



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Avaliação dos efeitos de *pellets* e polímeros, oxi-biodegradável e hidrossolúvel, em ambientes marinhos utilizando sedimento marcado e mexilhões da espécie *Mytella charruana*

DANIELLE GARCIA ARAUJO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientadora:

Profa. Dra. Marycel Elena Barboza Cotrim

São Paulo
2022

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Avaliação dos efeitos de pellets e polímeros, oxi-biodegradável e hidrossolúvel, em ambientes marinhos utilizando sedimento marcado e mexilhões da espécie *Mytella charruana*

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

DANIELLE GARCIA ARAUJO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientadora:

Profa. Dra. Marycel Elena Barboza Cotrim

São Paulo

2022

Fonte de Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

GARCIA ARAUJO, D. ***Avaliação dos efeitos de pellets e polímeros, oxi-biodegradável e hidrossolúvel, em ambientes marinhos utilizando sedimento marcado e mexilhões da espécie Mytella charruana.*** 2022. 77 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Garcia Araujo, Danielle

Avaliação dos efeitos de pellets e polímeros, oxi-biodegradável e hidrossolúvel, em ambientes marinhos utilizando sedimento marcado e mexilhões da espécie *Mytella charruana* / Danielle Garcia Araujo; orientador Marycel Elena Barboza Cotrim. -- São Paulo, 2022.

77 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2022.

1. Partículas plásticas. 2. Biomarcadores. 3. Sedimento Marinho. 4. Metais. 5. Bioplásticos. I. Barboza Cotrim, Marycel Elena, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço três grandes mulheres que sempre acreditaram em mim desde pequena, Cristina, Glória e Kelly, que sempre me ajudaram a conquistar os meus sonhos, este é mais um deles. Obrigada por tudo, por todo apoio, incentivo ao longo desses anos.

À Dra. Marycel Elena Barboza Cotrim, CEQMA – IPEN, pela orientação e por confiar no meu trabalho.

Aos meus familiares e amigos por sempre estarem comigo, por sempre me apoiarem, mesmo de longe. Ao meu namorado, Giovani por todo suporte, por sempre me fazer rir e querer que eu conquiste o mundo. Sei que você sempre acreditou e torceu pelo meu sucesso, sem você essa etapa teria sido mais difícil.

A Julia Luzzi e Leticia Lopes, obrigada por toda ajuda e momentos compartilhados ao longo desses anos, desde o estágio até o mestrado, obrigada por toda ajuda e apoio. Ao Fabio Pusceddu, Lorena da Silva Souza, Caio Nobre, Renan Paes, por toda ajuda no laboratório e fora dele.

À Dra. Paloma Gusso-Choueri, UNESP – Campos do litoral Paulista por toda ajuda e ensinamentos, principalmente nas etapas das análises dos biomarcadores e estatística.

Ao professor Dr. Denis Moledo de Souza Abessa, UNESP – Campos do litoral Paulista por ceder o laboratório de ecotoxicologia para realização das análises dos biomarcadores.

À Dra. Giovana Gimiliani, CEQMA – IPEN, pelas análises químicas dos pellets e polímeros e pelo apoio ao desenvolvimento da dissertação.

Ao Marcos Scapin, CEQMA – IPEN, pelas análises químicas das amostras e pelos ensinamentos sobre a técnica de raio-x.

Agradeço aos laboratórios de ecotoxicologia da UNISANTA, UNIFESP E UNESP pelo apoio para que toda etapa de ecotoxicologia desta dissertação pudesse acontecer.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro por meio da bolsa de pesquisa.

RESUMO

ARAÚJO, D. G. **Avaliação dos efeitos de *pellets* e polímeros, oxi-biodegradável e hidrossolúvel, em ambientes marinhos utilizando sedimento marcado e mexilhões da espécie *Mytella charruana*.** 2022. 76 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN- CNEN/SP. São Paulo.

