

João Pedro de Lima Mukai

**Toxicidade de pellets plásticos de diferentes regiões do
Atlântico sobre embriões de bolacha-do-mar (*Mellita
quinqüesperforata*) e mexilhão (*Perna perna*)**

Trabalho de Conclusão de Curso

São Vicente

2023

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

João Pedro de Lima Mukai

**Avaliação ecotoxicológica de microplásticos: toxicidade de pellets
plásticos de diferentes regiões em embriões de bolacha-do-mar
(*Mellita quinquiesperforata*) e mexilhão (*Perna perna*)**

**Trabalho de Conclusão de Curso
(TCC) apresentado ao Instituto de
Biociências da UNESP – Campus
do Litoral Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do
grau de bacharel em Ciências
Biológicas, com habilitação em
Biologia Marinha.**

**Orientador: Denis Moledo de
Souza Abessa**

São Vicente

2023

M953t

Mukai, João Pedro de Lima

Toxicidade de pellets plásticos de diferentes regiões do atlântico sobre embriões de bolacha-do-mar (*Mellita quinquiesperforata*) e mexilhão (*Perna perna*) / João Pedro de Lima Mukai. -- São Vicente, 2023

27 p. : tabs., fotos, mapas

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente
Orientador: Denis Moledo de Souza Abessa

1. ecotoxicologia. 2. microplástico. 3. poluição marinha. 4. pellets plásticos.
I. Título.

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.

Sumário

1. Introdução	5
2. Objetivo	8
3. Materiais e Métodos	9
3.1 Origem dos pellets plásticos usados no presente estudo	9
3.2 Caracterização do pellets microplástico	9
3.3 Bolacha-do-Mar (<i>Mellita quinquiesperforata</i>)	11
3.4 Mexilhão (<i>Perna perna</i>)	11
3.5 Preparo dos lixiviados	12
3.6 Toxicidade dos lixiviados sobre o desenvolvimento embriolarval de <i>Mellita quinquiesperforata</i>	13
3.7 Toxicidade dos lixiviados sobre o desenvolvimento embriolarval de <i>Perna perna</i>	14
4. Resultados	15
5. Discussão	17
6. Conclusão	22
7. Referências Bibliográficas	23

Resumo

O presente estudo aborda a problemática do lixo plástico nos oceanos, globalmente crescentemente reconhecida devido aos seus impactos adversos nos ecossistemas aquáticos. O aumento contínuo da produção global anual de plásticos, a durabilidade desses materiais e sua baixa degradabilidade contribuem para a formação de grandes aglomerados, especialmente de microplásticos (< 5mm). Pellets plásticos são microplásticos de origem primária, fabricados em grandes quantidades já em pequena escala de tamanho a fim de facilitar seu transporte. A maior parte dos pellets plásticos encontrados no ambiente são feitos de polietileno, polipropileno e poliestireno, polímeros produzidos resistentes que no ambiente marinho levam muito tempo para se degradar. Os pellets podem sorver poluentes orgânicos persistentes (POPs) e representar uma ameaça à vida marinha, se ingeridos por organismos e/ou liberarem os poluentes de volta ao meio, induzindo a exposição aos poluentes e podendo causar efeitos adversos nesses organismos. Este estudo teve como foco pellets plásticos coletados em diferentes regiões em colaboração com o programa International Pellet Watch (IPW). Seu objetivo principal foi avaliar a toxicidade desses pellets por meio de ensaios ecotoxicológicos com embriões de bolacha-do-mar (*Mellita quinquesperforata*) e mexilhão (*Perna perna*), a partir de lixiviados preparados com pellets em concentrações ambientais realistas. Foram realizados dois testes: o primeiro usou amostras de pellets de 7 diferentes regiões do Atlântico e embriões de *Mellita quinquesperforata*, enquanto o segundo teste foi realizado com amostras de apenas uma região (Pine Gully, Houston, Texas), e embriões de mexilhão *Perna perna*. A análise dos dados do primeiro teste foi realizada com um teste paramétrico t, e não houve toxicidade em nenhuma das concentrações ou amostras. No segundo teste foi usada Análise de Variância (ANOVA), tendo sido possível verificar toxicidade em algumas amostras, em diferentes níveis, sobre o desenvolvimento embriolarval de *Perna perna*. O presente estudo evidencia dados sobre a toxicidade de pellets plásticos em espécies marinhas e também busca contribuir para o monitoramento global dos impactos dos pellets plásticos nos ambientes marinhos

Palavras-chave: microplásticos, pellets plásticos, poluição marinha, ecotoxicologia

1. Introdução

Os primeiros relatos sobre lixo plástico no oceano foram feitos por volta dos anos 1970 (Fowler, 1987, Carpenter et al., 1972, Carpenter and Smith, 1972, Coe and Rogers, 1996, Colton and Knapp, 1974), e na época chamaram pouca atenção da comunidade científica. Porém, ao longo dos últimos 50 anos, o acúmulo e o descarte incorreto de resíduos plásticos no ambiente produziram grandes aglomerados de lixo plástico nos rios e oceanos, e a partir da identificação de suas consequências ecológicas adversas, o tema passou a receber crescente interesse da comunidade científica. Algumas características do plástico, como sua leveza, durabilidade, e resistência à corrosão, além do baixo preço, favorecem seu uso generalizado na indústria e no dia-a-dia, demandando uma produção cada vez maior (Xu et al., 2019).

A produção global anual de plásticos nos últimos anos vem aumentando continuamente (Andrady, 2011). De acordo com a UNEP (2021) (Figura 1), a produção global de plásticos deverá passar de 9,2 bilhões de toneladas em 2017 para 34 bilhões de toneladas em 2050 (Rochman et al., 2013; Geyer, 2020; UNEP, 2021). Uma das maiores preocupações em relação a crescente produção de plásticos é sua durabilidade, já que os plásticos apresentam baixa degradabilidade, e alguns polímeros comuns (polipropileno, polietileno e poliestireno) possuem baixa densidade, tornando-os persistentes no meio ambiente (Silva et al., 2016). Os resíduos plásticos apresentam uma grande variedade na sua composição e tamanho, sendo descritas 5 diferentes categorias de tamanho: megaplástico (> 100 mm), macropástico (20–100 mm), mesoplástico (5–20 mm) (Barnes et al. 2009; de Lucia et al. 2014; Bråte et al. 2016), micropástico (1 µm–5 mm) (Frias and Nash, 2019), e nanoplástico (1 nm–1 µm) (Hartmann et al. 2015; da Costa et al., 2016). Os micropásticos representam uma forma predominante de lixo plástico (Galloway et al., 2017), principalmente no ambiente aquático, com uma distribuição generalizada nesses ambientes (Yurtsever, 2019a), atingindo até mesmo regiões remotas, como ilhas, zonas polares e mares profundos (Lusher et al., 2015; Wang et al., 2018).

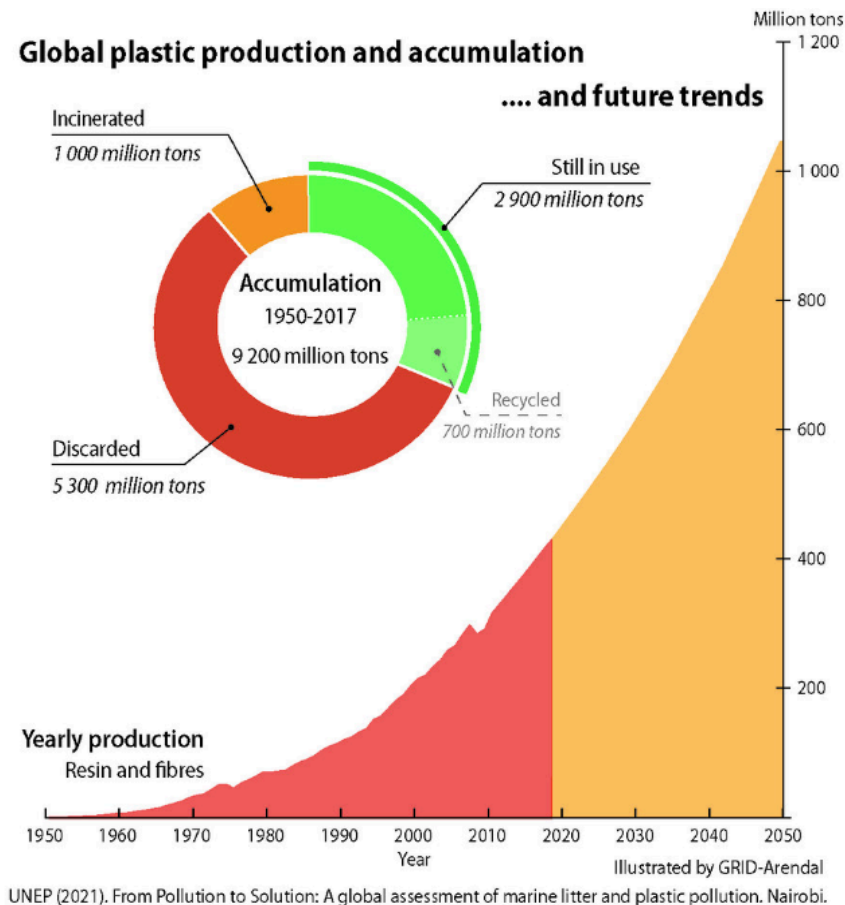


Figura 1: Produção e acumulação global de plástico e futuras tendências (Fonte: UNEP 2021)

