos e entender se os mesmos estão em equilíbrio com outras fases no ambiente (ZICCARDI et al., 2016), tornand-se disponíveis à biota.

Diversos estudos vêm demonstrando que plásticos se comportam como carreadores químicos no ambiente, devido sua capacidade de sorção e desorção, apresentando variação nas concentrações de compostos como os encontrados em fragmentos por Hirai et al. (2011),  $\Sigma$ PCBs (1 à 436 ng.g<sup>-1</sup>),  $\Sigma$ HPAs (1 à 9297 ng.g<sup>-1</sup>), PBDE (BDE- 47 e BDE -209 - 0,3 à 9909 ng.g<sup>-1</sup>), alquifenóis (Nonilfenol 0,3 à 3936 ng.g<sup>-1</sup> e Octifenol 0,1 à 1530 ng.g<sup>-1</sup>),  $\Sigma$ DDT ( DDE, DDD, DDT – 0,2 à 198 ng.g<sup>-1</sup>), Bisfenol – A (0,2 à 729,7 ng.g<sup>-1</sup>) ou em *pellets* por Van et al. (2012), HPAs ( 18 à 210 ng.g<sup>-1</sup>), PCBs ( 3,8 à 42 ng.g<sup>-1</sup>), Clordanos (1,8 à 170 ng.g<sup>-1</sup>) e DDT (0,56 à 64 ng.g<sup>-1</sup>).

Em estudo realizado ao longo do litoral do estado de São Paulo, Taniguchi et al. (2016) encontraram altas concentrações de PCB's ( $\Sigma_{51}$ PCBs 818 ng.g<sup>-1</sup> e  $\Sigma_{13}$ PCBs 551 ng.g<sup>-1</sup>), PBDEs ( $\Sigma$ PBDEs 2 ng.g<sup>-1</sup>), HPAs ( $\Sigma$ HPAs 8540 ng.g<sup>-1</sup> e  $\Sigma_{16}$ HPAs 1256 ng.g<sup>-1</sup>) e pesticidas organoclorados ( $\Sigma$ DDTs 441 ng.g<sup>-1</sup>, HCB 44,4 ng.g<sup>-1</sup>, Mirex 55,8 ng.g<sup>-1</sup>,  $\Sigma$ HCHs 1,48 ng.g<sup>-1</sup>,  $\Sigma$ Clordano 22,9 ng.g<sup>-1</sup>) em *pellets* coletados na região de Santos (área de obtenção de *pellets* no presente estudo), sendo que Santos apresentou as maiores médias de concentrações de compostos nos *pellets*, quando comparados a praias de outros municípios do litoral do estado.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram as diferentes possibilidades dos *pellets* depositados em sedimento apresentarem efeitos conforme as condicionantes a quais são expostos. Sobre vigorosa agitação (elutriato), não foram observados efeitos para as amostras em ambos os ensaios, contudo quando em repouso (sedimento integral) as mesmas já demonstram seu potencial de gerar efeito, o que fica evidenciado principalmente no ensaio 1, onde as amostras contendo *pellet* virgem e *pellet* praia apresentaram toxicidade. No segundo e terceiro ensaios não foram observadas diferenças estatísticas em relação ao controle, mas se nota uma diminuição no número de descendentes gerados, especialmente no ensaio 3, onde a diferença não encontrada em relação ao controle pode estar relacionada ao alto desvio padrão.

A ausência de efeito nos ensaios empregando o tratamento elutriado pode estar ligada ao fato da presença de ligantes no sedimento como finos (silte e argila), matéria orgânica, carbonato de cálcio e a microbiota (microfitobentos, bactérias e fungos) a ele associado, tendo estes maior afinidade com os contaminantes presentes nos *pellets* como hidrocarbonetos alifáticos, ftalatos, PCB, PBDE, entre outros, que quando remobilizados apresentam pouca ou nenhuma interação com a água, outro fator há considerar segundo Manahan (2013) é a formação de colóides hidrofóbicos (partículas orgânicas associadas a compostos apolares), que apresentam menor interação com a coluna d'água, devido a sua estabilidade de cargas na camada superior.

O ensaio crônico de sedimento integral com o copépodo bentônico *Nitocra* sp. apresentou diferença estatística significativa para as amostras com *pellet* virgem e *pellet* coletados em praia, tendo estes apresentado menor taxa reprodutiva em relação ao controle. Esse resultado é corroborado pelos ensaios empregando larvas de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, onde grânulos virgens e de praia apresentaram toxicidade quando exposto ao tratamento interface *pellet*-água onde não há agitação da amostra, Li et al. (2015) em estudo agudo empregando larvas de craca *Amphibalanus amphitrite* expostos a lixiviados de diferentes polímeros também observou toxicidade para os plásticos oriundos da indústria.