Os plásticos estão entre os principais resíduos sólidos encontrados no ambiente marinho e seu uso crescente, descarte não adequado e sua alta persistência a degradação, têm contribuído para o acúmulo deste detrito no meio ambiente, em especial nos oceanos. Os plásticos convencionais fabricados à base de petróleo ainda são os mais utilizados, apesar do grande avanço dos biodegradáveis. Os plásticos biodegradáveis podem diminuir o tempo de vida do material, no entanto, se descartado no ambiente natural, ainda não há dados suficientes sobre a capacidade de biodegradação. Os testes e métodos de biodegradabilidade no ambiente aquático, não consideram testes de toxicidade, nem os possíveis efeitos ecológicos do material e suas micropartículas produzidas pela fragmentação. Nos últimos anos, diferentes estudos vêm sendo realizados para identificar os efeitos negativos do plástico no ambiente marinho e compreender a dinâmica dos aditivos associados a esses materiais. Com base nos fatos acima o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos tóxicos de *pellets* e polímeros, biodegradáveis e solúveis em água sobre o mexilhão *Mytella charruana*. Os mexilhões foram expostos por 168 h em sedimentos marinhos com *pellets* plásticos de polipropileno (PP), polietileno (PE) e poliestireno (PS), uma mistura dos três *pellets* (PP, PE e PS) e polímeros plásticos, oxi-biodegradável e solúvel em água. A hemolinfa e as brânquias foram extraídas e analisadas após dois tempos de exposição, 24 horas e 168 horas, usando um conjunto de biomarcadores (GST, GPX, LPO, dano ao DNA, ChE e estabilidade da membrana lisossômica). Os resultados demonstraram respostas bioquímicas e fisiológicas em relação às enzimas antioxidantes de fase II, danos ao DNA e estabilidade da membrana lisossômica em mexilhões expostos aos *pellets* PP, PE e PS e no polímero hidrossolúvel em 24 horas. Análises químicas realizadas por fluorescência de raios-x por energia dispersiva (EDXRF) para identificação de aditivos químicos mostraram a presença de metais como: Al, Si, P, S, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu e Zn nos *pellets* e polímeros.

Palavras-Chave: Partículas plásticas; Biomarcadores; Sedimento Marinho; Metais; Bioplásticos

ABSTRACT

ARAÚJO, D. G. **Evaluation of the effects of pellets and biodegradable and water-soluble polymers in marine environments using spiked sediment and *Mytella charruana* mussels.** 2022. 76 f. Dissertation (Master in Nuclear Technology) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN- CNEN/SP. São Paulo.

Plastics are among the main solid waste found in the marine environment and their increasing use, improper disposal and their high persistence to degradation, have contributed to the accumulation of this waste in the environment, especially in the oceans. Conventional petroleum-based plastics are still the most used, despite the great advance of biodegradable ones. Biodegradable plastics can reduce the lifespan of the material, however, if discarded in the natural environment, there is still not enough data on the ability to biodegrade. The biodegradability tests and methods in the aquatic environment do not consider toxicity tests, nor the possible ecological effects of the material and its microparticles produced by fragmentation. In recent years, different studies have been carried out to identify the negative effects of plastic on the marine environment and to understand the dynamics of additives associated with these materials. Based on the facts above, the aim of this study was to evaluate the toxic effects of biodegradable and water-soluble pellets and polymers on the mussel *Mytella charruana*. The mussels were exposed for 168 h in marine sediments with plastic pellets of polypropylene (PP), polyethylene (PE) and polystyrene (PS), a mixture of the three pellets (PP, PE and PS) and plastic polymers, oxo-biodegradable and soluble in water. Hemolymph and gills were extracted and analyzed after two exposure times, 24 hours and 168 hours, using a set of biomarkers (GST, GPX, LPO, DNA damage, ChE and lysosomal membrane stability). The results demonstrated biochemical and physiological responses in relation to phase II antioxidant enzymes, DNA damage and lysosomal membrane stability in mussels exposed to PP, PE and PS pellets and water-soluble polymers in 24 hours. Chemical analyzes performed by energy dispersive x-ray fluorescence (EDXRF) to identify chemical additives showed the presence of metals such as: Al, Si, P, S, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu and Zn in pellets and polymers.

Keywords: Plastic particles; Biomarkers; Marine Sediment; Metals; Bioplastics

Lista de Figuras

Figura 1 - Trecho da cadeia de polietileno. A parte em destaque é a unidade repetitiva.

Figura 2 - *Pellets* virgens de Polietileno (PE), Polipropileno (PP) e Poliestireno (PS).

Figura 3 - Fluxograma da exposição dos organismos aos *pellets* virgens e polímeros plásticos em respostas das atividades enzimáticas.

Figura 4 - Indivíduos expostos ao sedimento integral contaminado com mistura de *pellets* (PP, PE e PS).

Figura 5 - Hemócitos tratados com corante vermelho neutro observados sob microscópio óptico (400x). As setas pretas indicam exemplos de alguns dos critérios analisados.

