



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências
Campus do Litoral Paulista



**Avaliação Ecotoxicológica de Microplásticos: Toxicidade do *Glitter* sobre Embriões de
Bolacha do Mar *Mellita quinquiesperforata***

Letícia Albanit França

São Vicente

2022

Instituto de Biociências - Campus do Litoral Paulista
Praça Infante D. Henrique s/no - CEP 11330-900 - São Vicente (SP) - Brasil
Tel. (13) 3569-7100

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA ‘JÚLIO DE MESQUITA FILHO’

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS DO LITORAL PAULISTA

Letícia Albanit França

Avaliação Ecotoxicológica de Microplásticos: Toxicidade do *Glitter* sobre Embriões de Bolacha do Mar *Mellita quinquesperforata*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da UNESP – Campus do Litoral Paulista para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, modalidade Gerenciamento Costeiro.

Orientador: Denis Moledo de Souza Abessa

São Vicente

2022

F814a	<p>França, Leticia Albanit</p> <p>Avaliação ecotoxicológica de microplásticos: toxicidade do glitter sobre embriões de bolacha do mar <i>Mellita quinquiesperforata</i> / Leticia Albanit França. -- São Vicente, 2022</p> <p>28 f. : il., tabs.</p> <p>Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente</p> <p>Orientador: Denis Moledo de Souza Abessa</p> <p>1. Resíduo Plástico. 2. Ecotoxicologia. 3. Compostos. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Alexandre e Margarete, que sempre me apoiaram em todas decisões da minha vida profissional e pessoal e nunca deixaram de estar do meu lado, sem eles nada disso seria possível e ao meu irmão, que mesmo longe sempre esteve do meu lado e se orgulhando de mim, obrigada por tudo e eu amo vocês.

Ao meu orientador Denis por todo apoio e incentivo em todo esse projeto e por ter me cativado a continuar nessa área, obrigada pela inspiração. A FAPESP pela bolsa de iniciação científica que colaborou para o desenvolvimento desse projeto.

A Bamban, que me ajudou em todos os testes e aguentou todos os surtos quando as coisas estavam dando errado, obrigada por tudo, amiga. Ao Mequetrefe que solucionou o que estava dando de errado nos testes e ajudou em todas estatísticas mesmo sem precisar fazer nada disso, você foi incrível e não sei como te agradecer.

A Luiza, a Raquel e a Thais por serem mulheres incríveis que se mantiveram ao meu lado e me ajudaram nessa jornada de uma forma ou de outra.

Ao Salguys por serem pessoas extraordinárias, bom demais ter vocês todos na minha vida.

Aos meninos da Cantareira, foi ótimo dividir o dia-a-dia com vocês em 2021 todo.

Ao Rodrigo, por estar presente todos os dias na minha vida e apoiando cada decisão que tomo, obrigada por tanto, você me faz muito feliz.

Avaliação Ecotoxicológica de Microplásticos: Toxicidade do *Glitter* sobre Embriões de Bolacha do Mar *Mellita quinquiesperforata*

RESUMO

A poluição por microplásticos (< 5 mm) é uma das formas que mais cresce no mundo, tornando-se uma preocupação ambiental de alta prioridade, estando esse material descrito nos oceanos e ambientes de água doce em todo o mundo. O *glitter* é um tipo de partícula formada por camadas de polímeros plásticos e metais, amplamente utilizado em maquiagens, artefatos, fantasias, etc, sendo facilmente levados para o ambiente aquático, a partir de efluentes domésticos ou da drenagem urbana, podendo atingir os sistemas aquáticos naturais. Este estudo determinou a toxicidade de partículas de *glitter* de diferentes colorações (branco e verde) sobre embriões da bolacha do mar *Mellita quinquiesperforata*. Adultos da espécie foram coletados, e em laboratório, obtivemos os gametas para uso no teste. As partículas de *glitter* foram diluídas em um litro de água do mar filtrada, formando a solução estoque (100 mg.L⁻¹) (SE100), mantida em aeração. A solução estoque de *glitter* foi diluída de forma seriada em água do mar filtrada formando 5 concentrações teste (100, 10, 1, 0.1 e 0.01 mg.L⁻¹), mais o controle. Após cerca de 36h, os embriões foram contados sob microscópio, visando avaliar as taxas de desenvolvimento normal. Os resultados foram analisados com por meio de análise de variância, seguida do teste não-paramétrico de Mann-Whitney, onde foi possível observar que ambas cores de *glitter* foram tóxicas para o desenvolvimento larval da bolacha do mar, sendo que o *glitter* branco apresentou taxas de desenvolvimento larval normal menores que o *glitter* verde. A granulometria dos dois *glitters* se mostraram diferentes, sendo o *glitter* verde foi mais fino que o branco, ademais, a partir dos rótulos dos produtos pode-se observar uma diferença da composição, onde o *glitter* verde apresentava mais compostos que o branco, no entanto, a partir de uma análise quanto ao tipo polimérico utilizando Pirólise acoplada à Espectrometria de Massas e Cromatografia a Gás (Py-GC/MS) do *glitter* branco foi possível obter compostos não descritos no rótulo. A maioria dos compostos dispostos nos rótulos e descobertos por Py-GC/MS são tóxicos para o desenvolvimento de espécie de água doce conforme a literatura, possivelmente a toxicidade encontrada nesse trabalho se deu a partir da lixiviação dos compostos presentes nas partículas e no contato direto destas com os embriões.

Palavras-chaves: resíduo plástico; ecotoxicologia; compostos.

ABSTRACT

Plastic pollution is one of the highest increasing forms of pollution in the world, being then a high-priority environmental concern. Microplastics (< 5 mm) have already been described in oceans and freshwater environments. Glitter is a type of particle formed by overlapping layers of plastic polymers and metals, and it has not received much attention from the scientific community regarding its polluting potential, despite the fact that it is widely used in makeup, artifacts, costumes, etc., and consequently can be easily introduced into domestic effluents or detach from skin and deposit on the streets, from where it can be leached in the stormwater runoff. After reaching the natural aquatic systems, glitter, as a plastic particle has potential to cause toxic effects to aquatic species. This study aimed to determine the toxicity of glitter particles of different colors (white and green) on embryos of the sand-dollar *Mellita quinquesperforata*. Adult individuals were collected, acclimated in the laboratory and induced to spawn. The gametes were separated and examined and then the in vitro fertilization was done. The glitter particles were diluted in 1L of filtered seawater, forming the stock solution (100 mg.L⁻¹) (SE100), which was maintained under aeration. Each stock solution was serially diluted in filtered seawater forming 5 test concentrations (100, 10, 1, 0.1 and 0.01 mg.L⁻¹), plus the control. Four replicates were prepared for each test-concentration, in glass test tubes, and fertilized eggs were added to each replicate. After about 36h, the test was finished, and the embryos were counted under a microscope, in order to assess normal development rates. The results were analyzed by analysis of variance, followed by the non-parametric Mann-Whitney test. The results indicated that both types of glitter were toxic for the larval development of the sand dollar, and that the white glitter induced higher toxicity than the green glitter. The textures of the two glitters were different, with the green glitter being finer than the white one. In addition, the product labels indicates differences between the composition of both glitters, where the green glitter had more compounds than the white one. However, an analysis for the polymeric type using Pyrolysis coupled to Mass Spectrometry and Gas Chromatography (Py-GC/MS) was done with the white glitter, revealing compounds not described on the label. Most of the compounds displayed on the labels and discovered by Py-GC/MS can be toxic to freshwater species according to literature, thus the toxicity found in this investigation was likely due to the leaching of chemical compounds from the glitter particles.

Key-words: plastic waste; ecotoxicology; compounds.

1. Introdução

A poluição por plásticos é crescente no mundo todo, tornando-se uma preocupação ambiental de alta prioridade (Xu *et al.*, 2019). Os resíduos plásticos apresentam uma grande variedade na sua composição e no seu tamanho, em relação a este último aspecto, os resíduos plásticos normalmente são categorizados em 5 diferentes categorias: nanoplástico (1 nm–1 µm) (Hartmann *et al.* 2015; da Costa *et al.*, 2016), microplástico (1 µm–5 mm) (Frias and Nash, 2019), mesoplástico (5–20 mm), macropástico (20–100 mm) e megapástico (> 100 mm) (Barnes *et al.* 2009; de Lucia *et al.* 2014; Brâte *et al.* 2016). Entre elas, destacam-se os microplásticos (MP), que representam uma forma predominante de lixo plástico (Galloway *et al.*, 2017), principalmente no ambiente aquático. A poluição por microplástico exibe uma distribuição generalizada em vários locais, tanto em ambientes terrestres quanto aquáticos, como os oceanos (Yurtsever, 2019a), atingindo até mesmo regiões remotas, como ilhas, zonas polares e mares profundos (Lusher *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018). Além disso, a presença desse material já foi descrita em ambientes de água doce, que têm como seu destino o oceano (Li *et al.*, 2018).

