

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

TAWANY DE MELLO SOUZA

Avaliação da toxicidade de microplástico associado ao
benzo(a)pireno sobre duas espécies de invertebrados
marinhos

SANTOS

2022

TAWANY DE MELLO SOUZA

Avaliação da toxicidade de microplástico associado ao benzo(a)pireno sobre duas espécies de invertebrados marinhos

Dissertação apresentada à Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ecologia, sob a orientação da Profa. Dra. Paloma Gusso Choueri.

SANTOS

2022

571.95 Mello Souza, Tawany de.

S719a Avaliação da toxicidade de microplástico associado ao benzo(a)pireno sobre duas espécies de invertebrados marinhos. / Tawany de Mello Souza. 2022. 67 f.

Orientadora: Profa. Dra. Paloma Gusso Choueri.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Santos, SP, 2017.

1. Microplásticos. 2. Benzo(a)pireno. 3. Ecotoxicologia. 4. Biomarcadores. 5. I. Choueri, Paloma Gusso. II. Avaliação da toxicidade de microplástico associado ao benzo(a)pireno sobre duas espécies de invertebrados marinhos.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais pelo acalento nos momentos difíceis, pela compreensão e pelo amor que me ajudaram a chegar até aqui.

Ao meu namorado, companheiro, parceiro e grande amor por acreditar em mim até o fim, pelas palavras de carinho e abraços de aconchego.

Eu nada seria se não fossem vocês.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Paloma Kachel Gusso Choueri pela orientação e por todo suporte e ajuda nesse tempo de desenvolvimento do trabalho, principalmente durante a pandemia, por sempre estar presente, pela confiança e pelas palavras de incentivo, sem você com certeza não conseguiria completar essa caminhada. Também agradeço ao Caio pelo suporte no trabalho e por ser sempre tão solícito em todas as vezes que precisei de ajuda.

Aos professores da pós-graduação por todos os ensinamentos, pela paciência a cada questionamento e por contribuírem nos meus conhecimentos. Com certeza vocês são parte importantíssima na minha formação. E também aos colegas de curso, com quem realizei trabalhos em grupo, dividi conhecimentos e sanei dúvidas.

Um agradecimento especial aos membros da banca pela disposição à leitura deste trabalho, pelas críticas importantes para melhoria e engrandecimento do mesmo e pela atenção ao participar dessa etapa final. À empresa ALS Life Sciences Brasil por me permitir realizar os procedimentos dos ensaios dentro de seus laboratórios.

Às minhas queridas amigas Bianca, Daniela e Vanessa, que me ajudaram nos momentos difíceis, me aguentaram nas horas de reclamação e me deram forças para passar por este processo e chegar até o fim, me ouvindo e me fazendo rir. Aos meus amigos e colegas de trabalho que me ajudaram nos momentos em que precisei e a todos que, de alguma forma, me ajudaram neste longo caminho.

Agradeço aos meus pais Ligia e Agnaldo e à minha família que estiveram presentes em todos os momentos em que mais precisei e ao amor da minha vida, Leonardo, que sem ele, com certeza, não teria chegado à metade de onde cheguei. Sou eternamente grata por você dividir a sua vida comigo.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da conclusão deste trabalho. Obrigada!

EPÍGRAFE

*“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas.
Isso é perfeitamente aceitável,
elas são a abertura para achar as que estão certas”.*

Carl Sagan

RESUMO

A sociedade atual adotou uma cultura de consumo desenfreado de plásticos. Esse consumo tem sido um dos principais motivos da crescente preocupação ambiental devido à grande quantidade dos resíduos gerados. O principal problema causado por esses resíduos é a poluição nos ambientes marinhos e esses são os mais vulneráveis, pois estão mais expostos às fontes de lixo. Esses materiais se fragmentam e se desintegram em pequenas partículas denominadas microplásticos e estão entre os contaminantes mais prejudiciais que inundam os oceanos. Essas partículas possuem um grande potencial para acumulação e transporte de contaminantes que estão presentes no meio, devido à sua natureza orgânica que permite a adsorção de compostos hidrofóbicos, como o benzo(a)pireno, um contaminante ambiental persistente, que pode ser absorvido pelas vias de exposição oral, inalatória e dérmica. Muito pouco se sabe sobre os efeitos combinados dos microplásticos e contaminantes químicos sorvidos nestas partículas, bem como suas relações com a toxicidade. Desta forma, é importante que se investigue mais profundamente quais são os efeitos da interação entre microplásticos e substâncias orgânicas hidrofóbicas altamente tóxicas. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade dos compostos BaP e MP, isolados e em mistura, em dois modelos biológicos (*Mysidopsis juniae* e *Echinometra lucunter*), através de ensaios agudos e crônicos e respostas de biomarcadores de efeito. Para tanto, os organismos foram expostos a seis concentrações de BaP em água, na presença e na ausência de microplásticos em três concentrações. Os resultados foram analisados estatisticamente por meio da Análise Permutacional de Variância (PERMANOVA" main test"), univariada e bifatorial, considerando dois fatores fixos: tratamento (BaP isolado e BaP associado a MP) e concentração. As larvas *pluteus* se mostraram sensíveis ao benzo(a)pireno. O valor da EC50 sobre o desenvolvimento embrionário foi de 13,0 µg/L nos tratamentos de BaP isolado e 11,8 µg/L nos tratamentos de BaP associado a MP. Já o *Mysidopsis juniae* se mostrou resistente aos contaminantes. Nos tratamentos com maior concentração de microplástico, foram observadas diferenças em relação ao efeito sobre os organismos expostos, sendo que para ouriço-do-mar, o desenvolvimento larval foi menos afetado e nos ensaios com *Mysidopsis juniae*, a mortalidade também foi reduzida. Nos ensaios com biomarcadores, também foi possível observar uma queda dos danos em DNA e estresse oxidativo nos tratamentos com maior quantidade de microplástico. Os resultados do presente estudo evidenciam que os microplásticos alteram a toxicidade do BaP na água do mar. Foi possível observar que a magnitude dos efeitos negativos do BaP é dependente da concentração do microplástico presente no meio. Assim, nossos dados evidenciam, pioneiramente, efeitos interativos entre microplástico e o BaP para os organismos testados (*Mysidopsis juniae* e *Echinometra lucunter*), contribuindo para elucidar o fenômeno da exposição conjunta de organismos marinhos a microplástico e outros contaminantes.

Palavras-chave: microplásticos, benzo(a)pireno, ecotoxicologia, biomarcadores, invertebrados-marinhos.

ABSTRACT

Evaluation of the toxicity of microplastics associated with benzo(a)pyrene on two species of marine invertebrates

The current society has adopted a culture of unbridled consumption of plastics. This consumption has been one of the main reasons for the growing environmental concern due to the large amount of waste generated. The main problem caused by this waste is pollution in marine environments, and these are the most vulnerable because they are more exposed to the sources of waste. These materials fragment and disintegrate into small particles called microplastics and are among the most harmful contaminants that flood the oceans. These particles have a great potential for accumulation and transport of contaminants that are present in the environment due to their organic nature that allows adsorption of hydrophobic compounds such as benzo(a)pyrene, a persistent environmental contaminant that can be absorbed by oral, inhalation, and dermal exposure routes. Very little is known about the combined effects of microplastics and chemical contaminants sorbed on these particles, as well as their relationships to toxicity. Thus, it is important to further investigate what the effects of the interaction between microplastics and highly toxic hydrophobic organic substances are. In view of the above, the aim of the present study was to evaluate the toxicity of BaP and MP compounds, alone and in mixture, in two biological models (*Mysidopsis juniae* and *Echinometra lucunter*), through acute and chronic assays and biomarker effect responses. To this end, organisms were exposed to six concentrations of BaP in water, in the presence and in the absence of microplastics at three concentrations. The results were statistically analyzed by Permutation Analysis of Variance (PERMANOVA" main test"), univariate and bifactorial, considering two fixed factors: treatment (BaP alone and BaP associated with MP) and concentration. The pluteus larvae proved to be sensitive to benzo(a)pyrene. The EC50 value on embryolarval development was 13.0 µg/L in BaP alone and 11.8 µg/L in BaP associated with MP. *Mysidopsis juniae*, on the other hand, proved to be resistant to the contaminants. In the treatments with higher concentration of microplastics, differences were observed regarding the effect on exposed organisms, being that for sea urchin, larval development was less affected and in the *Mysidopsis juniae* assays, mortality was also reduced. In the biomarker assays, it was also possible to observe a decrease in DNA damage and oxidative stress in the treatments with the highest amount of microplastic. The results of the present study provide evidence that microplastics alter the toxicity of BaP in seawater. It was possible to observe that the magnitude of the negative effects of BaP is dependent on the concentration of the microplastic present in the medium. Thus, our data provide pioneering evidence of interactive effects between microplastic and BaP for the tested organisms (*Mysidopsis juniae* and *Echinometra lucunter*), contributing to elucidate the phenomenon of joint exposure of marine organisms to microplastic and other contaminants.

Keywords: microplastics, benzo(a)pyrene, ecotoxicology, biomarkers, marine invertebrates.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Tratamentos de exposição para experimento com <i>Mysidopsis juniae</i>	28
Figura 2.	Tratamentos de exposição para experimento com <i>Echinometra lucunter</i>	28
Figura 3.	Réplicas do ensaio com ouriço-do-mar já preparadas e mantidas em incubadora.....	29
Figura 4.	Exemplar de ouriço-do-mar <i>Echinometra lucunter</i>	30
Figura 5.	Aplicação de injeção de KCL na região perioral do ouriço-do-mar para obtenção dos gametas.....	30
Figura 6.	Separação dos organismos-teste em copinhos plásticos para posterior adição nas réplicas do experimento.....	32
Figura 7.	Réplicas do ensaio com misidáceos já preparadas e mantidas em sala climatizada.....	32
Figura 8.	Náuplios de <i>Artemia</i> sp fornecidos aos organismos durante o experimento.....	33
Figura 9.	Fecundação de óvulos de <i>Echinometra lucunter</i>	37
Figura 10.	Representação gráfica do efeito de BaP e MP sobre o desenvolvimento embriolarval de ouriço-do-mar nos tratamentos de BaP e MP isolados e em mistura.....	38
Figura 11.	Larvas <i>pluteus</i> de <i>Echinometra lucunter</i>	39
Figura 12.	Representação gráfica da CE ₅₀ calculada para a exposição de 36 horas.....	39
Figura 13.	Representação gráfica do efeito de BaP sobre o desenvolvimento larval de <i>Echinometra lucunter</i> exposto à CE ₅₀ em diferentes concentrações de microplástico.....	40
Figura 14.	Representação gráfica do efeito de BaP e MP sobre a sobrevivência de <i>Mysidopsis juniae</i> nos tratamentos de BaP e MP isolados e em mistura.....	42
Figura 15.	Representação gráfica do efeito de BaP sobre a sobrevivência de <i>Mysidopsis juniae</i> em mistura com diferentes concentrações de microplástico.....	43

Figura 16.	Representação gráfica dos níveis de estresse oxidativo nos diferentes tratamentos, após 96 horas de exposição.....	44
Figura 17.	Representação gráfica dos níveis de estresse oxidativo nos diferentes tratamentos, após 96 horas de exposição.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Fecundação dos óvulos de ouriço-do-mar para obtenção dos embriões.....	36
Tabela 2.	Comparação do desenvolvimento embriolarval obtido no controle e controle acetona.....	37
Tabela 3.	Mortalidades obtidas no controle e controle acetona.....	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Comparação da sensibilidade dos organismos ao BaP pelo valor da concentração de efeito em 50% dos organismos expostos ao contaminante.....	48
-----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

BaP – benzo(a)pireno

CE – concentração efetiva

CE₅₀ – concentração que causa letalidade em 50% dos organismos expostos

CENO – concentração de efeito não observado

CEO – concentração de efeito observado

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo

CL – concentração letal

CL₅₀ – concentração que causa letalidade em 50% dos organismos expostos

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DNA – ácido desoxirribonucléico

EO – estresse oxidativo

EPA – *Environment Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)

ERO – espécie reativa de oxigênio

HPA – hidrocarboneto policíclico aromático

IARC – *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer)

KCL – cloreto de potássio

LPO – peroxidação lipídica

MP – microplástico

OECD – *Organization for Economic Cooperation and Development* (Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento)

PBDE – éter difenílico polibromado

PCB – bifenilpoliclorado

PE – polietileno

PET – tereftalato de polietileno

POP – poluente orgânico persistente

PP – polipropileno

PS – poliestireno

PVC – policloreto de vinila

UNEP - *United Nations Environment Programme* (Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	PLÁSTICOS.....	15
1.1.1	Microplásticos	16
1.2	HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS.....	18
1.2.1	Benzo(a)pireno	19
1.3	A ECOTOXICOLOGIA COMO FERRAMENTA DE MONITORAMENTO AMBIENTAL.....	20
1.3.1	Biomarcadores	22
1.4	JUSTIFICATIVA.....	22
1.5	OBJETIVO E HIPÓTESE.....	23
2	MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.1	ORGANISMOS MODELOS.....	24
2.1.1	<i>Echinometra lucunter</i>	24
2.1.2	<i>Mysidopsis juniae</i>	25
2.2	DESENHO EXPERIMENTAL.....	25
2.2.1	Avaliando o efeito de uma concentração ambiental de microplástico sobre a toxicidade de BaP	25
2.2.2	Avaliando o efeito da variação da concentração do microplástico sobre a toxicidade de BaP	26
2.2.2.1	Desenvolvimento embrionarval de <i>Echinometra lucunter</i>	26
2.2.2.2	Biomarcadores de efeito em <i>Mysidopsis juniae</i>	26
2.2.3	Preparo das soluções-estoque	26
2.2.4	Preparo das soluções-teste	27
2.3	ENSAIOS DE TOXICIDADE.....	28
2.3.1	Ouriço do mar (<i>Echinometra lucunter</i>)	28
2.3.1.1	Coleta dos organismos.....	29
2.3.1.2	Obtenção dos gametas.....	30
4.3.1.3	Fecundação.....	31
4.3.1.4	Encerramento.....	31
2.3.2	Misidáceos (<i>Mysidopsis juniae</i>)	31
2.3.3	Análises dos Biomarcadores	33

2.3.3.1	Peroxidação lipídica.....	34
2.3.3.2	Precipitação Alcalina (DNA <i>strand breaks</i>).....	34
2.3.3.3	Proteínas totais.....	34
2.4	ENSAIOS COM SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA.....	35
2.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	35
3	RESULTADOS	36
3.1	SENSIBILIDADE DOS ORGANISMOS.....	36
3.2	<i>ECHINOMETRA LUCUNTER</i>	36
3.2.1	Validação dos controles	37
3.2.2	Avaliando o efeito de uma concentração ambiental de microplástico sobre a toxicidade de BaP	37
3.2.3	Avaliando o efeito da variação da concentração do microplástico sobre a toxicidade de BaP	39
3.3	<i>MYSIDOPSIS JUNIAE</i>	41
3.3.1	Validação dos controles	41
3.3.2	Avaliando o efeito de uma concentração ambiental de microplástico sobre a toxicidade de BaP	41
3.3.3	Avaliando o efeito da variação da concentração do microplástico sobre a toxicidade de BaP	42
3.3.4	Biomarcadores	44
3.3.4.1	Estresse Oxidativo (LPO).....	44
3.3.4.2	Danos em DNA.....	45
4	DISCUSSÃO	47
5	CONCLUSÃO	53
6	TRABALHO SUBMETIDO OU ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	53
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 PLÁSTICOS

A sociedade atual adotou uma cultura de consumo desenfreado de plásticos. Esse consumo tem sido um dos principais motivos da crescente preocupação ambiental, devido à grande quantidade dos resíduos gerados (OLIVATTO, 2018). Segundo a associação Plastics Europe (2011), a produção mundial de plásticos, em 1950, era de cinco milhões de toneladas e, no ano de 2010, a produção subiu para 265 milhões de toneladas (aumento regular de 6% ao ano nos últimos 20 anos). Nos dias atuais, cerca de 300 milhões de toneladas de plástico são produzidos anualmente no mundo todo e mais de oito milhões de toneladas vão para os oceanos. Os oceanos ocupam cerca de 70% da superfície do planeta e são os ambientes mais vulneráveis, pois estão mais expostos às fontes de lixo, recebendo cerca de 10% da produção anual de plástico, sendo que mais de 80% da poluição marinha provém de atividades humanas chegando aos oceanos de forma acidental ou deliberada (WWF GLOBAL, 2016). De todo o lixo encontrado nos ambientes marinhos, 60 a 80% são plásticos e, devido às suas características físicas, se encontram amplamente espalhados pelo ambiente marinho (ERIKSEN *et al.*, 2014).

Por ser um material de baixo custo de produção, resistente, de fácil moldagem e altamente versátil, acaba sendo cada vez mais utilizado em diversos produtos e se torna um material ótimo para embalagens (incluindo itens descartáveis) que são descartados logo após o primeiro uso (ASCER, 2015; PHUONG *et al.*, 2018). Além disso, os plásticos também são encontrados em muitos produtos que são usados diariamente, como materiais médico cirúrgico, produtos domésticos, equipamentos eletrônicos, entre outros materiais (ANDRADY e NEAL, 2009; PLASTICS EUROPE, 2015). Os plásticos são produtos sintéticos obtidos a partir da polimerização de monômeros derivados de gás ou de petróleo, geralmente com a incorporação de aditivos químicos que potencializam suas propriedades. A polimerização é uma transformação química onde os monômeros (moléculas pequenas) se juntam e formam macromoléculas (moléculas grandes). Os monômeros são submetidos a uma fração que dá origem aos: etileno, propileno, butadieno, buteno e isobutileno. Essas substâncias são chamadas de petroquímicos básicos e são transformadas nos petroquímicos finos, como: polietileno (PE),

polipropileno (PP), policloreto de vinila (PVC), tereftalato de polietileno (PET), poliestireno (PS) e estes contribuem com, aproximadamente, 90% da produção total de plástico mundial (PHUONG *et al.*, 2016). Além disso, cinco trilhões de partículas plásticas encontram-se nos mares e oceanos (ERIKSEN *et al.*, 2014). Alguns polímeros como acrílico, policarbonato, ácido polilático, nylon e poliuretanos também são encontrados no ambiente (BRATOVVIC, 2019).