Um fator a se considerar ao efeito apresentado é que muitos compostos apresentam afinidade com a matéria orgânica associada ao sedimento, disponibilizando uma via indireta de contaminação de microplástico devido a ingestão da matéria orgânica como alimento pelos organismos.

Compostos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e as bifenilas policloradas (PCBs), quando em contato com sedimentos tendem a se associar preferencialmente ao carbono orgânico, mesmo que estes componham apenas de 5 à 7% aproximadamente a matriz sedimentar (MANAHAN,2013), alguns compostos específicos como o fenantreno (HPA), mesmo em contato com a coluna d'água ou sedimento tendem a ter maior afinidade com o polímero, apresentando menor biodisponibilidade para os organismos (TEUTEN et al., 2007).

Importa também considerar a microbiota associada ao sedimento, microorganismos que vivem em uma matriz auto-produzida composta por substâncias extracelulares como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (FLEMMING & WINGENDER, 2010), e que apresentam grande afinidade com os compostos hidrofóbicos, fazendo com que os mesmos possam se associar ao biofilme, ficando assim biodisponível a organismos que vivem e se alimentam no sedimento.

O estudo realizado por Bejgarn et al. (2015), por meio de testes agudos empregando o copépodo *Nitocra spinipes*, demonstra que diferentes lixiviados obtidos de diversos materiais plásticos, sobre distintas condicionantes ambientais, podem apresentar variação em sua toxicidade dependendo dos fatores pH, temperatura e irradiação. Tal fato pode explicar a diferença encontrada no presente estudo.

Browne et al. (2013), em seu estudo de ingestão de partículas plásticas por poliquetas, observou que as maiores taxas de contaminação foram por ingestão de partículas plásticas do que por ingestão dos grãos de sedimento contaminados com as mesmas, o que vai de acordo com trabalhos pretéritos que demonstram que resinas virgens e expostos ao ambiente podem causar efeitos adversos a diferentes organismos (BROWNE et al. 2013; DELLA TORRE et al. 2014; NOBRE et al. 2015).

Nossos resultados demonstram a importância de se estudar diferentes vias de exposição, pois as distintas respostas obtidas nos tratamentos elutriato e sedimento integral, pode se dar a manipulação dos mesmos, pois para o tratamento elutriato a uma vigorosa agitação de curta duração, o que não se faz suficiente, para a passagem de compostos do sedimento para a coluna d'água, devido ao fato de tais compostos possivelmente terem se associado a matéria orgânica ou microbiota presentes no sedimento indisponibilizando-os. . No tratamento de sedimento integral não há movimentação, facilitando a ligação dos compostos presentes nos *pellets* com as diferentes partes que compõe o sedimento como carbono orgânico e microbiota, o que faz com que a mesma apresente menor variação ou perda de compostos.

### 3.4. Conclusão

*Pellets* são capazes de conferir toxicidade aos sedimentos marinhos, e os resultados obtidos no presente estudo demonstram efeitos crônicos em organismos epibentônicos. Uma vez que as concentrações utilizadas nos ensaios são ambientalmente relevantes, pode-se afirmar que grânulos plásticos (virgens e coletados em praia) representam um risco ambiental aos ecossistemas ao qual são inseridos, independentemente da ingestão, devido à sua composição e seu comportamento como adsorventes e carreadores de xenobióticos.

#### 4. CONCLUSÕES FINAIS

*Pellets* plásticos são tóxicos e capazes de contaminar matrizes ambientais (água e sedimento) e gerar efeitos à biota associada. As respostas obtidas nas matrizes água e sedimento demonstram a importância de se estudar diferentes compartimentos, além de diferentes vias de exposição, como elutriato, interface pellet-água e sedimento integral.

Para organismos planctônicos a toxicidade dos pellets de praia foi inferior à dos *pellets* virgens, e foi observada apenas para o ensaio de interface *pellet*-água. Estes resultados demonstram que os *pellets* atuam como um vetor de poluentes a partir do momento que são introduzidos no ambiente, em função dos aditivos encontrados em partículas virgens. Porém, larvas expostas a elutriato e interface pellet-água apresentaram retardo ou anomalias no desenvolvimento embriolarval.

Os organismos epibentônicos apresentaram efeitos crônicos apenas quando expostos ao sedimento integral, o que pode estar relacionada às características da composição do sedimento, como matéria orgânica, carbonato de cálcio, carbono orgânico e microbiota associada que interagem com os compostos apolares tornando-os menos biodisponíveis ao elutriato. No entanto, são capazes de conferir toxicidade ao sedimento marinho e efeitos crônicos em organismos epibentônicos.