Figura 6 - Cromatograma da amostra de *pellet* PE.

Figura 7 - Tripletos representando um dieno, alqueno e alceno.

Figura 8 - Cromatograma da amostra de *pellet* PP.

Figura 9 - Cromatograma da amostra de *pellet* PS.

Figura 10 - Pirograma de poliestireno.

Figura 11 - Cromatograma das amostras de *pellet* PP e canudo Oxi-biodegradável.

Figura 12 - Biomarcadore GPx após 24 horas e 168 horas de exposição. * Relação de diferença significativa para o controle ($p < 0,05$). ** Diferença significativa relativa para outro tratamento ($p < 0,05$). *** Relação de diferença significativa ao controle e outro tratamento ($p < 0,05$).

Figura 13 - Biomarcador GST após 24 horas e 168 horas de exposição. * Relação de diferença significativa para o controle ($p < 0,05$). ** Diferença significativa relativa para outro tratamento ($p < 0,05$). *** Relação de diferença significativa ao controle e outro tratamento ($p < 0,05$).

Figura 14 - Biomarcador AchE após 24 horas e 168 horas de exposição. * Relação de diferença significativa para o controle ($p < 0,05$). ** Diferença significativa relativa para outro tratamento ($p < 0,05$). *** Relação de diferença significativa ao controle e outro tratamento ($p < 0,05$).

Figura 15 - Biomarcador LPO após 24 horas e 168 horas de exposição. * Relação de diferença significativa para o controle ($p < 0,05$). ** Diferença significativa relativa para outro tratamento ($p < 0,05$). *** Relação de diferença significativa ao controle e outro tratamento ($p < 0,05$).

Figura 16 - Biomarcador Danos no DNA após 24 horas e 168 horas de exposição. * Relação de diferença significativa para o controle ($p < 0,05$). ** Diferença significativa relativa para outro tratamento ($p < 0,05$). *** Relação de diferença significativa ao controle e outro tratamento ($p < 0,05$).

Figura 17 - Biomarcador VN após 24 horas e 168 horas de exposição. * Relação de diferença significativa para o controle ($p < 0,05$). ** Diferença significativa relativa para outro tratamento ($p < 0,05$). *** Relação de diferença significativa ao controle e outro tratamento ($p < 0,05$).

Figura 18 - Respostas combinadas de biomarcadores nas amostras de brânquia. A imagem mostra o comportamento dos biomarcadores nos tratamentos no tempo 24 horas.

Figura 19 - Respostas combinadas de biomarcadores nas amostras de brânquia. A imagem mostra o comportamento dos biomarcadores nos tratamentos no tempo 168 horas.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Critérios analisados na observação das lâminas com hemócitos tratados com vermelho neutro para diferenciar células saudáveis das estressadas.

Tabela 2 - Diferentes métodos na programação do cromatógrafo.

Tabela 3 - Faixa de leitura no sistema EM para amostras poliméricas.

Tabela 4 - SIMPER realizado com resultados de biomarcadores bioquímicos (GST, GPX, LPO, ChE e Danos em DNA) e fisiológico (vermelho neutro) em 24 horas de exposição na brânquia de *Mytella charruana*.

Tabela 5 - SIMPER realizado com resultados de biomarcadores bioquímicos (GST, GPX, LPO, ChE e Danos em DNA) e fisiológico (vermelho neutro) em 168 horas de exposição na brânquia de *Mytella charruana*.

Tabela 6 - Valores de Horwitz.

Tabela 7 - Concentrações (mg kg^{-1}) dos elementos químicos no material de referência obtidos por EDXRF.

Tabela 8 - Concentrações (mg kg^{-1}) dos elementos químicos em *pellets* e polímeros obtidos por EDXRF.