Fonte: FromPollutionToSolution_redux.pdf (gridarendal-website-live.s3.amazonaws.com)

Nesse sentido, os microplásticos representam uma grande preocupação para os ambientes aquáticos, podendo se originar de fontes primárias ou secundárias. Os microplásticos (MPs) de fonte primária possuem entre 1 μm e 5 mm e são produzidos em escala diminuta para a confecção de produtos plásticos, mas também podem ser produzidos para o uso em produtos de limpeza e estética. Especificamente, os pellets plásticos são produzidos sob diversas formas, em especial, esféricas, ovóides e cilíndricas, com tamanhos variando entre 1 a 5 mm, e cores, geralmente claras, brancas ou transparentes, dependendo da sua composição química e de seu propósito de uso final (Manzano, 2009). Já os microplásticos de fontes secundárias são resultados da degradação de restos plásticos maiores (macro e mesoplásticos), devido a processos físicos, químicos e mecânicos do ambiente (Alomar et al., 2016), que fragmentam o macropástico ao longo do tempo gerando milhares de pedaços menores, tornando-os cada vez mais nocivos ao ambiente aquático, pois essas pequenas partículas de plásticos se tornam difíceis de serem retiradas do meio ambiente.

Uma das preocupações relacionadas aos microplásticos é o seu potencial tóxico para os organismos aquáticos, já que essas partículas podem ser ingeridas por diversos organismos marinhos, desde pequenos peixes e invertebrados, até aves e mamíferos marinhos. Segundo *EPA (1993)*, as aves marinhas são os animais que mais ingerem pellets, cerca de um quarto das espécies de aves marinhas tiveram ingestão de pellets comprovada. Além disso, os pellets podem transportar compostos químicos tóxicos adsorvidos à sua superfície (*LE et al., 2016; Rios et al., 2007; Taniguchi et al., 2016*). Por exemplo, os poluentes orgânicos persistentes (POPs) são adsorvidos pelos grânulos, alcançando concentrações que podem ser um milhão de vezes maiores do que a concentração destes compostos dissolvidos na água. Dessa forma, a ingestão dos pellets pode acarretar efeitos adversos associados aos POPs, como interferentes endócrinos, prejudicando o desenvolvimento e a reprodução dos organismos marinhos que os consomem e, indiretamente os humanos, já que muitos desses organismos, em especial os peixes, são comuns na dieta humana (*Endo et al., 2005; Heskett et al., 2011; Holmes, Turner, Thompson., 2012*).

Entre os resíduos plásticos considerados preocupantes em âmbito global, destacam-se os pellets plásticos, que são MPs de fonte primária, caracterizando-se como pequenas partículas de plástico sólido entre 1 e 5 mm e formato arredondado ou cilíndrico. Essas esferas de plástico são produzidas a fim de facilitar o transporte e o comércio internacional de polímeros plásticos, já que elas são utilizadas como matéria-prima para a produção de produtos plásticos. Devido ao seu tamanho reduzido, os pellets podem ser acidentalmente liberados no mar, e sua dispersão está associada ao transporte de grandes quantidades, em grande parte ao longo de rotas marítimas (*Izar et al., 2019*). Eles podem ser facilmente transportados pelos sistemas de água, dessa forma se acumulando em ambientes fluviais, terrestres e principalmente nos ambientes marinhos. Estima-se que cada navio cargueiro transporta aproximadamente 1 bilhão de pellets plásticos por viagem (*Hammer et al., 2012*). Para estudar a poluição global por pellets plásticos, pesquisadores da Universidade de Tóquio criaram, em 2005, o programa International Pellet Watch (*IPW - ver <http://pelletwatch.org/>*), um programa de monitoramento global voluntário que conta com uma extensa rede de colaboradores ao redor do mundo, os quais realizam amostragem de pellets em diversos locais, visando monitorar a poluição por pellets nos oceanos e seu papel como carreadores de poluentes orgânicos persistentes (POPs). As amostras coletadas têm sido analisadas para a presença e quantificação de uma série de poluentes, gerando mapas, relatórios e publicações

científicas. Mais recentemente, o IPW passou a enviar amostras de pellets para nosso grupo de pesquisa, visando a determinação da toxicidade associada a esses resíduos, e permitindo uma melhor interpretação dos resultados químicos já obtidos.

Um estudo recente observou alterações no desenvolvimento embrionário do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, após exposição a pellets plásticos virgens e encalhados na praia (Nobre et al., 2015). No entanto, as listas de compostos químicos associados aos pellets ainda são escassas, dificultando a avaliação dos reais riscos ambientais desses materiais (Li et al., 2015). De todo modo, há alguns compostos que foram identificados nos pellets plásticos, dentre os quais podemos citar, bisfenol A (BPA), ftalatos, retardantes de chama (como os éteres difenílicos polibromados (PBDE) e tetrabromobisfenol (TBBPA)), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilos policlorados (PCBs), inseticidas organoclorados como o diclorodifeniltricloroetano (DDT) e seus produtos de degradação, que incluem o diclorodifenildicloroetileno (DDE) e o diclorodifenildicloroetano (DDD), e metais (Ashton et al., 2010, Endo et al., 2005, Gorman et al., 2019, Hammer et al., 2012., Holmes et al., 2012, Ogata et al., 2009, Taniguchi et al., 2016).

Segundo dados do programa de monitoramento International Pellet Watch (IPW) alguns dos principais contaminantes já encontrados nos pellets plásticos são PCBs, DDTs, Hexaclorociclohexano (HCH) e Nonilfenol (NP), embora restem muitos outros grupos químicos a serem estudados nestes materiais. Portanto, como os pellets são carreadores importantes de poluentes químicos nos mares do planeta, passa a ser importante avaliar sua capacidade de produzir efeitos tóxicos sobre os organismos marinhos. Assim, o desenvolvimento de estudos ecotoxicológicos usando pellets plásticos representa uma demanda atual, sendo importante para estimar potenciais impactos que os pellets podem causar sobre os ecossistemas costeiros e marinhos.

2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade de pellets plásticos coletados ao redor do mundo pelo IPW, a partir da realização de ensaios ecotoxicológicos com embriões de bolacha-do-mar (*Mellita quinquiesperforata*) e mexilhão (*Perna perna*) usando lixiviados (SE100) preparados a partir desses pellets plásticos, em concentrações ambientais reais. Esperamos também que a realização deste projeto possa contribuir para

o International Pellet Watch (IPW) e o monitoramento dos impactos globais desses resíduos sobre os ambientes marinhos.

3. Materiais e Métodos

3.1 Origem dos pellets plásticos usados no presente estudo

Para a realização do presente estudo, foram utilizados pellets plástico de 7 diferentes regiões distribuídas pelo globo (Figura 2), os quais foram enviados por voluntários e pesquisadores parceiros do IPW: (1) Pine Gully, Houston, Texas, EUA; (2) Normandie, França; (3) Delaware, EUA; (4) Port Aransas [1], Texas, EUA; (5) Ais George, Santos, Brasil; (6) Port Aransas [2], Texas, EUA; (7) Playa La Esperanza, Porto Rico.

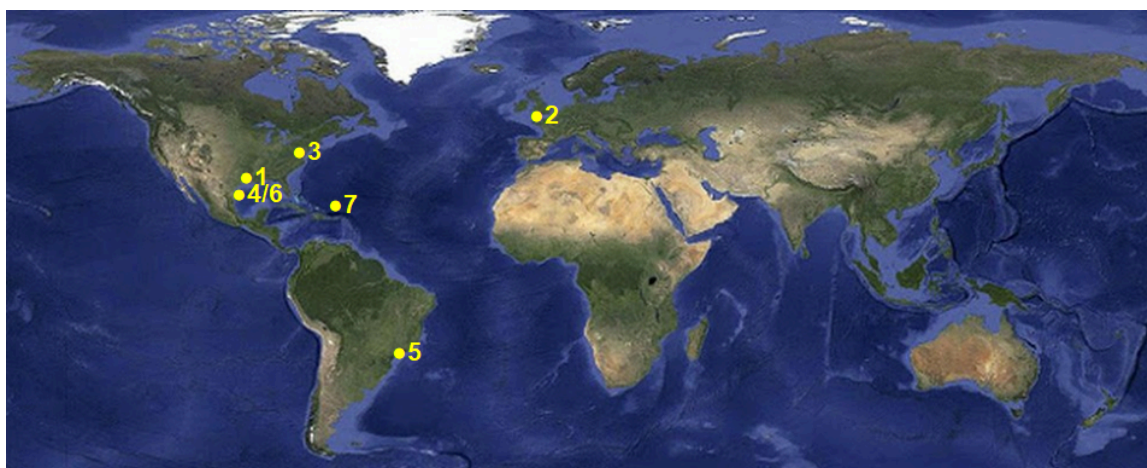


Figura 2. Mapa mostrando a localização dos pontos de coleta de pellets plásticos. (1) Pine Gully, Texas, EUA; (2) Normandie, França; (3) Delaware, EUA; (4) e (6) Port Aransas, Texas, EUA; (5) Santos, Brasil; (7) Playa La Esperanza, Porto Rico.