Uma importante diferença entre os estudos com água e sedimento deve-se ao emprego de uma abordagem mais mecanística com os organismos planctônicos, quando altas concentrações de grânulos foram utilizadas a fim de observar se *pellets* não ingeridos gerariam efeitos sobre a biota. No entanto, nos ensaios com sedimento se utiliza uma abordagem baseada na avaliação do risco ecológico, uma vez que concentrações ambientalmente relevantes foram adotadas e efeitos tóxicos foram observados sobre a reprodução de um organismo bentônico.

Futuros ensaios de longa duração com diferentes endpoints e o uso de biomarcadores fazem-se necessários para melhor compreensão dos mecanismos de ação sobre organismos aquáticos, além de ensaios de bioacumulação para avaliar a degradação ou depuração e se compreender o risco ambiental de microplásticos em ambientes costeiros.

Para melhor compreensão dos efeitos à biota oriundos da contaminação química de *pellets* no sedimento, se faz importante a avaliação por meio de estudos dos mecanismos de ação dos compostos presentes nos *pellets*, através do uso de biomarcadores, pois estudos anteriores já demonstraram a capacidade de polímeros plásticos gerarem efeitos fisiológicas e comportamentais em organismos, alterações celulares como desestabilidade da membrana lisossômica, processos inflamatórios, respostas imunológicas, sistemas antioxidantes, efeitos neurotóxicos, genotoxicidade, mudança no perfil de expressão gênica (VON MOOS et al., 2012; AVIO et al., 2015) e perda no desempenho e eficiência predatória (DE SÁ et al., 2014).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESSA, D. M. S. 2002. Avaliação da qualidade de Sedimento do Sistema Estuarino de Santos, SP, Brasil. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo – Instituto Oceanográfico, 2002. 340 p.

ABESSA, D. M., CARR, R. S., RACHID, B. R., SOUSA, E. C., HORTELANI, M. A., & SARKIS, J. E. 2005. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 50(8), 875-885.

ASCER, L. G. 2015. Efeitos de microplástico na fisiologia do mexilhão *Perna perna* (*Bivalvia: Mytilidae*) (Dissertação de metrado), Universidade de São Paulo.

ABU-HILAL, A. H., & AL-NAJJAR, T. 2004. Litter pollution on the Jordanian shores of the Gulf of Aqaba (Red Sea). *Marine environmental research*, 58(1), 39-63.

ANANTHASWAMY, A., 2001. Junk food – a diet of plastic pellets plays havoc with animals' immunity. *New Sci.* 169, 18.

ANDRADY, A. L. 2011. Microplastics in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, 62(8), 1596-1605.

ASHTON, K., HOLMES, L., & TURNER, A. 2010. Association of metals with plastic production pellets in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, 60(11), 2050-2055.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS ABNT. NBR 15350, 2012. Ecotoxicologia aquática -Toxicidade crônica de curta duração -Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea), 21 pp.

ASTM. 2000. Standard test methods for moisture, ash, and organic matter of peat and other organic soils. Method D 2974-00. American Society for Testing and Materials. West Conshohocken, PA.

AVIO, C. G., GORBI, S., MILAN, M., BENEDETTI, M., FATTORINI, D., D'ERRICO, G., PAULLETO, M., BARGELLONI, L. & REGOLI, F. 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution*, 198, 211-222.

BAKIR, A., ROWLAND, S.J., THOMPSON, R.C. 2012. Competitive sorption of persistent organic pollutants onto microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2782–2789.

BAKIR, A., ROWLAND, S.J., THOMPSON, R.C. 2014. Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions. *Environ. Pollut.* 185, 16–23.

BARBOZA, L. G. A., & GIMENEZ, B. C. G. 2015. Microplastics in the marine environment: Current trends and future perspectives. *Marine pollution bulletin*, 97(1), 5-12.

BILA, D. M., & DEZOTTI, M. 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química nova*, 30(3), 651.

BRAID, J. J., & WALE, M. C. 2002. The antibacterial activity of triclosan-impregnated storage boxes against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* and *Shewanella putrefaciens* in conditions simulating domestic use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(1), 87-94.

BEBIANNI, M. J., PEREIRA, C. G., REY, F., CRAVO, A., DUARTE, D., D'ERRICO, G., REGOLI, F. 2015. Integrated approach to assess ecosystem health in harbor areas. *Science of The Total Environment*, v. 514, p. 92-107.

BLAISE, C. 1991. Microbiotests in aquatic ecotoxicology: characteristics, utility, and prospects. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6(2), 145-155.

BRANDON, J., GOLDSTEIN, M., & OHMAN, M. D. 2016. Long-term aging and degradation of microplastic particles: Comparing in situ oceanic and experimental weathering patterns. *Marine Pollution Bulletin*.

BROWNE, M.A., DISSANAYAKE, A., GALLOWAY, T.S., LOWE, D.M., THOMPSON, R.C. 2008 Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.) *Environ. Sci. Technol.*, 42, pp. 5026–503.