Cerca de 80% da poluição por MP nos oceanos têm origem em fontes terrestres (*land-based sources*), sendo que os sistemas fluviais são um dos principais caminhos para estes poluentes chegarem aos oceanos (Besseling *et al.* 2017a, b; Leslie *et al.* 2017; Rochman 2018). Os MP que atingem fontes de água doce e salgada frequentemente flutuam por um longo tempo na água, no entanto, após certas interações (biológicas, físicas e químicas) (Oberckmann *et al.*, 2014) eles seriam mais propensos a precipitar e acumular no sedimento (Coppock *et al.* 2017; Imhof *et al.* 2018, Yurtsever, 2019b).

Os microplásticos representam um contaminante de preocupação emergente no ambiente aquático (Yurtsever, 2019a), podendo ser originários de fontes primárias e secundárias (Figura 1). Os MP de fonte primária são produzidos intencionalmente em escala microscópica como precursores de outros produtos ou para uso direto como abrasivos em produtos de limpeza, estética, etc. Por sua vez, os microplásticos secundários resultam da degradação de macropásticos, devido a processos mecânicos, fotolíticos e/ou químicos no ambiente (Alomar *et al.*, 2016), os quais fragmentam objetos maiores em milhares ou milhões de microplásticos.

Figura 1: Representação de MPs primários e secundários.



Fonte: Elaborada pela autora.

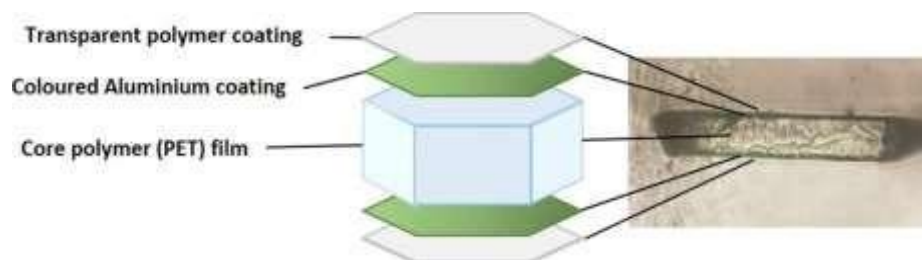
Os microplásticos presentes no ambiente marinho são constituídos por polímeros sintéticos e ou copolímeros de pequena escala, por se encontrarem em fase sólida são insolúveis em água e dificilmente (Battacharya, 2015). Dentro das subcategorias dos MP de fontes primárias, um tipo de partícula que se destaca são os *microbeads* ou microesferas, que são pequenas esferas de plástico que variam em tamanho de aproximadamente 5 μm a 1 mm, sendo feitas de polímeros sintéticos, incluindo polietileno (PE), ácido polilático (PLA), polipropileno (PP), poliestireno (PS) ou tereftalato de polietileno (PET) (Rochaman *et al.*, 2015).

As microesferas são fabricadas e incluídas intencionalmente em vários produtos de cuidados pessoais, como cremes dentais, cosméticos de limpeza facial, sabonetes, materiais de limpeza e entre outros, para fortalecer a sua ação limpante ou funções esfoliantes (Rochman *et al.*, 2015; Lei *et al.*, 2017), além de serem projetadas para o descarte no ralo (Rochman *et al.*, 2015). Devido ao seu grande volume de produção, juntamente com sua durabilidade, as microesferas têm o potencial de ser uma relevante fonte de poluição de microplásticos no ambiente marinho. Por conta disso, uma crescente pressão pública tem levado à proibição dessas partículas em diversos produtos cosméticos (Rochman *et al.*, 2015).

No entanto, o *glitter*, que é um tipo de partícula bastante similar às microesferas, não tem recebido a mesma atenção da comunidade científica quanto ao seu potencial poluidor (Tagg & Ivar do Sul, 2019). O termo *glitter* refere-se a uma variedade de partículas pequenas, planas e reflexivas, as quais são utilizadas com frequência em

produtos cosméticos, têxteis e artesanatos (Yurtsever, 2019a), apesar de muitos pensarem que a composição do *glitter* seja metálica ou mineral, a verdade é que somente uma fina camada metálica protege camadas de plástico mais espessas (Tagg & Ivar do Sul, 2019), como podemos observar na Figura 2. Devido ao seu tamanho muito pequeno, ele é facilmente aderido à pele humana e é removido após a lavagem com água em pias ou no banho, sendo provavelmente levados para os efluentes domésticos onde podem atingir os sistemas aquáticos naturais (Tagg & Ivar do Sul, 2019). A utilização do *glitter* no Brasil é extremamente difundida, principalmente na época do carnaval, servindo como adereço em maquiagens, fantasias, carros alegóricos e etc. Apesar de ser um material que se adere facilmente a pele e outras superfícies, com o movimento e até mesmo o suor, o *glitter* acaba caindo dessas superfícies entrando em contato com as ruas que pode ser facilmente carregado pelo escoamento superficial, até chegar em rios e mares, então a drenagem urbana pode representar mais uma via de entrada desse material nos ambientes aquáticos. Tagg & Ivar do Sul (2019) sugeriram que o *glitter* é um importante indicador da presença de esgotos no ambiente marinho.

Figura 2: Demonstração da composição e morfologia de uma partícula de *glitter* hexagonal e seu diagrama.



Fonte: Tagg & Ivar do Sul, 2019.

Partículas de *glitter* foram encontradas em amostras de estações de tratamento de esgoto da Noruega (Lusher et al., 2017), e no sedimento de rios no Reino Unido, em grandes quantidades (Hurley et al., 2018). Também, houve um aumento da prevalência dos microplásticos em ecossistemas de água doce e com isso sabe-se que estão presentes em rios e lagos em todo o mundo (Rios Mendoza e Balcer, 2019). Yurtsever (2019a) em uma revisão sobre o tema, registrou que estudos analisando amostras ambientais de água continham glitter, chamando a atenção para os potenciais problemas relacionados ao comércio e uso desse material.

Tagg & Ivar do Sul (2019) mostraram que as partículas de *glitter* não têm sido incluídas historicamente na maioria dos estudos sobre o potencial poluidor dos

microplásticos conduzidos internacionalmente. Por exemplo, em um relatório da União Internacional para a Conservação da Natureza (UICN) sobre o estado atual dos microplásticos primários que entram no ambiente marinho, não há nenhuma menção sobre glitter, apesar deste material se encaixar na definição de microplástico primário, que são aqueles que atingem ambientes aquáticos ou marinhos já em escala milimétrica, de acordo com a classificação de Frias & Nash (2019).

De acordo com Lucio *et al.* (2019), no Brasil, até o momento, não existem legislações proibindo o uso de microplásticos em produtos de uso pessoal, e também, a portaria nº 2914 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde não dispõe sobre nenhum procedimento de controle e vigilância, nem padrão de potabilidade para água contaminadas com essas partículas (Brasil, 2011), não existindo nenhuma regulamentação ou diretriz tratando sobre a retirada dessas partículas durante o tratamento de água pelas companhias de saneamento. Portanto, no Brasil não há também nenhuma regulação sobre o uso e manejo do glitter.

Tagg & Ivar do Sul (2019) também apontaram a ausência de estudos e informações sólidas, em âmbito global, sobre as fontes, taxas de aporte, distribuição, presença no ambiente e possíveis efeitos do *glitter* nos ambientes marinhos, e ao mesmo tempo destacaram sua importância como poluente, chamando a atenção para a necessidade de estudos sobre estas partículas.

Um dos problemas causados pela presença de MP no ambiente é a intoxicação da biota, por diferentes formas. Estudos demonstraram que os estágios iniciais de desenvolvimento dos organismos exibem uma maior sensibilidade aos contaminantes do que outros estágios da vida (Beiras *et al.*, 2012; Martínez-Gómez *et al.*, 2017). Kaposi *et al.* (2014) demonstraram que nas larvas do ouriço-do-mar *Tripneustes gratilla* expostas a microesferas de polietileno eram capazes de ingerir as partículas, apresentando efeitos sub-letais, como por exemplo, redução no tamanho e desenvolvimento larval, na concentração de 300 microesferas por mililitro. Gambardella *et al.* (2017) mostraram que microesferas de poliestireno se acumularam nos estágios planctônicos de cracas e artêmias, afetando a natação (a partir de 1 mg.L⁻¹) e causando neurotoxicidade desde

0.001 mg.L⁻¹, ou seja, em concentrações ambientais e altas de MPs. Em outro estudo com neonatos de rotíferos e larvas de ouriço-do-mar, Gambardella *et al.* (2018) detectaram alteração na velocidade de natação devido a microesferas de poliestireno, também a partir de 0.001 mg.L⁻¹, confirmando que estes MP podem induzir toxicidade já em concentrações ambientalmente relevantes. Além disso, dados não publicados

obtidos de forma preliminar em nosso laboratório mostraram evidências de que o *glitter* pode afetar a sobrevivência de *Artemia* sp, pois a exposição a diferentes concentrações causou aumento da letalidade e redução do crescimento de microcrustáceos marinhos desse gênero.

