



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



Avaliação da toxicidade das misturas de cobre, zinco e microplástico no desenvolvimento embrio-larval de ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*.

Vitória Nogueira Soares

São Vicente
2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA ‘JÚLIO DE MESQUITA FILHO’

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS DO LITORAL PAULISTA

Vitória Nogueira Soares

Avaliação da toxicidade das misturas de cobre, zinco e microplástico no desenvolvimento embrio-larval de ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*.

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 Biologia Marinha.

Orientador: Dr. Caio Cesar Ribeiro
Coorientador: Dr. Denis Moledo de Souza Abessa

São Vicente
2023

S676

Soares, Vitória Nogueira

Avaliação da toxicidade das misturas de cobre, zinco e microplástico no desenvolvimento embrio-larval de ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*. / Vitória Nogueira Soares. -- São Vicente, 2023

34 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente

Orientador: Caio Cesar Ribeiro

Coorientador: Denis Moledo de Souza Abessa

1. Ecotoxicologia. 2. Resíduos plásticos. 3. Metais. 4. Misturas. 5. *Echinometra*

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.

Avaliação da toxicidade das misturas de cobre, zinco e microplástico no desenvolvimento embrio-larval de ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*.

RESUMO

Metais são elementos indestrutíveis que são facilmente bioacumulados e induzem efeitos agudos e crônicos na biota. A presença de diversos metais na água pode acarretar em efeitos aditivos, sinérgicos e antagônicos tóxicos para a biota. Metais em ambientes aquáticos sempre ocorrem em misturas, porém os padrões e critérios para a qualidade da água comumente consideram somente sua ocorrência de forma isolada. Por isso, é necessário conduzir estudos para determinar se os valores legais são adequados para proteger a biota brasileira e gerar dados para subsidiar uma possível revisão da legislação. Este estudo avaliou a toxicidade do cobre (Cu) e do zinco (Zn) isoladamente, combinados e em associação com microplásticos, considerando o desenvolvimento embrionário do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*. Para cada concentração (i.e., concentrações de Cu e Zn isoladamente, e misturas de CuZn com e sem microplásticos) quatro réplicas foram feitas, além de um controle negativo. As concentrações teste foram definidas com base em testes preliminares e foi realizado um teste para a garantia que os microplásticos não apresentam toxicidade de forma isolada. Depois de aproximadamente 36-42 h, os embriões foram contados sob o microscópio óptico para a análise da taxa de desenvolvimento normal. Os resultados foram analisados utilizando o software R-Studio para determinar a concentração efetiva a 50% dos organismos (CE50). Foi testada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk e a sua homocedasticidade pelo teste de Levene. Em seguida, foi utilizada análise de variâncias (ANOVA) seguida de comparação múltipla de Tukey para a determinação das concentrações de efeito observado (CEO) e não observado (CENO). Os resultados mostraram que a toxicidade dos metais isolados é menor quando comparada com a mistura, e as CE_{50-36h} foram 0,061 mg/L para o Cu, 0,060 mg/L para o Zn e 0,031 mg/L para o CuZn, indicando um possível efeito aditivo. Para a mistura de metais e microplásticos, o resultado do CE_{50-36h} foi de 0,021 mg/L, indicando que a presença de microplásticos potencializou o efeito tóxico dos metais. Por sua

vez, as A CEO para ambas as misturas (CuZn com e sem microplásticos) foram de 0,004 mg/L, enquanto

para o Zn e o Cu isoladamente, esses valores foram de 0,01 mg/L e 0,05 mg/L, estando todos os valores, menos o da CEO do Cu, acima dos valores máximos estabelecidos pela legislação, indicando que uma revisão é necessária.

Palavras-chaves: metais, resíduos plásticos; misturas; ecotoxicologia;

**Evaluation of the toxicity of copper, zinc, and microplastic mixtures
on the embryo-larval development of the sea urchin *Echinometra
lucunter*.**

5

ABSTRACT

Metals are indestructible elements that are easily bioaccumulated and induce acute and chronic effects on biota, and their mixtures in the water can lead to additive, synergistic, and antagonistic toxic effects to the biota. Metals in aquatic environments always occur in mixtures, but standards and criteria for water quality have been established only for single elements. Thus, it is necessary to conduct studies to determine whether the legal values are adequate to protect the national biota and to generate data to support a possible revision of Brazilian legislation. This study evaluated the toxicity of copper (Cu) and zinc (Zn) metals alone, combined, and in association with microplastics, considering the embryo-larval development of the sea urchin *Echinometra lucunter*. For each treatment (i.e. Cu and Zn alone, , and the CuZn mixtures with and without microplastics), four replicates were prepared, plus a negative control. The test concentrations were defined from preliminary tests and an additional test was made to ensure that the microplastics would not be toxic without the metal association. After approximately 36-42 h, the embryos were counted under the microscope to assess normal development rates. The results were analyzed using the R-Studio software to determine the effective concentrations to 50% organisms (EC50). Data were checked for Normality by the Shapiro-Wilk test and homoscedasticity by the Levene test. ANOVA, followed by the Tukey test, was used to determine the low observed effect concentration (LOEC) and no observed effect concentration (NOEC). The toxicity of single was lower when compared to their mixture, and the EC_{50-36h} vales were 0.061 mg/L for Cu, 0.060 mg/L for Zn, and 0.031 mg/L for CuZn, indicating a possible additive effect. For the mixture of metals and microplastics, the EC_{50-36h} was 0.021 mg/L, indicating that the presence of microplastics likely potentiated the toxic effect of metals. The LOECs of both mixtures were 0.004 mg/L, while for Zn and Cu the LOECs were 0.01 mg/L and Cu, 0.05 mg/L, respectively. These values (except for the LOECs of Cu) were greater than the standard values for metallic ions according to CONAMA, indicating that a revision of the legislation is needed.

Keywords: metals, plastic waste, mixtures; ecotoxicology;

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores limite de íons metálicos para qualidade da água, órgãos internacionais e para águas salinas de classe 1 segundo a Resolução CONAMA 357/05, com destaque para os metais estudados Cobre e Zinco. **18**

Tabela 2. Valores das concentrações definitivas para Zn, Cu, CuZn e CuZn+M

22

Tabela 3. Taxa de desenvolvimento normal das larvas expostas aos microplásticos na concentração de 1000 mg/L.

26

Tabela 4. Valores encontrados para o CE50%-36h (mg/L) e da CEO 36h(mg/L), com destaque para os valores menores que os limites da Resolução CONAMA 357/05.

27

Lista de figuras

Figura 1. Espécimes de *E. lucunter*. **20**

Figura 2. Larva pluteus de *E. lucunter*. **20**

Figura 3. Fêmea de *Echinometra lucunter* liberando gametas alaranjados (esquerda) e macho liberando gametas esbranquiçados (direita). **23**

Figura 4. Fêmea de *Echinometra lucunter* liberando óvulos de cor laranja.