BROWNE, M.A., NIVEN, S.J., GALLOWAY, T.S., ROWLAND, S.J., THOMPSON, R.C. 2013. Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Curr. Biol.* 23, 2388–2392.

CARPENTER, E. J., ANDERSON, S. J., HARVEY, G. R., MIKLAS, H. P., & PECK, B. B. 1972. Polystyrene spherules in coastal waters. *Science*, 178(4062), 749-750.

CARPENTER, E. J., & SMITH, K. L. 1972. Plastics on the Sargasso Sea surface. *Science*, 175(4027), 1240-1241.

CESAR, A.; SILVA, S. L. R. & SANTOS, A. R. 1997. Testes de Toxicidade Aquática no Controle da Poluição – Universidade Santa Cecília – UNISANTA - Santos. São Paulo, Brasil. 37p.

CESAR, A., MARÍN, A., MARÍN-GUIRAO, L., VITA, R. 2004. Amphipod and sea urchin tests to assess the toxicity of Mediterranean sediments: the case of Portmán Bay. *Sci. Mar.* 68 (Suppl. 1), 205–213.

CHAPMAN, P. M. & LONG, E. R. 1983. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Marine Pollution Bulletin*, 14(3):81-84.

CHUA, E.M., SHIMETA, J., NUGEGODA, D., MORRISON, P.D., CLARKE, B.O. 2014. Assimilation of polybrominated diphenyl ethers from microplastics by the marine amphipod, *Allorchestes compressa*. *Environ. Sci. Technol.* 48, 8127–8134.

COLE, M., LINDEQUE, P., HALSBAND, C., GALLOWAY, T. 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2588–2597.

COLE, M., LINDEQUE, P., FILEMAN, E., HALSBAND, C., GOODHEAD, R.M., MORGER, J., GALLOWAY, T. 2013. Microplastic ingestion by zooplankton. *Environ. Sci. Technol.* 47, 6646–6655.

DARNERUD, P. O., ERIKSEN, G. S., JÓHANNESSEN, T., LARSEN, P. B., & VILUKSELA, M. 2001. Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environmental health perspectives*, 109(Suppl 1), 49.

DELLA TORRE, C., BERGAMI, E., SALVATI, A., FALERI, C., CIRINO, P., DAWSON, K.A., CORSI, I. 2014. Accumulation and embryotoxicity of polystyrene nanoparticles at early stage of development of sea urchin embryos *Paracentrotus lividus* *Environ. Sci. Technol.*, 48, pp. 12302–12311.

DERRAIK, J. G. 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine pollution bulletin*, 44(9), 842-852.

DE SÁ, L. C., LUÍS, L. G., & GUILHERMINO, L. 2015. Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions. *Environmental Pollution*, 196, 359-362.

DOYLE, M. J., WATSON, W., BOWLIN, N. M., & SHEAVLY, S. B. 2011. Plastic particles in coastal pelagic ecosystems of the Northeast Pacific ocean. *Marine Environmental Research*, 71(1), 41-52.

ENDO, S., TAKIZAWA, R., OKUDA, K., TAKADA, H., CHIBA, K., KANEHIRO, H., OGI, H., YAMASHITA, R. & DATE, T. 2005. Concentration of polychlorinated biphenyls (PCBs) in beached resin pellets: variability among individual particles and regional differences. *Marine Pollution Bulletin*, 50(10), 1103-1114.

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-B92-010, Environmental Protection Agency, Washington, DC.

EPA, 2002. Short-term Methods for Measuring the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms – EPA/821/R-02/014. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Endo, S., Takizawa, R., Okuda, K., Takada, H., Chiba, K., Kanehiro, H., Ogi, H., Yamashita, R. & Date, T. 2005. Concentration of polychlorinated biphenyls (PCBs) in beached resin pellets: variability among individual particles and regional differences. *Marine Pollution Bulletin*, 50(10), 1103-1114.

EUROPE, P. 2012. *Plastics-the Facts 2012*. An analysis of European plastics production, demand and waste data for 2011, Plastic Europe; Brussels.

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

FENDALL, L. S., & SEWELL, M. A. 2009. Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Marine pollution bulletin*, 58(8), 1225-1228.

FENILI, L. H. 2012. *Qualidade do sedimento do canal de navegação do Porto de Santos (Santos, SP) após dragagem de aprofundamento: ensaios ecotoxicológicos com *Tiburionella viscana* e *Nitokra sp** (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

FERRAZ, M.A., CHOUERI, R.B., FIORI, E.F., NOBRE, C.R., CESAR, A., PEREIRA, C.D.S., 2012. Avaliação da qualidade dos sedimentos da orla de Santos empregando-se ensaios de toxicidade e caracterização da estrutura da comunidade macrobentônica. *Mundo Saúde* 36, 625–634.