Green *et al.* (2020) testaram os impactos ecológicos do *glitter* fabricado de tereftalato de polietileno (PET) convencional não biodegradável e *glitters* de materiais alternativos (celulose regenerada modificada, mica ou mica sintética) na biodiversidade e no funcionamento do ecossistema de água doce, os resultados demonstram de maneira geral que tanto o *glitter* convencional quanto os alternativos podem causar impactos ecológicos no ecossistema aquático.

Tendo em vista as considerações feitas por Tagg & Ivar do Sul (2019) e Yurtsever (2019a), o uso intenso de glitter pela população, e o fato da maioria das praias no Brasil receber aportes de esgoto não tratado, em volumes consideráveis, é esperada a presença de glitter nos ambientes marinhos brasileiros, de modo que o glitter deve ser considerado como potencial contaminante para esses ambientes. Assim, são necessárias análises dos potenciais efeitos que o *glitter* pode causar na biota e nos ecossistemas aquáticos, sobretudo os ambientes marinhos, uma vez que até o momento o potencial tóxico do *glitter* para a biota marinha ainda é desconhecido.

2. Objetivos

Avaliar a toxicidade do *glitter* sobre embriões da bolacha do mar *Mellita quinquesperforata*, e comparar a toxicidade entre os *glitters* de diferentes cores (branco e verde) para avaliar se há diferença na toxicidade por conta da composição de cada um.

3. Materiais e Métodos

3.1 Caracterização do Glitter

Dois tipos de *glitter* foram usados no presente estudo, sendo ambos da mesma marca, mas com diferentes colorações: um verde e um branco. Primeiramente, a distribuição granulométrica desses *glitters* foi analisada, no Instituto de Geociências da Universidade de São Paulo, visando verificar o tamanho das partículas, por meio da análise por difração de raios *laser*, seguindo a norma ISO 13320 (ISO, 2020). Os tamanhos das partículas de *glitter* foram examinadas usando o granulômetro a laser

Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK) com a unidade úmida, módulo Hydro 2000MU, em dez repetições.

Inicialmente foi feita a homogeneização das amostras, por agitação mecânica, e em seguida uma quantidade de *glitter* foi separada para a análise (0,3–0,5 g de amostra). Para a dispersão dos aglomerados da amostra de *glitter*, foi utilizada uma solução tensoativa, de modo a evitar a agregação das partículas. As amostras foram injetadas na unidade Malvern 2000 Hydro e então foi aplicado ultrassom 50% sobre elas, visando aumentar sua dispersão e garantir a homogeneização da solução. Em seguida, o aparelho realizou a verificação da distribuição granulométrica por espalhamento do feixe de luz *laser* incidente: a distribuição de tamanho de partículas é medida pela variação angular na intensidade da luz difundida à medida que o *laser* interage com as partículas na solução. Os valores numéricos relativos ao padrão de espalhamento são registrados para análise subsequente, obtendo-se a caracterização do tamanho das partículas de *glitter*.

Além disso, o *glitter* branco foi analisado quanto ao tipo polimérico utilizando Pirólise acoplada à Espectrometria de Massas e Cromatografia a Gás (Py-GC/MS) de acordo com as metodologias adaptadas de Gimiliani *et al.* (2020), Tsuge *et al.* (2011) e Zellner and Quarino (2009). Essa é uma técnica poderosa para análise de microplásticos, fornecendo a separação cromatográfica e detecção de massa de todos os produtos da pirólise (Matsui *et al.*, 2020). Cerca de 0,2 mg de amostra foram transferidos para o amostrador do pirolisador para o copo de amostra no sistema PyGC/MS. No sistema GC, a temperatura da coluna iniciou em 40°C por 2 min e atingiu 295°C com taxa de aquecimento de 20°C min⁻¹ por 13 min. A relação massa-carga no sistema MS foi de 25–200 m/z, e a divisão aplicada foi de 27 com um impacto de elétrons de 70 eV. Os gases resultantes da queima da amostra foram transferidos por gás portador de hélio através da coluna Ultra ALLOY-5 (apolar). Um pirolisador Frontier Labs (modelo EGA/PY-3030D) foi usado com um micro-forno em modo de *single shot*, conectado a um sistema Shimadzu GC/MS (modelo QP5000). Os gases resultantes da queima foram separados e quantificados por meio do sistema GC/MS. Paralelamente à análise da amostra, foi realizada a análise do policloreto de vinila (PVC) padrão. Antes de cada análise, uma amostra em branco foi analisada nas mesmas condições, a fim de determinar qualquer interferência no tempo de retenção da amostra e os cromatogramas obtidos foram comparados com aqueles fornecidos por Tsuge *et al.* (2011).

3.2 Preparação das Concentrações

Foi preparada uma solução estoque (SE100) de *glitter*, pela adição em água do mar filtrada e autoclavada (água de diluição), de modo a se obter uma mistura de 100 mg.L⁻¹, mantida em agitação no momento da preparação das soluções-teste. Posteriormente a SE100 foi diluída de forma seriada em água de diluição, visando obter pelo menos cinco concentrações, as quais foram 0,01%; 0,1%; 1%; 10% e 100%¹ da SE100, mais o controle (água de diluição sem o *glitter*). Estas soluções-teste inicialmente permaneceram em forte agitação, no entanto, foi possível observar que as partículas de *glitter* formam conglomerados que não se misturam por inteiro, para solucionar esse problema, utilizou-se um sonificador com frequência de 40kHz por oito minutos na solução de 100% que posteriormente foi diluída de forma seriada. A partir das soluções-teste, foram preparadas as réplicas em tubos de ensaio contendo o volume de 10 ml de solução, sendo 4 réplicas por concentração.

3.3 *Mellita quinquiesperforata*

A espécie da bolacha-da-praia *Mellita quinquiesperforata* é representante da classe *Echinoidea* (Wellner, 2012), sendo um organismo abundante nas regiões neotropicais e subtropicais, inclusive em praias arenosas brasileiras, especialmente na zona infralitoral, distribuindo-se paralelamente à linha de costa. São organismos propensos ao contato com eventuais partículas de microplásticos (ou *glitter*), pois ao alcançar as fontes marinhas alguns MPs podem precipitar e acumular no sedimento (Coppock *et al.* 2017; Imhof *et al.* 2018), e as bolachas-da-praia tendem a ficar na superfície da areia ou logo abaixo dela, nas regiões rasas da zona entre-marés. Além disso, como *M. quinquiesperforata* apresenta alta sensibilidade a contaminantes, justifica-se o seu uso nos ensaios ecotoxicológicos (Laitano *et al.*, 2015; Mello *et al.* 2020). O uso da bolacha-do-mar como organismo teste se faz viável uma vez que o mesmo indivíduo pode ser utilizado repetidamente para a obtenção de gametas, reduzindo os custos operacionais do ensaio (Wellner, 2012), e mesmo que não seja possível a identificação do gênero visualmente, assim que há a indução/liberação dos gametas, o reconhecimento é feito facilmente por meio da coloração.

¹ Deste modo, as concentrações representam 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 mg L⁻¹ de glitter, respectivamente.

3.4 Teste de toxicidade com os embriões

Para a realização dos testes de toxicidade de desenvolvimento embrionário com ovos recém fecundados de *Mellita quinquesperforata*, foi utilizada uma adaptação do protocolo experimental descrito pela Norma Técnica NBR 15350 (ABNT, 2012), o qual descreve testes de desenvolvimento embrionário com ouriços do mar, com ajustes posteriores propostos por Laitano *et al.* (2015) para bolachas do mar. O método fundamenta-se na obtenção de gametas, fertilização artificial e determinação do número de embriões normais e afetados após um período de exposição de 36 horas (Mello *et al.*, 2020). 100 indivíduos adultos de *M. quinquesperforata* foram coletados na região infralitoral de praias do litoral paulista para cada teste. Em laboratório, os animais foram colocados dentro de um recipiente com sedimento limpo e água do mar, e mantidos em condições constantes de aclimação (fotoperíodo 12h:12h claro-escuro, temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, salinidade entre 33-36 e aeração constante). Os gametas foram obtidos por indução osmótica com o auxílio de uma seringa hipodérmica e 0,5 ml de uma solução de cloreto de potássio (1 M KCl) injetada na região aboral dos organismos (Laitano *et al.*, 2015). Devido à diferença de osmolaridade, a solução estimula a contração dos tecidos no entorno das gônadas, culminando na liberação dos gametas através do gonópore. Para o sucesso do teste, a solução de gametas deve ser composta por material de diferentes organismos; por isso foram obtidos gametas de, no mínimo, 3 machos e 3 fêmeas (ABNT, 2012; Laitano *et al.*, 2015).