24

Figura 6: Larvas pluteus anormais (ao redor) e larva normal (centro) de *Echinometra lucunter*.

25

Figura 7: Gráfico com os valores de CE50%-36h para o zinco (Zn), o cobre (Cu), o cobre e zinco (CuZn), e o cobre, zinco e microplásticos (CuZn+MP), sendo que o eixo x representa as concentrações e o eixo y a normalidade dos embriões de *Echinometra lucunter*.

27

Índice

1. Introdução 11

1.1 Poluição aquática e ecotoxicologia 11

1.2 Metais 12

1.3 Microplásticos 1

4 1.4 Legislação ambiental 15

1.5 Echinometra lucunter 17

2. Objetivos 18

2.2 Objetivos específicos 19

3. Materiais e Métodos 19

3.1 Preparo das concentrações 19

3.2 Preparo dos embriões 20

4. Resultados 23

5. Discussão 25

4. Referências Bibliográficas 30

1. Introdução

1.1 Poluição aquática e ecotoxicologia

Contaminantes são substâncias liberadas devido às atividades humanas de cunho industrial, doméstico e agrícola. Quando esses contaminantes possuem efeitos deletérios em organismos vivos, eles são considerados poluentes (Moriarty, 1999). Os contaminantes presentes no ambiente podem ser absorvidos pela biota, que sofre efeitos fisiológicos e bioquímicos causados por esses compostos nas suas células e tecidos. Esses efeitos podem incluir interferência na produção de ATP, comprometimento na síntese e liberação de hormônios, redução da velocidade de crescimento dos organismos, aumento ou diminuição da excreção, distúrbios respiratórios e metabólicos e alterações enzimáticas (Connel & Miller, 1984).

A crescente industrialização e urbanização decorrente do desenvolvimento econômico e crescimento populacional, observada principalmente após a Revolução Industrial, trouxe inúmeros benefícios para a humanidade, porém com eles também vieram inquestionáveis danos ao meio ambiente devido ao uso abusivo de recursos naturais e a dispersão desenfreada de contaminantes que atingem os ecossistemas (Connel, 2009).

A poluição de corpos hídricos e do solo ocorre quando o descarte ou disposição final de resíduos é feita de forma inadequada, afetando assim o meio ambiente e a biota aquática. Diversas substâncias químicas podem ser arrastadas pela água, solubilizadas ou acumuladas no sedimento (Connel, 2009). Isso ocorre principalmente devido ao lançamento de dejetos nos corpos hídricos, devido a falhas no tratamento de efluentes industriais ou domésticos, no contato de agrotóxicos e produtos químicos com os lençóis freáticos, o lançamento indevido de resíduos oriundos da aquicultura, na mineração indevida ou desenfreada em calhas de rios, na ausência de alternativas sustentáveis para o descarte de substâncias como os aterros e lixões e a falta ou ineficiência de programas de educação ambiental, assim como a criação de leis ou maior fiscalização a respeito dos recursos hídricos (Knie & Lopes, 2004).

A Ecotoxicologia é uma ciência que surgiu da necessidade de avaliar os efeitos ecológicos que os produtos químicos utilizados pela humanidade

acarretam nos ecossistemas naturais (Moriarty, 1999). O termo ecotoxicologia surgiu pela primeira vez em junho de 1969 em Estocolmo, sugerido pelo toxicologista René Truhaut e é definida por ele como a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações ou comunidades em seus ecossistemas, incluindo as formas de transporte dessas substâncias e suas interações com o ambiente (Moriarty, 1999; Hoffman, 2002; Connel, 2009). Na prática a ecotoxicologia pode ser utilizada para o estabelecimento de critérios e padrões de qualidade de águas, no controle de qualidade de efluentes, na caracterização de resíduos sólidos, sedimentos e solos e no registro de produtos químicos (Connel, 2009).

Em geral, a toxicidade das substâncias é quantificada por meio de ensaios (ou testes) ecotoxicológicos, que consistem na exposição de organismos pré-selecionados a amostras contendo os contaminantes em questão, sob condições controladas, sendo observadas as respostas apresentadas pelos organismos. Os ensaios ecotoxicológicos podem ser classificados como de toxicidade aguda ou crônica. O teste de toxicidade aguda avalia os efeitos rápidos sofridos pelos organismos expostos ao agente potencialmente tóxico, geralmente em um período de até 96h, enquanto o teste de toxicidade crônica avalia os efeitos adversos das amostras sob um longo período de exposição, onde os organismos-teste são expostos durante todo seu ciclo de vida (Knie & Lopes, 2004).

1.2 Metais

Os metais ocorrem naturalmente na superfície terrestre, porém muitos deles possuem uma ampla utilização no ramo industrial e tecnológico, estando presentes em automóveis, utensílios domésticos, embalagens, tintas, abrasivos, cimentos, explosivos, projéteis de armas de fogo, aditivos na gasolina, corantes, fios elétricos, produtos farmacêuticos e cosméticos, entre outros, o que contribui para sua ampla distribuição no ambiente. Outras fontes importantes de metais são os esgotos domésticos, as tintas anti-incrustantes, o petróleo, e as atividades de mineração (Branco, 2008). O zinco (Zn) é muito utilizado na indústria de construção civil, automobilística e de eletrodomésticos, na fabricação de ligas resistentes à

corrosão e na galvanização de produtos de ferro e aço. O mineral mais comum de Zn é o sulfeto de zinco esfalerito (ZnS). Outros minerais comuns de Zn são a willemita (Zn_2SiO_4), o silicato mais comum, óxidos, como a zincita (ZnO) e a franklinita ($ZnFe_2O_4$). Os óxidos de zinco são utilizados nas indústrias de cerâmica, para borrachas e tintas, e o sulfato de zinco possui aplicação na indústria têxtil e no enriquecimento do solo. O cloreto de zinco é utilizado

para preservar madeiras e composição de tintas. Outros compostos também podem ser utilizados na indústria farmacêutica, como para a fabricação de filtros solares, desodorantes, tratamento de micoses, acne e caspa (CETESB, 2017). O zinco é um elemento necessário para o organismo em pequenas quantidades, participando da divisão celular, expressão genética, processos fisiológicos como crescimento e desenvolvimento, na transcrição genética, na morte celular, agindo como estabilizador de estruturas de membranas e componentes celulares, além de participar da função imune e desenvolvimento cognitivo (Mafrá, 2004). Por outro lado, a deficiência de Zn pode causar falta de apetite, diminuição do paladar e olfato, doenças imunológicas, cicatrização lenta, retardo no crescimento e dermatite. A contaminação por Zn pode ocorrer de diversas formas no corpo humano, como por inalação, pela absorção cutânea ou ingestão de quantidades tóxicas do metal. A inalação já foi relacionada a problemas respiratórios como a chamada “*metal fume fever*”, que causa sintomas como calafrios, náuseas, sudorese, vômito e dor nas articulações. A ingestão de quantidades tóxicas de Zn pode causar efeitos gastrointestinais como dores abdominais, vômitos, diarreias e náuseas (Plum, 2010).