O principal problema causado por esses resíduos é a poluição nos ambientes marinhos. Os plásticos se decompõem de forma muito lenta, necessitando de séculos para se degradar. Na medida em que é decomposto, o processo de fragmentação forma partículas cada vez menores, chamadas de microplásticos (MPs), e essa contaminação atinge toda a fauna, desde o zooplâncton até os mamíferos do topo de cadeia (ASCER, 2015; GUSMÃO *et al.*, 2016; SANTANA *et al.*; 2016; BOTTERELL *et al.*, 2019; ZANTIS *et al.*, 2021).

1.1.1 Microplásticos

A poluição por microplástico (MP) é quase invisível ao olho humano, porém está presente em, praticamente, todas as matrizes ambientais e estas partículas estão entre os contaminantes mais prejudiciais que inundam os oceanos, podendo se acumular em zonas costeiras e estuarinas. Os microplásticos são partículas plásticas que possuem tamanhos menores que 5mm e são classificados em primários e secundários (COLLIGNON *et al.*, 2014; ROCHA-SANTOS e DUARTE, 2015). Os MPs secundários são os que se fragmentam e se desintegram através de processos químicos, físicos ou biológicos, formando partículas pequenas (MURPHY *et al.*, 2016). Os MPs primários são as partículas já produzidas em tamanho microscópio pela indústria, denominadas microesferas ou *microbreads*, sendo 93% fabricados a partir do polietileno (NAPPER *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2016). Os *microbreads* possuem formato de esferas (*pellets*) e, geralmente, são usados na produção de produtos pessoais como, por exemplo, esfoliantes cosméticos, pastas de dente, além de serem usados em máquinas industriais para criar abrasão (BARCELOS, 2016). Este tipo de microplástico representa mais de 90% dos microplásticos desta categoria detectados no ambiente marinho (GUERRANTI *et al.*, 2019). Em 2015, os *microbreads* foram reconhecidos pela *United Nations*

Environment Programme (UNEP) como uma fonte de poluição marinha por plásticos. Essas microesferas agem como vetores de transporte de produtos químicos sorvidos e são, facilmente, carregadas pela água, podendo percorrer longas distâncias e chegando às matrizes ambientais (NAPPER *et al.*, 2015). Essas partículas podem estar na superfície, em suspensão na coluna d'água e/ou depositadas nos fundos dos oceanos ou nas praias, sendo que sua localização na coluna d'água depende da sua densidade (os polímeros mais densos que a água do mar tendem a afundar e os polímeros de menor densidade tendem a flutuar) (AVIO *et al.*, 2016).

Quanto menores as partículas de plástico, mais disponíveis elas ficam para serem consumidas por uma ampla gama de organismos marinhos (SILVA, 2018), sendo facilmente ingeridas por tartarugas, mamíferos, peixes e os organismos filtradores, como os mexilhões, que filtram as partículas da água quando se alimentam (ROCHA, 2016). Essa ingestão pode levar à introdução de contaminantes com potencial de bioacumulação na base da cadeia alimentar, ou seja, se um organismo ingerir outro que contenha plástico, o plástico irá se incorporar no seu corpo, liberando os contaminantes adsorvidos e, quanto maior o consumo, mais contaminantes o seu corpo terá, chegando aos humanos pelo mesmo processo (ROCHA, 2016). Os microplásticos também podem ser incorporados pela respiração e/ou ventilação (TANAKA e TAKADA, 2016; BOUR *et al.*, 2020), pois as partículas flutuantes próximas ao corpo do animal podem entrar no sistema de ventilação a partir das câmaras branquiais, dependendo do tamanho dessas partículas (WATTS *et al.*, 2014). Além disso, a densidade dos plásticos favorece estas vias de exposição (DUIS e COORS, 2016). Segundo pesquisas realizadas com mexilhões, estes fragmentos também podem entrar em contato com o organismo do animal via cutânea, uma vez que micro fragmentos plásticos foram encontrados em tecidos moles que não estão relacionados ao sistema digestivo, como pé e tecido adutor (KOLANDHASAMY *et al.*, 2018).

Muitos estudos na literatura evidenciam os problemas ocasionados pela ingestão de plásticos, provenientes dos oceanos, e seus efeitos em tartarugas, aves e mamíferos (MOORE, 2008; GREGORY, 2009; BARCELOS, 2016). Já é sabido que danos indiretos também podem ocorrer devido à acumulação de metais e outros químicos, como bifenilpoliclorado (PCB), éter difenílico polibromado (PBDE) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) (TEUTEN *et al.*, 2009; BARCELOS,

2016). Porém, pouco se sabe acerca dos efeitos dos microplásticos e contaminantes associados sobre os invertebrados marinhos, principalmente porque os microplásticos interagem potencialmente com a biota aquática de muitas formas além da ingestão de partículas, como a exposição química a substâncias adsorvidas ou liberadas de micropartículas de detritos plásticos (NOBRE *et al.*, 2015; NOBRE *et al.*, 2020). Isso ocorre, pois, os plásticos no ambiente podem atuar como vetores da contaminação por poluentes persistentes, sendo lesivos aos organismos (BESSELING, 2014).

1.2 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Como mencionado anteriormente, os plásticos que flutuam nos oceanos possuem um grande potencial para acumulação e transporte de contaminantes que estão presentes no meio, devido à sua natureza orgânica que permite a adsorção desses compostos hidrofóbicos (OGATA *et al.*, 2009; FISNER, 2012). Parte desses poluentes são os chamados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Os HPAs são compostos orgânicos que possuem dois ou mais anéis aromáticos juntos, além de hidrogênio e carbono como constituintes. Também possuem baixa polaridade e são altamente insolúveis em solventes polares, podendo ser emitidos por queima de madeiras e carvão, fumaça de cigarro, fuligem de chaminé, descarga de veículos automotores, exaustão de incineração de plantas e rejeitos, aplicações de asfalto, queima de rejeitos na agricultura etc. (POPPI, 2000 *apud* SOUZA, 2007; RIBEIRO, 2001).

O petróleo é uma das mais conhecidas fontes de HPA e, a cada ano, cerca de cinco milhões de toneladas são derramadas nos oceanos do mundo todo (FOSSI *et al.*, 2000). Devido à baixa solubilidade que apresentam em água, os HPAs são persistentes e se tornam disponíveis para uma vasta gama de organismos marinhos, pois apresentam alta capacidade de se associarem a materiais particulados, como os microplásticos, além de ficarem depositados nos sedimentos (PINO *et al.*, 2000; GODOI *et al.*, 2004). Dentro dos organismos, promovem a formação de moléculas carcinogênicas e se bioacumulam na cadeia alimentar. Por isso, são tóxicos e representam um grande risco aos organismos marinhos (SOUZA, 2007; FRIAS *et al.*, 2010). O metabolismo dos HPAs está presente tanto em grupos de invertebrados

quanto vertebrados e envolve processos de hidroxilação e conjugação que biotransformam o contaminante em um composto mais solúvel para que seja excretado do organismo (ORBEA *et al.*, 2002; SETTE *et al.*, 2013).

1.2.1 Benzo(a)pireno

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA – *Environment Protection Agency*), 16 HPAs são poluentes prioritários para determinação e monitoramento. Entre eles, está o benzo(a)pireno (BaP). O BaP é um HPA de alto peso molecular que apresenta uma estrutura química com 5 anéis aromáticos, sendo um contaminante de alto risco devido à sua capacidade de induzir efeitos mutagênicos, cancerígenos, citotóxicos, genotóxicos etc, além de atuar como desregulador endócrino (GAO *et al.*, 2015; ZENA *et al.*, 2015; WAKX *et al.*, 2016, FANALI *et al.*, 2018). Por conta de sua baixa solubilidade em água ($S = 0,0038 \text{ mg. L}^{-1}$), quando presente em ambientes aquáticos, se associa à matéria orgânica em suspensão ou permanece concentrado nos sedimentos (MEIRE *et al.*, 2007; BILODEAU *et al.*, 2019).

Em 1970, o BaP foi classificado como constituinte de aerossóis urbanos, além de agente cancerígeno altamente persistente que pode ser absorvido pelas vias de exposição oral, inalatória e dérmica (CARUSO e ALABURDA, 2008; VERMA *et al.*, 2012). Depois que BaP é absorvido pelo organismo, ocorre sua metabolização dividida em três fases. Nas fases I e II, ocorrem a biotransformação e conjugação e, na fase III, a excreção dos produtos da biotransformação (RODRIGUES, 2014). As ativações enzimáticas da primeira fase ocorrem através do citocromo P-450, um complexo multienzimático formado por heme-proteínas, que forma metabólitos de natureza eletrofílica denominados carcinógenos efetivos e são esses metabólitos que interagem com o material genético, atacando o ácido desoxirribonucleico (DNA). Um dos mecanismos que pode explicar essa ativação metabólica é a oxidação enzimática seguida de hidrólise com a formação de diolepóxidos. O metabólito BaP-7,8-diol-9,10-epóxido (BaP-diolepóxido) é o que possui maior tendência à carcinogenicidade. Assim, quando formado na ativação metabólica, a interação com o DNA é favorecida (BERNARDO *et al.*, 2016). Além disso, a biotransformação dos compostos acaba ocasionando uma superprodução de Espécies Reativas de

Oxigênio (ERO) e, se essa produção exceder a neutralização pela defesa antioxidante da célula, ocorrerá um Estresse Oxidativo (EO) (LUSHCHAK, 2011).

Devido à sua natureza genotóxica e capacidade de se acumular em vários órgãos, o benzo(a)pireno se tornou um composto modelo para muitas investigações toxicológicas (LI e CHEN, 2002). Além disso, é um poluente prioritário presente na lista de legislações que regulamentam suas concentrações nos ambientes. As concentrações máximas de BaP que podem estar presentes nos corpos d'água variam entre 0,018 e 0,700 µg/L, determinadas pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA Nº 357 (BRASIL, 2005). A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2005), determina que águas subterrâneas com concentrações de BaP acima de 0,700 µg/L são contaminadas. Nos Estados Unidos, o BaP também compõe a lista de poluentes prioritários da Agência de Proteção Ambiental (EPA) que determina, para água potável, a concentração máxima de 0,2 µg/L. Segundo a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, 2010), o BaP é um dos agentes carcinogênicos, embriotóxicos e teratogênicos mais potentes em animais.

1.3 A ECOTOXICOLOGIA COMO FERRAMENTA DE MONITORAMENTO AMBIENTAL

Para avaliar os efeitos desses compostos e de outros agentes físicos e químicos sobre os organismos vivos e todas as suas interações com o meio ambiente, a ecotoxicologia é uma ciência muito utilizada. A contaminação ambiental gera preocupações quanto ao uso inadequado dos compostos e precauções devem ser tomadas. Por isso, a avaliação ecotoxicológica se tornou uma ferramenta de monitoramento ambiental bastante importante para o controle e classificação dessas substâncias (HOLANDA *et al.*, 2012). A ecotoxicologia é uma ciência que estuda os efeitos das substâncias sobre os organismos vivos, sendo animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos e descreve a relação entre o ambiente e os poluentes químicos que ali foram liberados (MAGALHÃES e FERRÃO, 2008). Esses estudos permitem a determinação dos riscos potenciais que os poluentes podem ocasionar sobre os ecossistemas (indivíduos, populações e comunidades), fazendo com que

medidas sejam tomadas, através de ações técnicas e regulatórias (STUTZER e GUIMARÃES, 2003; ZAGATTO, 2015).

Para que os efeitos tóxicos das substâncias sejam detectados, é necessário o uso de sistemas biológicos (organismos vivos), pois, somente as análises químicas não retratam o impacto ambiental que os poluentes causam, já que, não necessariamente, demonstram os efeitos em níveis biológicos sobre os ecossistemas (MAGALHÃES e FERRÃO, 2008). O biomonitoramento, ou monitoramento biológico, foi estabelecido em 1984 pela USEPA, que permite o uso de organismos vivos para o monitoramento da qualidade da água. A Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD), na Europa, também lançou protocolos de testes com organismos aquáticos, sendo eles microcrustáceos, algas e peixes.

A toxicidade de um composto químico depende de alguns fatores como: suas características químicas, fatores ambientais, exposição e suscetibilidade do organismo, este último devido a cada espécie de organismo vivo possuir uma suscetibilidade diferente, que varia de acordo com seu metabolismo, hábitos alimentares, comportamento, fase de desenvolvimento, entre outras coisas que podem estar sujeitas às exposições aguda e/ou crônica (TOMITA e BEYRUTH, 2002). Os ensaios realizados em laboratório avaliam a toxicidade de uma ou mais substâncias em um período pré-determinado e essas exposições podem ser classificadas em exposições agudas e crônicas (MAGALHÃES e FERRÃO, 2008).

A exposição aguda abrange apenas parte do ciclo de vida do organismo, pois ocorre num pequeno período de tempo e a concentração letal do agente tóxico é liberada em um único evento, podendo durar de horas a alguns dias (NIPPER, 2000; BORRELY, 2001). Os resultados geralmente são expressos em CL (Concentração Letal) e CE (Concentração Efetiva). As mais utilizadas nas avaliações de efeito agudo são as CL_{50} e CE_{50} , sendo representadas pelas concentrações que causam letalidade a 50% dos organismos expostos e pelas concentrações que causam efeito a 50% dos organismos expostos, respectivamente, e os efeitos observados são letalidade e imobilidade no caso de microcrustáceos. Geralmente os efeitos são imediatos (RAND e PETROCELLI, 1985; CETESB, 1990; MAGALHÃES e FERRÃO, 2008).

A exposição crônica é uma exposição mais longa, com baixas concentrações do agente tóxico (concentrações subletais), liberadas em eventos periodicamente repetidos. Abrange grande parte do ciclo de vida do organismo (desenvolvimento, crescimento, reprodução etc.), podendo durar semanas, meses, até anos. A exposição crônica também pode ser de curta duração, com períodos de exposição mais curtos, abrangendo partes sensíveis do ciclo de vida do organismo (NIPPER, 2000; BORRELY, 2001). Os resultados geralmente são expressos em CENO (Concentração de Efeito Não Observado) e CEO (Concentração de Efeito Observado), mas também pode ser expresso em CEp (ABNT, 2020). Essa exposição pode não levar à morte, mas causa distúrbios fisiológicos e comportamentais em longo prazo (BURATINI e BERTOLETTI, 2006).

1.3.1 Biomarcadores

Outra abordagem utilizada para avaliar efeitos e alterações em resposta à exposição aos contaminantes são os biomarcadores. Os biomarcadores são medidas quantitativas que refletem uma interação entre um sistema biológico e um risco potencial, podendo ser químico, físico ou biológico, a partir da exposição dos organismos (bioindicadores) aos poluentes. Quando os contaminantes entram em contato com os organismos, podem ocorrer diferentes mecanismos de ação tóxica a níveis celular, molecular e fisiológico (VAN DER OOST *et al.*, 2003) e os biomarcadores fornecem esse diagnóstico precoce, avaliando os danos antes que sejam sentidos em níveis maiores de organização biológica, abrangendo mudanças genéticas, bioquímicas, histológicas, fisiológicas e comportamentais, como fuga, natação, captura de presas, etc (PEREIRA *et al.*, 2014; COLIN *et al.*, 2016).

Os biomarcadores podem ser divididos em biomarcadores de efeito, que determinam as alterações sofridas pelos organismos; e biomarcadores de exposição, que indicam apenas a exposição do organismo a um poluente e não seus efeitos adversos. Dentre os biomarcadores de efeito estão a peroxidação lipídica, que avalia o estresse oxidativo (PAROLINI e BINELLI, 2014), e a precipitação alcalina (DNA *strand-breaks*) que avalia a genotoxicidade (GUSSO-CHOUERI *et al.*, 2016; NOBRE *et al.*, 2020).

1.4 JUSTIFICATIVA

Devido à ampla distribuição dos microplásticos, sua capacidade de adsorção de contaminantes orgânicos e ingestão por organismos na base da cadeia trófica, sua presença nos oceanos se tornou uma grande preocupação (OLIVATTO e CARREIRA, 2017). Quanto menor o tamanho dos fragmentos, mais poluentes persistentes eles podem adsorver, se tornando bioacumuláveis e tóxicos e aumentando o risco de introdução destes compostos ao nível dos consumidores primários com efeitos imprevisíveis para as cadeias tróficas dos oceanos (FRIAS, OTERO e SOBRAL, 2014). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos combinados dos microplásticos (incluindo os aditivos presentes em sua composição) e contaminantes químicos sorvidos nestas partículas, bem como suas relações com a toxicidade (ALIMBA e FAGIO, 2019).

Uma questão ainda nebulosa é, em até que ponto, estes co-contaminantes causam efeitos prejudiciais quando combinados aos microplásticos, pois, se por um lado os microplásticos podem potencialmente facilitar a transferência de poluentes orgânicos persistentes (POP) para a biota (uma vez que os contaminantes adsorvidos podem ser biodisponibilizados aos organismos devido a uma mudança de lipofilicidade do meio após a ingestão) (CHUA *et al.*, 2014; BATEL *et al.*, 2016), por outro, o sequestro das moléculas tóxicas hidrofóbicas pelas partículas plásticas pode contribuir para reduzir a biodisponibilidade do contaminante, particularmente se a rota de exposição principal for via água.