3.2 Caracterização do pellets microplástico

Os pellets plásticos podem ter diversos formatos, sendo eles, ovóides, esféricos ou cilíndricos, possuem um tamanho médio de 1 a 5 mm, e possuem diversas cores, sendo os brancos e transparentes mais comumente encontrados em praias, assim como os de coloração amarelada, mais intemperizados. A maior parte desses pellets encontrados nas praias é feita de polietileno (PE), polipropileno (PP) e poliestireno (PS) (EPA, 1992; Costa et al., 2010), o que lhes oferece mais resistência a diferentes temperaturas e ambientes. Além disso, como já mencionado, os pellets podem constituir carreadores

químicos para alguns compostos tóxicos e persistentes que não se dissolvem na água (Endo et al., 2005; Ogata et al., 2009).

No presente estudo, por sua origem variada e questões como tamanho mínimo da amostra (i.e., nº de pellets), os pellets usados nos experimentos são de diferentes colorações e formas, o que pode implicar em tempos diferentes em que esses MPs permaneceram no ambiente antes de chegar às praias onde foram coletados. Alguns estudos mostram que a partir do amarelamento de pellets é possível estimar o seu tempo de permanência no ambiente, sendo os mais claros com menor tempo de permanência no ambiente e os mais amarelados com maior tempo, e também os mais contaminados (Fisner et al., 2017; Fanini & Bozzeda, 2018; Zanetti, 2019). Para uma representação mais realista da exposição dos organismos-teste, a escolha dos pellets para os experimentos ecotoxicológicos foi feita de maneira aleatória, sem distinção de tipo de material, coloração ou degradação (Figura 3).



Figura 3: Pellets plástico usados no primeiro teste

Os pellets obtidos foram analisados em dois testes, da seguinte forma: o primeiro experimento visou avaliar as amostras recebidas das diferentes regiões do mundo, usando lixiviados preparados com concentrações reais. Esse teste visou obter uma análise mais global sobre a toxicidade dos pellets plásticos, e usou concentrações realistas, que estariam aproximadamente na média para dados globais (Delaeter et al., 2022). Já no segundo experimento, foram utilizados apenas pellets da região (1) Pine Gully (Houston, Texas, EUA), para a qual havíamos recebido uma quantidade maior de amostras, com maior refinamento de amostragem, ou seja mais amostras de diferentes pontos de uma mesma região. Para esse teste, os lixiviados foram preparados com o dobro da concentração de pellets usada no primeiro experimento (ainda dentro da faixa de concentrações realistas, porém já na faixa média superior, ou seja, considerando o valor médio acrescido do desvio superior). No experimento, foi usada então uma nova

Dispersão Estoque (SE100), e sua diluição em 50%, visando comparar os resultados com o primeiro experimento realizado.

3.3 Bolacha-do-Mar (*Mellita quinquesperforata*)

A bolacha-do-mar da espécie *Mellita quinquesperforata*, invertebrado marinho da classe Echinoidea, é encontrada abundantemente em regiões neotropicais e subtropicais, e pode ser comumente encontrada nas praias brasileiras, na zona infralitoral, onde elas ficam logo abaixo da superfície de areia, distribuindo-se paralelamente à linha de costa (Wellner, 2012). Embriões de *M. quinquesperforata* vêm sendo usados cada vez mais em testes e estudos ecotoxicológicos, pois os adultos são organismos resistentes, ou seja, podem ser mantidos por longos períodos em laboratório. Além disso, indivíduos adultos de *M. quinquesperforata* têm a capacidade de produzir um grande número de gametas em curtos períodos de tempo e podem ser usados repetidamente para a extração do mesmo, diminuindo os custos laboratoriais (Wellner, 2012). Apesar de não ser possível identificar os indivíduos macho e fêmea no campo, em laboratório a identificação dos gametas é simples, já que eles se diferem pela cor. Além desses fatores, embriões de *M. quinquesperforata* apresentam uma alta sensibilidade a diversos tipos de contaminantes (Laitano et al., 2015; Mello et al. 2020), e trata-se de um organismo propenso a ter contato com os pellets plásticos, os quais se acumulam no sedimento das praias (Coppock et al. 2017; Imhof et al. 2018).

3.4 Mexilhão (*Perna perna*)

O mexilhão *Perna perna* possui ampla distribuição latitudinal, ocorrendo do norte do Espírito Santo até o sul do Rio Grande do Sul (Fernandes, 1981), e habita as regiões superior do infralitoral e entre-marés, onde se fixam a qualquer rocha ou estrutura rígida imersa. São invertebrados do filo Mollusca (classe Bivalvia) e seus ovos e embriões vêm sendo comumente utilizados em testes ecotoxicológicos, além de serem capazes de produzir um grande número de gametas (Zaroni et al., 2005). Assim como a bolacha-do-mar, também não é possível identificar o dimorfismo sexual de *P. perna* em campo, mas seus gametas possuem diferentes colorações, sendo possível fazer a identificação dos sexos em laboratório, após a indução da liberação de gametas.

No hemisfério norte há muitos estudos ecotoxicológicos analisando seu desenvolvimento embrionário de mexilhões, como por exemplo, os trabalhos elaborados por Bayne (1965); Bayne et al. (1975); Cherr et al. (1990); Davis (1961); Fichet et al. (1998); His & Beiras (1995); e Hunt & Anderson (1993). No Brasil, o mexilhão *P. perna* possui grande potencial de aplicabilidade em testes de toxicidade, pois respeita os requisitos de Greenberg et al. (1992) como espécie bioindicadora, sendo elas: disponibilidade ao longo do ano; adaptabilidade a condições laboratoriais; sensibilidade aos compostos químicos; importância econômica e ecológica comprovada. Além disso, o mexilhão *P. perna* é morfologicamente muito semelhante às espécies encontradas na América do Norte e que possuem testes padronizados pela EPA (1991) e ASTM (1992), como por exemplo, *Mytilus edulis* e *M. galloprovincialis*. Por ser um organismo filtrador e possuir hábitos sedentários, embriões de *P. perna* vêm sendo cada vez mais usados devido a sua habilidade de bioconcentrar poluentes se enquadrando como organismos sentinelas apropriados para estudos laboratoriais de toxicidade, segundo a NBR 16456 (ABNT, 2016).

3.5 Preparo dos lixiviados

Para o preparo das amostras de lixiviado do primeiro teste foi feita uma solução estoque (SE100) de pellets plásticos. Foram adicionados 200 mL de água do mar filtrada e autoclavada em béqueres de 500 mL, e em cada um foram adicionados aproximadamente 0.200 g de pellets plástico de cada uma das regiões, para se obter uma concentração 100% da solução. As soluções (SE100) foram sonicadas inicialmente por 8 minutos e depois devidamente lacradas, foram armazenadas a 4 °C, em geladeira, por 5 dias. A partir da solução estoque de lixiviado foram feitas as diluições e a montagem das réplicas em tubos de ensaios de vidro contendo 10 ml de amostra, sendo feitas 4 réplicas por concentração. Para tal, a SE100 foi diluída em água do mar filtrada e autoclavada, a fim de obter três concentrações diferentes: 1%; 10%; 100% da SE100, além do controle (água do mar filtrada e autoclavada sem amostras de pellets plástico).

Para o segundo teste, também foi preparada uma solução estoque de lixiviado (SE100) de pellets plástico, porém nesse segundo teste foram usadas as amostras de apenas uma região (Pine Gully, Houston, Texas, EUA), conforme já mencionado. Para esse experimento, a quantidade de pellets usada na preparação do lixiviado foi o dobro das concentrações usadas no experimento 1. Dessa forma foram adicionados

aproximadamente 0.400 g de pellets plásticos e 200 mL de água do mar filtrada e autoclavada nos béqueres para se obter uma concentração de 100% da solução. Posteriormente, os lixiviados foram sonicados por 8 minutos, e depois mantidos em frascos devidamente lacrados, sendo armazenados por 5 dias a 4°C. partir da solução estoque (SE100) foram feitas 2 diluições, 50% (equivalente à SE100 do primeiro experimento) e 100%, cada uma delas com 4 réplicas por concentração, além do controle.