FISNER, M. 2012. Grânulos plásticos em praias arenosas: avaliação de um método amostral quantitativo e da contaminação química. Ph.D. Thesis, São Paulo University, São Paulo, Brazil, 121 pp.

FISNER, M., TANIGUCHI, S., MOREIRA, F., BÍCEGO, M. C., & TURRA, A. 2013a. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plastic pellets: Variability in the concentration and composition at different sediment depths in a sandy beach. *Marine pollution bulletin*, 70(1), 219-226.

FISNER, M., TANIGUCHI, S., MAJER, A.P., BÍCEGO, M.C., TURRA, A. 2013b. Concentration and composition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plastic

pellets: implications for small-scale diagnostic and environmental monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 76, 349–354.

FLEMMING, H. C., & WINGENDER, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.

FRIAS, J.P.G.L., SOBRAL, P., FERREIRA, A. 2010. Organic pollutants in microplastics from two Portuguese beaches. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 1988–1992.

FRIES, E., ZARFL, C. 2012. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to low and high density polyethylene (PE). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 1296–1304.

GESAMP. 2010. (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection), 2010. In: Bowmer, T., Kershaw, P.J. (Eds.), *Proceedings of the GESAMP International Workshop on Plastic Particles as a Vector in Transporting Persistent, Bioaccumulating and Toxic Substances in the Oceans*. GESAMP Rep. Stud. No. 82.

GESAMP. 2015. Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment. (Kershaw, P. J., ed.). (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Rep. Stud. GESAMP No. 90, 96 p.

GREGORY, M. R. 1978. Accumulation and distribution of virgin plastic granules on New Zealand beaches. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 12(4), 399-414.

HALDEN, R.U. 2010. Plastics and health risks. *Annu. Rev. Public Health* 31, 179–194.

HAYS, H., & CORMONS, G. 1974. Plastic particles found in tern pellets, on coastal beaches and at factory sites. *Marine Pollution Bulletin*, 5(3), 44-46.

HIRAI, H., TAKADA, H., OGATA, Y., YAMASHITA, R., MIZUKAWA, K., SAHA, M., KWAN, C., MOORE, C., GRAY, H., LAURSEN, D., ZETTLER, E.R., FARRINGTON, J.W., REDDY, C.M., PEACOCK, E.E., WARD, M.W. 2011. Organic micropollutants in marine plastics from the open ocean and remote and urban beaches. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1683– 1692.

HIROTA, J., & SZYPER, J. P. 1975. Separation of total particulate carbon into inorganic and organic components. *Limnology and Oceanography*, 20(5), 896-900.

HORTELLANI, M.A., SARKIS, J.E.S., ABESSA, D.M.S., SOUSA, E.C.P.M. 2008. Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do Estuário Santos-São Vicente. *Quím. Nova* 31, 10–19.

INOUE, K., KONDO, S., YOSHIE, Y., KATO, K., YOSHIMURA, Y., HORIE, M., & NAKAZAWA, H. 2001. Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride food packaging films into food simulants and foods. *Food Additives & Contaminants*, 18(2), 157-164.

IVAR DO SUL, J. A., SPENGLER, Â., & COSTA, M. F. 2009. Here, there and everywhere. Small plastic fragments and pellets on beaches of Fernando de Noronha (Equatorial Western Atlantic). *Marine Pollution Bulletin*, 58(8), 1236-1238.

IVAR DO SUL, J., COSTA, M.F., 2014. The present and the future of microplastic pollution in the marine environment. *Environ. Pollut.* 185, 352–364.

KARAPANAGIOTI, H. K., & KLONTZA, I. 2008. Testing phenanthrene distribution properties of virgin plastic pellets and plastic eroded pellets found on Lesbos island beaches (Greece). *Marine environmental research*, 65(4), 283-290.

KARAPANAGIOTI, H. K., ENDO, S., OGATA, Y., & TAKADA, H. 2011. Diffuse pollution by persistent organic pollutants as measured in plastic pellets sampled from various beaches in Greece. *Marine pollution bulletin*, 62(2), 312-317.

KARTAR, S., MILNE, R. A., & SAINSBURY, M. 1973. Polystyrene waste in the Severn Estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 4(9), 144.

LI, H. X., GETZINGER, G. J., FERGUSON, P. L., ORIHUELA, B., ZHU, M., & RITTSCHOF, D. 2015. Effects of Toxic Leachate from Commercial Plastics on Larval Survival and Settlement of the Barnacle *Amphibalanus amphitrite*. *Environmental science & technology*, 50(2), 924-931.

LITHNER, D., LARSSON, A., DAVE, G. 2011. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *Sci. Total Environ.* 409, 3309–3324.