1.5 OBJETIVO E HIPÓTESE

Diante do exposto e, considerando que estudos controlados em laboratório são necessários para distinguir os efeitos causados pela exposição à microplásticos, contaminantes e/ou seus efeitos combinados, o presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade dos compostos BaP e MP, isolados e em mistura, em dois modelos biológicos (*Mysidopsis juniae* e *Echinometra lucunter*), através de ensaios agudos e crônicos e respostas de biomarcadores de efeito. Para tal, o trabalho foi desenvolvido com o intuito de testar a seguinte hipótese:

- Microplásticos e BaP interagem modificando a toxicidade dos elementos isolados.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios ecotoxicológicos foram realizados no laboratório de ecotoxicologia da empresa ALS Life Science Brasil – *Food & Agro*, localizada à Rua Fábria, 59, Vila Romana, São Paulo – SP. O composto benzo(a)pireno foi adquirido junto à Sigma-Aldrich Chemical Representações Ltda e as partículas de microplástico foram cedidas pela empresa petroquímica brasileira Braskem S.A. São micropartículas virgens, de polietileno, com tamanho aproximado de 100 a 250 µm e usadas como esfoliante e abrasivo em produtos cosméticos de cuidado pessoal.

2.1 ORGANISMOS MODELOS

2.1.1 *Echinometra lucunter*

Os ouriços-do-mar são invertebrados sésseis e bentônicos, pertencentes ao grupo dos equinodermos, que apresentam uma carapaça calcária cheia de espinhos e forma ovoide (MALINCONICO *et al.*, 2013). São organismos extremamente sensíveis, de fácil recolha e ciclo de vida rápido, sendo muito utilizados nos testes ecotoxicológicos, principalmente no estado de vida larval (RIBEIRO *et al.*, 2018). Sua fecundação ocorre externamente com formação de uma larva *pluteus* de vida livre, que se alimenta de algas unicelulares e sofrerá metamorfose até se desenvolver em um organismo adulto (LIVINGSTONE, 2016). Possuem um epitélio externo expandido, de onde conseguem captar substâncias dissolvidas no ambiente e seus hábitos bentônicos os tornam mais susceptíveis à captura de poluentes adsorvidos nos sedimentos marinhos (CARNEVALI, 2005). São componentes críticos dos ecossistemas marinhos (contribuem com 90% de biomassa bentônica) e predadores de segundo ou terceiro grau, estando sujeitos a processos de magnificação trófica (PEREIRA *et al.*, 2018).

A diferença do ouriço-do-mar para os demais organismos utilizados nos testes ecotoxicológicos é que os ouriços não são cultivados em laboratório e sim recolhidos

do ambiente (ABNT NBR 15350, 2020). A sua distribuição geográfica estende-se desde o sul dos EUA até o sul do Brasil (LIMA *et al.*, 2009; MARIANTE *et al.*, 2009).

2.1.2 *Mysidopsis juniae*

Os misidáceos são pequenos invertebrados marinhos, pertencentes ao subfilo Crustacea. Esses animais são muito parecidos com o camarão, pois possuem um tórax recoberto por carapaça (rosto), onde se encontram os olhos compostos e dois pares de apêndices, sendo que um par se modifica em maxilípedes e exópodes filamentosos. Apresentam tamanho de 2 a 30 mm e a reprodução é do tipo sexuada, sendo que as fêmeas possuem um marsúpio onde carregam os ovos e liberam os juvenis com forma semelhante ao adulto (RUPPERT e BARNES, 1996). São animais omnívoros que se alimentam de pequenas partículas e organismos planctônicos, além de serem parte importante na dieta de muitos peixes (RUPPERT *et al.*, 2005).

Estes organismos possuem alta importância em testes ecotoxicológicos devido à sua sensibilidade aos efeitos de contaminantes, sendo internacionalmente reconhecidos como organismos-padrão em testes de toxicidade. São membros importantes da cadeia alimentar, de fácil manutenção em laboratório e possuem um grande potencial reprodutivo (ARAGÃO, 2006).

2.2 DESENHO EXPERIMENTAL

2.2.1 Avaliando o efeito de uma concentração ambiental de microplástico sobre a toxicidade de BaP

A toxicidade do BaP, tanto isolado quanto associado aos MPs, para os dois organismos modelos, foi avaliada utilizando-se as mesmas concentrações e este screening buscou encontrar as concentrações de efeito destes contaminantes. Para tanto, concentrações iniciais de BaP utilizadas no presente estudo (0,03; 0,3 e 3,0 µg/L) foram determinadas a partir de valores obtidos em áreas estuarinas (POLAKIEWICZ, 2008; NASHER *et al.*, 2013; ADENIJI *et al.*, 2019), sendo consideradas ambientalmente relevantes. Valores encontrados em estudos de toxicidade também foram considerados (SIU *et al.*, 2004). Além destas

concentrações, foram testadas concentrações mais elevadas de BaP (12,0 µg/L, 21,0 µg/L e 30,0 µg/L).

A quantidade de microplástico empregada (5 mg/L) é próxima às quantidades reportadas para o Giro Central do Pacífico Norte (3,02 mg/L) (MOORE *et al.*, 2001; SUSSARELLU *et al.*, 2016) e para a Costa da Califórnia (5,33 mg/L) (GILFILLAN *et al.*, 2009). A dose relativamente alta de microplástico, ainda que ambientalmente relevante, foi estabelecida neste estudo para explorar o potencial mecanismo de ação deste estressor.

2.2.2 Avaliando o efeito da variação da concentração do microplástico sobre a toxicidade de BaP

2.2.2.1 Desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

Após ser encontrada a CE50 do BaP isolado e associado a MP, um novo experimento foi realizado. Neste experimento, foi testada a concentração de efeito de BaP (12,0 µg/L) em diferentes cenários de exposição a microplásticos, partindo da concentração ambiental de 5 mg/L e aumentando para 50 e 500 mg/L, simulando uma exposição extrema a estas micropartículas.

2.2.2.2 Biomarcadores de efeito em *Mysidopsis juniae*

Para *Mysidopsis juniae*, como não foi possível encontrar a CL50, buscou-se avaliar os efeitos subletais de BaP isolado e associado a MP. Desta forma, um novo ensaio foi realizado com concentrações de BaP mais elevadas, inicialmente testadas (3,0; 12,0; 21,0 e 30,0 µg/L), em dois cenários de exposição a microplásticos: primeiro com a concentração ambiental testada (5 mg/L) e, segundo, aumentando a concentração de microplástico para 50 mg/L. Ao final do experimento, os organismos vivos foram separados e preservados em ultra-freezer (-70°C), para a avaliação dos biomarcadores de efeito (LPO e Dano em DNA).

2.2.3 Preparo das soluções-estoque

Para a exposição ao BaP, duas soluções-estoque foram preparadas a partir da diluição do BaP em solvente. Por ser um composto altamente insolúvel em água ($S = 0,0038 \text{ mg. L}^{-1}$) (MEIRE *et al.*, 2007), a solução aquosa foi preparada através da utilização de acetona, que ajuda a aumentar a solubilidade do HPA e diminui sua adsorção nas paredes dos frascos utilizados nos experimentos (CAVALCANTE *et al.*, 2007). Para a solução-estoque 01, 0,001 g de BaP foi dissolvido em 5 mL de acetona. Desta solução, 0,500 mL foi dissolvido em 4,5 mL de acetona para obtenção da solução-estoque 02.

2.2.4 Preparo das soluções-teste

As soluções-estoque foram calculadas para atingir as concentrações nominais na água de 0,03 µg/L, 0,3 µg/L, 3,0 µg/L, 12,0 µg/L, 21,0 µg/L e 30,0 µg/L. Além das soluções-estoque, um volume de acetona também foi adicionado nas soluções-teste para melhor dissolução do contaminante. Para testar a toxicidade do solvente aos organismos expostos, foi preparado um tratamento controle com 150 µL de acetona em 1000 mL de água do mar. O tratamento controle contendo apenas água marinha também foi devidamente utilizado.

Os grânulos de polietileno foram pesados em balança analítica e distribuídos igualmente em cada réplica. A concentração inicial de MP utilizada foi de 5 mg/L para ambos os organismos. Nos ensaios posteriores, as concentrações foram aumentadas, sendo 5, 50 e 500 mg/L para *Echinometra lucunter*, adicionados em concentração de efeito do BaP para este organismo (12,0 µg/L) e 5 mg/L e 50 mg/L para *Mysidopsis juniae*, adicionados às concentrações mais elevadas do ensaio inicial (3,0; 12,0; 21,0 e 30,0 µg/L). Para cada tratamento, foram preparadas quatro réplicas de exposição de 250 mL para misidáceos e 10 mL para embriões de ouriço-do-mar (Figuras 1 e 2).

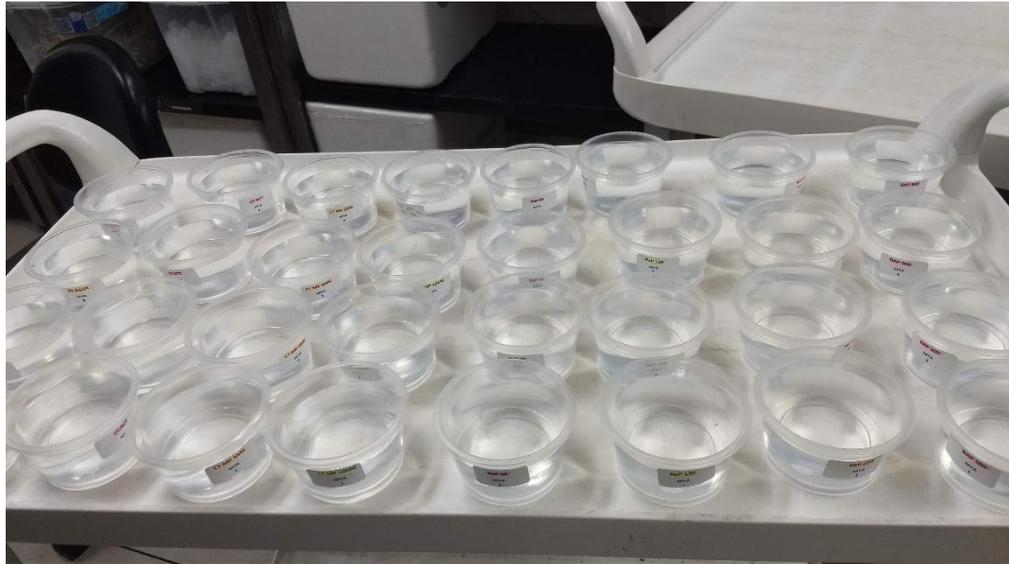


Figura 1. Tratamentos de exposição para experimento com *Mysidopsis juniae*.
Fonte: Elaborado pela autora.



Figura 2. Tratamentos de exposição para experimento com *Echinometra lucunter*.
Fonte: Elaborado pela autora.

2.3 ENSAIOS DE TOXICIDADE

2.3.1 Ouriço-do-mar (*Echinometra lucunter*)

O experimento com *Echinometra lucunter* consistiu na exposição dos ovos de ouriço-do-mar às diluições de BaP, na presença e ausência de microplásticos. Os ensaios foram mantidos em incubadora à temperatura de 24 a 28°C (Figura 3) e

fotoperíodo de 12 a 16 horas de luminosidade. As leituras das análises físico-químicas (oxigênio dissolvido, pH e salinidade) foram realizadas no início e no final do teste, sendo que, para a leitura final, as réplicas adicionais foram montadas no início do experimento e guardadas junto às outras réplicas com ovos de ouriço para que permanecessem nas mesmas condições do ensaio.



Figura 3. Réplicas do ensaio com ouriço-do-mar já preparadas e mantidas em incubadora.
Fonte: Elaborado pela autora.

2.3.1.1 Coleta dos organismos

Os ouriços-do-mar foram coletados em São Sebastião, município do estado de São Paulo, nas praias Guaecá e Barequeçaba, e entregues ao laboratório nos dias dos ensaios. Os ouriços da espécie *Echinometra lucunter* são bastante frequentes nos costões do canal de São Sebastião (MILANELLI, 2003; BRITO *et al.*, 2014). A Figura 4 mostra um exemplar da espécie coletado para o experimento.



Figura 4. Exemplo de ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*.
Fonte: Elaborado pela autora.

2.3.1.2 Obtenção dos gametas

Os organismos foram lavados com água de diluição para remoção de qualquer detrito na superfície corpórea e estimulados a liberarem seus gametas através da aplicação de injeção de 5 mL de KCL 0,5 M na região perioral (2,5 mL em cada ponto), conforme mostra Figura 5. Posterior a isso, o animal foi agitado suavemente para que o KCL se espalhasse em sua cavidade celômica.



Figura 5. Aplicação de injeção de KCL na região perioral do ouriço-do-mar para obtenção dos gametas.
Fonte: elaborado pela autora.

Os gametas masculinos e femininos foram coletados separadamente (os gametas se diferem pela coloração, onde os óvulos apresentam coloração

alaranjada e os espermatozoides coloração esbranquiçada). Os espermatozoides foram coletados diretamente dos gonóporos utilizando-se uma micropipeta e foram mantidos em um béquer com gelo até o momento da fertilização. Os óvulos foram coletados em béqueres contendo água de diluição, onde as fêmeas foram apoiadas com a face aboral voltada para baixo. Após a liberação dos óvulos, o conteúdo foi filtrado em malha de 350 μm e reunido em um béquer único, onde foi acrescentada água marinha até um volume de 600 mL. Foi aguardada a sedimentação dos óvulos e o sobrenadante foi descartado. Este processo foi repetido três vezes.

2.3.1.3 Fecundação

Uma solução espermática foi preparada utilizando-se esperma e água de diluição bem misturada para dissolução dos grumos. Posteriormente, esta solução foi adicionada à solução de óvulos e a mistura foi levemente agitada durante 5 minutos para que pudesse ocorrer a fecundação e obtenção da solução de ovos. Para confirmação da fecundação, 1 mL da solução de ovos foi diluído em 100 mL de água de diluição. A partir dessa mistura, 1 mL foi colocado em câmara de Sedgwick-Rafter para contagem dos ovos em microscópio óptico. O volume necessário de solução de ovos por réplica foi calculado e adicionado às soluções-teste 2 horas após a fecundação.

2.3.1.4 Encerramento

Os ensaios foram encerrados quando, no mínimo, 80% dos organismos no controle atingiram o estágio de *pluteus* normais, apresentando braços de tamanho igual ou maior ao comprimento do corpo da larva. As larvas foram contadas em câmara de *Sedgwick-Rafter* em microscópio óptico. As réplicas foram finalizadas com solução de lugol para preservação das larvas e, posterior a isso, foi feita a análise do estágio de desenvolvimento larval e ocorrência de anomalias em cada réplica.

2.3.2 Misidáceos (*Mysidopsis juniae*)

O experimento com *Mysidopsis juniae* consistiu na exposição de misidáceos jovens, de 1 a 8 dias de idade, às diluições de BaP, na presença e ausência de microplásticos. Foram adicionados 40 organismos em cada tratamento, sendo 10 organismos por réplica. Os organismos foram isolados de 10 em 10 em copinhos plásticos, com o mínimo de água de diluição possível (Figura 6), para evitar que as soluções-teste fossem mais diluídas.

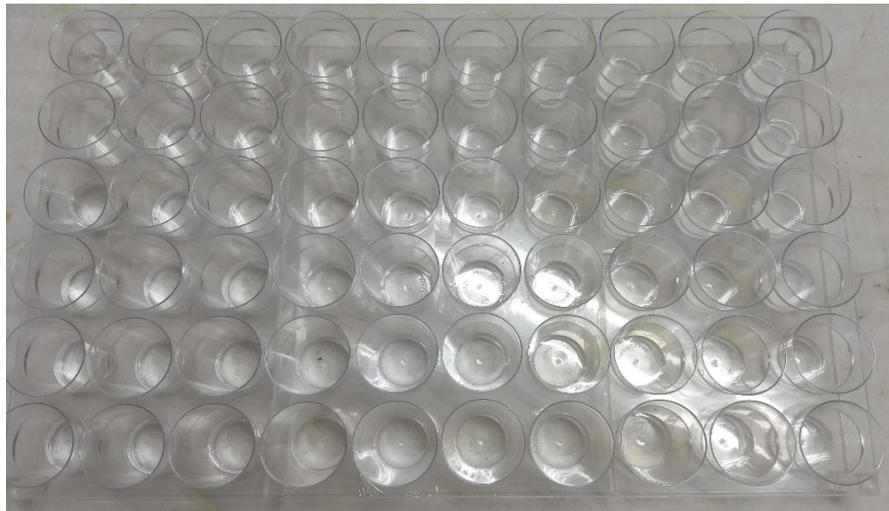


Figura 6. Separação dos organismos-teste em copinhos plásticos para posterior adição nas réplicas do experimento.

Fonte: Elaborado pela autora.

As soluções-teste foram dispostas em prateleiras dentro de sala climatizada com temperatura de 23 a 27°C e fotoperíodo de 12 a 16 horas de luminosidade. Todas as réplicas contaram com aeração para oxigenação das soluções (Figura 7).



Figura 7. Réplicas do ensaio com misidáceos já preparadas e mantidas em sala climatizada.

Fonte: Elaborado pela autora.

Foram realizadas avaliações diárias para registro da letalidade dos organismos de cada solução-teste e as análises físico-químicas (oxigênio dissolvido, pH e salinidade) foram realizadas no início e no final do ensaio. Os organismos foram alimentados diariamente com 20 a 50 náuplios de *Artemia* sp. por organismo-teste (Figura 8).