Os gametas masculinos foram coletados com auxílio de uma pipeta *Pasteure* transferidos para um béquer mantido em gelo, de forma a preservar o esperma. Os óvulos foram coletados, transferidos para béqueres com água do mar, e observados em microscópio para verificar o estágio de maturação e a presença de possíveis anomalias. Antes da fecundação, foi preparada uma solução espermática a partir da diluição 200 μL do líquido espermático em 10 mL de água do mar filtrada.

Para a fecundação foram adicionados 1-2 mL de solução espermática à solução de óvulos, sendo feita agitação por 10 minutos para permitir a fecundação. Após esse tempo confirma-se a fecundação dos óvulos pela observação da membrana da fertilização ao redor deles em microscópio (Nascimento *et al.*, 2002). A fecundação mínima determinada, em três sub-amostras de 1ml, para testes de toxicidade deve ser maior que 70% (Laitano *et al.*, 2015).

Alíquotas da solução de ovos recém-fecundados foram separadas e introduzidas nos tubos de ensaio, de modo que cerca de 500 ovos fossem adicionados a cada réplica, num volume menor do que 500 µL. Em seguida, o sistema teste foi mantido em condições controladas (fotoperíodo 12h:12h claro-escuro, $25 \pm 2^\circ\text{C}$) por cerca de 36-42 h, até que os embriões se desenvolvessem até o estágio de *pluteus*. Posteriormente, os conteúdos das réplicas foram fixados pela adição de 0,5ml de solução tamponada de formaldeído a 10%. Os primeiros 100 embriões de cada réplica foram contados em microscópio óptico, permitindo identificar as larvas normais e anormais (i.e., aquelas exibindo retardo no desenvolvimento ou anomalias morfológicas), de acordo com ABNT 15350(2012). Antes e após os experimentos, os parâmetros físico-químicos (pH, salinidade, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura) das soluções de *glitter* foram medidos, utilizando-se sensores adequados.

Os resultados foram planilhados, e verificados para normalidade e homogeneidade no Software Paleontological Statistical 4.03 – PAST (Hammer *et al.*, 2001), em seguida, foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste não paramétrico de Mann-Whitney. A partir dessas análises, foi possível estimar a concentração de efeito observável (CEO).

4. Resultados

4.1 Caracterização do *glitter*

A partir da caracterização dos dois tipos de *glitter* utilizados, foi possível observar uma grande variedade de tamanhos de partículas, como evidenciado pelo desvio padrão alto (Tabela 1). Estes diferentes tamanhos das partículas de *glitter* demonstrando a não homogeneidade das amostras, sendo que no *glitter* verde é maior essa diferença dos tamanhos das partículas.

Conforme a Norma Técnica NBR 6502 (ABNT, 1995) a classificação granulométrica está disposta na tabela 2. Com isso, temos que no *glitter* verde se observa partículas com tamanhos classificados como silte que variam entre 0,002 a 0,06 mm, predominando o silte médio, seguido de partículas de tamanho similar a silte grosso e fino, respectivamente. No *glitter* branco temos partículas com características de tamanho do tipo grãos de areia que variam de 0,06 a 2 mm, predominando o tamanho de areia muito fina, seguido de silte grosso e areia fina. Assim, o *glitter* branco pode ser classificado como tendo textura similar à de areia siltosa.

Tabela 1: Classificação Granulométrica dos *Glitters* incluindo Material Pelítico

		<i>Glitter</i>		
		Verde	Branco	
Estatísticas da Distribuição Granulométrica (Phi)	Diametro Médio	5,524	3,941	
	Desvio Padrão	0,94	0,84	
	Assimetria	0,59	0,897	
	Curtose	3,531	4,187	
Faixa Granulométrica	Areia	Média	0,00	0,316
		Fina	0,00	17,28
		Muito Fina	4,239	43,928
	Silte	Grosso	29,511	26,62
		Médio	39,214	7,946
		Fino	20,662	3,123
		Muito Fino	4,942	0,726
	Pelíticos	Argila	1,431	0,113

Fonte: Elaborada pela autora.

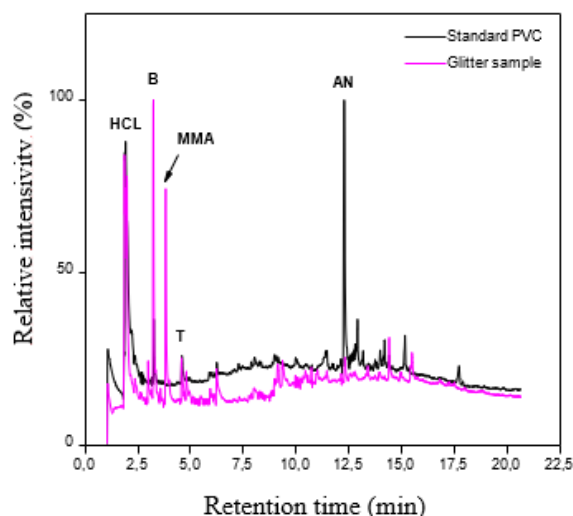
Tabela 2: Classificação Granulométrica de acordo com a norma ABNT 6502/95.

Classificação Granulométrica		
Argila	Silte	Areia
<0.002mm	0.002 - 0.06 mm	0.06 - 2 mm

Fonte: Elaborada pela autora.

Os produtos da pirólise identificados na análise da amostra de *glitter* branco por Py-GC/MS estão apresentados no cromatograma da Figura 3, cujo tipo polimérico determinado foi o copolímero metil-acrilato cloreto de vinil – P(MA-VC).

Figura 3: Produtos de pirólise apresentados em cromatogramas da amostra de *glitter* branco. HCL: cloreto de hidrogênio; B: benzeno; MMA: copolímero de acrilato de metila-cloreto de vinila; T: tolueno; AN: antraceno.



Fonte: Dra. Giovana Gimiliani.

Os produtos da pirólise identificados evidenciam picos dos seguintes compostos característicos do PVC: cloreto de hidrogênio (HCl), benzeno (B), tolueno (T) e antraceno (AN). Metil acrilato (MM) também foi identificado na amostra de *glitter*, o qual não faz parte da cadeia polimérica do PVC, sendo um monômero acrílico utilizado no preparo de polímeros com propriedades rígidas, flexíveis, hidrofóbicas ou hidrofílicas (BASF®, 2005). Estes resultados são compatíveis com a literatura, pois *glitters* podem conter diferentes tipos de polímero: Poliéster, polipropileno, cloreto de polivinil e poli(metil metacrilato), podendo haver uma mistura de polímeros em sua composição e camadas (Vernoud *et al.*, 2011; Gross *et al.*, 2010). Polímeros do tipo poli(cloreto vinil) – PVC, apresentam em sua composição cloreto de hidrogênio, benzeno, tolueno, estireno e alguns compostos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como indeno, naftaleno, acenafteno, fluoreno e antraceno (Tsuge *et al.*, 2011). No entanto, pode ocorrer a não identificação de todos os compostos por Py-GC/MS.

4.2 Toxicidade

Os resultados dos experimentos realizados com os embriões de bolacha do mar *M. quinquiesperforata* com ambas colorações de *glitter* estão dispostos nas Figuras 4, 5 e 6. No teste 1 (Figura 4) e no teste 2 (Figura 5) foi possível observar um desenvolvimento larval normal no controle com taxas de desenvolvimento mais elevado, em relação ao teste 2 (Figura 6), o qual o controle apresentou menor taxa de desenvolvimento normal, estando pouco acima do valor mínimo aceitável proposto por Laitano *et al.* (2015). Nos dois primeiros testes do *glitter* verde e do *glitter* branco, foi possível observar que a CEO foi igual a 0,01 mg.L⁻¹, sendo a concentração de diluição mais baixa utilizada. Já no terceiro teste, a concentração de 0,01 mg.L⁻¹ não apresentou diferença significativa em relação ao controle (p = 0,05) em ambas cores dos *glitters*, no *glitter* verde (Figura 6 – A) a CEO foi igual a 100 mg.L⁻¹, enquanto no *glitter* branco (Figura 6 – B), a CEO foi igual a 0,1 mg.L⁻¹, como apontado, a contagem do controle desse teste em específico se apresentou baixa em relação aos outros dois, o que pode ter influenciado na estimativa da CEO.