LOTUFO, G. R., & ABESSA, D. M. S. 2002. Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. *NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, ECPM; NIPPER, M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil. São Paulo, Artes Gráficas e Industriais*, 151-162.

MANAHAN, S. E. 2013. Química ambiental. *Tradução Wilson de Figueiredo Jardim. Editora Bookman. 9ª Edição.*

MANZANO, A.B., 2009. Distribuição, taxa de entrada, composição química e identificação de fontes de grânulos plásticos na Enseada de Santos, SP, Brasil. M.Sc. Dissertation, São Paulo University, São Paulo, Brazil, 122 pp.

MCCAIVE I.N., SYVITSKI J.P.M. 1991. Principles and methods of geological particle size analysis. In: J.P.M. Syvitski (ed.). Principles, Methods, and Application of Particle Size Analysis, Cambridge University Press, Cambridge. pp. 3-21.

MATO, Y., ISOBE, T., TAKADA, H., KANEHIRO, H., OTAKE, C., KAMINUMA, T. 2001. Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environ. Sci. Technol.* 35, 318–324.

MATO, Y., TAKADA, H., ZAKARIA, M.P., KURIYAMA, Y., KANEHIRO, H. 2002. Toxic chemicals contained in plastic resin pellets in the marine environment – spatial difference in pollutant concentrations and the effects of resin type. *Environmental Science (Japan)*. 15, 415– 423.

MENDES, G. I. 2016. Análise de pellets nas praias do litoral paulista e seus efeitos ecotoxicológicos em ambientes marinhos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, Brasil.

MCDERMID, K.J., MCMULLEN, T.L. 2004. Quantitative analysis of small-plastic debris on beaches in the Hawaiian Archipelago. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 790–794.

MEEKER, J.D., SATHYANARAYANA, S., SWAN, S.H. 2009. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philos. Trans. Roy. Soc. B: Biol. Sci.* 364, 2097–2113.

MOORE, C. J. 2008. Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long- term threat. *Environmental research*, 108(2), 131-139.

NOBRE, C. R., SANTANA, M. F. M., MALUF, A., CORTEZ, F. S., CESAR, A., PEREIRA, C. D. S., & TURRA, A. 2015. Assessment of microplastic toxicity to embryonic development

of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Marine pollution bulletin*, 92(1), 99-104.

OGATA, Y., TAKADA, H., MIZUKAWA, K., HIRAI, H., IWASA, S., ENDO, S., MATO, Y., SAHA, M., OKUDA, K., NAKASHIMA, A., MURAKAMI, M., ZURCHER, N., BOOYATUMANONDO, R., ZAKARIA, M.P., DUNG, L.Q., GORDON, M., MIGUEZ, C., SUZUKI, S., MOORE, C., KARAPANAGIOTI, H.K., WEERTS, S., MCCLURG, T., BURREN, E., SMITH, W., VELKENBURG, M.V., LANG, J.S., LANG, R.C., LAURSEN, D., DANNER, B., STEWARDSON, N., THOMPSON, R.C. 2009. International pellet watch: global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs. *Marine pollution bulletin* 58, 1437–1446.

OLIVEIRA, M., RIBEIRO, A., GUILHERMINO, L. 2012a. Effects of exposure to microplastics and PAHs on microalgae *Rhodomonas baltica* and *Tetraselmis chuii*. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* 163, S19–S20.

OLIVEIRA, M., RIBEIRO, A., GUILHERMINO, L. 2012b. Effects of short-term exposure to microplastics and pyrene on *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* 163, S20.

OLIVEIRA, M., RIBEIRO, A., HYLLAND, K., & GUILHERMINO, L. 2013. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Ecological indicators*, 34, 641-647.

PRUTER, A. T. 1987. Sources, quantities and distribution of persistent plastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 18(6), 305-310.

ROCHMAN, C. M., LEWISON, R. L., ERIKSEN, M., ALLEN, H., COOK, A. M., & TEH, S. J. 2014. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in fish tissue may be an indicator of plastic contamination in marine habitats. *Science of the Total Environment*, 476, 622-633.

SHIBER, J. G. 1979. Plastic pellets on the coast of Lebanon. *Marine Pollution Bulletin*, 10(1), 28-30.

SHIBER, J. G. 1982. Plastic pellets on Spain's 'Costa del Sol'beaches. *Marine Pollution Bulletin*, 13(12), 409-412.

SUGUIO, K. 1973. Introdução à sedimentologia. São Paulo, Edgard Blücher/EDUSP. 317pp.

TANIGUCHI, S., COLABUONO, F. I., DIAS, P. S., OLIVEIRA, R., FISNER, M., TURRA, A., IZAR, G. M., ABESSA, D. M. S., SAHA, M., HOSODA, J., YAMASHITA, R., TAKADA, H., LOURENÇO, R. A., MAGALHÃES, C. A., BICEGO, M. C., MONTONE, R. C. 2016. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine pollution bulletin*, 106(1), 87-94.