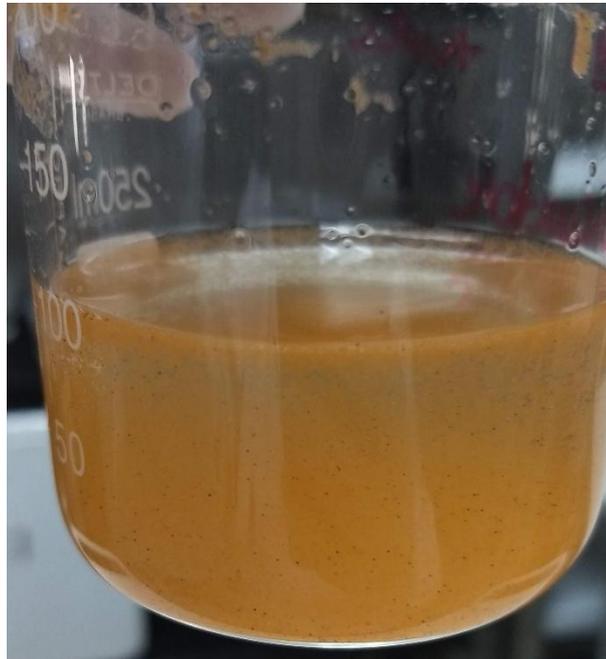


Figura 8. Náuplios de *Artemia* sp fornecidos aos organismos durante o experimento.
Fonte: Elaborado pela autora.

Os ensaios tiveram duração de 96 horas e, ao final, foram registradas as letalidades obtidas em cada réplica, além das leituras de pH, salinidade e oxigênio dissolvido.

2.3.3 Análises dos Biomarcadores

Após a finalização dos ensaios, os organismos, ainda vivos, foram coletados e agrupados em tubos de criogenia e preservados em ultra freezer (-70°C) até o momento de análise. Para a análise, os organismos foram homogeneizados a 20 % p/v em tampão Tris-HCl (Tris 50 mM; EDTA 1 mM; DTT 1 mM; sucrose 50 mM; KCl 150 mM; PMSF 1 mM, pH 7.6). O homogenato foi então separado para a análise de danos em DNA (25 μ L) e peroxidação lipídica (150 μ L).

2.3.3.1 Peroxidação lipídica

A análise de peroxidação lipídica foi realizada através do método do ácido tiobarbitúrico (WILLS, 1987), onde produtos primários, como hidroperóxido lipídico, e outros produtos secundários ou finais do processo de peroxidação lipídica, como os dienos conjugados, são avaliados e expressos como substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARs). O método consiste na utilização de 150µL de tecidos homogeneizados acrescidos de 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% 1mM FeSO₄ e 150µL de ácido tiobarbitúrico (TBAR 0.67%) e aquecidos a 70°C por 10 min. Alíquotas de 200µL são então retiradas para determinação em espectrofotômetro das absorbâncias a 540nm e com curva padrão de tetrametoxipropano. Os resultados são expressos em µg TBARs/mg proteínas.

2.3.3.2 Precipitação Alcalina (DNA *strand breaks*)

Os danos no DNA foram avaliados pelo ensaio de precipitação alcalina (OLIVE, 1988), quantificando vestígios de DNA através da fluorescência (GAGNÉ e BLAISE, 1993). O método consiste na separação de vestígios livres de DNA do DNA genômico dos tecidos dos animais, onde estes homogeneizados (25µL) são misturados com 200µL de 2% SDS contendo 10mM EDTA, 10mM Tris–base e 40mM NaOH. O homogenato é centrifugado por 1 minuto, onde serão adicionados 200µL de 0,12M KCl e levados ao aquecimento por 10 min a 60°C, misturados por inversão e resfriados a 4°C por 30 minutos para precipitação do DNA genômico ligado ao SDS associado a nucleoproteínas. Esta mistura é então centrifugada a 8.000g por 5 minutos (4°C). Em seguida, é feita a coloração do sobrenadante em microplacas (96) 50µL, sendo adicionados 150µL de corante Hoescht, na concentração de 1µg/mL (diluído em tampão contendo 0,4 MNaCl, 4mM colato de sódio e 0,1M Tris–acetato, pH 8,5–9,0). Após agitação por 5 minutos, a fluorescência é então medida utilizando filtro de 360nm (excitação) e 450nm (emissão). Para elaboração da curva padrão, é utilizado DNA genômico de esperma de salmão. Os resultados são expressos em µg DNA mg⁻¹ proteína total.

2.3.3.3 Proteínas totais

Todas as análises de biomarcadores foram normalizadas pelas concentrações de proteína. Esta determinação foi realizada por espectrofotometria a 595nm (BRADFORD, 1976), utilizando BSA (proteína albumina do soro bovino) como padrão.

2.4 ENSAIOS COM SUBSTÂNCIA REFERÊNCIA

A qualidade dos ensaios ecotoxicológicos realizados neste estudo foi aferida pelo controle da sensibilidade dos organismos, através da realização dos ensaios com substância de referência. A substância utilizada foi o sulfato de zinco e este atende aos critérios descritos pela *Environment Canada* (1990), sendo classificado como uma substância viável para ser utilizada como referência nos testes.

Os valores obtidos nos ensaios de sensibilidade foram compreendidos dentro dos limites da carta-controle já estabelecida pelo laboratório. No caso dos ouriços-do-mar, os ensaios foram realizados a cada nova coleta de organismo. Os valores obtidos também foram compreendidos dentro dos limites da carta-controle já estabelecida pelo laboratório.

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A significância das diferenças entre os tratamentos (tanto dos ensaios de toxicidade quanto dos biomarcadores) foi avaliada por meio da Análise Permutacional de Variância (PERMANOVA “*main test*”) univariada e bifatorial (ANDERSON, 2017), considerando dois fatores fixos: tratamento (BaP isolado e BaP associado a MP) e concentração. As variáveis da matriz foram normalizadas para que tivessem igual importância na análise. Quando o teste principal apresentou resultado significativo ($p < 0.05$), foi aplicado teste *a posteriori* (“*pairwise multiple comparisons test*”) para identificar quais níveis diferiram entre si. A homogeneidade das variâncias foi analisada utilizando PERMDISP. Uma vez que o resultado da PERMANOVA é sensível à heterocedasticidade dos dados, em casos em que foi identificada, foi observado se as séries de dados, apesar da sua heterocedasticidade, possuíam locação suficientemente distintas para corroborar uma eventual diferença significativa apontada pela PERMANOVA.

A concentração efetiva de BaP isolado e BaP associado a MP capaz de inibir em 50% o desenvolvimento embriolarval de ouriço-do-mar (CE₅₀) foi calculada através do *Trimmed Spearman-Kärber Method* utilizando software *GraphPad Prism*.

3 RESULTADOS

3.1 SENSIBILIDADE DOS ORGANISMOS

Os resultados dos ensaios com ambos os organismos se apresentaram dentro da faixa aceitável, estabelecida pela carta-controle vigente no laboratório. A CL₅₀ para misidáceos foi de 0,24 mg Zn/L, com intervalo de confiança entre 0,21 e 0,27 mg Zn/L, sendo que os limites da carta-controle são 0,20 a 0,29 mg Zn/L. Para os ouriços-do-mar, a CE₅₀ foi de 0,160 mg Zn/L (intervalo de confiança: 0,154 a 1,66 mg Zn/L) para o primeiro lote de organismos e 0,176 mg Zn/L (intervalo de confiança: 0,172 a 0,180) para o segundo lote, sendo que os limites da carta-controle são 0,156 a 0,193 mg Zn/L. Assim, a sensibilidade dos lotes utilizados nos ensaios foi considerada válida.

3.2 ECHINOMETRA LUCUNTER

Foram utilizados três machos e cinco fêmeas para coleta dos gametas dos organismos e posterior fecundação. A contagem de ovos para adição nos experimentos está descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Fecundação dos óvulos de ouriço-do-mar para obtenção dos embriões.

Fecundação	Valores obtidos
Contagem de ovos	80
Número de óvulos fecundados	78
Quantidade de ovos por réplica	300
Volume adicionado por réplica (mL)	0,038

Fonte: Elaborado pela autora.

A porcentagem de fecundação obtida após a adição de esperma de ouriço-do-mar ao volume de óvulos foi de 98%, estando acima do valor de 80%

estabelecido pela norma do ensaio (ABNT NBR 15350, 2020). A Figura 9 apresenta os ovos já fecundados obtidos durante o experimento.

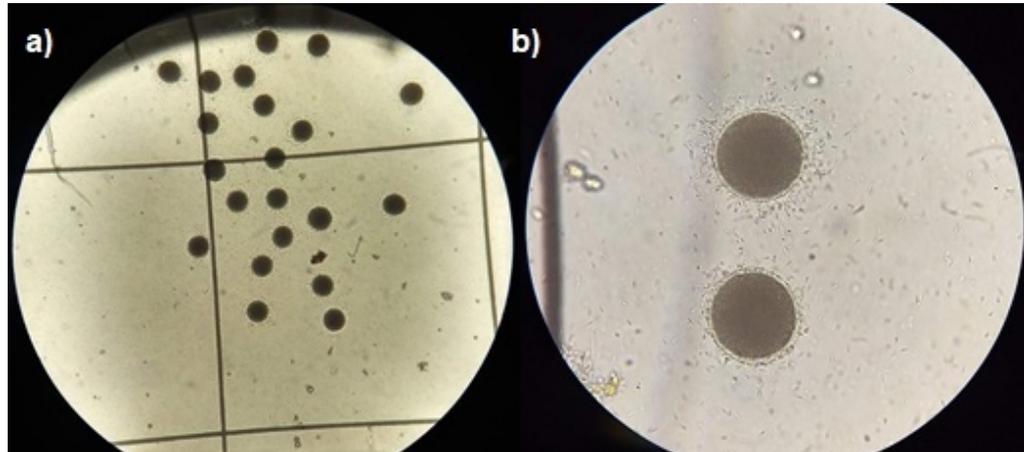


Figura 9. Fecundação de óvulos de *Echinometra lucunter*, a) ovos obtidos no ensaio; b) objetiva mais ampliada para visualização da membrana de fecundação.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os testes foram finalizados após 36 horas de exposição e apresentaram uma porcentagem de larvas *pluteus* normais nos controles acima de 80% (93%).

3.2.1 Validação dos controles

De acordo com o teste t de *Student* ($p < 0.05$), não houve diferença significativa entre os tratamentos controle e controle acetona. Portanto, a acetona não foi considerada tóxica para os embriões de ouriço-do-mar. Os resultados estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 - Comparação do desenvolvimento embriolarval obtido no controle e controle acetona.

Tratamento	Desenvolvimento larval normal (%)	Desenvolvimento larval anormal (%)
Controle	84,75	15,25
Controle acetona	81,75	18,25

Fonte: Elaborado pela autora.

3.2.2 Avaliando o efeito de uma concentração ambiental de microplástico sobre a toxicidade de BaP

Os resultados do ensaio que contempla as concentrações de BaP 0,03; 0,3; 3,0; 12,0; 21,0 e 30,0 µg/L e 5 mg/L de microplástico estão expressos na Figura 10.

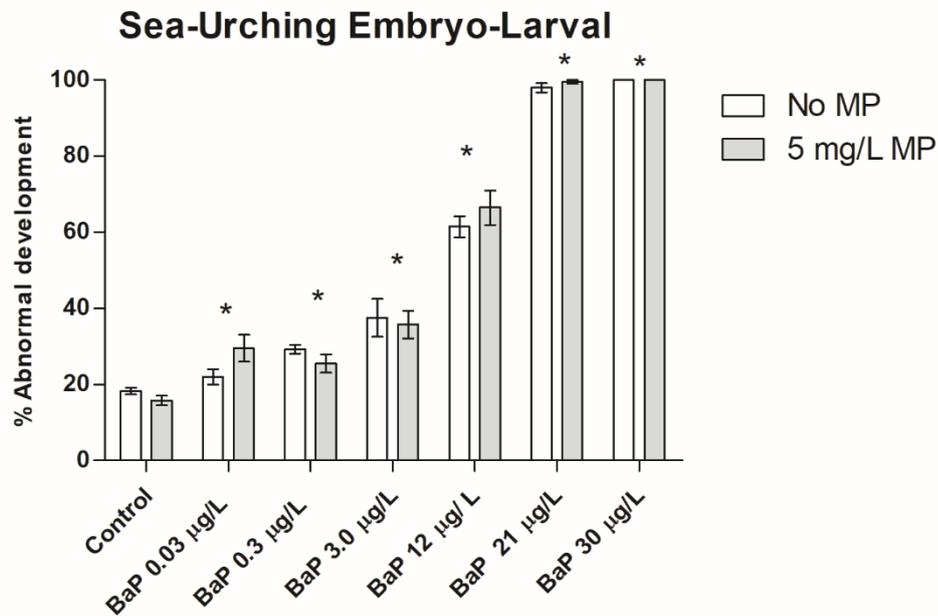


Figura 10. Representação gráfica do efeito de BaP e MP sobre o desenvolvimento embriolarval de ouriço-do-mar nos tratamentos de BaP e MP isolados e em mistura. Asteriscos representam diferenças significativas nos tratamentos em comparação com o controle ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

As larvas *pluteus* se mostraram sensíveis ao BaP. O desenvolvimento larval foi significativamente afetado pela exposição em todas as concentrações de BaP testadas, segundo o teste PERMANOVA. As partículas de microplástico sozinhas não induziram efeito significativo no desenvolvimento embriolarval de ouriço-do-mar, sendo este tratamento igual ao tratamento controle, onde as larvas *pluteus* se desenvolveram normalmente. A presença de MP nos tratamentos com BaP também não interferiu na toxicidade do contaminante para as larvas de ouriço. Segundo a PERMANOVA, os tratamentos BaP isolado e BaP associado a MP são iguais, indicando ausência de interação entre os dois compostos. Assim, BaP induziu toxicidade às larvas de ouriço tanto isoladamente quanto em mistura.

A Figura 11 apresenta larvas *pluteus* em seus estados de desenvolvimento normal e anormal.

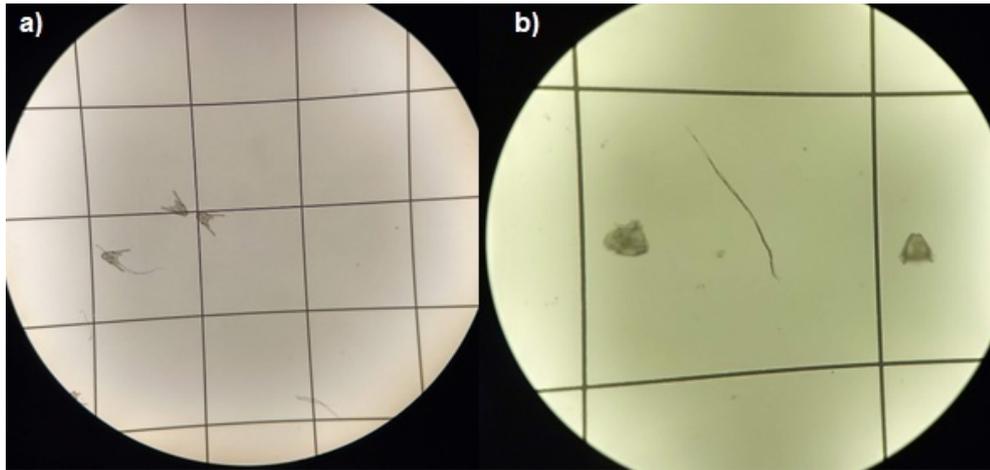


Figura 11. Larvas *pluteus* de *Echinometra lucunter*; a) *pluteus* normais que não sofreram danos no desenvolvimento; b) *pluteus* anormais que não se desenvolveram normalmente.
Fonte: Elaborado pela autora.

Os valores calculados da CE₅₀ de BaP para *Echinometra lucunter* estão representados na Figura 12.

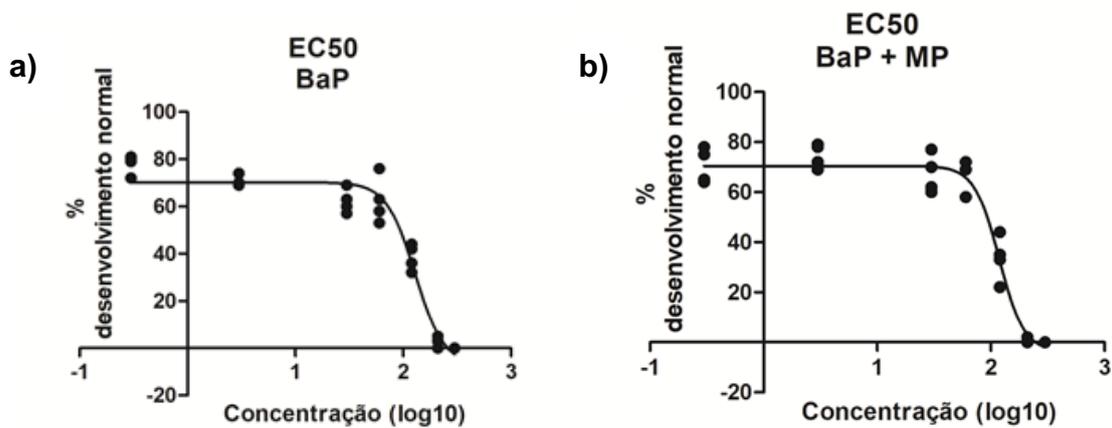


Figura 12. Representação gráfica da CE₅₀ calculada para a exposição de 36 horas; a) Tratamento de BaP isolado; b) Tratamento de BaP associado a MP.
Fonte: Elaborado pela autora.