Figura 4: Desenvolvimento embrionário normal de *Mellita quinquiesperforata* no teste 1. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0.05$), sendo **A** o *glitter* verde e **B** o *glitter* branco.

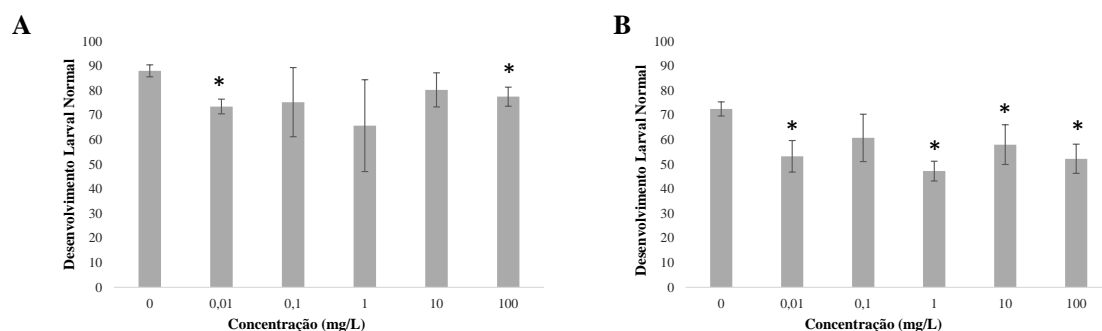


Figura 5: Desenvolvimento embrionário normal de *Mellita quinquiesperforata* no teste 2. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0.05$), sendo **A** o *glitter* verde e **B** o *glitter* branco.

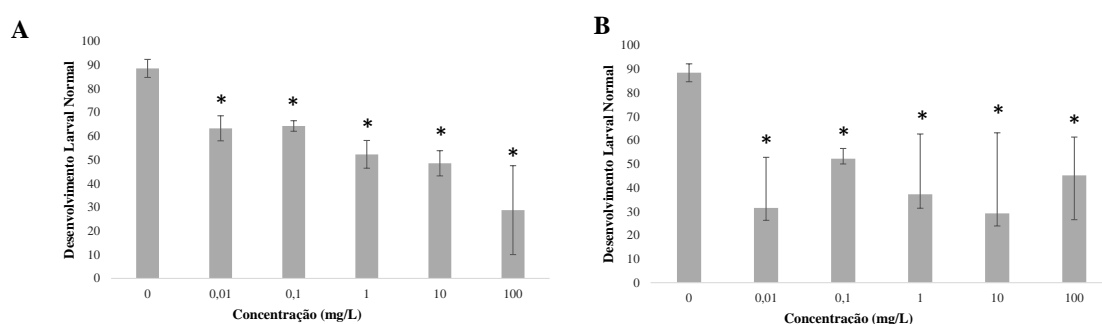
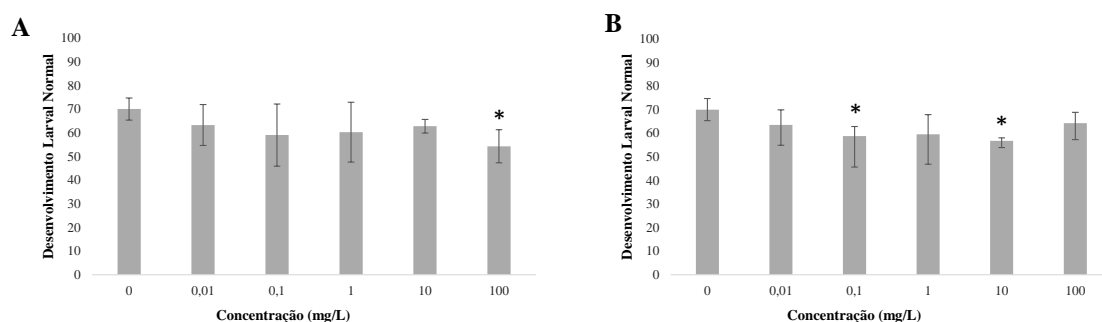


Figura 6: Desenvolvimento embrionário normal de *Mellita quinquiesperforata* no teste 3. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0.05$), sendo **A** o *glitter* verde e **B** o *glitter* branco.



Outro ponto a se ressaltar, são os desvios padrões relativamente altos, em especial no Teste 2 com glitter branco, que pode ter se devido a uma dificuldade do *glitter* em se misturar de forma homogênea na água, apesar dos procedimentos usados para homogeneizar as soluções, por se tratar de um contaminante que não se dissolve em água, a quantidade partículas que as larvas foram expostas variaram, o que pode ter refletido na variabilidade das respostas. Ademais, as composições dos dois *glitters* são

diferentes: na Tabela 3 temos a composição de cada um dos produtos retirados dos rótulos das embalagens. Como é possível observar, o *glitter* verde apresenta uma quantidade bem maior de compostos em sua fabricação em relação ao *glitter* branco. Essa diferença na composição, junto a diferença da granulometria de cada um, pode explicar a diferença na preparação das soluções e nas suas toxicidades, onde o *glitter* branco facilmente se misturava com a água do mar e o *glitter* verde formava uma camada na superfície da água por ser mais fino, tendo uma maior facilidade em flutuar e/ou ficar preso pela tensão superficial na interface água-ar.

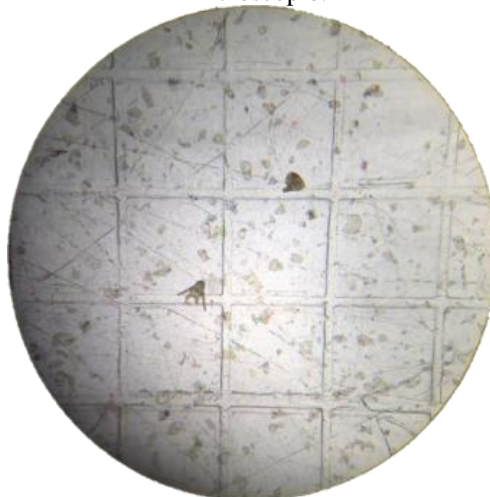
Tabela 3: Composição dos *glitters* transcritos dos rótulos de cada embalagem, nota-se que os nomes dos compostos estão descritos em inglês. (CI 77019 = mica; CI 77891 = Titanium Dioxide)

<i>Glitter</i>	Composição				
branco	BHT	Propylparaben	Talc	CI 77019	CI 77891

<i>Glitter</i>	Composição				
verde	BHT	Methylparaben	Propylparaben	Serica Powder	
	Hydrolyzed collagen	Caprylic/Capric Triglycerde	Magnesium Carbonate	Zinc Stearate	
	Paraffinum Liquidum	Talc	Cyclomethicone	Dimethicone Crosspolymer	

Apesar disso, é possível observar que ambos os *glitters* apresentaram toxicidade sobre o desenvolvimento larval da bolacha-do-mar desde a concentração mais baixa à mais alta. O *glitter* branco apresentou taxas de desenvolvimento larval menores que o *glitter* verde, possivelmente por ele se homogenizar mais facilmente na água do mar, tendo um contato direto maior com os embriões, como podemos observar na Figura 7, enquanto o *glitter* verde acaba por se acumular mais na superfície.

Figura 7: Larva normal e anormal na concentração de 100% do *glitter* branco em aumento de 4x no microscópio.



5. Discussão

De maneira geral, ambos os *glliters* foram tóxicos para o desenvolvimento larval normal de *M. quinquiesperforata* desde a concentração mais baixa a mais alta, mas houve uma diferença de toxicidade entre o *glitter* branco e o verde, pois o *glliter* branco induziu taxas menores no desenvolvimento larval normal de *M. quinquiesperforata* em relação ao *glliter* verde. A partir dos resultados obtidos observa-se uma similaridade do que foi encontrado em experimentos preliminares conduzidos por nosso grupo de pesquisa (dados não publicados), pois o *glliter* em concentrações superiores a 0,1% aumentou a mortalidade e redução do crescimento do microscrustáceos marinhos do gênero *Artemia*, e com a bolacha do mar, foi observado uma diminuição no desenvolvimento larval normal principalmente nos Testes 1 e 2 (Figuras 4 e 5) a partir da menor concentração (0,01%).