TEUTEN, E.L., ROWLAND, S.J., GALLOWAY, T.S., THOMPSON, R.C. 2007. Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 41, 7759–7764.

TEUTEN, E.L., SAQUING, J.M., KNAPPE, D.R.U., BARLAZ, M.A., JONSSON, S., BJÖRN, A., ROWLAND, S.J., THOMPSON, R.C., GALLOWAY, T.S., YAMASHITA, R., OCHI, D., WATANUKI, Y., MOORE, C., VIET, P.H., TANA, T.S., PRUDENTE, M., BOONYATUMANOND, R., ZAKARIA, M.P., AKKHAVOND, K., OGATA, Y., HIRAI, H., IWASA, S., MIZUKAWA, K., HAGINO, Y., IMAMURA, A., SAHA, M., TAKADA, H. 2009. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philos. Trans. Roy. Soc. B: Biol. Sci.* 364, 2027–2045.

THOMPSON, R.C., OLSEN, Y., MITCHELL, R.P., DAVIS, A., ROWLAND, S.J., JOHN, A.W.G. 2004. Lost at sea: where is all the plastic? *Science* 304, 838.

THOMPSON, R, MOORE, C., ANDRADY, A., GREGORY, M., TAKADA, H., WEISBERG, S. 2005. New directions in plastic debris. *Science* 310, 1117.

TURNER, A., & HOLMES, L. 2011. Occurrence, distribution and characteristics of beached plastic production pellets on the island of Malta (central Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin*, 62(2), 377-381.

TURRA, A., MANZANO, A. B., DIAS, R. J. S., MAHIQUES, M. M., BARBOSA, L., BALTHAZAR-SILVA, D., & MOREIRA, F. T. 2014. Three-dimensional distribution of plastic pellets in sandy beaches: shifting paradigms. *Scientific reports*, 4.

TYLER, C., JOBLING, S., & SUMPTER, J. P. 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Critical reviews in toxicology*, 28(4), 319-361.

U.S. EPA. 2001. Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual. EPA 823-B-01-002. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC.

U.S. EPA. 2003. A Compendium of chemical, Physical and Biological Methods for Assessing and Monitoring the Remediation of Contaminated Sediment Sites. EPA/68- W-99-033. United States Environmental Protection Agency. Duxbury.

VAN, A., ROCHMAN, C. M., FLORES, E. M., HILL, K. L., VARGAS, E., VARGAS, S. A., & HOH, E. 2012. Persistent organic pollutants in plastic marine debris found on beaches in San Diego, California. *Chemosphere*, 86(3), 258-263.

VAN CAUWENBERGHE, L., DEVRIESE, L., GALGANI, F., ROBBENS, J., & JANSSEN, C. R. 2015. Microplastics in sediments: a review of techniques, occurrence and effects. *Marine environmental research*.

- VON MOOS, N., BURKHARDT-HOLM, P., & KÖHLER, A. 2012. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environmental science & technology*, 46(20), 11327-11335.
- WANG, J., TAN, Z., PENG, J., QIU, Q., & LI, M. 2016. The behaviors of microplastics in the marine environment. *Marine environmental research*, 113, 7-17.
- WARD, J.E., KACH, D.J. 2009. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Mar. Environ. Res.* 68, 137–142.
- WENTWORTH, C. K. 1922. A scale of grade and class terms for clastic sediments. *The Journal of Geology*, 30(5), 377-392.
- WEST, INC GULLEY, D. 1996. TOXSTAT®. Computer Program. Version 3.5. University of Wyoming.
- WILCOX, C., MALLOS, N. J., LEONARD, G. H., RODRIGUEZ, A., & HARDESTY, B. D. 2016. Using expert elicitation to estimate the impacts of plastic pollution on marine wildlife. *Marine Policy*, 65, 107-114.
- WRIGHT, S.L., THOMPSON, R.C., GALLOWAY, T.S. 2013. The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. *Environ. Pollut.* 178, 483–492.
- ZARFL, C., FLEET, D., FRIES, E., GALGANI, F., GERDTS, G., HANKE, G., & MATTHIES, M. 2011. Microplastics in oceans. *Marine Pollution Bulletin*, 62, 1589-1591.
- ZICCARDI, L. M., EDGINGTON, A., HENTZ, K., KULACKI, K. J., & KANE DRISCOLL, S. 2016. Microplastics as vectors for bioaccumulation of hydrophobic organic chemicals in the

marine environment: A state-of-the-science review. *Environmental Toxicology and Chemistry*

## Anexo A

Página do artigo referente ao capítulo 2, publicado no periódico *Marine Pollution Bulletin*.