Tabela 9 - Análise da Permanova para polímeros, hidrossolúvel e oxi-biodegradável, e para *pellets* (PP, PE e PS) para fatores “tempo” e tipo polimérico. Os valores em negrito são para indicar $p < 0,05$.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivos específicos.....	15
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1 Plásticos.....	15
3.1.1 Polímeros Biodegradáveis.....	16
3.1.2 Polímeros oxi-biodegradáveis	17
3.1.3 Polímero solúvel em água	18
3.2 Impactos dos plásticos no ambiente marinho.....	19
3.3 Aditivos químicos e metais	22
3.4 Ecotoxicologia e meio ambiente	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Desenho experimental.....	26
4.2 Coleta e manutenção dos organismos-teste.....	27
4.3 Avaliação dos sedimentos	28
4.3.1 Coleta de sedimentos.....	28
4.2.3 Mistura do sedimento com os plásticos.....	28
4.3 Exposição dos organismos	29
4.4 Biomarcadores bioquímicos.....	30
4.4.2 Glutathione S-transferase (GST).....	31
4.4.3 Glutathione Peroxidase (GPx).....	31
4.4.4 Danos no DNA (strand breaks)	31
4.4.5 Colinesterase (ChE).....	32
4.4.6 Peroxidação Lipídica (LPO).....	32
4.5 Ensaio de estabilidade da membrana lisossômica.....	32
4.5.1 Preparo das soluções	33
4.5.2 Solução fisiológica	33
4.5.3 Solução de vermelho neutro.....	33
4.5.4 Solução de trabalho	33
4.5.5 Extração e manuseio da hemolinfa.....	34
4.6 Análise química dos <i>pellets</i> e polímeros	36
4.6.1 Pirólise acoplada à cromatografia a gás e à espectrometria de massas	36

4.6.2 Fluorescência de raios-x por energia dispersiva.....	38
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
Fonte: Autora da dissertação.....	39
6 RESULTADOS.....	40
6.1 Caracterização dos <i>pellets</i> e polímeros por pirólise acoplada à cromatografia a gás e à espectrometria de massas	40
6.2 Análises por fluorescência de raios-x por energia dispersiva	43
6.3 Respostas biológicas	46
7 DISCUSSÃO.....	51
7.1 Análises de metais presentes nos <i>pellets</i> e polímeros por fluorescência de raios-x por energia dispersiva.....	51
7.2 Biomarcadores.....	53
8 CONCLUSÃO	58

1 INTRODUÇÃO

Materiais plásticos, uma vez inseridos no meio ambiente não são biodegradáveis e ao serem expostos ao intemperismo acabam se fragmentando. Essa persistência leva uma abundância crescente no oceano tornando os detritos plásticos mais disponíveis a vida marinha (LI et al., 2016; GALLO et al., 2018). Os produtos plásticos são uma mistura de polímeros e aditivos químicos, e seus tamanhos variam de metros a nanômetros (LI et al., 2016). Compreendem itens diversos como garrafas, equipamentos de pesca, canudos, embalagens de alimentos, microesferas em cosméticos, *pellets* plásticos entre outros (GALLO et al., 2018).

Segundo dados de 2019 da organização não governamental internacional WWF (do inglês *World Wide Fund for Nature*), o Brasil ocupa o 4º lugar de maior produtor mundial de resíduo plástico descartado no mundo com cerca de 11 milhões de toneladas, atrás de outros países como Estados Unidos, China e Índia. Foi estimado que em 2025 a quantidade global de plásticos nos oceanos será de 250 milhões de toneladas, o que provavelmente representará uma carga poluente de milhões de toneladas de aditivos químicos (JAMBECK et al., 2015; GALLO et al., 2018).

Grandes quantidades de *pellets* plásticos, matéria prima para produção de produtos plásticos, também estão sendo encontradas em áreas costeiras (NOBRE et al., 2016; FOTOPOLU e KARAPANAGIOTI, 2012; MATO et al., 2001; HOLMES et al., 2011), sendo os mais comuns derivados de polipropileno (PP), polietileno (PE) e poliestireno (PS) (EPA, 1992). Esses materiais plásticos uma vez inseridos no meio ambiente, podem adsorver substâncias como diclorodifeniltricloroetano (DDT), policlorado bifenilos (PCBs), fenóis e outras substâncias não polares (RIOS et al., 2007; ENGLER, 2012).

Os *pellets* plásticos e seus produtos no meio ambiente podem liberar aditivos químicos que foram adicionados durante sua produção para melhorar ou modificar suas propriedades e, assim, tornar o plástico mais utilizável. Esses aditivos são utilizados para atender os padrões de segurança em materiais eletrônicos (retardantes de chamas, incluindo éter difenílico polibromado), tornar os plásticos mais flexíveis (ftalatos), reduzir a degradação dos raios UV e do calor (fenóis e arilaminas), tornar o material mais resistente a degradação química ou até adicionar uma coloração desejada (CALLISTER, et al. 2017).