Green *et al.* (2020) utilizando uma densidade de $\sim 435 \text{ mg kg}^{-1}$ de *glliter* convencional de PET não biodegradável e *glliter* biodegradáveis de materiais alternativos (celulose regenerada modificada, mica ou mica sintética) no sedimento em tratamentos diferentes por 48h, observaram que *glitter* biodegradáveis alternativos tiveram vários efeitos semelhantes aos observados para o *glitter* convencional de PET, qualquer tipo de *glliter* (PET, celulose regenerada modificada, mica e mica sintética) resultou em menos clorofila B e C na coluna de água e comprimentos de raiz mais curtos de *L. minor* em comparação com os controles, no entanto, o *glitter* decantou no fundo dos tratamentos e não foi observado aderido à *L. minor*, é mais provável que o lixiviado dos *glliters* (possivelmente dos revestimentos à base de alumínio e acrílico) tenha causado a redução na biomassa do fitoplâncton e a diminuição da raiz de *L. minor*.

Na composição do *glliter* branco (Tabela 3), podemos observar a presença da mica (CI 77019) a qual foi pontuado no estudo de Green *et al.* (2020) e também, sabe-se a partir de análises químicas, que os plásticos podem lixiviar as substâncias que estão presentes na sua composição (Brede *et al.*, 2003; Henneuse-Boxus & Pacary, 2003; Kim *et al.*, 2006; Mutsuga *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2008; Tønning *et al.*, 2010), além dos compostos que estão descritos nos rótulos dos *glliters*, foram identificados outros compostos do *glitter* branco por Py-GC/MS (HCl, B, T, NA e MM). Ademais, podem não ter sido identificados todos os compostos presentes na amostra, embora a literatura indique a presença frequente de inúmeros contaminantes, e possivelmente tais compostos pode também prejudicar o desenvolvimento larval de *M. quinquiesperforata*

O Propilparabeno (PPB) que está descrito nos dois rótulos é utilizado para prolongar a vida útil dos produtos de cuidados pessoais, García-Espiñeira *et al.* (2018) utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans* para avaliar os efeitos toxicológicos do PPB demonstrou que este composto altera a fisiologia da espécie em termos de crescimento, reprodução e expressão gênica, sendo que o PPB é um produto químico já conhecido como potencial desregulador endócrino. A partir da lixiviação do PPB para água, este pode ocasionar a alteração do funcionamento do sistema endócrino, podem acontecer anomalias nos processos de vitelogênese e dos sistemas reprodutivos dos animais (Bila & Dezotti, 2007), podendo então, estar associadas a diminuição das taxas de reprodução e desenvolvimento embrionário observado nos testes.

Outro composto descrito em ambos rótulos, o BHT, também é utilizado como um aditivo para aumentar a durabilidade dos plásticos, embora seja considerado seguro para os humanos em nível autorizado, sua presença no ambiente aquático e dados toxicológicos controversos são de grande preocupação tanto para a vida aquática quanto a humana (Sarmah *et al.*, 2020). Testes de toxicidade embrionária com peixe-zebra (*Danio rerio*) foram realizados por Sarmah *et al.* (2020) e Yang *et al.* (2018), e as medidas de toxicidade aguda de 96 horas, como LC₅₀, foram 4,388 mg.L⁻¹ e 200 µM, respectivamente. Os valores com medidas diferentes nas concentrações de efeitos ocorreram por conta do protocolo distinto, pois os testes tinham abordagens com objetivos diferentes. Apesar disso, esses dados evidenciaram a toxicidade do BHT no desenvolvimento dos embriões, sendo este princípio ativo um potencial composto teratogênico, que é a capacidade da substância presente durante o estágio embrionário ou fetal produza alterações na estrutura ou função da descendência, na vida aquática. Embora os trabalhos sobre esse composto tenham focado na realização de testes com organismos de água doce, possivelmente o potencial teratogênico desse composto aconteça também na água salgada.

Somente no rótulo do *glitter* verde podemos encontrar o Metilparabeno (MeP), entre os parabenos, esse é o que tem a maior concentração em vários produtos cosméticos (Marquez-Sillero *et al.*, 2010). de Carvalho *et al.* (2021) em um estudo para avaliar os efeitos de Metilparabeno em larvas e adultos do peixe-zebra *Danio rerio*, encontraram uma concentração letal mediana (LC₅₀) de MeP foi de 105,09 mg.L⁻¹ para adultos e 211,12 mg.L⁻¹ para as larvas, mesmo os testes de toxicidade demonstrando que o MeP foi mais tóxico para os adultos em comparação as larvas, o que é inesperado, pois os estágios iniciais dos peixes são comumente mais sensíveis aos poluentes, um

estudo de Li & Zhang (2017) que discutem que o vitelo parece estar envolvido na defesa imunológico em embriões em larvas de peixes. No caso das larvas de *M. quinquiesperforata*, não encontramos o vitelo, com isso, elas estariam mais expostas ao MeP podendo prejudicar seu desenvolvimento.

O Metil Acrilato (MM) identificado por Py-GC/MS no *glliter* branco já foi utilizado em testes de toxicidade usando peixes de água doce e invertebrados em um estudo de Staples *et al.* (2000), onde foi observado as concentrações letais de $>6,7$ mg.L⁻¹ (24h e 48h), 4,5 mg.L⁻¹ (72h) e 3,4 mg.L⁻¹ (96h) em *Oncorhynchus mykiss*, de 3.8 mg.L⁻¹ (24h) 2,1 mg.L⁻¹ (48h), 1,3 mg.L⁻¹ (72h) e 1,1 mg.L⁻¹ (96h) em *Cyprinodon variegatus*, de $>6,4$ mg.L⁻¹ (24h) e 2,6 mg.L⁻¹ (48h) em *Daphnia magna* (invertebrado) e por fim concentrações letais de $>2,1$ mg.L⁻¹ (24h), $>3,1$ mg.L⁻¹ (48h), 1,6 mg.L⁻¹ (72h) e 1,6 mg.L⁻¹ (96h) em *Mysidopsis bahia* (invertebrado). Observando a toxicidade encontrada em mais de uma espécie, podemos entender que o MM pode prejudicar as larvas de bolacha do mar também.

Outros dois compostos identificados no *glliter* branco, o benzeno e o tolueno, já tiveram suas toxicidades descritas em larvas de *Pimephales promelas*, um peixe de água doce por Marchini *et al.* (1992), onde encontraram que o benzeno foi tóxico nos estágios larvais em concentrações de 15,59 mg.L⁻¹ quando expostos por 96 horas e 14,01 mg.L⁻¹ quando expostos por 7 dias, com esses intervalos próximos, sugere-se que o efeito letal acontece principalmente nos primeiros dias. Já no estágio larval de exposição ao tolueno, em 96 horas a concentração tóxica foi de 17,03 mg.L⁻¹ e em 7 dias foi de 9,39 mg.L⁻¹. Nos juvenis, a concentração de letalidade de benzeno e tolueno foram de 24,6 mg.L⁻¹ e 36,2 mg.L⁻¹, demonstrando que essas substâncias são mais prejudiciais aos estados larvais do organismo. Com isso, a lixiviação dessas substâncias a partir do *glliter* branco pode prejudicar o desenvolvimento larval da bolacha do mar.

Ademais, dados não publicados do Laboratório de Aquicultura Sustentável da UNESP de São Vicente, demonstraram os efeitos do *glliter* branco, o mesmo utilizado nos testes com a bolacha do mar, em diferentes concentrações na fisiologia do camarão dulcícola, foram observadas reduções de cerca de 50% no consumo de oxigênio em todos os tratamentos quando comparados ao controle, também durante a exposição os animais deixaram de oxidar principalmente carboidratos e passaram a usar proteínas, possivelmente a exposição ao *glitter* causou danos físicos nas brânquias, afetando o consumo de oxigênio e a ingestão pode ter ocasionado danos aos tecidos do sistema digestório e alterado a absorção de nutrientes, diminuindo a taxa metabólica,

demonstrando que o *glliter* causou alterações na fisiologia energética desses camarões, sendo um potencial fator para afetar o crescimento e reprodução.

Nos preparos das soluções é possível enxergar uma diferença entre a forma como os *glliters* se comportam em meio aquoso, enquanto no *glliter* branco a solução fica homogênea mais facilmente, talvez por ter um tamanho maior facilitando seu espalhamento na solução, enquanto no *glliter* verde, sem sonificador, não conseguimos homogeneizar ao máximo a solução. Isso faz com que as partículas de *glliter* branco fiquem mais espalhadas na água e em maior contato com as larvas, enquanto as partículas do *glliter* verde tendem a ficar mais na superfície, com isso, pode se explicar em parte que o *glliter* branco se demonstrou mais tóxico com o verde, pois apresentava um maior contato direto com as larvas prejudicando seu desenvolvimento, já que o *glliter* foi capaz de ocasionar danos físicos em camarões.