O cobre (Cu) é um metal maleável muito utilizado na fabricação de moedas, fios elétricos, tubulações e encanamentos de água quente, e em combinação com outros metais para a produção de ligas e chapas metálicas. A calcopirita ($CuFeS_2$) é o mineral de Cu mais comum, seguido pela calcocita (Cu_2S) e a bornita (Cu_5FeS_4). Os compostos de Cu são usados na agricultura, no tratamento da água para controle de algas (sulfato de cobre pentahidratado), na preservação de madeira, couro e tecido e como aditivo em alimentos (CETESB, 2022). O Cu é um elemento essencial aos organismos vivos em pequenas quantidades, porém em humanos, a ingestão de água contendo altas concentrações do metal pode induzir náuseas,

vômitos, dores abdominais e diarreias e a sua inalação pode causar irritação no nariz, na boca e nos olhos, cefaléia, náusea, vertigem e diarreia (CETESB, 2022).

No século XX, os óxidos de Cu e Zn foram os primeiros biocidas utilizados regularmente nas tintas anti incrustantes, porém devido aos riscos à saúde pública e aos problemas ambientais, além da baixa efetividade, já que possuíam uma garantia de funcionamento de aproximadamente um ano, começaram a ser substituídos por compostos organoestânicos (Castro, 2011). As tintas modernas de terceira geração utilizam biocidas na composição, que incluem Cu e Zn na forma de óxidos,

13 nanopartículas ou piritiona de Cu e Zn (Bao, 2011; Shin, 2022). Em ecossistemas aquáticos os íons metálicos tendem a ser adsorvidos em partículas finas de sedimento e matéria orgânica, ou em organismos vivos (Livett, 1988).

Alguns metais são considerados essenciais para a fisiologia dos seres vivos (em baixas concentrações), porém, em quantidades que excedem a necessidade dos organismos podem induzir efeitos tóxicos (De Souza Beghelli, 2018). Outros metais, considerados não essenciais, já são extremamente tóxicos em baixas concentrações. Os metais são considerados contaminantes estáveis e persistentes, uma vez que são dificilmente degradados, além de possuírem capacidade bioacumulativa (Goretti, 2016) e de biomagnificação, no caso do Hg e do metalóide Se (Cardwell, 2013).

Organismos aquáticos, como peixes e invertebrados, podem absorver metais diretamente da água contaminada ou por meio da alimentação, estando expostos a diversos efeitos tóxicos, como redução e atraso do crescimento, aumento de anomalias e genotoxicidade, redução da sobrevivência, e extinção de populações de peixes em reservatórios poluídos (Zagatto, 2008; Khayatzadeh, 2010).

A presença de diversos metais na água pode acarretar em efeitos aditivos, sinérgicos e antagônicos sobre a biota - efeitos aditivos são quando a toxicidade da mistura é igual à soma das toxicidades individuais dos componentes, enquanto um efeito antagônico é caracterizado como uma toxicidade menor do que a soma das toxicidades individuais, indicando que

a interação entre eles diminui sua toxicidade. Já no efeito sinérgico a toxicidade da mistura é maior que a soma das toxicidades individuais, indicando que houve uma potencialização do efeito (Roberts, 2022). Os metais em ambientes aquáticos sempre ocorrem em forma de misturas, mas os padrões e critérios para qualidade da água comumente são desenvolvidos como se eles ocorressem de forma isolada (Mebane, 2020).

1.3 Microplásticos

Outro poluente que tem se mostrado uma preocupação ambiental de alta prioridade são os microplásticos (MPs) e sua presença no ambiente marinho tem aumentado consideravelmente (Ivar do Sul, 2014; Orona-Návar, 2022). Os MPs já são considerados onipresentes (Pastor, 2021; Wu, 2021), visto que foram encontrados microplásticos em sedimentos de zonas abissais do oceano, de 1000 à 5000 metros de profundidade (Cauwenberghe, 2013).

14

Microplásticos são polímeros de tamanho entre 1 μm –5 mm (Frias and Nash, 2019), que podem se originar da degradação de plásticos maiores devido a intempéries físicas e químicas (MP secundários), ou então produzidos intencionalmente para a sua utilização como matéria-prima para outros produtos, sendo então considerados MPs primários (Chaudhry, 2021). Seu uso pode ser direto em diversos tipos de cosméticos, como sabonetes, xampus, desodorantes, cremes dentais, esfoliantes, hidratantes, cremes de barbear, protetores solares, máscaras de limpeza facial e maquiagens (Bhattacharya, 2016) e na indústria têxtil para a produção de tecidos sintéticos, como o poliéster (Carney, 2018). O glitter também é um exemplo de MP de primário com grande potencial poluidor, porém ainda pouco estudado na comunidade científica (Tagg & Ivar do Sul, 2019).

Os MPs podem ser encontrados em diversos níveis da teia trófica, e apresentam a capacidade de bioacumulação e de induzir diversos efeitos na saúde tanto de animais aquáticos quanto de seres humanos (Chaudhry, 2021). Essas partículas, quando ingeridas por organismos aquáticos, podem causar danos, como bloqueio no trato digestivo, lesões internas e externas (Wright, 2013), assim como problemas na reprodução, crescimento e sobrevivência de diversas espécies, também influencia processos

importantes para o ecossistema associados aos ciclos biogeoquímicos, como através das atividades fotossintetizantes e calcificação de corais (Raju, 2022).

Em ambientes aquáticos os MPs têm a capacidade de se acumular no sedimento e de adsorver contaminantes orgânicos e inorgânicos, como metais pesados, toxinas e Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), contribuindo para a ampla disseminação desses compostos (Rodrigues, 2019, Chaudhry, 2021).

Diversos estudos apontam que MPs podem conter quantidades variadas de metais em sua composição, que podem tanto ser adsorvidos do ambiente ou provenientes de compostos organometálicos advindos da sua fabricação, que são adicionados para otimizar suas propriedades e custos de produção, indicando que essas partículas plásticas podem atuar como importantes vetores de metais em ecossistemas aquáticos (Brennecke, 2016; Kutralam-Muniasamy, 2021).

1.4 Legislação ambiental

Atualmente, no Brasil, a Resolução CONAMA N° 357/05 dispõe sobre a classificação dos corpos de água e dá diretrizes ambientais para o seu enquadramento,

15
bem como estabelece padrões de lançamento de efluentes (Tabela 1) entre outras providências. No entanto, essa resolução não trata da contaminação por MPs, inexistindo legislação nacional específica para esse tipo de contaminante nos corpos hídricos.