A maioria dos aditivos químicos geralmente não são ligados covalentemente ao polímero plástico e assim podem migrar para a superfície do material, sendo potencialmente

liberados ao meio ambiente (CAPOLUPO et al., 2020). Os aditivos podem ser utilizados em plásticos biodegradáveis para se degradarem mais rapidamente e a assim, não se acumularem no meio ambiente. A biodegradação dos materiais depende das propriedades químicas dos polímeros e grupos funcionais (-COO-, -OH e -COOH), estrutura química e cristalinidade dos polímeros (NAZARETH et al., 2019).

Os plásticos oxi-biodegradáveis por exemplo, possuem um aditivo (pró-oxidante) em sua composição, que tem como objetivo quebrar algumas ligações químicas da cadeia molecular do polímero. A etapa final do processo de biodegradação é a bioassimilação e mineralização por microorganismos (NAPPET e THOMPSON, 2019).

Esses plásticos biodegradáveis se tornaram uma alternativa para substituir os plásticos convencionais, derivados do petróleo, e assim reduzir o acúmulo ambiental desses detritos (ZHU e WANG, 2020). Os fabricantes têm tentado atrair os consumidores usando marketing verde (KOENING-LEWIS, 2018). Já que o *Greenwashing* (estratégia de marketing, de promover discursos, ações e propagandas sustentáveis anunciando mais benefícios ambientais do que realmente os produtos oferecem) empregados nesses produtos pelos fabricantes têm atraídos consumidores pelo mundo todo, na promessa de produtos mais sustentáveis ou amigos do meio ambiente (FUENTES, 2015; BLOME et al., 2015).

Os plásticos solúveis em água também são frequentemente considerados como soluções para o acúmulo de resíduos plásticos, mas esses plásticos são produtos químicos com alto potencial de liberação no meio ambiente, e sua ocorrência e concentrações ambientais são desconhecidas (HUPPERTSBERG et al., 2020).

Segundo Nappet e Thompson (2019) há uma falta de evidências de que materiais biodegradáveis, oxi-biodegradáveis e compostáveis ofereçam uma vantagem ambiental em relação aos plásticos convencionais, e o potencial de fragmentação em microplásticos causa preocupação adicional. As micropartículas e nanopartículas além de serem encontradas em organismos marinhos, já foram encontradas na placenta e em tecidos pulmonares humanos, pois os microplásticos estão presentes no ar e podem ser inalados por humanos (RUGASSA et al., 2021; AMATO-LOURENÇO et al., 2021).

Os riscos gerados pelos plásticos são uma nova área de investigação, e existe um grande desafio para entender como as substâncias químicas associadas a eles interagem no meio ambiente e suas consequências na vida marinha. De acordo com Bertolotti (1990), os testes

toxicológicos possibilitam estabelecer limites permissíveis para diversas substâncias químicas e, avaliar o impacto de misturas de poluentes presentes nos ambientes aquáticos sobre os organismos.

Os ensaios ecotoxicológicos são realizados com organismos indicadores, que possuem um limite de tolerância a determinadas substâncias químicas e apresentam alguma alteração, seja ela fisiológica, morfológica ou comportamental, quando expostos a determinados poluentes e concentrações. Essas exposições são feitas em diferentes concentrações de substâncias (isoladas ou em combinação) por um determinado período de tempo (MAGALHÃES e FILHO, 2008).

Organismos como ouriços-do-mar, mexilhões, microalgas, peixes e microcrustáceos são utilizados como organismos-teste em ensaios de ecotoxicidade em laboratórios. Através desses testes é possível observar a sobrevivência, o crescimento e a reprodução de um indivíduo, e também os efeitos dos contaminantes, nos processos bioquímicos, fisiológicos, celulares e comportamentais (VAN DER OOST et al., 2003). Estas respostas em níveis bioquímicos, celulares e fisiológicas podem determinar o estado de saúde do organismo e, assim, determinar os primeiros sinais de dano causada por poluentes (GUSSO-CHOUERI et al., 2015).

A brânquia é um órgão muito estudado em trabalhos de toxicologia aquática por ser o primeiro contato do animal com contaminantes ambientais e/ou antrópicos, portanto, organismos filtradores, como os bivalves, são amplamente utilizados em monitoramento de poluição em áreas costeiras. Seus tecidos são capazes de acumular contaminantes orgânicos hidrofóbicos com baixas taxas de transformação metabólica (WIDDOWS e DONKIN, 1991; ALMEIDA et al., 2007; ORTEGA et al., 2018).