Os valores que inibiram 50% do desenvolvimento larval dos ouriços em 36 horas de exposição nos tratamentos de BaP isolado e BaP associado a MP foram de 13,0 µg/L (com intervalo de confiança entre 10,8 µg/L e 15,3 µg/L) e 11,8 µg/L, (com intervalo de confiança entre 10,5 µg/L a 13,2 µg/L), respectivamente.

3.2.3 Avaliando o efeito da variação da concentração do microplástico sobre a toxicidade de BaP

Os resultados dos ensaios de BaP em sua concentração de efeito para *Echinometra lucunter* (12,0 µg/L) em diferentes concentrações de microplástico (5, 50 e 500 mg/L) estão expressos na Figura 13.

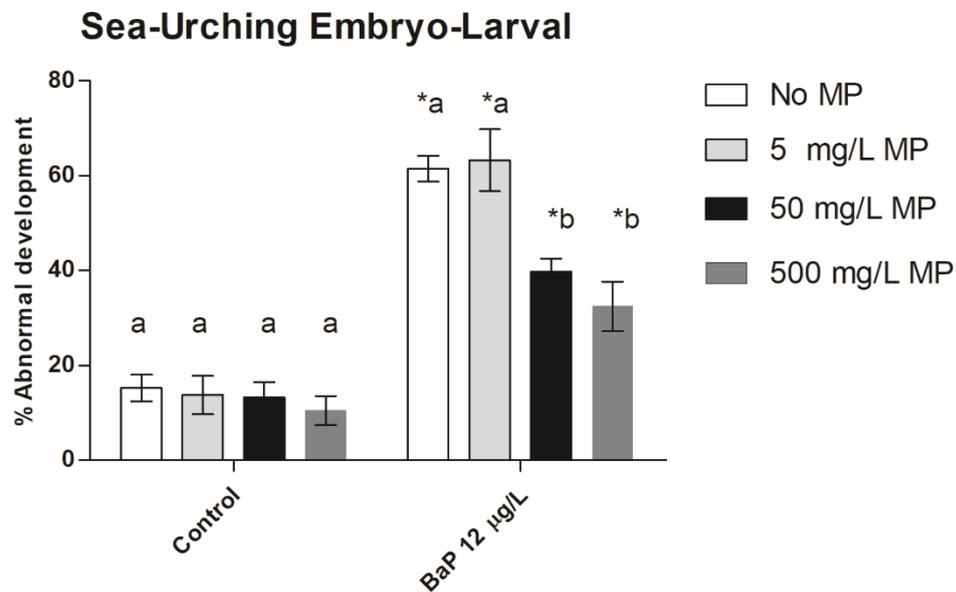


Figura 13. Representação gráfica do efeito de BaP sobre o desenvolvimento larval de *Echinometra lucunter* exposto à CE₅₀ em diferentes concentrações de microplástico. Letras diferentes representam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,05$). Asteriscos representam diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Assim como no primeiro ensaio, os resultados da PERMANOVA demonstram que os tratamentos contendo apenas microplástico não diferiram do tratamento controle, indicando que as partículas de polietileno não são tóxicas às larvas de ouriço-do-mar, mesmo em concentrações mais elevadas. Todas as concentrações de MP (5, 50 e 500 mg/L) são iguais ao tratamento controle. Nos tratamentos de BaP e MP em mistura, foi observado que a menor concentração de microplástico (5 mg/L) não alterou a toxicidade de BaP sobre o desenvolvimento das larvas *pluteus*, sendo este tratamento igual ao tratamento contendo BaP isolado, segundo a PERMANOVA. Esses resultados corroboram os resultados apresentados no primeiro ensaio, onde a presença de 5 mg/L de MP também não alterou a toxicidade de BaP para os embriões de ouriço-do-mar. Em contrapartida, nos tratamentos contendo maiores concentrações de microplástico (50 e 500 mg/L), foi observada uma diminuição da toxicidade de BaP para as larvas de ouriço, sendo que ambos os tratamentos diferiram dos tratamentos de BaP isolado e BaP em mistura com 5 mg/L

de MP, segundo o teste PERMANOVA. Apesar da queda de efeito observada em ambos os tratamentos, essa diminuição não foi o suficiente para que BaP deixasse de induzir efeito tóxico sobre o desenvolvimento larval de ouriço-do-mar.

3.3 *MYSIDOPSIS JUNIAE*

3.3.1 Validação dos controles

De acordo com o teste t de *Student* ($p < 0.05$), não houve diferença significativa entre os tratamentos controle e controle acetona. Portanto, a acetona não foi considerada tóxica para os organismos. Os resultados estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 - Mortalidades obtidas no controle e controle acetona.

Tratamento	Total de organismos	Número de mortos	Mortalidade (%)
Controle	40	4	10
Controle acetona	40	4	10

Fonte: Elaborado pela autora.

O controle se manteve dentro dos padrões estabelecidos pela norma de referência do teste (ABNT NBR 15308, 2017), portanto, foi considerado válido.

3.3.2 Avaliando o efeito de uma concentração ambiental de microplástico sobre a toxicidade de BaP

Os resultados do ensaio que contempla as concentrações de BaP 0,03; 0,3; 3,0; 12,0; 21,0 e 30,0 $\mu\text{g/L}$ e 5 mg/L de microplástico estão expressos na Figura 14.

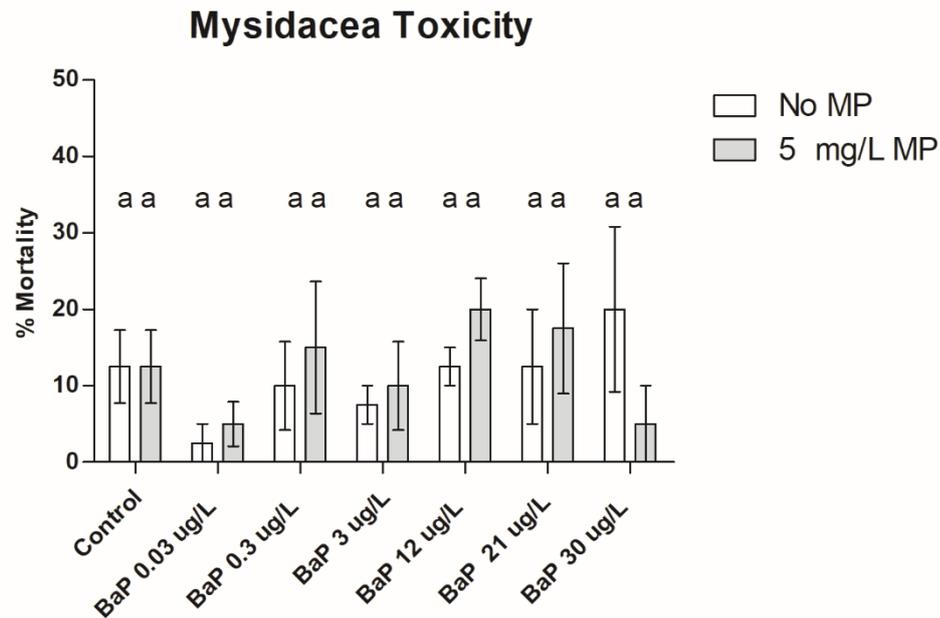


Figura 14. Representação gráfica do efeito de BaP e MP sobre a sobrevivência de *Mysidopsis juniae* nos tratamentos de BaP e MP isolados e em mistura. Letras iguais representam ausência de diferenças significativas entre tratamentos ($p > 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Os misidáceos se mostraram resistentes ao BaP. Não houve diferença significativa em nenhuma das concentrações testadas em relação ao controle, segundo a PERMANOVA, não sendo possível calcular a CL50 em 96 horas de exposição ao BaP. Assim como nos ensaios com ouriço-do-mar, as partículas de microplástico não induziram efeito significativo sobre os organismos expostos no tratamento de MP isolado, sendo igual ao tratamento controle, segundo o teste PERMANOVA. Apesar da ausência de efeito agudo de BaP e MP isolados sobre os misidáceos, é possível observar que nos tratamentos dos compostos em mistura, o efeito de mortalidade aumentou em todas as concentrações, ainda que sem diferença estatística, indicando um possível efeito negativo de BaP e MP sobre a sobrevivência dos organismos. A exceção ocorreu na concentração mais elevada (30,0 $\mu\text{g/L}$), onde houve uma diminuição da mortalidade dos organismos no tratamento de BaP e MP em mistura. Esses resultados apontam para uma possível interação entre BaP e MP.

3.3.3 Avaliando o efeito da variação da concentração do microplástico sobre a toxicidade de BaP

Os resultados dos ensaios com concentrações elevadas de BaP e diferentes concentrações de MP (5 e 50 mg/L) estão expressos na Figura 15.

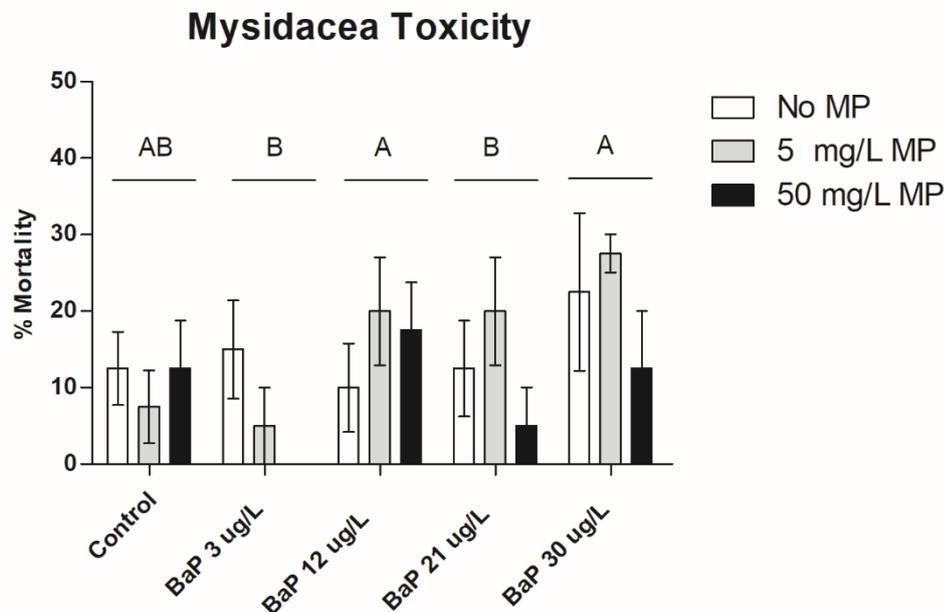


Figura 15. Representação gráfica do efeito de BaP sobre a sobrevivência de *Mysidopsis juniae lucunter* em mistura com diferentes concentrações de microplástico. Letras diferentes representam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Segundo a PERMANOVA, houve um efeito significativo de BaP neste ensaio. É possível observar um aumento na mortalidade dos organismos expostos nas concentrações 12,0 e 30,0 $\mu\text{g/L}$ em relação ao controle de BaP, embora os testes *PAIRWISE* não indiquem diferença significativa. O efeito significativo do BaP é observado nos tratamentos 30,0 $\mu\text{g/L}$ e 12,0 $\mu\text{g/L}$, cujas mortalidades foram mais altas do que nos tratamentos 3,0 $\mu\text{g/L}$ e 21,0 $\mu\text{g/L}$. As análises PERMDISP mostraram que os resultados são homogêneos, portanto, não influenciam nos resultados da PERMANOVA. Quando testado o efeito das diferentes concentrações de microplásticos sobre a mortalidade dos organismos, não se observam diferenças significativas dentro de cada tratamento, além de ser ausente a interação de efeitos entre as concentrações de microplásticos e concentrações de BaP. Porém, ainda que exista ausência de diferenças estatísticas, nos tratamentos contendo BaP e MP (5 mg/L) em mistura, é possível observar um pequeno aumento na taxa de mortalidade em comparação aos tratamentos de BaP isolado. Esses resultados são

consistentes com os resultados obtidos no primeiro ensaio, indicando um possível efeito negativo de BaP e MP sobre a sobrevivência dos organismos. Em contrapartida, os tratamentos de BaP associado a 50 mg/L de MP apresentaram redução na taxa de mortalidade dos organismos em todas as concentrações testadas, com exceção da concentração 12,0 µg/L.

3.3.4 Biomarcadores

3.3.4.1 Estresse Oxidativo (LPO)

Os resultados dos níveis de peroxidação lipídica sobre *Mysidopsis juniae* estão expressos na Figura 16.

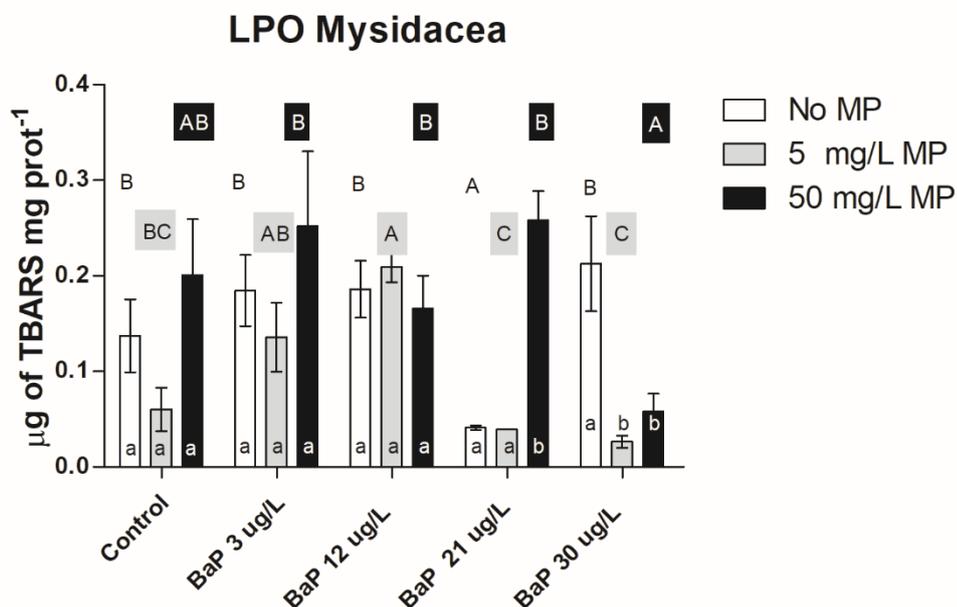


Figura 16. Representação gráfica dos níveis de estresse oxidativo nos diferentes tratamentos, após 96 horas de exposição. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre cada concentração de BaP e MP isolados e em mistura ($p < 0,05$).

Fonte: elaborado pela autora.

Os resultados mostram efeitos significativos dos fatores MP e BaP, além da interação entre eles. Ou seja, ambos os fatores causaram efeitos sobre os níveis de peroxidação lipídica, porém o efeito de um é dependente do outro. Desta forma, comparando a resposta nos níveis de MP dentro de cada concentração de BaP, através do teste *PAIRWISE*, foi observado que a maior concentração de

microplástico (50 mg/L) provocou um aumento significativo da LPO apenas na exposição a 21,0 $\mu\text{g/L}$ de BaP. Já na exposição a 30,0 $\mu\text{g/L}$, a presença de microplástico em qualquer concentração (5 ou 50 mg/L) provocou uma diminuição da LPO em relação ao tratamento sem microplástico. Quando se comparam os resultados de LPO entre as diferentes concentrações de BaP em cada nível de MP, observa-se que, no tratamento de BaP isolado, só os animais da concentração 21,0 $\mu\text{g/L}$ apresentam diferença estatística, sendo a peroxidação lipídica reduzida nestes organismos. Comparando a peroxidação lipídica dos organismos expostos a 5 mg/L de MP, os tratamentos contendo menores concentrações de BaP (3,0 e 12,0 $\mu\text{g/L}$) apresentaram maiores níveis de LPO do que os animais expostos às maiores concentrações de BaP (21,0 $\mu\text{g/L}$ e 30,0 $\mu\text{g/L}$). Nos animais do tratamento com 50 mg/L de microplástico, também se observa uma menor peroxidação lipídica na maior concentração de BaP (30,0 $\mu\text{g/L}$).

3.3.4.2 Danos em DNA

Os resultados dos níveis de danos em DNA sobre *Mysidopsis juniae* estão expressos na Figura 17.