Tabela 1 - Valores limite de íons metálicos para qualidade da água, órgãos internacionais e para águas salinas de classe 1 segundo a Resolução CONAMA 357/05, com destaque para os metais estudados Cobre e Zinco.

mg/L				
Metais	U.S. EPA	EEC	Guidelines	CONAMA 357/05
Ag	0,05	0,01	-	0,005
Al	-	0,2	0,2	1,5
As	-	0,2	0,05	-
Ba	1	1	-	1
Cd	0,01	0,005	0,005	0,005
Cr	0,05	0,05	0,05	0,05
Cu	1	-	1	0,005
Fe	0,3	0,2	0,3	0,3
Mn	0,1	0,05	0,1	0,1
Ni	0,05	0,05	0,05	0,025
Pb	0,05	0,05	0,05	-
Zn	5	5	5	0,09

Fonte: ¹USEPA, Federal Register 40. National Primary Drinking Water Regulations, 1975.

²Official Journal European Communities N° L229, pp, 11-28, 1990.

³Guidelines for drinking water quality in Australia. National Health and Medical Research Council and Australian Water Resources Council, 1987.

4. Adaptado e modificado da Resolução CONAMA 357/05.

As diretrizes da legislação CONAMA N° 357/05 foram baseadas majoritariamente em legislações internacionais, como dos órgãos ambientais americanos (USEPA) e canadenses (Environment Canada) (Tabela 2), que foram estabelecidas a partir de ensaios ecotoxicológicos provenientes de clima Temperado, com espécies que não se aplicam totalmente para regiões de clima Tropical e Subtropical (FDEP, 1994; Long et al., 1995; Environment Canada, 2002). Da mesma forma, a legislação ambiental no Brasil que trata dos padrões e condições para qualidade da

água e lançamento de efluentes falha no que se diz respeito a levar em consideração as modificações que os metais podem sofrer de acordo com as propriedades físico químicas da água, que podem variar de acordo com o clima da região, assim como os efeitos de mistura de substâncias que podem potencializar ou diminuir sua toxicidade.

1.5 Echinometra lucunter

A classe Echinoidea possui cerca de 950 espécies e engloba os ouriços-do-mar e bolachas-de-praia, animais essencialmente marinhos e bentônicos (Brusca & Brusca & Brusca, 2019).

A espécie *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) (Figura 1) é um ouriço-do-mar da família Echinometridae, conhecido popularmente como pinaúna ou pindá, muito abundante na costa do Brasil (Carneiro, 2006), e sua cor varia do preto ao roxo. Possuem corpo globoso e simetria radial, carapaça rígida formada por placas esqueléticas e espinhos móveis com tamanhos variados. Alimentam-se de uma variedade de algas macrófitas, esponjas, microcrustáceos e corais (Carneiro, 2008).

Esses animais têm um importante aparelho mastigador interno, denominado “lanterna de Aristóteles”, utilizado pelos ouriços-do-mar para raspar algas e matéria orgânica do substrato. São animais dioicos, com a gametogênese regulada por fotoperíodo, e suas larvas são denominadas de pluteus (Figura 2) (Brusca & Brusca, 2019).



Figura 1: Espécimes de *E. lucunter*



Figura 2: Larva pluteus de *Echinometra lucunter*.

Habitam águas temperadas e tropicais do oceano Atlântico, desde a costa leste dos Estados Unidos (Carolina do Norte) até o sul do Brasil (Florianópolis), assim como em regiões costeiras de algumas ilhas, como Antilhas, Bermudas, Ascensão, Santa Helena, geralmente ocorrendo em águas rasas de até 45 metros de profundidade. São frequentemente encontrados entre rochas, em regiões de mar calmo ou batido, e predominantes em ambientes expostos a águas turbulentas (Carneiro, 2008). É um recurso pesqueiro de alto valor econômico, especialmente no mercado internacional, utilizado na alimentação (através de suas gônadas) e no artesanato (Zilia, 2021).

2. Objetivos

Considerando que tanto os metais quanto os MPs são contaminantes de

grande interesse para a comunidade científica, além da sua capacidade de acumular no ambiente marinho de forma conjunta, este trabalho tem como objetivo analisar a toxicidade do Cu e do Zn em associação com os MPs. Além disso, serão analisadas a toxicidade desses metais de forma isolada e conjunta, sendo possível averiguar possíveis efeitos aditivos, antagônicos e sinérgicos, e comparar os dados com as concentrações máximas para íons metálicos presentes na Resolução CONAMA N° 357/05.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a interação entre o cobre e o zinco quando expostos de forma conjunta em testes de toxicidade em embriões do ouriço-do-mar *E. lucunter*.
- Verificar se os valores limite da resolução CONAMA 357 para águas salinas de classe 1 em relação a metais causam efeito tóxico no desenvolvimento larval do ouriço do-mar *E. lucunter*.
- Avaliar a interação entre o cobre e o zinco na presença de microplásticos nos testes de toxicidade com embriões de *E. lucunter*.

3. Materiais e Métodos

3.1 Preparo das concentrações

Foram realizados testes preliminares para a determinação de uma faixa de concentração próxima ao da concentração efetiva a 50% das larvas testadas após o período de 36h de exposição (CE_{50-36h}), e através deles foram determinadas as concentrações definitivas que estão expressas na tabela 4.

Para cada concentração de cada metal (Cu e Zn), assim como para a mistura dos metais sem (CuZn) e com microplástico (CuZn+MP), foram feitas 4 réplicas em solução de água reconstituída (salinidade 35) e uma solução controle (água do mar artificial reconstituída). Foi separado um frasco teste para a medição dos parâmetros físico químicos da água, que foram salinidade, pH e teor de oxigênio dissolvido. Tais parâmetros foram salinidade 33, pH entre 7,9 e 8,1 e oxigenação entre 4,6 e 5,9 mg/L O₂, que foram medidos no começo e no final do experimento. Para o preparo das concentrações foram utilizadas soluções padrão MERCK

100 mg/L de Cu e Zn diluídas de forma seriada em água reconstituída visando obter as concentrações expressas na tabela (Tabela 2). Para a mistura dos metais, foi utilizada a mesma concentração de Cu e de Zn.

Tabela 2: Valores das concentrações definitivas para Zn, Cu, CuZn e CuZn+MP.

mg/L			
Zn	Cu	CuZn	CuZn + MP
0	0	0	0
0,01	0,05	0,004	0,004
0,1	0,1	0,008	0,008
1	1	0,016	0,016
2,5	2,5	0,032	0,032
5	5	0,064	0,064
		0,128	0,128

Para os testes com metais e microplástico, primeiramente foi realizado um teste preliminar para averiguar se os microplásticos não apresentam toxicidade de forma isolada. Para isso foram adicionados em tubos de ensaio microplásticos do tipo polipropileno com aditivos, polipropileno sem aditivos, poliestireno e polietileno na concentração de 1000 mg/L, concentração avaliada em Tunalí et al. (2020), que foi pesada em balança de precisão analítica. Posteriormente foram adicionados os embriões e água reconstituída. Para a mistura de metais e microplástico, foram adicionados 10 ml da solução de metais em cada tubo, os microplásticos na concentração de 1000 mg/L e os embriões.