3.6 Toxicidade dos lixiviados sobre o desenvolvimento embriolarval de *Mellita quinquesperforata*

Com as réplicas feitas após os lixiviados, foi feito um teste de toxicidade crônica de curta duração, utilizando embriões de *M. quinquesperforata*. As bolachas-do-mar foram coletadas em praias da Baixada Santista (SP) e aclimatadas em laboratório, visando à obtenção dos gametas e posterior exposição de seus ovos recém-fecundados às soluções-teste. Para isso, foi utilizada uma adaptação do protocolo experimental descrito pela Norma Técnica NBR 15350 (ABNT, 2023), que descreve testes com ouriços-do-mar, com ajustes posteriores propostos por *Laitano et al.*, (2015) para bolachas-do-mar.

A obtenção dos gametas foi induzida a partir de choque osmótico. Com o auxílio de uma seringa hipodérmica, 0,5mL de solução de cloreto de potássio (KCl), foi injetada na região aboral das bolachas-do-mar (*Laitano et al.*, 2015). Os gametas masculinos e femininos coletados foram inicialmente examinados em microscópio óptico a fim de examinar sua viabilidade. A partir da obtenção dos gametas viáveis foi feita a fecundação, pela adição de 1-2 mL de solução espermática à solução de óvulos. Após essa adição, a solução foi agitada por 10 minutos para permitir a fecundação. Após esse tempo, a fecundação dos óvulos foi confirmada através da observação da membrana da fertilização em microscópio óptico (*Nascimento et al.*, 2002). A partir da visualização da membrana de fertilização em pelo menos 70% dos ovos (*Laitano et al.*, 2015), foram adicionados cerca de 500 ovos recém-fecundados em cada uma das réplicas de cada concentração, sendo mantidos nos tubos de ensaio, em condições controladas, por cerca de 36-42 horas, até que os embriões atingissem o estágio *pluteus*.

Após 36-42 horas, as réplicas foram fixadas pela adição de 0,5 mL de solução tamponada de formaldeído a 10%. Em seguida, foi feita a contagem dos primeiros 100 embriões das subamostras de cada réplica, contabilizando os embriões com

desenvolvimento normal e anormal. No grupo controle, os embriões devem alcançar uma taxa mínima de 70% de desenvolvimento normal para a viabilidade do teste (*Laitano et al., 2015*). Antes e após o experimento, os parâmetros físico-químicos (pH, salinidade, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura) foram analisados com um sensor multiparâmetro adequado. Os resultados foram planilhados e, em seguida, foram analisados pelo teste paramétrico t.

3.7 Toxicidade dos lixiviados sobre o desenvolvimento embriolarval de *Perna perna*

Para o segundo teste, também foi realizado um teste crônico de curta duração, porém com embriões do mexilhão (*Perna perna*) seguindo a norma técnica NBR 16456 (*ABNT, 2022*). Os mexilhões foram coletados e aclimatados no laboratório, onde foram limpos e separados a fim de evitar a contaminação com outros organismos.

Assim como a bolacha-do-mar, os mexilhões são animais de fertilização externa e a liberação de gametas podem ser induzidas por algumas técnicas, nesse experimento nós usamos o choque térmico. Inicialmente os organismos foram mantidos em bandejas com água do mar filtrada e autoclavada, em temperatura ambiente (25°), sendo então transferidos para tanques contendo água refrigerada (15-20°) e subseqüentemente a água aquecida (32°) (*Bayne et al, 1976*). Após a liberação, os gametas masculinos e femininos foram separados com o uso de um conta-gotas em diferentes béqueres e analisados em microscópio óptico a fim de confirmar a sua viabilidade. A partir da obtenção dos gametas viáveis foi feita a fecundação. Para a fecundação foram adicionados 1-2 mL de solução espermática à solução de óvulos, e em seguida a solução foi levemente agitada por 10 minutos para permitir a fecundação. Após esse tempo, a fecundação dos óvulos foi confirmada através da observação da membrana da fertilização em microscópio óptico (*Nascimento et al., 2002*). A partir da análise dos embriões recém-fecundados, foram adicionados cerca de 500 ovos em cada uma das réplicas, em suas respectivas concentrações. O sistema-teste foi devidamente mantido por cerca de 24-48 horas em incubadora, sob condições constantes, até que as larvas atingissem o estágio larval D (véliger).

Após as 24-48 horas as réplicas foram fixadas pela adição de 0,5 mL de solução tamponada de formaldeído a 10%. Em seguida, foi feita a contagem dos primeiros 100 embriões das subamostras de cada réplica, contabilizando os embriões com

desenvolvimento normal e anormal. No grupo controle, os embriões devem alcançar uma taxa de 70% de desenvolvimento normal para viabilidade do teste (ASTM 1992). No início e no término do experimento, os parâmetros físico-químicos (pH, salinidade, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura) foram analisados com uma sonda multiparâmetros. Os resultados foram planilhados e, em seguida, foram analisados por Análise de Variância (ANOVA).

4. Resultados

Os resultados dos experimentos realizados com embriões de bolacha-do-mar e mexilhão estão dispostos nas figuras 4 e 5 respectivamente. No teste 1 (Figura 4) é possível observar uma taxa adequada no desenvolvimento larval normal do controle, segundo proposto por *Laitano et al. (2015)*. Nas diferentes concentrações (1%, 10%, 100%), as taxas de desenvolvimento embrionário foram elevadas, similares à taxa observada no grupo controle, não havendo diferença estatística significativa em nenhuma das amostras. Portanto, nenhuma amostra analisada no primeiro experimento foi considerada tóxica.

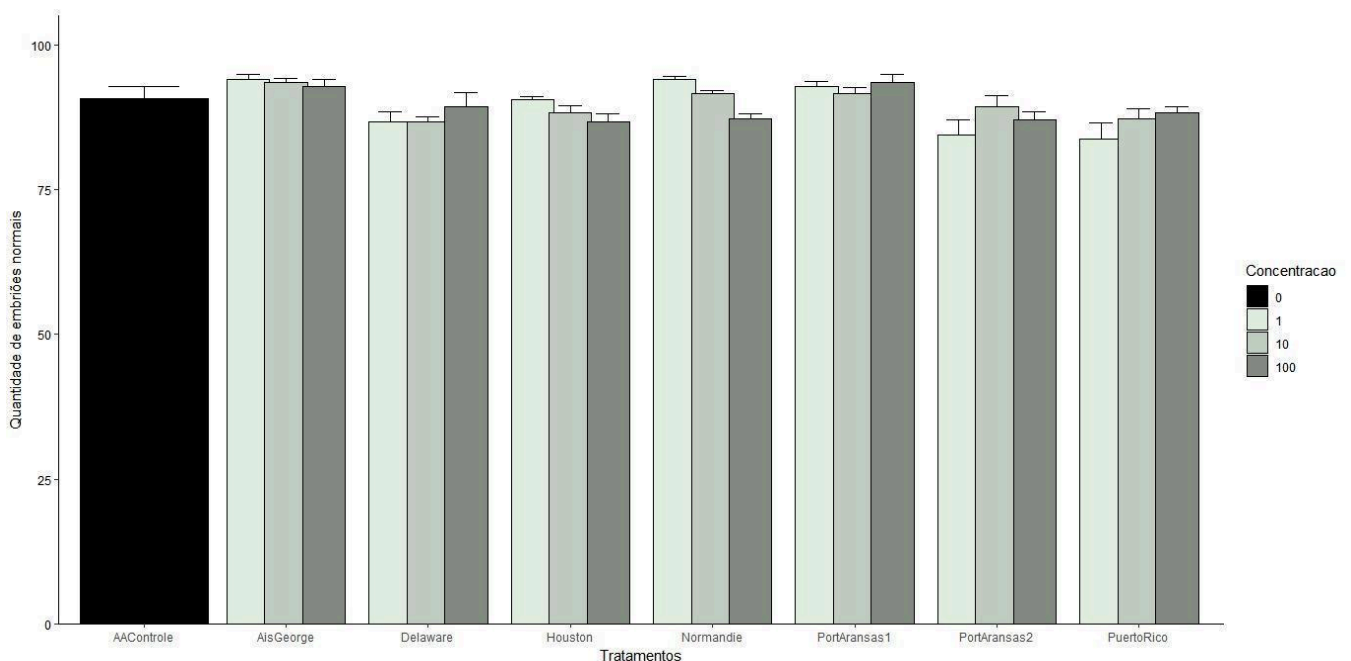


Figura 4: Desenvolvimento embrionário de *Mellita quinquesperforata* no teste 1. Não houve diferença significativa em nenhuma das concentrações e amostras.