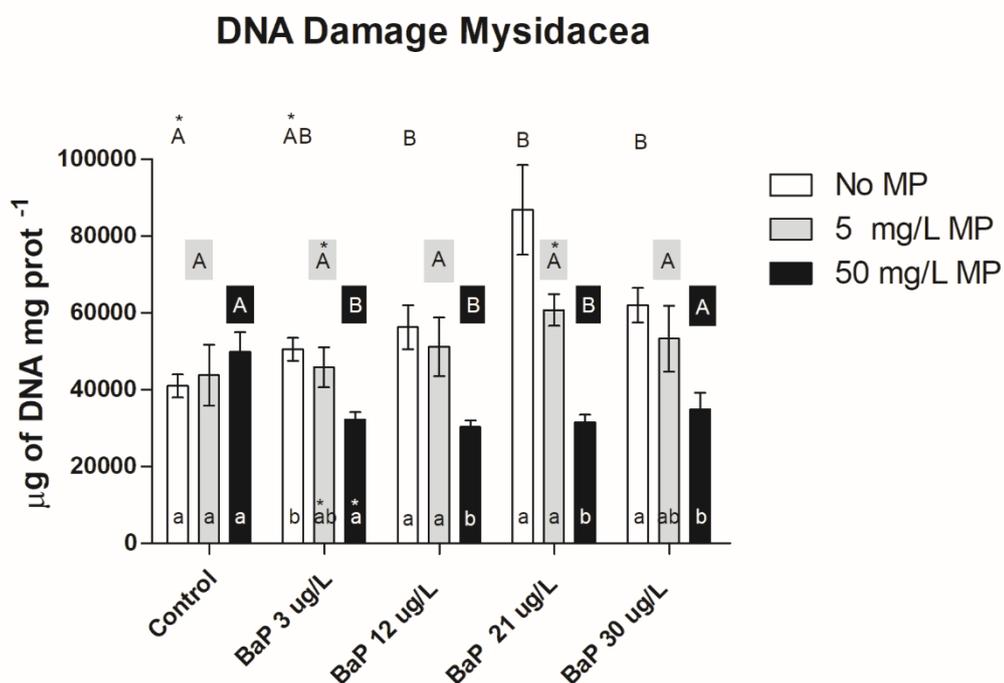


Figura 17. Representação gráfica dos níveis de danos em DNA nos diferentes tratamentos, após 96 horas de exposição. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os

tratamentos ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre cada concentração de BaP e MP isolados e em mistura ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Assim como observado nos resultados de LPO, para os resultados de dano em DNA também foram observados efeitos significativos dos fatores BaP e MP, além da interação entre eles. Ou seja, ambos os fatores causaram efeitos sobre os níveis de dano em DNA, porém o efeito de um é dependente do outro. Contudo, diferentemente dos resultados de LPO, os danos em DNA apresentaram um padrão de respostas mais evidente. Comparando as respostas entre as diferentes concentrações de microplástico dentro de cada nível de BaP, tem-se que a genotoxicidade foi reduzida significativamente em todos os tratamentos de BaP associado a 50 mg/L de microplástico em comparação aos tratamentos de BaP isolado. Além disso, nos tratamentos de BaP 12,0 e 21,0 $\mu\text{g/L}$ associado a 50 mg/L de MP, a genotoxicidade apresentada também foi diferente dos tratamentos de BaP associado a 5 mg/L de MP. Ainda que sem diferença estatística, foi observada uma redução da genotoxicidade nos tratamentos com 5 mg/L de microplástico. Quando se comparam os resultados de dano em DNA entre as diferentes concentrações de BaP em cada nível de MP, temos a ocorrência de genotoxicidade no tratamento contendo BaP isolado em quase todas as concentrações testadas (12,0; 21,0 e 30,0 $\mu\text{g/L}$).

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os organismos expostos apresentaram diferentes sensibilidades ao BaP. As larvas de ouriço-do-mar se mostraram mais sensíveis, uma vez que o desenvolvimento embriolarval foi afetado já na primeira concentração testada (0,03 $\mu\text{g/L}$). Nas concentrações mais elevadas (21,0 $\mu\text{g/L}$ e 30,0 $\mu\text{g/L}$), o efeito sobre o desenvolvimento larval foi cerca de 100%. As concentrações nominais de BaP utilizadas nesse estudo foram eleitas a partir de valores obtidos em áreas estuarinas. Assim, estas concentrações podem ser consideradas ambientalmente relevantes. Concentrações de BaP de 10,3 $\mu\text{g/L}$ e 37,8 $\mu\text{g/L}$ foram encontradas nos estuários de Santos e São Vicente (POLAKIEWICZ, 2008). Em 2013, Nasher *et al.* encontraram concentrações de BaP nas águas do mar na Malásia, que variaram entre 0,45 e 1,1 $\mu\text{g/L}$, com uma média

de 0,8 µg/L. Foram encontradas concentrações de BaP com um valor médio de 3.29 ± 0.31 µg/L em uma área estuarina da África do Sul, (ADENIJI *et al.*, 2019). Valores encontrados em estudos de toxicidade também foram considerados. Sendo assim, o efeito observado no desenvolvimento embriolarval dos ouriços testados em concentrações ambientalmente relevantes de BaP se torna particularmente crítico, pois a estrutura das comunidades marinhas depende também do desenvolvimento bem-sucedido de larvas planctônicas (RENDELL-BHATTI *et al.*, 2021).

Já o crustáceo *Mysidopsis juniae*, mesmo nas concentrações mais elevadas, se mostrou resistente aos efeitos do contaminante. Segundo Ringwood (1992), a sensibilidade de invertebrados marinhos aos compostos tóxicos é maior em estágios de desenvolvimento embrionário e larval quando comparados aos organismos adultos. Além disso, as larvas que se encontram no fundo ou próximas a sedimentos, podem estar mais suscetíveis à contaminação através da absorção dérmica e das superfícies respiratórias, devido à natureza lipofílica do HPA, que faz com que se associe preferencialmente às fases orgânicas de partículas e sedimentos em suspensão (BILODEAU *et al.*, 2019). A comparação dos efeitos tóxicos de uma determinada substância a diferentes organismos é de extrema importância devido a essas diferenças de sensibilidade que podem ser observadas. Quando se avalia o efeito de uma substância para mais de uma espécie, é possível estimar com mais segurança o impacto do contaminante no corpo d'água receptor através do organismo que se mostrou mais sensível. Ou seja, apesar dos misidáceos terem apresentado uma alta resistência ao BaP, não significa que esse contaminante não será tóxico para outros organismos da biota aquática. Por isso, não se deve extrapolar o efeito tóxico de uma substância sobre determinada espécie para outra espécie (COSTA *et al.*, 2008). Comparando os resultados aqui obtidos com os resultados de outros estudos, também é possível verificar a diferença na resposta de sensibilidade de cada organismo para BaP (Quadro 1). No presente estudo, os ensaios com *Mysidopsis juniae* não apresentaram CE50 para as concentrações testadas de BaP. O valor de CE50 para *Echinometra lucunter* foi de 13,0 µg/L. Em 2010, Almeida testou a toxicidade de BaP sobre o crescimento da macroalga vermelha *Gracilaria birdiae* e o valor de CE50 encontrado foi de 69 µg/L. Valores de CE50 de 4,3 µg/L e 4,7 µg/L foram encontrados para *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia reticulata*, respectivamente (IKENAKA *et al.*, 2013).

Quadro 1. Comparação da sensibilidade dos organismos ao BaP pelo valor da concentração de efeito em 50% dos organismos expostos ao contaminante.

Toxicidade Benzo(a)pireno			
Organismo	Espécie	Valor de CE50 (µg/L)	Fonte
Pulga d'água ou Dáfnia	<i>Daphnia magna</i>	4,3	Ikenaka <i>et al.</i> , 2013
Pulga d'água ou Dáfnia	<i>Ceriodaphnia reticulata</i>	4,7	Ikenaka <i>et al.</i> , 2013
Macroalga vermelha	<i>Gracilaria birdiae</i>	69	Almeida, 2010
Ouriço-do-mar	<i>Echinometra lucunter</i>	13	Presente estudo
Misídeo	<i>Mysidopsis juniae</i>	Não calculada dentro das concentrações testadas	Presente estudo

Fonte: Elaborado pela autora.

Neste estudo, os microplásticos isolados (virgens) não induziram efeitos agudos e crônicos para misidáceos e ouriço-do-mar. Ainda não existe um consenso acerca dos efeitos produzidos pelas micropartículas virgens para organismos planctônicos, pois alguns trabalhos encontram efeitos prejudiciais (SUSSARELLU *et al.*, 2016; TRIFUOGGI *et al.*, 2019;) enquanto outros, como o presente estudo, observaram ausência de efeitos (BEIRA *et al.*, 2018; LO e CHAN, 2018; KAPOSI *et al.*, 2014). Segundo Hammer *et al.* (2012), os plásticos virgens são considerados bioquimicamente inertes no ambiente marinho, devido à sua estrutura macromolecular que não é capaz de reagir e penetrar nas membranas celulares dos organismos. Além disso, uma hipótese que pode ser levantada para explicar a falta de toxicidade das micropartículas aos organismos expostos é o tipo de polímero utilizado. Segundo Eltemsah e Bohn (2019), os diferentes tipos de polímeros podem apresentar diferentes níveis de toxicidade a diferentes organismos. Em 2018, Messinetti *et al.* mostraram que microesferas de poliestireno apresentaram diferenças significativas sobre o desenvolvimento de larvas de ouriço. Outro estudo também comparou a toxicidade de partículas de polietileno e poliestireno e os resultados mostraram que as microesferas de poliestireno também foram mais tóxicas do que as de polietileno (AU, 2015). Porém, é importante ressaltar que a via de exposição (principalmente via ingestão) pode alterar essas respostas. No

presente estudo, a ingestão de MPs não foi testada, pois as larvas de ouriço-do-mar são organismos planctônicos que não entraram em contato direto com as partículas de microplástico, uma vez que estas ficaram flutuando na superfície da água. Além disso, os *pluteus* se alimentam de algas unicelulares (LIVINGSTONE, 2016), não sendo capazes de ingerir estas partículas. Já no caso dos misidáceos, acredita-se que, devido ao tamanho das micropartículas utilizadas (100 a 250 μm), os organismos não seriam capazes de ingeri-las, ainda que acidentalmente. As partículas foram utilizadas em tamanhos irregulares, pois fazem as condições de exposição dos ensaios se assemelham com as condições observadas no ambiente aquático real, uma vez que essas partículas estão submetidas a forças naturais gradativas de desgaste da sua superfície, sejam por processos bióticos ou abióticos (LAMBERT e WAGNER, 2017).

Apesar dos microplásticos isolados não induzirem efeitos tóxicos aos organismos expostos, quando estas micropartículas estiveram associadas ao BaP, foi possível observar, ainda que sem diferença estatística, um aumento da mortalidade dos misidáceos na concentração mais baixa de microplástico testada (5 mg/L). Ou seja, a presença de microplástico pode ter induzido um efeito negativo sobre os organismos quando associado ao BaP. É possível que os microplásticos tenham interferido nos mecanismos fisiológicos dos organismos expostos, não sendo suficiente para apresentar toxicidade relevante quando isolado, mas sujeitando a célula a maior estresse e causando aumento da toxicidade de BaP. Segundo Besseling *et al.* (2014), a presença de microplásticos no meio pode tornar os organismos mais vulneráveis a outros contaminantes. Um estudo realizado por Prata (2016) demonstrou que o antibiótico doxiciclina, na presença de microplásticos, induziu mais efeitos sobre uma espécie de alga do que quando isoladamente. Em 2013, Oliveira *et al.* observaram que a presença de microplástico causou a diminuição da toxicidade do pireno sobre peixes, porém tiveram efeitos negativos sobre enzimas da respiração celular. Estes resultados indicam que as partículas de MP podem aumentar a toxicidade dos contaminantes, pelo menos a concentrações mais baixas.

Para o ouriço-do-mar, o desenvolvimento larval foi fortemente afetado pelas maiores concentrações de BaP, tanto isolado quanto em combinação com 5 mg/L de microplástico, não sendo observado uma interação entre esses dois compostos. Isso

pode ter acontecido devido à alta sensibilidade do organismo apresentada para o contaminante estudado, já que o efeito observado foi próximo de 100% nas maiores concentrações. Apesar da inexistência de relatos semelhantes aos nossos, resultados já foram reportados em estudos envolvendo outros modelos animais e outros contaminantes. Em 2018, Horton *et al.* testaram a toxicidade de pesticidas para *Daphnia magna*, isolados e em combinação com microplástico em baixa concentração. Os resultados mostraram que a toxicidade dos pesticidas não foi afetada pela presença dos microplásticos, sendo que os pesticidas se mostraram tóxicos para *Daphnia magna* na presença e ausência de MPs. Em 2020, Yin *et al.* também demonstraram que a presença de microplásticos não teve nenhum efeito significativo sobre a toxicidade de três agentes antimicrobianos para *Daphnia magna*. Nesse caso, os estudos indicam que o microplástico não atuou como um vetor para a redução da toxicidade dos contaminantes para os organismos expostos, mas também não aumentou essa toxicidade, provavelmente já devido à alta resposta negativa dos organismos testados.

Além da concentração ambiental de microplásticos (5 mg/L), este trabalho também avaliou os possíveis efeitos frente à uma exposição a concentrações de micropartículas maiores que as observadas no ambiente (50 e 500 mg/L), considerando que os organismos seriam expostos a estas partículas de forma isolada e combinadas ao BaP. No caso do ouriço-do-mar, os valores de desenvolvimento embriolarval anormal obtidos na CE50 dos tratamentos contendo BaP isolado e BaP associado a 5 mg/L de microplástico foram significativamente reduzidos conforme foram aumentadas as concentrações de microplásticos. Esses resultados corroboram a hipótese de que a concentração de microplástico pode interferir na interação entre os contaminantes e os microplásticos. Além disso, estes achados também são consistentes com os resultados obtidos nos ensaios com misidáceos, onde, na maior concentração de MP (50 mg/L), também foi observada a redução da toxicidade de BaP para os organismos expostos. Segundo Wu *et al.* (2016), a adsorção de contaminantes aos microplásticos também está relacionada com a hidrofobicidade do composto, ocorrendo em maior grau em compostos hidrofóbicos. De fato, já foi comprovado que as micropartículas plásticas podem funcionar como doadores hidrofóbicos para o BaP (BATEL *et al.*, 2016). Assim, é possível que tenha ocorrido adsorção de BaP aos MPs devido às suas propriedades

hidrofóbicas, sendo que, quanto maior a concentração do contaminante na água, mais o microplástico irá conseguir adsorver esse composto. Os ensaios com misidáceos também corroboram essa afirmação, pois na maior concentração de BaP (30,0 µg/L) em associação a MP, é observada uma diminuição da mortalidade dos organismos em comparação ao tratamento sem microplástico. Todavia, deve-se ter cautela, pois estes contaminantes associados aos microplásticos podem vir a ser desorvidos na coluna d'água ou até mesmo dentro dos organismos (em situações de ingestão), quando o meio circundante é alterado (variação de pH, salinidade, etc.) (BATEL *et al.*, 2018).

Como neste estudo não foi observada alta taxa de mortalidade para *Mysidopsis juniae*, buscou-se avaliar se existiria algum efeito em nível celular frente à exposição ao BaP e ao MP isolados e em mistura. Para tanto, foram quantificados os biomarcadores de efeito. Nas análises de LPO, foi observado que os microplásticos, em uma concentração mais elevada (50 mg/L), tendem a induzir o estresse oxidativo em *M. juniae* até uma determinada faixa de concentração, confirmando que a presença de microplástico pode induzir um efeito negativo sobre os organismos expostos e, apesar de não culminar em mortalidade num primeiro momento, a longo prazo pode ser prejudicial para a saúde destes indivíduos (AVIO *et al.*, 2015; PAUL-PONT *et al.*, 2016; DÉTRÉE e GALLARDO-ESCÁRATE, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2017). A produção de efeitos oxidativos pode ocorrer através de uma rede complexa de reações diretas e mecanismos indiretos (REGOLI *et al.*, 2014). Em compostos orgânicos, como os testados no presente estudo, a biotransformação pode envolver uma série de enzimas e proteínas da fase 1 (principalmente atividade CYP 450) e fase 2 (principalmente Glutathione S-transferase). Além disso, enzimas serão envolvidas para proteger o organismo contra as espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas durante o processo. Todavia, quando a capacidade de detoxificação é excedida, distúrbios como o estresse oxidativo e danos no DNA podem ocorrer (VAN DEER OOST *et al.*, 2003).

Quando foi testada a maior concentração de BaP (30,0 µg/L) associada a MP, o estresse oxidativo passa a ser reduzido. Este fato pode ter ocorrido, possivelmente, devido à associação entre um aumento na adsorção de BaP e uma eficiente neutralização das EROs, através da ativação das enzimas antioxidantes (PAUL-PONT *et al.*, 2016). Apesar disso, foi observado uma diminuição nas

respostas de LPO no tratamento de 21,0 µg/L de BaP tanto isolado quanto em associação a 5 mg/L de MP, em relação aos tratamentos com menores concentrações de BaP (3,0 e 12,0 µg/L). Assim, não se descarta a ocorrência de uma possível resposta de hormesis. Neste contexto, os mecanismos antioxidantes são mais eficientes, ocorrendo uma supercompensação dos contaminantes (CALABRESE, 2010) e diminuindo os efeitos de peroxidação lipídica (MATTSON, 2008) e ocorrendo uma supercompensação dos contaminantes (CALABRESE, 2010).

Em relação aos danos em DNA, foi observado que à medida que a concentração de BaP aumenta, as respostas de dano em DNA também aumentam. Contaminantes genotóxicos, assim como o BaP, podem interagir com o DNA a partir de 2 vias: i) interação direta com o DNA e indução de mutações e; ii) alteração das vias de sinalização celular em decorrência do estresse oxidativo (contaminantes não genotóxicos) (MIRBAHAI *et al.*, 2011; KIN *et al.*, 2015), sendo que um mesmo contaminante pode causar alterações através das 2 vias. Para Jeng *et al.* (2011), o dano em DNA pode ocorrer de forma direta, pois a fisiologia do organismo pode ser afetada metabolicamente, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente a genotoxicidade do contaminante, pois a geração de EROs contribui para o desequilíbrio e decréscimo do mecanismo de defesa antioxidante (JENG *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2013; NOBRE *et al.*, 2020). Já nos tratamentos de BaP associado a MP (50 mg/L), foi observada uma redução significativa nos danos em DNA em comparação aos tratamentos de BaP isolado, corroborando novamente a hipótese de que a concentração de MP interfere na interação de microplástico e contaminante, reduzindo a toxicidade do composto para o organismo exposto.