6. Conclusão

O presente estudo evidencia dados sobre a toxicidade de partículas de *glliter* em espécies marinhas tropicais. Conforme os resultados, foi possível observar que ambas colorações do *glliter* prejudicaram o desenvolvimento larval normal da bolacha do mar *M. quinquiesperforata*, de maneira que o *glliter* branco se demonstrou mais tóxico do que o *glliter* verde.

De maneira geral, o *glliter* representa uma ameaça a biota aquática, no entanto, faltam informações na literatura a respeito da toxicidade do *glitter* sobre diferentes espécies e também, a maioria dos estudos em relação aos compostos que podemos encontrar na composição do *glliter* são realizados com animais de água doce, faltando informações sobre a reação desses compostos em água salgada.

7. Referências Bibliográficas

- Alomar, C., F., Estarellas, F. E Deudero, S. Microplastics in the Mediterranean Sea: Deposition in coastal shallow sediments, spatial variation and preferential grain size. *Mar. Environ. Res.*, v. 115, p. 1–10, 2016.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas ABNT. NBR 6502. Rochas e solos - Terminologia, 28 pp., 1995.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas ABNT. NBR 15350. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de Ensaio com ouriço-do-mar (*Echinodermata Echinoidea*), 21 pp., 2012.
- Barnes, D. K., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions*

- of the Royal Society of London B: Biological Sciences, v. 364(1526), p. 1985–1998, 2009.
- Bebiano, M. J., Pereira, C. G., Rey, F., Cravo, A., Duarte, D., D’Errico, G., Regoli, F. Integrated approach to assess ecosystem health in harbor áreas. *Sci. of the Total Environ.*, v. 514, p. 92–107, 2015.
- Beiras, R.; Durán, I.; Bellas, J., Sánchez-Marín, P. Biological effects of contaminants: *Paracentrotus lividus* sea urchin embryo test with marine sediment elutriates. International Council for the Exploration of the Sea, *Techn. Environ. Mar. Sci.* 51, 1–13, 2012.
- Besseling, E., Foekema, E. M., Van Den Heuvel-Greve, M. J., & Koelmans, A. A. The effect of microplastic on the uptake of chemicals by the lugworm *Arenicola marina* (L.) under environmentally relevant exposure conditions. *Environmental science & technology*, v. 51(15), p. 8795–8804, 2017a.
- Besseling, E., Quik, J. T., Sun, M., & Koelmans, A. A. Fate of nano-and microplastic in freshwater systems: A modeling study. *Environmental Pollution*, v. 220, p. 540–548, 2017b.
- Bhattacharya, P. A review of the impactos of microplastic beads used in cosmetics. Department of Environmental Science, Kanchrapara College, West Bengal-743 145, 2015.
- Bila D.M.; Dezotti, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química nova*, v. 30(3), p. 651, 2007.
- Brasil, Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial da União*, 2011.
- Bråte, I. L. N., Eidsvoll, D. P., Steindal, C. C., & Thomas, K. V. Plastic ingestion by Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the Norwegian coast. *Marine Pollution Bulletin*, v. 112(1–2), p. 105–110, 2016.
- Brede, C.; Fjeldal, P.; Skjevraak, I.; Herikstad, H. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Additives and Contaminants*, v. 20, p. 684–689, 2003.
- Coppock, R. L.; Cole, M.; Lindeque, P. K.; Queirós, A. M. e Galloway, T. S. A small-scale, portable method for extracting microplastics from marine sediments. *Environmental Pollution*, v. 230, p. 829–837, 2017.
- da Costa, J. P., Santos, P. S., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (Nano) plastics in the environment—sources, fates and effects. *Science of the Total Environment*, v. 566, p. 15–26, 2016.
- de Carvalho, LC.P, Coimbra Rola, R., da Silva Junior, F.M., Martins, C.M.G. Toxicity and sublethal effects of methylparaben on zebrafish (*Danio rerio*) larvae and adults. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, v. 28, p. 45534-45544, 2021.
- de Lucia, G. A., Caliani, I., Marra, S., Camedda, A., Coppa, S., Alcaro, L., Campani, T., Giannetti, M., Coppola, D., Cicero, A. N., Panti, C., Baini, M., Guerranti, C., Marsili, L., Massaro, G., Fossi, M. C. e Matiddi, M. Amount and distribution of neustonic micro-plastic off the western Sardinian coast (Central-Western Mediterranean Sea). *Marine Environmental Research*, v. 100, p. 10–16, 2014.
- Europe, P. *Plastics—The Facts. 2016, An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data, 2016.* Plastic Europe, EuPC, EuPR and EPRO 2012, 2012.

- Fernandes, A.R.; Rose, M.; Charlton, C. 4-Nonylphenol (NP) in food contact materials: analytical methodology and occurrence. *Food Additives and Contaminants*, v. 25, p. 364–372, 2008.
- Frias, J. P. G. L, & Nash, R. Microplastics: finding a consensus on the definition. *Marine Pollution Bulletin*, v. 138, p. 145-147, 2019.
- Gambardella, C., S. Morgana, S. Ferrando, M. Bramini, V. Piazza, E. Costa, F. Garaventa, and M. Faimali. Effects of polystyrene microbeads in marine planktonic crustaceans. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145: 250–257, 2017.
- Gambardella, C., S. Morgana, M. Bramini, A. Rotini, and L. Manfra. Ecotoxicological effects of polystyrene microbeads in a battery of marine organisms belonging to different trophic level. *Marine Environmental Research*, 2018.
- Galloway, T. S.; Cole, M.; Lewis, C. Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. *Nature Publishing Group*, v. 1, n. April, p. 1–8, 2017.
- García-Espiñeira, M.C.; Tejada-Benítez, L.P.; Olivero-Verbel, J. Toxic Effects of Bisphenol A, Propyl Paraben, and Triclosan on *Caenorhabditis elegans*. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 15 (4), p. 684, 2018,
- Geyer, R., Jambeck, J.R. & Law, K.L. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science advances* 3 (7): e1700782, 2017.
- Gimiliani, G.T.; Fornari, M.; Redígolo, M.M.; Bustillos, J.O.W.V.; Abessa, D.M.S.; Pires, M.A.F. Simple and cost-effective method for microplastic quantification in estuarine sediment: A case study of the Santos and São Vicente Estuarine System. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, v. 2, p. 100020, 2020.
- Green, S.D., Jefferson, M., Boots, B., Stone, L. All that glitter is litter? Ecological impacts of conventional versus biodegradable glitter in a freshwater habitat. *J. Hazard. Mater.*, v. 402, 2020.
- Gross, S., Igowsky, K., Pangerl, E. Glitter as a source of trace evidence. *Journal of the American Society of Trace Evidence Examiners*, 1(1): 62-72, 2010.
- Hammer, Ø.; Harper, D. A.T.; Ryan, P. D. (2001). *Past: Paleontological Statistics Software Package For Education And Data Analysis*. *Paleontologia Electronica*, S.L., V. 1, N. 4, P. 1-9
- Hartmann, N. I. B., Nolte, T., Sørensen, M. A., Jensen, P. R., & Baun, A. Aquatic ecotoxicity testing of nanoplastics: lessons learned from nanoecotoxicology. *ASLO Aquatic Sciences Meeting*, 2015.
- Henneuse-Boxus, C.; Pacary, T. Emissions from plastics. *Rapra Review Reports*, v. 14, 152 pp., 2003.
- Hurley, R, Woodward, J. & Rothwell, JJ. Microplastic contamination of river beds significantly reduced by catchment-wide flooding. *Nature Geoscience*, 11(4), 251, 2018.
- Imhof, H. K., Wiesheu, A. C., Anger, P. M., Niessner, R., Ivleva, N. P., & Laforsch, C. Variation in plastic abundance at different lake beach zones-A case study. *Science of the Total Environment*, v. 613, p. 530–537, 2018.
- ISO 13320. Particle size analysis—Laser diffraction methods. Geneva: International Organization for Standardization (ISO). p. 59, 2020.