Já no teste 2 (Figura 5) é possível observar que houve um desenvolvimento larval normal no controle, assim como e em várias amostras, como S1 (50%, 100%), S2 (50%, 100%), S3 (50%, 100%), S4 (50%, 100%), S5 (100%), S9 (50%), S10 (50%), S11 (50%), e S12 (50%). Entretanto houve diferença significativa entre as outras soluções em relação ao controle. Neste teste, houve toxicidade para os embriões de *P. perna*. Na amostra S6, a concentração de 100% apresentou toxicidade. Também foi possível observar que em S13, S14, e S15 na concentração 50% houve diferença em relação ao controle, havendo toxicidade em uma concentração ambiental real de pellets. Para estas amostras, na concentração 100% foi possível observar um grau maior de toxicidade em relação a outras amostras. Por outro lado, nas amostras S2, S3 e S4 (50%) houve um número maior de indivíduos normais comparado com o controle, indicando ausência de toxicidade e até um melhor desempenho dos embriões.

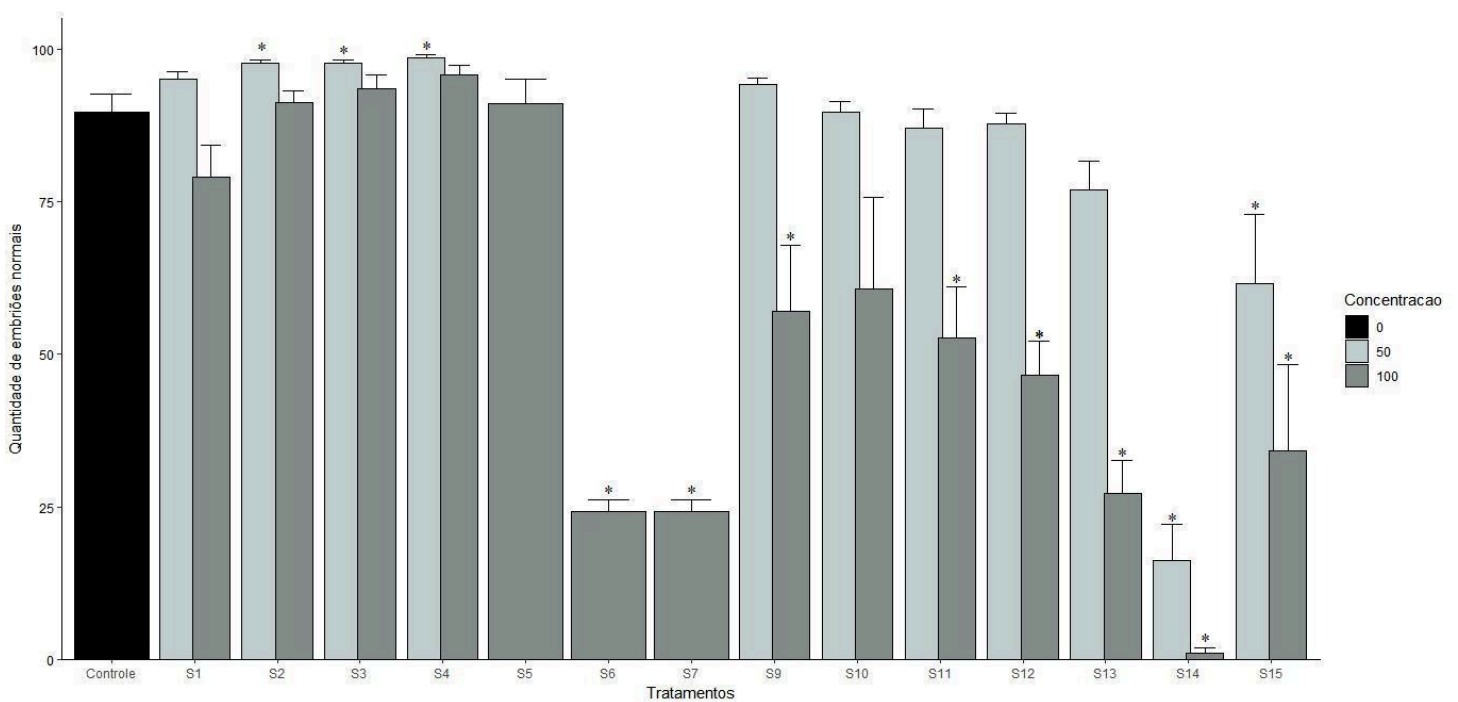


Figura 5: Desenvolvimento embrionário de *Perna perna* no teste 2. Em S5, S6 E S7 não foi possível obter os dados de 50% pois não havia amostras de pellets suficientes para a preparação das soluções

5. Discussão

Os pellets têm sido considerados carreadores de diversos poluentes orgânicos persistentes, tais como PCBs e DDTs (Takada, 2006), sendo capazes de induzir

toxicidade a organismos marinhos. Porém os resultados obtidos em estudos ecotoxicológicos recentes com pellets plásticos são controversos, pois em alguns casos foi observada toxicidade, enquanto em outros casos não, como por exemplo nos trabalhos de *Silva et al. (2016)* e *Barbosa et al. (2017)*. Os autores apontam várias causas para essa variação na toxicidade, como a variabilidade da contaminação nos pellets, as diferentes formas de exposição da biota aos contaminantes associados aos pellets, e variação de sensibilidade das espécies (*Thornton et al, 2022*), além do fato de que muitos estudos usam quantidades não realistas de pellets ou MPs. Assim, para um melhor entendimento da ecotoxicidade associada aos pellets, é necessário usar concentrações realistas e espécies que potencialmente estarão expostas direta ou indiretamente aos pellets, como feito no presente estudo.

O IPW possui um banco de dados sobre a natureza e os níveis de contaminação de pellets em algumas praias do mundo. E a partir desses dados de contaminação de POPs nos pellets do IPW, foi feita uma tabela (Tabela 1) que indica os níveis de contaminação encontrados para PCBs e DDT de cada região. As figuras 6 e 7 também foram obtidas no site do IPW (*pelletwatch.org*) e mostram o indicador de contaminação de PCBs e DDTs em ng/g. De acordo com esse indicador, para cada POP são estabelecidas faixas de concentração que indicam níveis de contaminação diferentes, variando entre não poluído e extremamente poluído.

A contaminação por bifenilas policloradas (PCBs) no meio ambiente ocorreu no passado, devido a liberação de efluentes industriais em mananciais e de resíduos em depósitos de lixo e aterros, sem qualquer precaução. Uma vez presentes no ambiente, as moléculas de PCB não se decompõem quimicamente com facilidade e permanecem por longos períodos nesse meio, se incorporando com facilidade ao ciclo da água e do solo (*Penteado & Vaz, 2001*).

Por sua vez, o Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDTs), é um inseticida considerado um dos poluentes mais perigosos devido à sua capacidade de bioacumulação (*ATSDR, 2002b*). O DDT começou a ser utilizado na Segunda Guerra Mundial para a prevenção de doenças causadas por piolhos e posteriormente começou a ser mundialmente utilizado na agropecuária por conta do seu baixo preço e elevada eficiência (*D'Amato, 2002*) A estimativa da meia vida do DDT, pelo processo de biodegradação, varia de 2 a mais de 15 anos (*Jesus, 2002*), e também causam preocupação pelo seu nível de toxicidade, já que também podem se bioacumular nos microplásticos encontrados no ambiente.

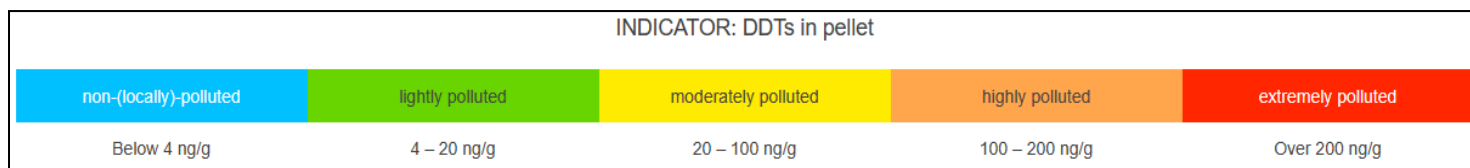


Figura 6: Indicador de contaminação por DDT em pellets

Fonte: (Google Map :: International Pellet Watch)

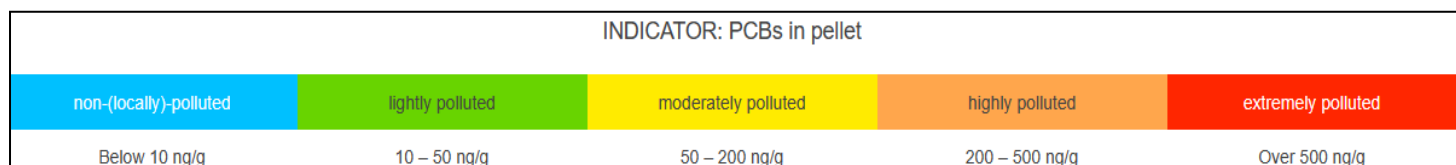


Figura 7: Indicador de contaminação por PCBs em pellets

Fonte: (Google Map :: International Pellet Watch)

Tabela 1: Concentração de PCBs e DDT encontradas em pellets nas regiões de estudo, tabela 1 foi criada a partir dos dados do IPW, com dados das concentrações de PCBs e DDT das regiões mais próximas em que os pellets foram coletados.