Ainda que os efeitos tóxicos relacionados aos microplásticos, em concentrações ambientais (5 mg/L), sejam relativamente baixos, nossos dados apresentados evidenciam que estas partículas podem interagir com BaP presente na água e que são capazes de adsorver estes compostos, sugerindo que essa adsorção de compostos hidrofóbicos pode contribuir para a redução da disponibilidade dos contaminantes para os organismos aquáticos, ao mesmo tempo em que também é possível que essas partículas induzam um efeito negativo na presença de outro contaminante, a depender de sua concentração. Assim, estes

achados enfatizam a necessidade de mais investigações, antes que essas conclusões possam ser estendidas aos riscos dos microplásticos e como essas partículas alteram a toxicidade dos contaminantes presentes nos ambientes aquáticos. Como no presente estudo, as alterações são evidenciadas em baixos níveis de organização biológica (nível subindividual), onde os microplásticos alteram as respostas bioquímicas ou fisiológicas dos organismos (BATEL *et al.*, 2020; PANNETIER *et al.*, 2020; BOUR *et al.*, 2018).

5 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo evidenciam que os microplásticos alteram a toxicidade do BaP na água do mar. Foi possível observar que a magnitude dos efeitos negativos do BaP é dependente da concentração do microplástico presente no meio, possivelmente devido à forma como este material se relaciona com o ambiente. Aparentemente, estas partículas são capazes de adsorver estes compostos, contribuindo para a redução da disponibilidade dos contaminantes para organismos aquáticos. Assim, estes resultados enfatizam a necessidade de mais investigações, principalmente em relação aos lixiviados destes materiais. É importante ressaltar também que a escassez de estudos envolvendo a exposição de misidáceos e ouriço-do-mar ao BaP em associação a MPs dificulta a comparação dos nossos dados. Assim, nossos dados evidenciam, pioneiramente, a toxicidade do composto estudado para os organismos testados (*Mysidopsis juniae* e *Echinometra lucunter*), assim como seus efeitos em combinação com partículas de microplástico.

6 TRABALHO SUBMETIDO OU ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

De: Marine Pollution Bulletin <em@editorialmanager.com>
Para: Paloma Kachel Gusso-Choueri <pgusso@yahoo.com.br>
Enviado: sexta-feira, 28 de janeiro de 2022 17:50:52 GMT-3
Assunto: Submission Confirmation

Marine Pollution Bulletin
Title: Evaluation of the toxicity of microplastics associated with benzo(a)pyrene on two species of marine invertebrates
Authors: Paloma Kachel Gusso-Choueri; Tawany Mello Souza
Article Type: Research Paper

Dear Dr. Paloma Kachel Gusso-Choueri,

Your submission entitled "Evaluation of the toxicity of microplastics associated with benzo(a)pyrene on two species of marine invertebrates" has been received by Marine Pollution Bulletin.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Editorial Manager as an author. The URL is <https://www.editorialmanager.com/mpb/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Please be aware that the average editorial time to first decision is 8.2 weeks.

Thank you for submitting your work to this journal. Please do not hesitate to contact me if you have any queries.

Kind regards,

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESSA, D. M. S. **Avaliação da qualidade de sedimentos do Sistema Estuarino de Santos**. 2002. Tese (Doutorado) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

ABNT NBR 15308. **Toxicidade aguda – Método de ensaio com misidáceos (Crustacea)**. 2017.

ABNT NBR 15350. **Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)**. 2020.

ADENIJI, A. O.; OKOH, O. O.; OKOH, A. I. Distribution pattern and health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in the water and sediment of Algoa Bay, South Africa. **Environmental Geochemistry Health**, v. 41, p. 1303-1320, 2019.

ALIMBA, C. G.; FAGGIO, C. Microplastics in the marine environment: Current trends in environmental pollution and mechanisms of toxicological profile. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 68, p. 61-74, 2019.

ALMEIDA, JOÃO VASCONCELLOS de. **Efeitos tóxicos de benzo(a)pireno sobre a macroalga vermelha *Gracilaria birdiae***. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ANDERSON, J. M. Permutational Multivariate Analysis of variance (PERMANOVA). Wiley Statsref: Statistics Reference Online. **John Wiley & Sons**, Ltd, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118445112.stat07841>. Acesso em: 10 ago. 2021.

ANDRADY, A. L. Microplastics in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 1596-1605, 2011.

ANDRADY, A.; NEAL, M. Applications and societal benefits of plastics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 364, p. 1977-1984, 2009.

ARAGÃO, J. S. **Toxicidade do efluente de uma fazenda de cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* e do metabissulfito de sódio em juvenis de *Mysidopsis juniae***. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

ASCER, L. G. **Efeitos de Microplásticos na Fisiologia do Mexilhão Perna perna (*Bivalvia:Mytilidae*)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de Fisiologia Geral) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

AU, S. Y.; BRUCE, T. F.; BRIDGES, W. C.; KLAINE, S. J. Responses of *Hyalella azteca* to acute and chronic microplastic exposures. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 11, p. 2564-2572, 2015.

AVIO, C. G.; GORBI, S.; REGOLI, F. Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. **Marine Environmental Research**, p. 1-10, 2016.

BAIRD, W. M.; HOOVEN, L. A.; MAHADEVAN, B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 45, p. 106-114, 2005.

BARCELOS, L. M. D. O impacto dos plásticos nos oceanos. **Pingo de Lava**, p. 43-46, 2016.

BARROSO, H. S. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em organismos marinhos da Baía do Almirantado, Península Antártica**. 2010. Dissertação (Doutorado em Ciências, área de Oceanografia Química e Geológica) – Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BATEL, A.; LINTI, F.; SCHERER, M.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T. Transfer of benzo[a]pyrene from microplastics to *Artemia nauplii* and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, p. 1656-1666, 2016.

BATEL, A.; BAUMANN, L.; CARTENY, C. C.; CORMIER, B.; KEITER, S. H.; BRAUNBECK, T. Histological, enzymatic and chemical analyses of the potential effects of differently sized microplastic particles upon long-term ingestion in zebrafish (*Danio rerio*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 153, 2020.

BEIRAS, R.; BELLAS, J.; CACHOT, J.; CORMIER, B.; COUSIN, X.; ENGWALL, M.; VIDAL-LIÑÁN, L. Ingestion and contact with polyethylene microplastics does not cause acute toxicity on marine zooplankton. **Journal of Hazardous Materials**, v. 360, p. 452-460, 2018.

BERNARDO, D. L.; BARROS, K. A.; SILVA, R. C.; PAVÃO, A. C. Carcinogenicidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Química Nova**, v. 39, p. 7, 2016.

BESSELING, E.; WANG, B.; LÜRLING, M.; KOELMANS, A. A. Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. **Environmental Science & Technology**, v. 48, p. 12336-12343, 2014.

BILODEAU, J. C.; VILLAGOMEZ, J. G.; KIMPE, L. E.; THOMAS, P. J.; PAULI, B. D.; TRUDEAU, V. L.; BLAIS, J. M. Toxicokinetics and bioaccumulation of polycyclic aromatic compounds in wood frog tadpoles (*Lithobates sylvaticus*) exposed to Athabasca oil sands sediment. **Aquatic Toxicology**, v. 207, p. 217-225, 2019.

BINELLI, A.; COGNI, D.; PAROLINI, M.; RIVA, C.; PROVINI, A.; In vivo experiments for the evaluation of genotoxic and citotoxic effects of Triclosan in Zebra mussel hemocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 91, p. 238-244, 2009.

BORRELY, S. I. **Redução da toxicidade aguda de efluentes industriais e domésticos tratados por irradiação com feixes de elétrons, avaliada com as espécies *Vibrio fischeri*, *Daphnia similis* e *Poecilia reticulata***. 2001. Tese (Doutorado em Ciências, área de Tecnologia Nuclear-Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001.

BOTTERELL, Z. L. R.; BEAUMONT, N.; DORRINGTON, T.; STEINKE, M.; THOMPSON, R. C.; LINDEQUE, P. K. Bioavailability and effects of microplastics on marine zooplankton: A review. **Environmental Pollution**, Plymouth, v. 245, p. 98-110, 2019.

BOUR, A.; HAARR, A.; KEITER, S.; HYLLAND, K. Environmentally relevant microplastic exposure affects sediment-dwelling bivalves. **Environmental Pollution**, v. 236, p. 652-660, 2018.

BOUR, A.; HOSSAIN, S.; TAYLOR, M.; SUMNER, M.; CARNEY, A. B. Synthetic Microfiber and Microbead Exposure and Retention Time in Model Aquatic Species Under Different Exposure Scenarios. **Frontiers in Environmental Science**, v. 8, n. 83, 2020.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 357**, de 15 de junho de 2005.

BRATOVČIČ, A.; Degradation of micro- and nano-plastics by photocatalytic methods. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology Applications**, v. 3, 2019.

BRITO, D. D.; MILANELLI, J. C. C.; RIEDEL, P. S.; WIECZOREK, A. **Sensibilidade do litoral paulista a derramamentos de petróleo: um atlas em escala de detalhe**. 1ª edição. Rio Claro: UNESP, 2014.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrates**. Sinauer Associates Sunderland, MA, p. 801-839, 1990.

BURATINI, S. V.; BERTOLETTI, E. IN: ZAGATTO, P. BERTOLETTI, E. (Eds). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. Rima: São Carlos, São Paulo, p. 221-249, 2006.

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

CARNEVALI, M. D. Regenerative response and endocrine disrupters in Crinoid echinoderms: an old experimental model, a new ecotoxicological test. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, p. 167-200, 2005.

CARR, S. A.; LIU, J.; TESORO, A. G. Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. **Water Research**, v. 91, p. 174–182, 2016.

CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 67, n. 1, p. 1-27, 2008.

CAVALCANTE, R. M.; FILHO, N. S. M.; VIANA, R. M.; OLIVEIRA, I. R. N.; NASCIMENTO, R. F.; SILVEIRA, E. R.; FREIRE, G. S. S. Utilização da extração em fase sólida (SPE) na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em matrizes aquosas ambientais. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 560-564, 2007.

CETESB. **Ensaio biológicos com organismos aquáticos e sua aplicação**. São Paulo: CETESB. p. 50, 1990.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores no Estado de São Paulo 2004**. São Paulo: CETESB, 2005.

CHUA, E. M.; SHIMETA, J.; NUGEGODA, D.; MORRISON, P. D.; CLARKE, B. O. Assimilation of polybrominated diphenyl ethers from microplastics by the marine amphipod, *Allochroetes compressa*. **Environmental Science & Technology**, v. 48, p. 8127-81344, 2014.

COLE, M.; LINDEQUE, P.; HALSBAND, C.; GALLOWAY, T. S. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 12, p. 2588-97, 2011.

COLLIGNON, A.; HECQ, J. H.; GALGANI, F.; COLLARD, F.; GOFFART, A. Annual variation in neustonic micro- and meso-plastic particles and zooplankton in the Bay of Calvi (Mediterranean-Corsica). **Marine Pollution Bulletin**, v. 79, n. 1-2, p. 293-298, 2014.

COLIN, N.; PORTE, C.; FERNANDES, D.; BARATA, C.; PADRÓS, F.; CARRASÓN, M.; MONROY, M.; ROCABAYERA-CANO, ORIOL; SOSTOA, A.; PIÑA, B.; VEIGA-MACEDO, A. Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macroinvertebrates and fish in Mediterranean rivers. **Science of The Total Environment**, v. 540, p. 307-323, 2016.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CRITCHELL, K.; HOOGENBOOM, M. O. Effects of microplastic exposure on the body condition and behaviour of planktivorous reef fish (*Acanthochromis polyacanthus*). **PloS One**, v. 13, n. 3, 2018.

DERRAIK, J. G. B. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 9, p. 842-852, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X02002205>. Acesso em: 21 out. 2020.

DUIS, K.; COORS, A. Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. **Environmental Sciences Europe**, v. 28, n. 1, p. 1-25, 2016.

ELTEMSAH, Y. S.; BØHN, T. Acute and chronic effects of polystyrene microplastics on juvenile and adult *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, 2019.

ENGLER, R. E. The Complex Interaction between Marine Debris and Toxic Chemicals in the Ocean. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 22, p. 12302-12315, 2012.

ERICKSON, W. P.; MCDONALD, L. L. Tests for bioequivalence of control media and test media in studies of toxicity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 14, p. 1247–1256, 1995.

ERIKSEN, M.; LEBRETON, L. C. M.; CARSON, H. S.; THIEL, M.; MOORE, C. J.; BORERRO, J. C. Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, 2014.

ERIKSEN, M.; MASON, S.; WILSON, S.; BOX, C.; ZELLERS, A.; EDWARDS, W.; FARLEY, H.; AMATO, S. Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 77, p. 177-182, 2013.

FANALI, L. Z.; FRANCO-BELUSSI, L.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; de OLIVEIRA, C. Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (*Anura: Leptodactylidae*). **Environmental Pollution**, v. 237, p. 93–102, 2018.

FISNER, M. **Grânulos plásticos em praias arenosas: avaliação de um método amostral quantitativo e da contaminação química**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências, área de Oceanografia Biológica) – Instituto de Oceanografia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

FOSSI, M. C.; CASINI, S.; SAVELLI, C.; CORBELLI, C.; FRANCHI, E.; MATTEI, N.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C.; CORSI, I.; BAMBER, S.; DEPLEDGE, H. M. Biomarker responses at different levels of biological organization in crabs (*Carcinus*

aestuarii) experimentally exposed to benzo(a)pyrene. **Chemosphere**, v. 40, p. 861-874, 2000.

FRIAS, J. P. G. L.; OTERO, V.; SOBRAL, P. Evidence of microplastics in samples of zooplankton from Portuguese coastal waters. **Marine Environmental Research**, v. 95, p. 89-95, 2014.

FRIAS, J. P. G. L.; SOBRAL, P.; FERREIRA, A. M. Organic pollutants in microplastics from two beaches of the Portuguese coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, p. 1988-1992, 2010.

GAO, D.; WU, M.; WANG, C.; WANG, Y.; ZUO, Z. Chronic exposure to low benzo [a] pyrene level causes neurodegenerative disease-like syndromes in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 167, p. 200-208, 2015.

GILFILLAN, L. R.; OHMAN, M. D.; DOYLE, M. J.; WATSON, W. Occurrence of plastic micro-debris in the Southern California Current system. **California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports**, v. 50, p. 123-133, 2009.

GODOI, A. F.; RAVINDRA, K.; GODOI, R. H. M.; ANDRADE, S.J.; SANTIAGO-SILVA, M.; VAECK, L.V.; GRIEKEN, R.V. Fast chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples from sugar cane burning. **Journal of Chromatography A**, v. 1027, p. 49-53, 2004.

GREGORY, M. R.; ANDRADY, A. L. "Plastics in the Marine Environment". In: Andrady, A.L. (ed), *Plastics and the Environment*. **Chapter 10**, p. 379-402, 2003.

GREGORY, M. R.; RYAN, P. G. Pelagic Plastics and Other Seaborne Persistent Synthetic Debris: A Review of Southern Hemisphere Perspectives. **Marine Debris**, p. 49-66, 1997.

GUERRANTI, C.; MARTELLINI, T.; PERRA, G.; SCOPETANI, C.; CINCINELLI, A. Microplastics in cosmetics: Environmental issues and needs for global bans. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 68, p. 75-79, 2019.

GUSMÃO, F.; DOMENICO, M.; AMARAL, A. C. Z.; MARTÍNEZ, A.; GONZALEZ, B. C.; WORSAAE, K.; IVAR DO SUL, J. A.; CUNHA LANA, P. DA. In situ ingestion of microfibrils by meiofauna from sandy beaches. **Environmental Pollution**, v. 216, p. 584–590, 2016.

GUSSO-CHOUERI, P. K.; CHOUERI, R. B.; SANTOS, G. S.; de ARAÚJO, G. S.; CRUZ, A. C.; STREMEL, T.; de CAMPOS, S. X.; CESTARI, M. M.; RIBEIRO, C. A.; ABESSA, D. M. Assessing genotoxic effects in fish from a marine protected area influenced by former mining activities and other stressors. **Marine Pollution Bulletin**, v. 104, p. 229-39, 2016.

HAMMER, J.; KRAAK, M. H. S.; PARSONS, J. R. Plastics in the Marine Environment: The Dark Side of a Modern Gift. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 220, 2012.

HOLANDA, J. N.; MACIEL, A. P.; SANTOS, R. L. Avaliação ecotoxicológica da água de lavagem da purificação de biodiesel de soja metílico utilizando *Danio rerio* como organismo teste. **Boletim do laboratório de hidrobiologia**, v. 25, n. 1, p. 13-20, 2012

HORTON, A. A.; VIJVER, M. G.; LAHIVE, E.; SPURGEON, D. J.; SVENDSEN, C.; HEUTINK, R.; BAAS, J. Acute toxicity of organic pesticides to *Daphnia magna* is unchanged by co-exposure to polystyrene microplastics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, p. 26-34, 2018.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **Household Use of Solid Fuels and High-temperature Frying**. Lyon, France, v. 95, 2010.

IKENAKA, Y.; SAKAMOTO, M.; NAGATA, T.; TAKAHASHI, H.; MIYABARA, Y.; HANAZATO, T.; CHANG, K.-H. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on an aquatic ecosystem: acute toxicity and community-level toxic impact tests of benzo[a]pyrene using lake zooplankton community. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 38, n. 1, p. 131-136, 2013.

IPCS. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization. Environmental Health Criteria 2002. **Selected non-heterocyclic. Polycyclic aromatic hydrocarbons**. Geneva, 1998.

IZAR, G. M.; MORAIS, L. G.; PEREIRA, C. D. S.; CESAR, A.; ABESSA, D. M. S.; CHRISTOFOLETTI, R. A. Quantitative analysis of pellets on beaches of the São Paulo coast and associated non-ingested ecotoxicological effects on marine organisms. **Regional Studies in Marine Science**, v. 29, 2019.