3.2 Preparo dos embriões

Para a realização dos ensaios ecotoxicológicos de desenvolvimento larval com ovos de *E. lucunter* foi utilizado o protocolo experimental descrito pela Norma Técnica NBR 15350 (ABNT, 2012), que descreve testes de desenvolvimento embrionário com ouriços do mar. Para a realização dos experimentos foram coletados exemplares adultos do ouriço-do-mar *E. lucunter* na Ilha das Palmas, em Santos/SP. A liberação dos gametas foi estimulada por meio da injeção de

aproximadamente 0,5 ml de uma solução de cloreto de potássio 0,5 M (KCl) na superfície oral dos indivíduos. Para a garantia de uma maior variabilidade genética foram obtidos gametas de, no mínimo, 3 machos e 3 fêmeas. Os gametas femininos foram identificados pela cor laranja e os gametas masculinos pela cor esbranquiçada e leitosa (Figura 3).

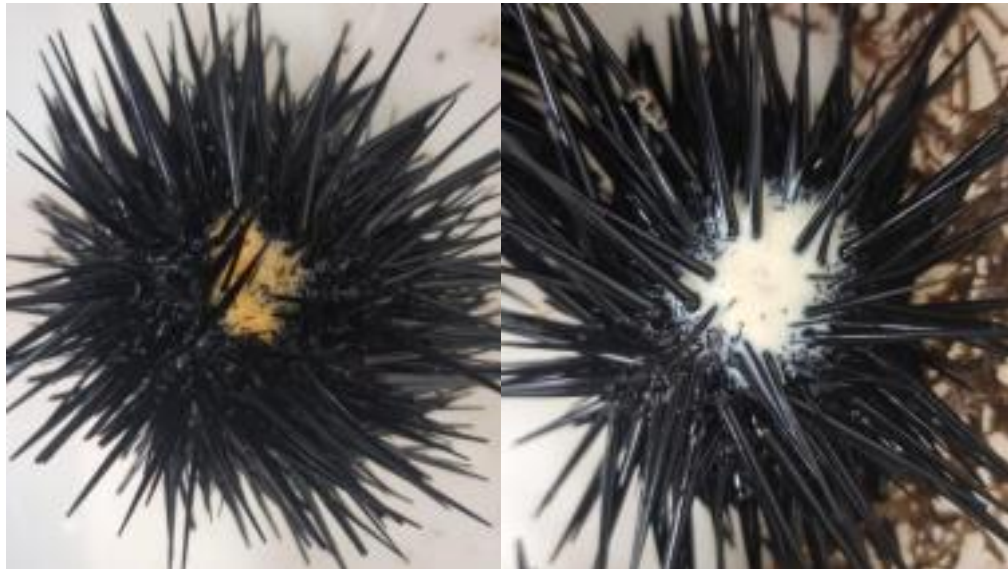


Figura 3: Fêmea de *Echinometra lucunter* liberando gametas alaranjados (esquerda) e macho liberando gametas esbranquiçados (direita).

Para a coleta dos óvulos as fêmeas foram mantidas apoiadas com a superfície aboral voltada para baixo em béqueres contendo água do mar para que os gametas fossem depositados (Figura 4). Os espermatozoides foram coletados diretamente dos gonóporos com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* e separados em um béquer mantido sob o gelo para sua preservação, evitando que estes entrassem em atividade antes do início dos experimentos.



Figura 4: Fêmea de *Echinometra lucunter* liberando óvulos de cor laranja.

Antes da fecundação foi preparada uma solução espermática a partir de uma diluição de 0,5 mL de espermatozoides para 24,5 mL de água do mar, e os óvulos foram observados em microscópio para a identificação do estágio de maturação dos gametas e a presença de possíveis anomalias.

Para a fecundação *in vitro* foi realizada a transferência de 0,5 ml de solução de espermatozoides para 99,5 ml da solução de óvulos. A solução foi agitada por 10 minutos para permitir a fecundação, que foi confirmada pela visualização da membrana de fertilização no microscópio. Confirmada a fecundação mínima determinada, que deve ser maior que 70% em três sub-amostras de 1 mL (Laitano, 2015), frações da solução de ovos fecundados foram introduzidas nos tubos de ensaio, sendo que aproximadamente 400 ovos foram adicionados em cada réplica. O teste foi mantido em estufa sob condições controladas, sob fotoperíodo de 12h claro - 12h escuro e temperatura mantida em 25,5 °C por 36 h, para que o desenvolvimento larval dos organismos acontecesse sob as condições adequadas.

Após o tempo estipulado do experimento, os conteúdos das réplicas foram fixados pela adição de 0,5ml de uma solução tamponada de formaldeído a 10%. Foram feitas contagens dos 100 primeiros embriões em

câmaras de Sedgewick-Rafter em

microscópio óptico, identificando as larvas normais e anormais. As larvas anormais são aquelas que apresentam retardos no crescimento ou anomalias morfológicas (Figura 6).

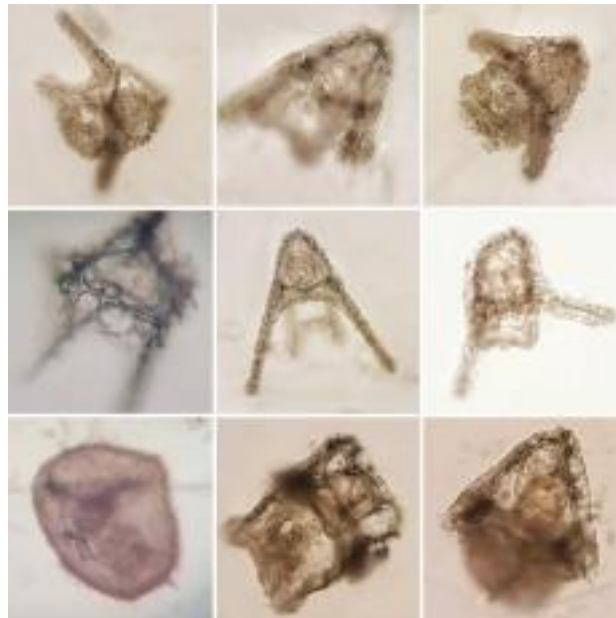


Figura 6: Larvas pluteus anormais (ao redor) e larva normal (centro) de *Echinometra lucunter*.

Os resultados foram planilhados e os dados foram analisados no software R Studio para determinação dos valores da concentração efetiva média a 50% dos organismos no intervalo de 36 h (CE50%-36h). Foi testada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk e a sua homocedasticidade pelo teste de Levene. Em seguida, foi utilizada análise de variâncias (ANOVA) seguida de comparação múltipla de Tukey para a determinação das concentrações de efeito observado (CEO), ou seja, a menor concentração em que se observou efeito significativo. Para todas as análises a menor concentração já foi a concentração de efeito observado, não sendo possível definir a concentração de efeito não observado (CENO – concentração mais alta sem efeito significativo).