Locais	Concentração de PCBs ng/g	Concentração de DDT ng/g
(1) Pine Gully, Houston, Texas (Upper Galveston Bay, Seabrook)	sem dados	sem dados
(2) Normandie, França	1945.0	11.0
(3) Delaware, EUA	94.0	73.0
(4) Port Aransas, Texas, EUA	45.0	n.a.
(5) Ais George, Santos, Brasil	406.0	171.4
(6) Port Aransas (2), Texas, EUA	45.0	n.a.
(7) Playa La Esperanza, Puerto Rico	301.0	n.a.

Baseado na tabela 1, é possível observar que as concentrações de PCBs e DDTs, em cada uma das regiões, é relativamente distinta. Relacionando com o teste 1, a concentração de PCBs principalmente em (2) Normandie, França e (5) Ais George, Brasil, é alta, variando entre altamente poluído (200 ~ 500 ng/g) e extremamente poluído (mais de 500 ng/g). Porém no primeiro teste realizado com embriões de bolacha-do-mar (*Mellita quinquiesperforata*) não foi possível observar toxicidade crônica em nenhuma

amostra, nas diferentes concentrações testadas (1%, 10% e 100%). Esses resultados sugerem que a concentração de pellets em condições ambientais reais ainda não apresenta grande potencial para gerar toxicidade, ou seja, numa baixa densidade de pellets a quantidade de contaminantes transferidos para a água seria pequena, ainda que os pellets estejam contaminados, como é o caso da amostra coletada na França. Essa quantidade de substâncias liberadas depende da concentração dos compostos nos pellets, mas também depende da polaridade dessas substâncias; aquelas muito apolares tendem a permanecer adsorvidas nos pellets, pela sua baixa afinidade com a água. Sabe-se que, no ambiente, os pellets passam por processos de intemperismo e degradação, tornando-se mais ásperos e irregulares, permitindo o aparecimento de rachaduras e cavidades (*Fotopoulou & Karapanagioti, 2015*), os tornando mais propensos a adsorção de alguns contaminantes. Além disso, os pellets contaminados podem sofrer reações químicas ao serem expostos à luz solar ou outros fatores ambientais, podendo alterar sua estrutura química e fazendo com que o tempo de absorção e adsorção de seus contaminantes mudem (*Albertsson et al. 1987*). Portanto, o intemperismo pode, em alguns casos, favorecer a retenção dos poluentes nos pellets e dificultar sua lixiviação para água, reduzindo portanto a toxicidade para organismos planctônicos, como é o caso dos embriões de bolacha-do-mar. Também é importante citar o grau de amarelamento dos pellets, que pode estar relacionado ao tempo de permanência desses pellets no meio ambiente (*Carson et al., 2011; Fanini & Bozzeda, 2018; Edo et al., 2019; Zanetti, 2019*). Pellets com alto grau de amarelamento também foram relacionados com maiores concentrações de contaminantes (*Mato et al., 2001; Endo et al., 2005; Frias et al., 2010; Holmes et al., 2012; Fisner et al., 2017*), embora, como mencionado acima, eles não estejam necessariamente biodisponíveis ou sejam lixiviados para a coluna d'água.

O segundo teste foi feito a partir das amostras de apenas uma região (1) Pine Gully, Houston, Texas, porém não há dados das concentrações de contaminantes nos pellets desta região, impossibilitando a correlação dos resultados obtidos no experimento com os contaminantes ali presentes. Porém, dados existentes mostram contaminação moderada nos sedimentos nas lagunas e áreas estuarinas próximas a Houston (*Camargo et al., 2021; Harmon et al. 2003*), que poderiam ajudar a explicar a toxicidade associada aos pellets dessa região. No respectivo teste realizado com embriões de mexilhão, foi possível observar toxicidade em algumas amostras, nas concentrações de 50% 100%. Porém a maior concentração gerou mais amostras tóxicas, o que poderia ser esperado, já que o primeiro teste feito com concentrações ambientais reais médias nós não obtivemos

resultados significativos de toxicidade. Neste segundo experimento, apenas 3 amostras exibiram toxicidade nas concentrações ambientais médias de pellets, e nas amostras S13 e S15 as taxas de desenvolvimento embrionário estiveram acima de 50%; apenas em S14 o desenvolvimento embrionário foi altamente reduzido, de modo que este segundo experimento tem bom grau de concordância com os resultados do primeiro teste. No entanto, como em 100% houve um maior número de amostras tóxicas, a partir desses resultados podemos especular que o aumento de concentração de MPs no ambiente em um futuro próximo pode resultar em elevadas taxas de toxicidade para o desenvolvimento e reprodução dos mexilhões *P. perna*.

Nos resultados obtidos no teste 2 é também possível observar que as soluções, tanto em 50% quanto em 100%, tiveram resultados diferentes, já que algumas amostras (ou soluções) não apresentaram toxicidade, enquanto outras coletadas na mesma praia foram tóxicas. Os pellets plásticos no ambiente possuem uma grande dispersão impulsionada principalmente pelo vento e correntes marinhas (Eriksen *et al.*, 2014), dessa forma o pellet plástico pode funcionar como um vetor transportador de poluentes para outras regiões (Mato *et al.*, 2001; Endo *et al.*, 2015; Rios *et al.*, 2007; Bakir *et al.*, 2012; Taniguchi *et al.*, 2016). É fato que ao alcançar o ambiente marinho os pellets podem absorver contaminantes, entre os principais como citado anteriormente estão os POPs, como Bifenilos Policlorados (PCB), Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT), que são contaminantes que podem agir como desreguladores endócrinos nos organismos, causando alterações hormonais e no sistema endócrino fazendo com que as larvas não se desenvolvam (Ogata *et al.*, 2009; Holmes *et al.*, 2012).

Uma possível explicação para esse resultado do teste 2, é que ainda não existem análises químicas dos contaminantes nem do tipo de material do pellet, portanto não temos como estimar ao certo a natureza e grau da contaminação associada a cada conjunto de pellets. Uma outra interpretação dos resultados é que pela proximidade entre os pontos de coleta, pode ser, que a deposição de pellets contaminados e não contaminados seja aleatória, assim parte das amostras apresenta toxicidade e outra não. Sem as informações de contaminantes dessa região, não é possível distinguir os tipos de contaminantes ou associar a toxicidade a um ou mais grupos químicos. Dessa forma é possível que os tratamentos com maior efeito tóxico tenham sido preparados com pellets mais contaminados, ou com contaminantes que foram mais rapidamente liberados na água.

Silva et al. (2016) realizaram testes ecotoxicológicos com embriões de *P. perna* utilizando a metodologia de interface pellet-água proposta por *Nobre et al. (2015)*, que consiste na utilização de uma rede de plâncton presa a um anel plástico fazendo com que os pellets plástico ficassem submersos na solução a fim de poder avaliar os efeitos de toxicidade dos pellets através da liberação na água. No mesmo trabalho *Silva et al. (2016)* os autores também realizaram experimento onde os pellets ficaram soltos na superfície dos béqueres usados como câmara-teste. Os resultados obtidos nos dois estudos mostraram toxicidade significativa, sendo que a porcentagem de larvas anormais ou mortas foi significativamente maior no experimento usando a malha submersa com os pellets. No entanto, pode ter havido interferência da malha sobre as larvas.

Em outro experimento *Barbosa et al. (2017)* realizaram um estudo onde foram avaliados efeitos agudos de microesferas de polietileno sobre *D. magna*, nesse experimento a mortalidade cumulativa e não cumulativa observada não foi superior a 10% dentro do período de exposição recomendado pela OCDE (*OECD, 2004*), e após 96 horas de exposição, a mortalidade não foi significativamente diferente em relação a outros períodos de exposição. Esse estudo evidencia que nem sempre os MPs causam toxicidade nos organismos marinhos.

De todo modo, para entender melhor o comportamento dos compostos químicos associados aos pellets, é necessário dispor das composições químicas dos microplásticos, assim como ter perfis mais completos sobre os contaminantes que podem estar associados a eles, de modo a compreender com uma maior exatidão a relação entre as possíveis causas de toxicidade.