JANTZ, L. A.; MORISHIGE, C. L.; BRULAND, G. L.; LEPCZYK, C. A. Ingestion of plastic marine debris by longnose lancetfish (*Alepisaurus ferox*) in the North Pacific Ocean. **Marine Pollution Bulletin**, v. 69, p. 97-104, 2013.

KAPOSI, K. L.; MOS, B.; KELAHER, B. P.; DWORJANYN, S. A. Ingestion of Microplastic Has Limited Impact on a Marine Larva. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 3, p. 1638-1645, 2014.

KOLANDHASAMY, P.; SU, L.; LI, J.; QU, X.; JABEEN, K.; SHI, H. Adherence of microplastics to soft tissue of mussels: A novel way to uptake microplastics beyond ingestion. **Science of The Total Environment**, p. 610-611, p. 635-640, 2018.

LAMBERT, S.; WAGNER, M. Microplastics Are Contaminants of Emerging Concern in Freshwater Environments: An Overview. **The Handbook of Environmental Chemistry**, p.1-23, 2017.

LI, J. L.; CHEN, B. H. Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants. **Chemical Engineering Science**, v. 57, p. 2825-2835, 2002.

- LIMA, E. J. B.; GOMES, P. B.; SOUZA, J. R. B. Reproductive biology of *Echinometra lucunther* (Echinodermata: echinoidea) in a northeast Brazilian sandstone reef. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, p. 51-59, 2009.
- LIU, L.; FOKKINK, R.; KOELMANS, A. A. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to polystyrene nanoplastic. **Chemical Toxicology and Chemistry**, v. 35, p. 1650-1655, 2016.
- LIVINGSTONE, I. Equinodermes - larva pluteus. **Casa das Ciências**. 2016.
- LO, H. K. A.; CHAN, K. Y. K. Negative effects of microplastic exposure on growth and development of *Crepidula onyx*. **Environmental Pollution**, v. 233, p. 588-595, 2018.
- LUSHCHAK, V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, p. 13–30.
- MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.
- MALINCONICO, N.; MARQUES, A. K. C. S.; SILVA, A. V.; BARBOSA, E. C. P. A.; FARIAS, P. C. S.; SILVA, U. B. T.; ANJOS, F. B. R. Descrição e comparação morfológica da espécie de *Echinometra lucunther* em diferentes áreas na praia de Enseada dos Corais. **Natural Resources**, Aquidabã, v. 3, n. 2, p. 36, 2013.
- MARIANTE, L. F.; LEMOS, G. B.; EUTRÓPIO, F. J.; GOMES, L. C. Reproductive biology of *Echinometra lucunther* (Echinodermata: echinoidea) in Praia da Costa, Vila Velha, Espírito Santo. **Zoologia**, v. 26, p. 641-646, 2009.
- MAZUROVÁ, E.; HILSCHEROVÁ, K.; TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H.-R.; MARŠÁLEK, B.; BLÁHA, L. Endocrine regulation of the reproduction in crustaceans: Identification of potential targets for toxicants and environmental contaminants. **Biologia**, v. 63, n. 2, p. 139-150, 2008.
- MEIRE, R.O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 11, n. 2, p. 188-201, 2007.
- MESSINETTI, S.; MERCURIO, S.; PAROLINI, M.; SMGNI, M.; PENNATI, R. Effects of polystyrene microplastics on early stages of two marine invertebrates with different feeding strategies. **Environmental Pollution**, v. 237, p. 1080-1087, 2018.
- MILANELLI, J. C. C. **Biomonitoramento de costões rochosos instrumento para avaliação de Impactos gerados por vazamentos de óleo na região do Canal de São Sebastião - São Paulo**. 2003. Tese (Doutorado em Ciências, área de Oceanografia Biológica) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- MOORE, C. J.; MOORE, S. L.; LEECASTER, M. K.; WEISBERG, S. B. A comparison of plastic and plankton in the North Pacific central gyre. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 12, p. 1297-1300, 2001.

MOORE, M. N.; ALLEN, J. I.; MCVEIGH, A.; SHAW, J. Lysosomal and autophagic reactions as predictive indicators of environmental impact in aquatic animals. **Autophagy**, v. 2, p. 217-220, 2006.

NAPPER, I. E.; BAKIR, A.; ROWLAND, S. J.; THOMPSON, R. C. Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. **Marine Pollution Bulletin**, v. 99, p. 178-185, 2015.

NASHER, E.; HENG, L.Y.; ZAKARIA, Z.; SURIF, S. Concentrations and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Seawater around Langkawi Island, Malaysia. **Journal of Chemistry**, p. 1-10, 2013.

NIPPER, M. **Avaliação de Toxicidade de Efluentes**. São Paulo. 2000.

NOBRE, C. R.; SANTANA, M. F. M.; MALUF, A.; CORTEZ, F. S.; CESAR, A.; PEREIRA, C. D. S.; TURRA, A. Assessment of microplastic toxicity to embryonic development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (*Echinodermata: Echinoidea*). **Marine Pollution Bulletin**. v. 92, p. 99–104, 2015.

NOBRE, C. R.; MORENO, B. B.; ALVES, A. V.; de LIMA ROSA, J.; da ROSA FRANCO, H.; ABESSA, D. M. S.; MARANHO, L. A.; CHOUERI, R. B.; GUSSO-CHOUERI, P. K.; PEREIRA, C. D. S. Effects of microplastics associated with triclosan on the oyster *Crassostrea brasiliana*: An integrated biomarker approach. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 79, p. 101-110, 2020.

OGATA, Y.; TAKADA, H.; MIZUKAWA, K.; HIRAI, H.; IWASA, S.; ENDO, S. 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**, v. 58, n. 10, p. 1437-1446, 2009.

OLIVATTO, G. P.; CARREIRA, R. S. **Estudo sobre Microplásticos em águas superficiais na porção oeste da Baía de Guanabara**. 2017. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

OLIVATTO, G. P.; CARREIRA, R. S.; TORNISIELO, V. L.; MONTAGNER, C. C. Microplásticos: Contaminantes de Preocupação Global no Antropoceno. **Revista Virtual de Química**, v.10, n. 6, p. 1968-1989, 2018.

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

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

PANNETIER, P.; MORIN, B.; LE BIHANIC, F.; DUBREIL, L.; CLÉRANDÉAU, C.; CHOUVELLON, F.; VAN ARKEL, K.; DANION, M.; CACHOT, J. Environmental samples of microplastics induce significant toxic effects in fish larvae. **Environment International**, 2020.

PEREIRA, E. R.; COGO, A. J. D.; CRUZ, Z. M. A. Biomarcadores enzimáticos em *Holothuria grisea* (Selenka, 1867) expostas ao chumbo, cádmio e cobre. **Natureza on line**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2014.

PEREIRA, T. M.; MERÇON, J.; PASSOS, L. S.; COPPO, G. C.; LOPES, T. O. M.; CABRAL, D. S.; SCHERER, R.; CHIPPARI-GOMES, A. R. Effects of the water-soluble fraction of diesel oil (WSD) on the fertilization and development of a sea urchin (*Echinometra lucunter*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 162, p. 59-62, 2018.

PERFETTI, G. A.; NYMAN, P. J.; FISHER, S.; JOE, F. L.; JR DIACHENKO, G. W. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in seafood by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of AOAC International**, v. 75, n. 5, p. 872-877, 1992.

PHUONG, N.N.; ZALOUK-VERGNOUUX, A.; KAMARI, A.; MOUNEYRAC, C.; AMIARD, F.; POIRIER, L.; LAGARDE, F. Quantification and characterization of microplastics in blue mussels (*Mytilus edulis*): protocol setup and preliminary data on the contamination of the French Atlantic coast. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 7, p. 6135-6144, 2018.

PIATTI, T. M.; RODRIGUES, R. A. F. Plásticos: características, usos, produção e impactos ambientais - Conversando sobre ciências em Alagoas. **Editora da Universidade Federal de Alagoas**, Maceió, p. 50-51, 2005.

PINO, V.; AYALA, J. H.; AFONSO, A. M.; GONZÁLEZ, V. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments by High Performance Liquid Chromatography after microwave-assisted extraction with micellar media. **Journal of Chromatography A**, v. 869, p. 515-522, 2000.

PLASTICS EUROPE. Plastics – the Facts 2011: an analysis of European plastics production, demand and recovery for 2010. **Association of Plastics Manufacturers in Europe**, 2011. Disponível em: https://www.plasticseurope.org/application/files/1015/1862/4126/FactsFigures_UK2011.pdf. Acesso em: 03 mar. 2021.

PLASTIC EUROPE. Plastics – the Facts 2014/2015: an analysis of European latest plastics production, demand and waste data. **Association of Plastics Manufacturers in Europe**, 2015. Disponível em: https://www.plasticseurope.org/application/files/5515/1689/9220/2014plastics_the_facts_PubFeb2015.pdf. Acesso em: 03 mar. 2021.

POLAKIEWICZ, L. **Estudo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nos estuários de Santos e São Vicente - SP utilizando diatomito como material adsorvente**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de Tecnologia Nuclear)

– Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

POPPI, N. R. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e outras substâncias orgânicas na combustão de madeira para produção de carvão e em particulado atmosférico da cidade de Campo Grande – MS.** 2000. Tese (Doutorado em Química, área de concentração Química Analítica). IQ/UNESP, Araraquara, São Paulo, 2000.

PRATA, J. C. **Avaliação da toxicidade do antibiótico doxiciclina isoladamente e na presença de microplásticos na microalga marinha *Tetraselmis chuii*.** 2016. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, 2016.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. Eds. Fundamentals of Aquatic Toxicology Methods and Applications. **Hemispheres Publishing**, New York, p. 374-415, 1985.

REDONDO-HASSELERHARM, P. E.; FALAHUDIN, D.; PEETERS, E. T. H. M.; KOELMANS, A. A. Microplastic Effect Thresholds for Freshwater Benthic Macroinvertebrates. **Environmental Science & Technology**, v. 52, p. 2278-2286, 2018.

REGOLI, F.; GIULIANI, M. E.; BENEDETTI, M.; ARUKWE, A. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: a comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. **Aquatic Toxicology**, v. 105, p. 56-66, 2011.

RIBEIRO, F. A. L. **Aplicação de Métodos de Análise Multivariada no Estudo de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.** 2001. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, IQ/UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2001.

RIBEIRO, R. C.; VERONEZ, A. C. S.; TOVAR, T. T.; SEREAN, A.; BARTOLOMEU, D. A.; PERONICO, C.; FURLEY, T. H. Cryopreservation: Extending the viability of biological material from sea urchin (*Echinometra lucunter*) in ecotoxicity tests. **Cryobiology**. v. 80, p. 139-143, 2018.

RINGWOOD, A. H. Comparative sensitivity of gametes and early developmental stages of a sea urchin species (*Echinometra mathaei*) and a bivalve species (*Isognomon californicum*) during metal exposures. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 22, p. 288-295, 1992.

ROCHA-SANTOS, T.; DUARTE, A. C. A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 65, p. 47–53, 2015.

ROCHMAN, C.; HOH, E.; KUROBE, T.; TEH, S. J. Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. **Scientific Reports**, v. 3, n. 3263, 2013.

RODRIGUES, A. C. F. **Estudo de variações bioquímicas e genotoxicidade induzidas por mistura de contaminantes em tilápia (*Oreochromis niloticus*), como biomarcadores de contaminação ambiental.** 2014. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2014.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados.** 6ª edição, Roca Editora, São Paulo, p. 1029, 1996.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados: Uma abordagem funcional evolutiva.** 7ª edição, Roca Editora, São Paulo, p. 1045, 2005.

SANTANA, M. F. M.; ASCER, L. G.; CUSTÓDIO, M. R.; MORIRA, F. T.; TURRA, A. Microplastic contamination in natural mussel beds from a Brazilian urbanized coastal region: Rapid evaluation through bioassessment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 106, p. 183–189, 2016.

SANTOS, J. B. **Qualidade ecotoxicológica do sedimento de caraguatatuba, SP.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de Oceanografia Biológica) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The Effects of Environmental Pollutants on Complex Fish Behavior: Integrating Behavioral and Physiological Indicators of Toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 68, p. 369-392, 2004.

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

SIU, W. H. L.; CAO, J.; JACK, R.W.; WU, R. S. S.; RICHARDSON, B. J.; XU, L.; LAM, R. K. S. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussels (*P. viridis*). **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 381-392, 2004.

SOUZA, W. R. de. **Análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – HPAs – em sedimentos do ribeirão do Funil na região de Ouro Preto – MG.** 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007.

STUTZER, G.; GUIMARÃES, G. **Aspectos toxicológicos e ambientais relacionados com o uso de produtos fitossanitários.** In: ZAMBOLIM, L. O que os engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários. Viçosa: UFV. p. 69-84, 2003.

SUSSARELLU, R.; SUQUET, M.; THOMAS, Y.; LAMBERT, C.; FABIoux, C.; PERNET, M. E. J. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, p. 2430-2435, 2016.

TANAKA, K.; TAKADA, H. Microplastic fragments and microbeads in digestive tracts of planktivorous fish from urban coastal waters. **Scientific Reports**, v. 6, n. 34351, 2016.

TEUTEN, E.L. *et al.* Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. Philos. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, p. 2027-2045, 2009.

THOMPSON, R. C.; OLSEN, Y.; MITCHELL, R. P.; DAVIS, A.; ROWLAND, S. J.; JOHN, A. W. G.; MCGONIGLE, D.; RUSSELL, A. E. **Lost at Sea: where is all the plastic?** **Science**, v. 304, n. 838, 2004.

THOMPSON, R. C.; SWAN, S. H.; MOORE, C. J.; VOM SAAL, F. S. Our plastic age. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 364, p. 1973-1976, 2009.

TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. **Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático.** **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 135-142, 2002.

TÓTH, G.; HÁHN, J.; KRISZT, B.; SZOBOSZLAY, S. Acute and chronic toxicity of herbicides and their mixtures measured by *Aliivibrio fischeri* ecotoxicological assay. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 185, 2019.

TRIFUOGGI, M.; PAGANO, G.; ORAL, R.; PAVI_CI_C-HAMER, D.; BURI_C, P.; KOVA_CI_C, I.; SICILIANO, A.; TOSCANESI, M.; THOMAS, P. J.; PADUANÓ, L. *et al.* Microplastic-induced damage in early embryonal development of sea urchin *Sphaerechinus granularis*. **Environmental Research**, v. 179, p. 108-815, 2019.

UNEP. **Plastic in Cosmetics.** ISBN: 978-92-807-3466-9, p. 33, 2015.

USEPA (Environmental Protection Agency). **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms.** EPA-821-R-02-013. Office of Water, Washington, DC. 4th Ed. 2002b.

USEPA (Environmental Protection Agency). **Technical Support Document for Water Quality-Based Toxic Control.** EPA-Washington D.C., 135 p. 1984.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VERMA, N.; RETTENMEIER, A. W.; SCHMITZ-SPANKE, S. Exposure of primary porcine urothelial cells to benzo(a)pyrene: in vitro uptake, intracellular concentration and biological response. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 12, p. 1861-1871, 2012.

WAKX, A.; REGAZZETTI, A.; DARGÈRE, D.; AUZEIL, N.; GIL, S.; EVAINBRION, D.; RAT, P. New in vitro biomarkers to detect toxicity in human placental cells: the example of benzo [a] pyrene. **Toxicology in Vitro**, v. 32, p. 76-85, 2016.

WALLE, T.; WALLE, U. K.; SEDMERA, D.; KLAUSNER, M. Benzo(a)pyrene induces oral carcinogenesis and chemoprevention: studies in bioengineered human tissue. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, p. 346-350, 2006.

WANG, H.; CUI, L.; CHENG, H.; ZHANG, Y.; DIAO, X.; WANG, J. Comparative Studies on the Toxicokinetics of Benzo[a]pyrene in *Pinctada martensii* and *Perna viridis*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 98, n. 5, p. 649-655, 2017.

WATTS, A. J.; LEWIS, C.; GOODHEAD, R. M.; BECKETT, S. J.; MOGER, J.; TYLER, C. R.; GALLOWAY, T. S. Uptake and retention of microplastics by the shore crab *Carcinus maenas*. **Environmental Science & Technology**, v. 48, p. 8823-8830, 2014.

WILLS, E. D. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: Snell K, Mullock B (eds) Biochemical toxicology: a practical approach. **IRL Press**, Washington, p. 127–150, 1987.

YIN, C.; YANG, X.; ZHAO, T.; WATSON, P.; YANG, F.; LIU, H. Changes of the acute and chronic toxicity of three antimicrobial agents to *Daphnia magna* in the presence/absence of micro-polystyrene. **Environmental Pollution**, 2020.

ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. IV Seminário sobre Ecotoxicologia. **Essentia Editora**, p. 1-2, Instituto Federal Fluminense, 2015.

ZANTIS, L. J.; CARROLL, E. L.; NELMS, S. E.; BOSKER, T. Marine mammals and microplastics: A systematic review and call for standardisation. **Environmental Pollution**, v. 269, p. 11614, 2021.

ZENA, R.; SPECIALE, A.; CALABRÒ, C.; CALÒ, M.; PALOMBIERI, D.; SAIJA, A.; CASCIO, P. L. Exposure of sea bream (*Sparus aurata*) to toxic concentrations of benzo [a] pyrene: possible human health effect. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 116-125, 2015.

ZICCARDI, L. M.; EDGINGTON, A.; HENTZ, K.; KULACKI, K. J.; KANE DRISCOLL, S. Microplastics as vectors for bioaccumulation of hydrophobic organic chemicals in the marine environment: A state-of-the-science review. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 7, p. 1667-1676, 2016.