4. Resultados

Os resultados mostraram que a toxicidade dos metais de forma

isolada são menores quando comparados com a mistura, sendo que a CE_{50-36h} para o cobre foi de 0,061 mg/L (0,057-0,07 mg/L), para o zinco de 0,060 mg/L (0,04-0,08 mg/L) e para o cobre e o zinco juntos 0,031 mg/L (0,0302-0,0333), indicando um possível efeito aditivo desses metais. O resultado do teste preliminar com microplásticos demonstrou uma taxa alta de desenvolvimento normal das larvas, o que demonstra que os microplásticos sozinhos não apresentam toxicidade (Tabela 4).

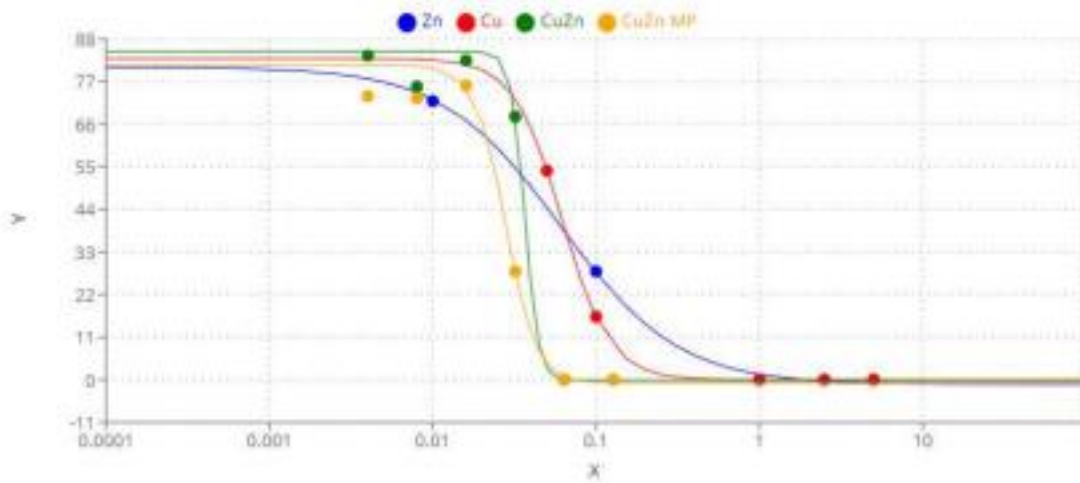
Tabela 3: Taxa de desenvolvimento normal das larvas expostas aos microplásticos na concentração de 1000 mg/L.

Microplásticos 1000 mg/L	Taxa de desenvolvimento normal (%)
R1	85
R2	86
R3	93
R4	87

Para a mistura dos metais com os microplásticos, o resultado da CE_{50-36h} foi de 0,021 mg/L (0,02077 - 0,0232), indicando que a presença dos microplásticos no tratamento causa uma potencialização do efeito tóxico dos metais. A CEO de ambas as misturas foi de 0,004 mg/L. Para o zinco a CEO foi de 0,01 mg/L e para o cobre de 0,05 mg/L (Tabela 4).

Tabela 4: Valores encontrados para o CE50%-36h (mg/L) e da CEO-36h(mg/L), com destaque para os valores menores que os limites da Resolução CONAMA 357/05.

Metais	CE50%-36h(mg/L)	Intervalo de confiança	CEO-36h(mg/L)
Cu	0,061	(0,057-0,07)	0,05
Zn	0,060	(0,04-0,08)	0,01
CuZn	0,03177	(0,0302-0,0333)	0,004
CuZn+MP	0,02199	(0,0207 - 0,0232)	0,004



X =
Concentrações
(mg/L)

Figura 7: Gráfico com os valores de CE50%-36h para o zinco (Zn), o cobre (Cu), o cobre e zinco (CuZn), e o cobre, zinco e microplásticos (CuZn+MP), sendo que o eixo x representa as concentrações e o eixo y a normalidade dos embriões de *Echinometra lucunter*,

5. Discussão

Comparando os resultados com outros estudos com Equinodermos de outras regiões, Rouchon et al. (2016) testou a sensibilidade dos embriões do ouriço-do-mar *Evechinus chloroticus*, espécie endêmica da Nova Zelândia, aos metais cobre e zinco isolados e em mistura. A toxicidade do Cu se mostrou maior para *E. chloroticus* que para *E. lucunter* neste estudo, com o CE_{50-72h} 0,0054 mg/L. Já o Zn teve uma menor toxicidade em comparação com a espécie brasileira, com a de a CE_{50-72h} de 0,0277 mg/L. A mistura de cobre e zinco teve um CE_{50-72h} de 0,0069 mg/L, apresentando um efeito aditivo baixo, porém com uma maior toxicidade que para *E. lucunter*. Por outro lado, Phillips et al. (2003) encontraram efeitos antagônicos para a mesma combinação de metais estudada (Cu+Zn) para o ouriço-do-mar da espécie *Strongylocentrotus purpuratus*, presente em ambientes de clima temperado, divergindo dos resultados presentes neste estudo.

Já em relação à legislação nacional para águas, a toxicidade de ambos os metais foi comparada com os valores máximos permitidos para íons metálicos de acordo com a Resolução CONAMA 357/05, e é possível observar que o CEO encontrado para o zinco neste estudo é de 0,01 mg/L e o CE_{50-72h} é de 0,060 mg/L, enquanto o valor máximo permitido para o zinco é de 0,09 mg/L, e ambos os valores ultrapassam a concentração que causa a anormalidade para a espécie nativa *E. lucunter*. O CE_{50-72h} e o CEO do Cu não ultrapassaram os limites da resolução, sendo o CEO 0,05 mg/L, o CE_{50-72h} 0,061 mg/L e o limite da resolução 0,005 mg/L. O valor encontrado do CEO para a mistura de cobre e zinco também é menor que os limites da CONAMA, sendo de 0,004 mg/L, o que é um fator que deve ser levado em consideração, já que os metais sempre são encontrados em misturas no ambiente. Isso indica que os valores legais não são seguros para esta espécie de ouriço-do-mar. Observa-se uma similaridade do que foi encontrado em outros estudos, onde os valores legais não são protetivos para a biota.