6. Conclusão

O presente estudo evidencia dados sobre a toxicidade de pellets plásticos em espécies marinhas. Conforme o resultado, foi possível observar que lixiviados preparados a partir de pellets plásticos coletados em diversos locais do mundo não causaram alterações no desenvolvimento embriolarval de *M. quinquiesperforata*, em concentrações ambientais reais, sugerindo baixa contaminação ou que eventuais contaminantes químicos não alcançavam concentrações suficientes nos lixiviados para causar toxicidade nesta espécie. Porém no segundo teste realizado com *P. perna*, somente com lixiviados coletados em Houston, Texas, EUA, foi possível observar diferentes níveis de toxicidade das amostras em relação ao desenvolvimento embriolarval, principalmente nas

concentrações maiores (100%), mostrando que mesmo sendo amostras da mesma região os pellets possuem diferentes níveis de toxicidade. Para que essa pesquisa esteja mais completa, se faz necessário realizar análises químicas dos pellets tanto em relação ao seu material quanto em relação aos seus contaminantes. De maneira geral, os pellets plásticos representam uma ameaça a biota aquática, no entanto, faltam informações na literatura a respeito da sua toxicidade sobre diferentes espécies.

7. Referências Bibliográficas

- Albertsson, A. C., Andersson, S. O., & Karlsson, S. (1987). The mechanism of biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability*, 18(1), 73-87.
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1596-1605.
- Alomar, C., Estarellas, F., & Deudero, S. (2016). Microplastics in the Mediterranean Sea: deposition in coastal shallow sediments, spatial variation and preferential grain size. *Marine Environmental Research*, 115, 1-10.
- Ashton, K., Holmes, L., & Turner, A. (2010). Association of metals with plastic production pellets in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 60(11), 2050-2055.
- ABNT, N. (1995). NBR 6502–Rochas e solos. *Rio de Janeiro*.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas ABNT. NBR 16456. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade - Método de ensaio de curta duração com embriões bivalves, 2016.
- 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.
- ASTM. 1992. Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. E 724-89 p. 377-394.
- Atsdr. (2002b). *ANNUAL REPORT 2002*. (n.d.).
- Bakir, A., Rowland, S. J., & Thompson, R. C. (2012). Competitive sorption of persistent organic pollutants onto microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 64(12), 2782-2789.
- Barbosa, A. C. B. (2017). Efeitos ecotoxicológicos de microplásticos e outros contaminantes ambientais em *Daphnia magna*.
- Barnes, D. K., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1985-1998.
- Bayne, B. L. (1965). Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). *Ophelia*, 2(1), 1-47.
- Bayne, B. L., Gabbott, P. A., & Widdows, J. (1975). Some effects of stress in the adult on the eggs and larvae of *Mytilus edulis* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 55(3), 675-689.
- Bayne, B. L. (Ed.). (1976). *Marine mussels: their ecology and physiology*.
- Bila, D. M., & Dezotti, M. (2007). Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, 30, 651-666.
- Bråte, I. L. N., Eidsvoll, D. P., Steindal, C. C., & Thomas, K. V. (2016). Plastic ingestion by Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the Norwegian coast. *Marine Pollution Bulletin*, 112(1-2), 105-110.
- Camargo, K. M., Foster, M., Buckingham, B., McDonald, T. J., & Chiu, W. A. (2021). Characterizing baseline legacy chemical contamination in urban estuaries for disaster-research through systematic evidence mapping: A case study. *Chemosphere*, 281, 130925.
- Carson, H. S., Colbert, S. L., Kaylor, M. J., & McDermid, K. J. (2011). Small plastic debris changes water movement and heat transfer through beach sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1708-1713.

- Carpenter, E. J., & Smith Jr, K. L. (1972). Plastics on the Sargasso Sea surface. *Science*, 175(4027), 1240-1241.
- Carpenter, E. J., Anderson, S. J., Harvey, G. R., Miklas, H. P., & Peck, B. B. (1972). Polystyrene spherules in coastal waters. *Science*, 178(4062), 749-750.
- Cherr, G. N., Shoffner-Mcgee, J., & Shenker, J. M. (1990). Methods for assessing fertilization and embryonic/larval development in toxicity tests using the California mussel (*Mytilus californianus*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 9(9), 1137-1145.
- Clesceri, L. S., Greenberg, A. E., Eaton, A. D., & Franson, M. A. H. (1989). Standard methods for the examination of water and wastewater.
- Coe, J. M., & Rogers, D. (Eds.). (2012). *Marine Debris: Sources, Impacts, and Solutions*. Springer Science & Business Media.
- Colton Jr, J. B., Burns, B. R., & Knapp, F. D. (1974). Plastic Particles in Surface Waters of the Northwestern Atlantic: The abundance, distribution, source, and significance of various types of plastics are discussed. *Science*, 185(4150), 491-497.
- Coppock, R. L., Cole, M., Lindeque, P. K., Queirós, A. M., & Galloway, T. S. (2017). A small-scale, portable method for extracting microplastics from marine sediments. *Environmental Pollution*, 230, 829-837.
- Costa, M. F., Ivar do Sul, J. A., Silva-Cavalcanti, J. S., Araújo, M. C. B., Spengler, Â., & Tourinho, P. S. (2010). On the importance of size of plastic fragments and pellets on the strandline: a snapshot of a Brazilian beach. *Environmental Monitoring and Assessment*, 168, 299-304.
- da Costa, J. P., Santos, P. S., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2016). (Nano) plastics in the environment—sources, fates and effects. *Science of the Total Environment*, 566, 15-26.
- Davis, H. C. (1961). Effects of some pesticides on eggs and larvae of oysters (*Crassostrea virginica*) and clams (*Venus mercenaria*). *Commercial Fisheries Review*, 23(12), 8-23.
- Delaeter, C., Spilmont, N., Bouchet, V. M., & Seuront, L. (2022). Plastic leachates: Bridging the gap between a conspicuous pollution and its pernicious effects on marine life. *Science of The Total Environment*, 826, 154091.
- de Lucia, G. A., Caliani, I., Marra, S., Camedda, A., Coppa, S., Alcaro, L., ... & Matiddi, M. (2014). Amount and distribution of neustonic micro-plastic off the western Sardinian coast (Central-Western Mediterranean Sea). *Marine Environmental Research*, 100, 10-16.
- D'amato, C., Torres, J. P., & Malm, O. (2002). DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental-uma revisão. *Química Nova*, 25, 995-1002.
- Endo, S., Takizawa, R., Okuda, K., Takada, H., Chiba, K., Kanehiro, H., ... & Date, T. (2005). Concentration of polychlorinated biphenyls (PCBs) in beached resin pellets: variability among individual particles and regional differences. *Marine Pollution Bulletin*, 50(10), 1103-1114.
- Eriksen, M., Lebreton, L. C., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., ... & Reisser, J. (2014). Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PloS one*, 9(12), e111913.
- EPA. 1991. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 4^o Edition. EMSL .293pp.
- EPA - 1992 Environmental Protection Agency. Plastic pellets in the aquatic environment: Sources and recommendations. EPA 842/B-92/010. Office of Water, Washington, p. 109.
- Fanini, L., & Bozzeda, F. (2018). Dynamics of plastic resin pellets deposition on a microtidal sandy beach: informative variables and potential integration into sandy beach studies. *Ecological Indicators*, 89, 309-316.