Marine Pollution Bulletin 92 (2015) 99–104



Contents lists available at ScienceDirect

Marine Pollution Bulletin

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/marpolbul](http://www.elsevier.com/locate/marpolbul)



## Assessment of microplastic toxicity to embryonic development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea)



C.R. Nobre<sup>a</sup>, M.F.M. Santana<sup>b</sup>, A. Maluf<sup>a</sup>, F.S. Cortez<sup>a</sup>, A. Cesar<sup>c</sup>, C.D.S. Pereira<sup>a,c</sup>, A. Turra<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> UNISANTA – Santa Cecília University, Department of Ecotoxicology, Oswaldo Cruz St., 266, 11045-907 Santos, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> USP – University of São Paulo, Oceanographic Institute (IO), Department of Biological Oceanography – Praça do Oceanográfico, 191, 05508-900, Cidade Universitária, São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> UNIFESP – Federal University of São Paulo, Department of Marine Science, Almirante Saldanha da Gama Ave., 89, 11030-490 Santos, São Paulo, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Available online 7 February 2015

#### Keywords:

Toxicity  
Sea urchin  
Plastic pellets  
Microplastics  
Pollutants  
Additives

### ABSTRACT

Apart from the physiological impacts on marine organisms caused by ingesting microplastics, the toxicity caused by substances leaching from these particles into the environment requires investigation. To understand this potential risk, we evaluated the toxicity of virgin (raw) and beach-stranded plastic pellets to the development of embryos of *Lytechinus variegatus*, simulating transfers of chemical compounds to interstitial water and water column by assays of pellet–water interface and elutriate, respectively. Both assays showed that virgin pellets had toxic effects, increasing anomalous embryonic development by 58.1% and 66.5%, respectively. The toxicity of stranded pellets was lower than virgin pellets, and was observed only for pellet–water interface assay. These results show that (i) plastic pellets act as a vector of pollutants, especially for plastic additives found on virgin particles; and that (ii) the toxicity of leached chemicals from pellets depends on the exposure pathway and on the environmental compartment in which pellets accumulate.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Plastic fragments comprise more than half of ocean litter (Derriak, 2002) and microplastics (plastic particles with a diameter of 5 mm or less; Cole et al., 2011) are now receiving attention from international agencies (GESAMP, 2010) and the scientific community (Wright et al., 2013; Ivar do Sul and Costa, 2014), because of the uncertainties regarding their environmental effects. Plastic pellets, or nibs, are a form of raw material for the manufacture of various plastic objects (EPA, 1990). They are small ( $\leq 5$  mm) and end up into marine environments by losses during the processes of production, transport and manufacturing (Thompson et al., 2005). Large quantities of plastic pellets are being found on coastal areas and other marine systems (Cole et al., 2011), and added to their potential ecological impacts and tendency to increase in production, plastic pellets have become an item of particular concern for marine environments (EPA, 1990).

The most common pellets are derived from polypropylene, polyethylene and polystyrene (EPA, 1992), and chemical compounds

(such as emollients, colorants and antioxidants) are usually added to them in order to enhance their performance (EPA, 1990, 1992; Teuten et al., 2009). According to Ananthaswamy (2001), many of these additives are toxic and their effects on organisms can be severe. Browne et al. (2013) showed that additives can leach from ingested microplastics (PVC) into the bodies of worms, reducing their feeding activity and showing worse effects than other persistent anthropogenic pollutants. However, there is still controversy regarding the release of these additives, and therefore their biological impacts (Thompson et al., 2004; Teuten et al., 2009). Additives can be mixed with or chemically bound to polymers, which could substantially change their capacity of leaching and the potential toxicity of plastic pellets (EPA, 1992).

Plastic polymers, including nibs, can also act as vehicles for toxic hydrophobic compounds absorbed from the environment (Cole et al., 2011; Fisner et al., 2013a), potentially increasing the availability of these pollutants to the biota (GESAMP, 2010; Teuten et al., 2009; Browne et al., 2013). DDT, PCBs, PAHs, nonyl-phenols and other nonpolar substances can adsorb on plastic surfaces (Ward and Kach, 2009; Fisner et al., 2013a,b), becoming available for animals mainly through ingestion (Teuten et al., 2009; Browne et al., 2013; Chua et al., 2014). Most of these pollutants are toxic and bioaccumulative, and if leached from pellet and assimilated by an organism, can be introduced into

\* Corresponding author at: USP – University of São Paulo, Oceanographic Institute (IO), Department of Biological Oceanography – Praça do Oceanográfico, 191, 05508-900, Cidade Universitária, São Paulo, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 11 30916594.

E-mail address: [turra@usp.br](mailto:turra@usp.br) (A. Turra).