Messias et al. (2023) compararam seus resultados com a Resolução CONAMA 420/09, que dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo, e estabelece valores máximos aceitáveis para metais. Os resultados dos ensaios de toxicidade crônica com Cu e Zn em minhocas da espécie *Eisenia andrei* obtidos pelos autores foram menores que os valores-guia encontrados na resolução, indicando que os valores limites de Cu e Zn não protegem as minhocas em solos brasileiros. Em Moreira et al. (2019) foi demonstrado que os valores

guia propostos por órgãos internacionais para qualidade do sedimento (Long et al., 1995, EC (*Environmental Canada and Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec*), 2008, HPA (*Hamburg Port Authority*), 2011), que foram adotados na Resolução CONAMA 454/12, são valores mais permissivos que classificaram todas as amostras como de toxicidade mínima, enquanto que nos testes realizados a maioria das amostras demonstrou níveis de contaminação crônicos ou agudos, o que demonstra que estes valores não são eficientes na previsão de certos efeitos tóxicos em ambientes de clima tropical.

26

Por sua vez, vários estudos tratam da associação entre microplásticos e metais. Tu et al. (2020) relacionaram a presença de microrganismos com o aumento da capacidade de adsorção dos microplásticos, e demonstrou que a formação de biofilmes em MP pode afetar positivamente a adsorção de metais, sendo que a concentração de metais aumenta de acordo com a maturação do biofilme, conseqüentemente aumentando sua toxicidade.

Tunali et al. (2020) analisaram efeitos de microplásticos isolados e em combinação com metais (Cu, Zn e Mn) sobre o crescimento e concentração de clorofila a na microalga *Chlorella vulgaris*. Nas maiores concentrações de microplástico (50, 100, 1000 mg/L) foi observada significativa redução do crescimento e da concentração de clorofila das microalgas e nas combinações de metais e microplásticos essa inibição foi ainda maior. Para os metais de forma isolada o crescimento foi reduzido de 47.83% - 49.57% e a concentração de clorofila 44.75–50.25%, porém o maior impacto foi observado na mistura dos três metais com os microplásticos, que causou 70% de inibição do crescimento e diminuição de 64% na concentração de clorofila a. Isso demonstrou que apesar dos microplásticos apresentarem toxicidade de forma isolada, em associação com os metais ela foi potencializada, da mesma forma que para *E.lucunter* neste estudo.

Partículas de tinta são uma fonte importante de MPs, e quando se tratam de tintas anti-incrustantes são também uma importante fonte de metais pesados e biocidas. O Cu e o Zn são os metais mais encontrados em partículas de tintas anti-incrustantes (Gaylarde, 2021). Os MPs de tintas anti-incrustantes mostraram uma grande toxicidade não apenas diretamente nos organismos expostos a tais partículas e ao ambiente circundante (Gaylarde, 2021). Molino et al. (2019)

realizaram testes ecotoxicológicos com partículas de tinta anti incrustante coletadas em um estaleiro em Bermudas, medindo o nível de sobrevivência de copépodos. No teste de toxicidade aguda, 0,3 g/L das partículas de tinta reduziram a sobrevivência dos copépodos a zero em 88 h.

No geral, os metais em excesso no organismo podem causar ligações aleatórias entre biomoléculas, como enzimas e proteínas, formando complexos capazes de danificar sua estrutura e função (Duruibe, 2007). Alguns metais também podem se acumular nos tecidos de animais aquáticos, em quantidades que podem ser preocupantes para o consumo humano (Abdel-Baki, 2011). Nesse sentido, o zinco já foi relacionado a causar danos físicos à guelras de peixes, além de ter potencial carcinogênico para

27

algumas espécies (Khayatzadeh, 2010). Por sua vez, o cobre é relacionado com a degradação da membrana lipídica. Isso pode causar diversos danos aos organismos aquáticos, como degeneração dos tecidos, mortalidade e efeitos subletais, como redução do metabolismo, o que pode reduzir a taxa de sucesso dos organismos nos seus habitats. Por estes motivos, estes contaminantes são de extrema importância para a comunidade científica.

Já foi demonstrado em diversos estudos que os valores legais nacionais não são adequados para proteger a biota brasileira, sendo estes mais permissivos, não se adequando ao clima do país. Isso pode ser devido às espécies de clima temperado frequentemente utilizadas em testes ecotoxicológicos, como os Equinodermos, possuem sensibilidades distintas das espécies de clima tropical aos mesmos contaminantes, que produzem diferentes efeitos tóxicos. Em relação aos microplásticos, a legislação brasileira falha em não ter uma legislação específica para este tipo de contaminante no ambiente, que além de apresentar muitas vezes toxicidade de forma isolada, é um importante vetor de metais pesados em ambientes aquáticos.

4. Referências Bibliográficas

Associação Brasileira de Normas Técnicas ABNT. NBR 15350. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de Ensaio com ouriçodo-mar (Echinodermata Echinoidea), 21 pp., 2012

Aelion, C. Marjorie, et al. "Temporal and spatial variation in residential soil metal concentrations: implications for exposure assessments." *Environmental pollution* 185 (2014): 365-368.

Bao, Vivien WW, et al. "Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species." *Marine pollution bulletin* 62.5 (2011): 1147-1151.

Beiras, R.; Durán, I.; Bellas, J. and Sánchez-Marín, P. (2012) Biological effects of contaminants: Paracentrotus lividus sea urchin embryo test with marine sediment elutriates. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, No. 51, 13 pp. Bhattacharya, Piyal. "A review on the impacts of microplastic beads used in cosmetics." *Acta Biomed. Sci* 3.4 (2016).

Branco, Pércio de Moraes. *Dicionário de Mineralogia e Gemologia*. São Paulo: Oficina de Textos, 2008. 608 p. il.

Brennecke, Dennis, et al. "Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment." *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 178 (2016): 189-195. BRUSCA, R.C. AND BRUSCA, G.J. 2019.

Invertebrados. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 3a edição, 968pp
Cardwell, R. D., DeForest, D. K., Brix, K. V., & Adams, W. J. (2013). Do Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn Biomagnify in Aquatic Ecosystems? *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 101–122.

Carney Almroth, Bethanie M., et al. "Quantifying shedding of synthetic fibers from textiles; a source of microplastics released into the environment." *Environmental Science and pollution research* 25.2 (2018): 1191-1199.

Cassee, F. R., et al. "Toxicology of chemical mixtures." (1999).

Castro, Ítalo B., Eliete Westphal, and Gilberto Fillmann. "Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático." *Química Nova* 34 (2011): 1021- 1031.

30

Chaudhry, Akshay Kumar, and Payal Sachdeva. "Microplastics' origin,

distribution, and rising hazard to aquatic organisms and human health: Socio-economic insinuations and management solutions." *Regional Studies in Marine Science* 48 (2021): 102018. Connell, Des W., et al. *Introduction to ecotoxicology*. John Wiley & Sons, 2009. Connell, Des W., and Gregory J. Miller. *Chemistry and ecotoxicology of pollution*. Vol. 65. John Wiley & Sons, 1984.