- Kaposi, K., Mos, B., Kelaher, B.P., Dworjanyn, S.A. Ingestion of microplastic has limited impact on a marine larva. *Environmental Science & Technology*. 48, 1638–1645, 2014.
- Kim, Y-J, Osako, M.; Sakai, S-I. Leaching characteristics of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) from flameretardant plastics. *Chemosphere*, v. 65, p. 506–513, 2006.
- Laitano, K., Gonçalves, C. & Resgalla Jr, C. Viabilidade do uso da bolacha-do-mar *Mellita quinquiesperforata* como organismo teste. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol*, 3, 9-14. 2008.
- Lei, K., Qiao, F., Liu, Q., Wei, Z., Qi, H., Cui, S., Yue, X., Deng, Y., An, L. Microplastics releasing from personal care and cosmetic products in China. *Marine Pollution Bulletin*, v. 123, p. 122-126, 2017.
- Leslie, H. A., Brandsma, S. H., Van Velzen, M. J. M., & Vethaak, A. D. Microplastics en route: Field measurements in the Dutch river delta and Amsterdam canals, wastewater treatment plants, North Sea sediments and biota. *Environment International*, v. 101, p. 133–142, 2017.
- Li, H., & Zhang, S. Functions of vitellogenin in eggs. In *Oocytes*. Springer, Cham, pp.389-40, 2017.
- Li, J.; Lusher, A.; Rotchell, J.M.; Company, S.D., Turra, A., Bråte, I.L.N., Sun, C., Shahadat Hossain, M., Li, Q., Kolandhasamy, P., Shi, H., Using mussel as a global bioindicator of coastal microplastic pollution. *Environmental Pollution* 244; p 522-533, 2018.
- Li, J.; Liu, H.; Chen, J.P. Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. *Water Research*, v. 137, p. 362–374, 2018.
- Lucio, F. T., Magnoni, D. M., Vicentini, V. E. P., Conte, H. Disponibilidade e Influência dos Microplásticos nos Seres Vivos e Ambiente: Uma revisão. *Conexão Ci.*, v. 14, p. 47-55, 2019.
- Lusher, A.L., Hurley, R., Vogelsang, C., Nizzetto, L. & Olsen, M Mapping microplastics in sludge, Norwegian Institute for Water Research. NIVA-report, 7215, 2017.
- Marchini, S., Tosato, M. L., Norberg-King, T. J., Hammermeister, D. E., Hoglund, M. D. Lethal and sublethal toxicity of benzene derivatives to the fathead minnow, using a short-term test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 11(2), p. 187–195, 1992.
- Marquez-Sillero, E. Aguilera-Herrador, S. Cardenas, M. Valcarcel Determination of parabens in cosmetic products using multi-walled carbon nanotubes as solid phase extraction sorbent and corona charged aerosol detection system *J. Chromatogr. A*, v. 1217, pp. 1-6, 2010.
- Martínez-Gómez, C., León, V. M., Calles, S., Gomáriz-Olcina, M., Vethaak, A.D., The adverse effects of virgin microplastics on the fertilization and larval development of sea urchins. *Marine Environmental Research*, 2017.
- Matsui, K.; Ishimura, T.; Mattonai, M.; Iwai, I.; Watanabe, A.; Teramae, N.; Ohtani, H.; Watanabe, C. Identification algorithm for polymer mixtures based on Py-GC/MS

- and its application for microplastic analysis in environmental samples. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 149, 1-9, 2020.
- Mello, L.C., Fonseca, T.G., Abessa, D.M.S. Using toxicity tests with embryos of *Mellita quinquiesperforata* in the ecotoxicological assessment of chemotherapeutic agents. *Marine Pollution Bulletin*, v. 159, 2020.
- Mutsuga, M.; Kawamura, Y.; Sugita-Konishi, Y.; Hara-Kudo, Y.; Takatori, K.; Tanamoto, K. Migration of formaldehyde and acetaldehyde into mineral water in polyethylene terephthalate (PET) bottles. *Food Additives & Contaminants*, v. 23, p. 212–218, 2006.
- Nascimento, I.A., Sousa, E.C.P.M., Nipper, M. Métodos em Ecotoxicologia Marinha—Aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria Ltda, 2002.
- Oberbeckmann, S., Loeder, M.G., Gerds, G., Osborn, A.M. Spatial and seasonal variation in diversity and structure of microbial biofilms on marine plastics in northern European waters. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 90 (2), p. 478–492, 2014.
- Rios Mendoza, L.M., Balcer, M. Microplastics in freshwater environments: a review of quantification assessment. *TrAC Trends Anal. Chem.*, v. 113, p. 402–408, 2019.
- Rochman, C.S.; Kross, S.M.; Armstrong, J.B; Bogan, M.T.; Darling, E. S.; Green, S.J.; Ashley, R.S. e Veríssimo, D. Scientific Evidence Supports a Ban on Microbeads. *Environmental Science & Technology*, v. 49, p. 10759–10761, 2015.
- Rochman, C. M. Microplastics research—From sink to source. *Science*, 360(6384), 28–29., 2018.
- Sarmah, R., Kanta Bhagabati, S., Dutta, R., Nath, D., Pokhrel, H., Mudoj, L. P., Sarmah, N., Sarma, J., Ahmed, A.M., Nath, L.P., Ingtipi, L., Kuotsu, K. Toxicity of a synthetic phenolic antioxidant, butyl hydroxytoluene (BHT), in vertebrate model zebrafish embryo (*Danio rerio*). *Aquaculture Research*, 00:1, p. 8, 2020.
- Tagg, A.S.; Ivar Do Sul, J.A. Is this your glitter? An overlooked but potentially environmentally-valuable microplastic. *Marine Pollution Bulletin*, v. 146, n. June, p. 50–53, 2019.
- Thompson, R.C.; Swan, S.H.; Moore, C.J.; vom Saal, F.S.. Our plastic age. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 1973–1976, 2009.
- Tsuge, S., H. Ohtani, C. Watanabe, Part 2 – Pyrograms and thermograms of 163 high polymers, and MS data of the major pyrolyzates, in: S. Tsuge, H. Ohtani, C. Watanabe (Eds), *Pyrolysis-GC/MS data book of synthetic polymers*, Elsevier, pp. 7-386, 2011.
- Tønning, K.; Jacobsen, E.; Pedersen, E.; Nilsson, N.H. Phthalates in products that children are in direct contact with. Survey of chemical substances in consumer products, n° 109210. Danish Ministry of the Environment and EPA, 2010.
- United States Pharmacopeia - USP. General Chapters. Laser Light Diffraction Measurement of Particle Size. 35. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention. 2012. Cap. 429. 161-165. Official monographs, *Efavirenz*. 35. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention.: 3010-3013, 2012.
- Vernoud, L.; Bechtel, H.A.; Martin, M.C.; Reffner, J.A.; Blackledge, R.D. Characterization of multilayered glitters particles using synchrotron FT-IR microscopy. *Forensic Science International*, v. 201, 47-51, 2011.

- Wellner, K. Inducing Fertilization and Development in Sand Dollars. Arizona State University. School of Life Sciences. Center for Biology and Society. Embryo Project Encyclopedia, 2012.
- Xu, S.; Ma, J.; Ji, R.; Pan, K.; Miao A.I. Microplastics in aquatic environments: occurrence, accumulation, and biological effects. *Science of the Total Environment*, v. 703, p. 134699, 2019.
- Yang, X., Sun, Z., Wang, W., Zhou, Q., Shi, G., Wei, F., & Jiang, G. Developmental toxicity of synthetic phenolic antioxidants to the early life stage of zebrafish. *Science of the Total Environment*, v. 643, p. 559–568, 2019.
- Yurtsever, M. Glitters as a Source of Primary Microplastics: An Approach to Environmental Responsibility and Ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, v. 32, n. 3, p. 459–478, 2019a.
- Yurtsever, M. Tiny, shiny, and colorful microplastics: Are regular glitters a significant source of microplastics? *Marine Pollution Bulletin*, v. 146, p. 678-682, 2019b.
- Zellner, M.M.S.; Quarino, L. Differentiation of twenty-one glitter lip-glosses by Pyrolysis Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. *Journal of Forensic Sciences*, 54(5), 1022-1028, 2009.

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**APRESENTAÇÃO REMOTA****Discente:** LETÍCIA ALBANIT FRANÇA**Título:** "Avaliação Ecotoxicológica de Microplásticos: Toxicidade do Glitter sobre Embriões de Bolacha do Mar Mellita quinquesperforata"**Orientador:** Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa**Curso/Habilitação:** Bacharelado em Ciências Biológicas/ Gerenciamento Costeiro

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa	APROVADA
MSC. Caio Rodrigues Nobre	APROVADA

CONCEITO FINAL:

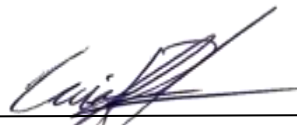
A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente **Letícia Albanit França** obteve o seguinte conceito:

 APROVADO REPROVADO

São Vicente, 01 de fevereiro de 2022.



Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa
(Orientador)



MSc. Caio Rodrigues Nobre