- Fernandes, F. D. C., & Tommasi, L. R. (1981). Aspectos biológicos e ecológicos do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) da região do Cabo Frio-Brasil.
- Fichet, D., Radenac, G., & Miramand, P. (1998). Experimental studies of impacts of harbour sediments resuspension to marine invertebrates larvae: bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn and toxicity. *Marine Pollution Bulletin*, 36(7), 509-518.
- Fisner, M., Majer, A., Taniguchi, S., Bicego, M., Turra, A., & Gorman, D. (2017). Colour spectrum and resin-type determine the concentration and composition of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in plastic pellets. *Marine Pollution Bulletin*, 122(1-2), 323-330.
- Frias, J. P., & Nash, R. (2019). Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Marine Pollution Bulletin*, 138, 145-147.
- Frias, J. P. G. L., Sobral, P., & Ferreira, A. M. (2010). Organic pollutants in microplastics from two beaches of the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin*, 60(11), 1988-1992.
- Fo, R. R., & Resgalla Jr, C. (2002). Testes de toxicidade com embriões de *Perna perna* (Linnaeus, 1758)(Mollusca: Mytilidae): avaliações de indução e sensibilidade. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, 6(1), 7-17.
- Fotopoulou, K. N., & Karapanagioti, H. K. (2015). Surface properties of beached plastics. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 11022-11032.
- Fowler, C. W. (1987). Marine debris and northern fur seals: a case study. *Marine Pollution Bulletin*, 18(6), 326-335.
- Galloway, T. S., Cole, M., & Lewis, C. (2017). Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. *Nature Ecology & Evolution*, 1(5), 0116.
- Geyer, R. (2020). Production, use, and fate of synthetic polymers. In *Plastic Waste and Recycling* (pp. 13-32). Academic Press.
- Gorman, D., Moreira, F. T., Turra, A., Fontenelle, F. R., Combi, T., Bicego, M. C., & de Castro Martins, C. (2019). Organic contamination of beached plastic pellets in the South Atlantic: Risk assessments can benefit by considering spatial gradients. *Chemosphere*, 223, 608-615.
- Hammer, J., Kraak, M. H., & Parsons, J. R. (2012). Plastics in the marine environment: the dark side of a modern gift. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1-44.
- Harmon, M. R., Pait, A. S., & Hameedi, M. J. (2003). Sediment contamination, toxicity, and macroinvertebrate infaunal community in Galveston Bay.
- Hartmann, N. I. B., Nolte, T., Sørensen, M. A., Jensen, P. R., & Baun, A. (2015, February). Aquatic ecotoxicity testing of nanoplastics: lessons learned from nanoecotoxicology. In *ASLO Aquatic Sciences Meeting* (Vol. 2015).
- Heskett, M., Takada, H., Yamashita, R., Yuyama, M., Ito, M., Geok, Y. B., ... & Mermoz, J. (2012). Measurement of persistent organic pollutants (POPs) in plastic resin pellets from remote islands: toward establishment of background concentrations for International Pellet Watch. *Marine Pollution Bulletin*, 64(2), 445-448.
- His, E., & Beiras, R. (1995). Monitoring fresh and brackish water quality around shellfish farming areas with a bivalve embryo and larva simplified bioassay method. *Oceanologica Acta*, 18(5), 591-595.
- Hunt, J. W., & Anderson, B. S. (1993). From research to routine: A review of toxicity testing with marine molluscs. *ASTM Special Technical Publication*, 1179, 320-320.
- Imhof, H. K., Wiesheu, A. C., Anger, P. M., Niessner, R., Ivleva, N. P., & Laforsch, C. (2018). Variation in plastic abundance at different lake beach zones-A case study. *Science of the Total Environment*, 613, 530-537.

- Izar, G. M., Morais, L. G., Pereira, C. D. S., Cesar, A., Abessa, D. M. S., & Christofolletti, R. A. (2019). Quantitative analysis of pellets on beaches of the São Paulo coast and associated non-ingested ecotoxicological effects on marine organisms. *Regional Studies in Marine Science*, 29, 100705.
- Jesus, M.G.S., 2002. DDT. Cadernos de referência ambiental, Vol 13, Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs). Centro de Recursos Ambientais, pp. 159-193
- Karami, A. (2017). Gaps in aquatic toxicological studies of microplastics. *Chemosphere*, 184, 841-848.
- Laitano, K. S., Gonçalves, C., & Resgalla Jr, C. (2008). Viabilidade do uso da bolacha-do-mar *Mellita quinquesperforata* como organismo teste. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol*, 3, 9-14.
- Le, D. Q., Takada, H., Yamashita, R., Mizukawa, K., Hosoda, J., & Tuyet, D. A. (2016). Temporal and spatial changes in persistent organic pollutants in Vietnamese coastal waters detected from plastic resin pellets. *Marine Pollution Bulletin*, 109(1), 320-324.
- Li, P., Lin, C., Cheng, H., Duan, X., & Lei, K. (2015). Contamination and health risks of soil heavy metals around a lead/zinc smelter in southwestern China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 391-399.
- Holmes, L. A., Turner, A., & Thompson, R. C. (2012). Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment. *Environmental Pollution*, 160, 42-48.
- Lusher, A. L., Tirelli, V., O'Connor, I., & Officer, R. (2015). Microplastics in Arctic polar waters: the first reported values of particles in surface and sub-surface samples. *Scientific Reports*, 5(1), 14947.
- Manzano, A. B. (2009). *Distribuição, taxa de entrada, composição química e identificação de fontes de grânulos plásticos na Enseada de Santos, SP, Brasil* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C., & Kaminuma, T. (2001). Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environmental Science & Technology*, 35(2), 318-324.
- Mello, L. C., da Fonseca, T. G., & de Souza, A. D. M. (2020). Ecotoxicological assessment of chemotherapeutic agents using toxicity tests with embryos of *Mellita quinquesperforata*. *Marine Pollution Bulletin*, 159, 111493.
- Nascimento, I. A., Sousa, E. C. P. M. D., & Nipper, M. (2002). Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil.
- Nobre, C. R., Santana, M. F. M., Maluf, A., Cortez, F. S., Cesar, A., Pereira, C. D. S., & Turra, A. (2015). Assessment of microplastic toxicity to embryonic development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Marine Pollution Bulletin*, 92(1-2), 99-104.
- Ogata, Y., Takada, H., Mizukawa, K., Hirai, H., Iwasa, S., Endo, S., ... & Thompson, R. C. (2009). International Pellet Watch: Global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs. *Marine Pollution Bulletin*, 58(10), 1437-1446.
- OECD, 2004. OECD guideline for the testing of chemicals. Guideline 202: *Daphnia* sp. acute immobilisation test, adopted 13 April 2004.
- Penteado, J. C. P., & Vaz, J. M. (2001). O legado das bifenilas policloradas (PCBs). *Química Nova*, 24, 390-398.
- Rehse, S., Kloas, W., & Zarfl, C. (2016). Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 153, 91-99
- Rochman, C. M., Browne, M. A., Halpern, B. S., Hentschel, B. T., Hoh, E., Karapanagioti, H. K., ... &

- Thompson, R. C. (2013). Classify plastic waste as hazardous. *Nature*, 494(7436), 169-171.
- Rios, L. M., Moore, C., & Jones, P. R. (2007). Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Marine Pollution Bulletin*, 54(8), 1230-1237.
- Silva, P. P. G. (2016). *Contaminação e toxicidade de microplásticos em uma área de proteção marinha costeira* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Taniguchi, S., Colabuono, F. I., Dias, P. S., Oliveira, R., Fisner, M., Turra, A., ... & Montone, R. C. (2016). Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 106(1-2), 87-94.
- Takada, H. (2006). Call for pellets! International Pellet Watch Global Monitoring of POPs using beached plastic resin pellets. *Marine Pollution Bulletin*, 52(12), 1547-1548.
- Tanaka, K., Takada, H., Yamashita, R., Mizukawa, K., Fukuwaka, M. A., & Watanuki, Y. (2015). Facilitated leaching of additive-derived PBDEs from plastic by seabirds' stomach oil and accumulation in tissues. *Environmental Science & Technology*, 49(19), 11799-11807.
- Thornton Hampton, L. M., Brander, S. M., Coffin, S., Cole, M., Hermabessiere, L., Koelmans, A. A., & Rochman, C. M. (2022). Characterizing microplastic hazards: which concentration metrics and particle characteristics are most informative for understanding toxicity in aquatic organisms? *Microplastics and Nanoplastics*, 2(1), 1-16.
- United Nations Environment Program (UNEP). 2021. From Pollution to Solution: A global assessment of marine litter and plastic pollution. Nairobi. 146p
- Wang, J., Wang, M., Ru, S., & Liu, X. (2019). High levels of microplastic pollution in the sediments and benthic organisms of the South Yellow Sea, China. *Science of the Total Environment*, 651, 1661-1669.
- Wellner, K. (2012). Inducing Fertilization and Development in Sand Dollars. *Embryo Project Encyclopedia*.
- Xu, S., Ma, J., Ji, R., Pan, K., & Miao, A. J. (2020). Microplastics in aquatic environments: occurrence, accumulation, and biological effects. *Science of the Total Environment*, 703, 134699.
- Yurtsever, M. (2019). Glitters as a source of primary microplastics: an approach to environmental responsibility and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 32(3), 459-478.
- Zanetti, D. G. (2019). Microplásticos em praias arenosas da Ilha de Santa Catarina: ocorrência, distribuição e caracterização.
- Zaroni, L. P., Abessa, D. M. D. S., Lotufo, G. R., Sousa, E. C. P. M., & Pinto, Y. A. (2005). Toxicity testing with embryos of marine mussels: protocol standardization for *Perna perna* (Linnaeus, 1758). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 74(4), 793-800.

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSODiscente: **JOÃO PEDRO DE LIMA MUKAI**Título: *"Toxicidade de pellets plásticos de diferentes regiões do Atlântico sobre embriões de bolacha-do-mar (Mellita quinquiesperforata) e mexilhão (Perna perna)"*

Orientador: Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa

Curso/Habilitação: Bacharelado em Ciências Biológicas/Biologia Marinha

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa	Aprovado
Dra. Ana Carolina Feitosa Cruz	Aprovado

PARECER:

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que o discente **João Pedro de Lima Mukai** obteve o seguinte conceito: APROVADO REPROVADO

São Vicente, 08 de dezembro de 2023.


Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa
Dra. Ana Carolina Feitosa Cruz