Costa, Carla Regina, et al. "A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação." *Química nova* 31 (2008): 1820-1830.

de Carvalho Penha, L.C., Coimbra Rola, R., da Silva Junior, F.M. et al. Toxicity and sublethal effects of methylparaben on zebrafish (*Danio rerio*) larvae and adults. *Environ Sci Pollut Res* 28, 45534–45544 (2021).

de Souza Beghelli, Frederico Guilherme, et al. "Lethal and sublethal effects of metal polluted sediments on *Chironomus sancticaroli* Strixino and Strixino, 1981." *Ecotoxicology* 27.3 (2018): 286-299

do Sul, Juliana A. Ivar, and Monica F. Costa. "The present and future of microplastic pollution in the marine environment." *Environmental pollution* 185 (2014): 352-364. Freitas, Carlos Machado de et al. Da Samarco em Mariana à Vale em Brumadinho: desastres em barragens de mineração e Saúde Coletiva. *Cadernos de Saúde Pública* [online]. 2019, v. 35, n. 5

Gaylarde, Christine C., José Antonio Baptista Neto, and Estefan Monteiro da Fonseca. "Paint fragments as polluting microplastics: A brief review." *Marine Pollution Bulletin* 162 (2021): 111847.

Goretti, E., et al. "Heavy metals bioaccumulation in selected tissues of red swamp crayfish: An easy tool for monitoring environmental contamination levels." *Science of the Total Environment* 559 (2016): 339-346.

Khayatzadeh, J., and E. Abbasi. "The effects of heavy metals on aquatic animals." *The 1st International Applied Geological Congress, Department of Geology, Islamic Azad University–Mashad Branch, Iran*. Vol. 1. 2010.

Knie, Joachim LW, and Ester WB Lopes. *Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações*. No. 574.64 KNI. 2004.

Kutralam-Muniasamy, Gurusamy, et al. "Overview of microplastics pollution with heavy metals: analytical methods, occurrence, transfer risks and call for

standardization." *Journal of Hazardous Materials* 415 (2021): 125755. Lari, Ebrahim, et al. "Interactive toxicity of Ni, Zn, Cu, and Cd on *Daphnia magna* at lethal and sub-lethal concentrations." *Journal of hazardous materials* 334 (2017): 21-28. Livett, Elizabeth A. "Geochemical monitoring of atmospheric heavy metal pollution: theory and applications." *Advances in Ecological Research*. Vol. 18. Academic Press, 1988. 65-177.

Liu, Sitong, et al. "Interactions between microplastics and heavy metals in aquatic environments: a review." *Frontiers in Microbiology* 12 (2021): 730.

Mafra, D., & Cozzolino, S. M. F. (2004). Importância do zinco na nutrição humana. *Revista de Nutrição*, 17(1), 79–87.

Mebane, C. A., Schmidt, T. S., Miller, J. L., & Balistrieri, L. S. (2020). Bioaccumulation And Toxicity Of Cadmium, Copper, Nickel, And Zinc And Their Mixtures To Aquatic Insect Communities. *Environmental Toxicology and Chemistry*.

Messias, Tâmara Guindo, Paulo Roger Lopes Alves, and Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso. "Are the Brazilian prevention values for copper and zinc in soils suitable for protecting earthworms against metal toxicity?." *Environmental Science and Pollution Research* (2023): 1-13.

Molino, Chiara, et al. "Effect of marine antifouling paint particles waste on survival of natural Bermuda copepod communities." *Marine Pollution Bulletin* 149 (2019): 110492. Moreira, Lucas Buruaem, et al. "Sediment quality assessment as potential tool for the management of tropical estuarine protected areas in SW Atlantic, Brazil." *Ecological Indicators* 101 (2019): 238-248.

Moriarty, Frank. "Ecotoxicology: the study of pollutants in ecosystems." (1999). Naqash, Nafiaah, et al. "Interaction of freshwater microplastics with biota and heavy metals: a review." *Environmental Chemistry Letters* 18.6 (2020): 1813-1824. Orona-Návar, C., García-Morales, R., Loge, F. J., Mahlke, J., Aguilar-Hernández, I., & Ornelas-Soto, N. (2022). Microplastics in Latin America and the Caribbean: A review on current status and perspectives. *Journal of Environmental Management*, 309, 114698.

Pastor, Kristian, et al. "Omnipresence of plastics: A review of the microplastic sources and detection methods." *Zbornik radova Građevinskog*

fakulteta, Subotica 39 (2021): 29-43.

32

Plum, Laura M., Lothar Rink, and Hajo Haase. "The essential toxin: impact of zinc on human health." *International journal of environmental research and public health* 7.4 (2010): 1342-1365.

Queiroz, Hermano M., et al. "The Samarco mine tailing disaster: a possible time-bomb for heavy metals contamination?." *Science of the Total Environment* 637 (2018): 498- 506.

Raju, P., P. Santhanam, and P. Perumal. "Impacts of microplastics on marine organisms: Present perspectives and the way forward." *The Egyptian Journal of Aquatic Research* (2022).

Riba, I., Delvalls, T. Á., Forja, J. M., & Gómez-Parra, A. (2004). The influence of pH and salinity on the toxicity of heavy metals in sediment to the estuarine clam *Ruditapes philippinarum*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(5), 1100-1107.

Roberts, Stephen M., Robert C. James, and Phillip L. Williams, eds. *Principles of toxicology: environmental and industrial applications*. John Wiley & Sons, 2022. Rodrigues, Joana Patrício, et al. "Significance of interactions between microplastics and POPs in the marine environment: a critical overview." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 111 (2019): 252-260.

Shin, Dongju, et al. "Comparative toxicity study of waterborne two booster biocides (CuPT and ZnPT) on embryonic flounder (*Paralichthys olivaceus*)."
Ecotoxicology and Environmental Safety 233 (2022): 113337.

Tagg, A. S., & Ivar do Sul, J. A. (2019). Is this your glitter? An overlooked but potentially environmentally-valuable microplastic. *Marine Pollution Bulletin*, 146, 50– 53.

Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J. (2012). Heavy Metal Toxicity and the Environment. In: Luch, A. (eds) *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Experientia Supplementum*, vol 101. Springer, Basel. Tunali, Merve, et al. "Effect of microplastics and microplastic-metal combinations on growth and chlorophyll a concentration of *Chlorella vulgaris*." *Science of the Total Environment* 743 (2020):

140479.

Van Cauwenberghe, Lisbeth, et al. "Microplastic pollution in deep-sea sediments." *Environmental pollution* 182 (2013): 495-499.

33

Wright, Stephanie L., Richard C. Thompson, and Tamara S. Galloway. "The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review." *Environmental pollution* 178 (2013): 483-492.

Wu, Mengjie, et al. "Time to Safeguard the Future Generations from the Omnipresent Microplastics." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 107.4 (2021): 793-799.

Zagatto, P.A. & Bertoletti, E., 2008. *Ecotoxicologia Aquática: Princípios E Aplicações*. 28-112 p.

Zilia, Federico, et al. "From waste to product: Circular economy applications from sea urchin." *Sustainability* 13.10 (2021): 5427.