No Brasil, mexilhões bivalves das espécies *Mytella charruana* e *Perna perna* são comercializados e servem como alimento para população, conseqüentemente são alvos de muitos estudos, pois podem impactar a saúde dos seres humanos (ALMEIDA et al., 2007; ORTEGA et al., 2018; NOBRE et al., 2020).

Após serem expostos aos poluentes, os organismos geralmente tentam metabolizar e depurar essas substâncias, buscando minimizar assim quaisquer danos celulares que eles causem. Nos últimos anos estudos ambientais vêm utilizando biomarcadores de exposição e de efeito para avaliar e prever os riscos ambientais de substâncias químicas. Esses biomarcadores são classificados em três classes, sendo a primeira de exposição, a segunda de efeito e a terceira

de suscetibilidade (WINSTON, 1990). Entre os biomarcadores de exposição estão a glutathione S-transferase (GST), a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione reduzida (GSH). O sistema biológico produz radicais livres de oxigênio nas células para melhorar a função fisiológica (VAN DER OOST et al., 2003). Quando o organismo é exposto a algum contaminante, ele tende a produzir espécies reativas ao oxigênio (EROS), ativando as defesas antioxidantes, podendo ser avaliada pela enzima glutathione peroxidase (GPX), que é responsável pela redução dos radicais livres e pela prevenção do estresse oxidativo (RÜDIGER et al., 1999; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993).

A GST também é uma enzima antioxidante e ela é responsável por catalisar a conjugação de vários compostos, sendo os conjugados resultantes solúveis em água e, portanto, são excretados mais facilmente (CHEUNG et al., 2001). Se as enzimas dos biomarcadores de exposição forem inibidas ou induzidas, podem ocorrer toxicidades pelos oxidantes. Essa oxidação que ocorre nos ácidos graxos poli-insaturados do organismo é uma consequência do estresse oxidativo, podendo ocasionar à destruição da estrutura das membranas celulares, falência nos mecanismos de troca de metabólitos e, morte celular, em casos extremos. A inibição dessa enzima também pode ocorrer pela ativação do mecanismo de detoxificação (VAN DER OOST et al., 2003; LIMA e ABDALLA, 2001).

Os biomarcadores são considerados de efeito pois detectam alterações bioquímicas e fisiológicas nos tecidos, órgãos ou sistemas de um organismo. Entre esses biomarcadores estão a colinesterase (ChE), a estabilidade da membrana lisossômica, danos ao DNA e peroxidação lipídica (LPO) (CHEUNG et al., 2001; BONNES-TAOUREL et al., 1992).

No que diz respeito a avaliação dos efeitos tóxicos mediados por plásticos, observa-se que as pesquisas em grande parte foram conduzidas objetivando-se compreender a exposição direta de organismos a detritos plásticos, uma vez ingeridos (VON MOOS et al., 2012; COLE e GALLOWAY, 2015; COLE et al., 2020).

Outra linha de investigação, busca elucidar a toxicidade indireta causada por lixiviados de plásticos, ou seja, a dessorção de produtos químicos no ambiente circundante na ausência de ingestão de plástico. Nesse contexto, estudos já foram realizados em diferentes organismos marinhos, como copépodes (BEJGARN et al., 2015; IZAR et al., 2019), cracas (LI et al. 2016), mexilhões (SILVA, 2016; WEBB et al., 2020; CAPOLUPO et al., 2020), ostras (GARDON et al., 2020; BRINGER et al., 2020), peixes (HAMLIM et al., 2015) e ouriço-do-mar (NOBRE, 2016; OLIVIERO et al., 2019; RENDELL-BHATTI et al., 2021). Contudo ainda pouco se sabe

sobre como os aditivos químicos se comportam no meio ambiente, uma vez inseridos através da dessorção de produtos plásticos, e quais seriam seus efeitos nos organismos marinhos, principalmente no que se diz respeito aos aditivos utilizados nos plásticos biodegradáveis e solúveis em água.

Devido a esta lacuna no conhecimento, devem ser realizadas avaliações dos efeitos biológicos através da exposição do organismo alvo a sedimentos e águas contaminadas com diferentes tipos de plásticos, principalmente os biodegradáveis, e que usem diferentes aditivos, para de fato auxiliar na compreensão e na dimensão dos efeitos tóxicos destas substâncias. Os testes de toxicidade aliados às caracterizações químicas destes materiais também auxiliam na produção de resultados mais confiáveis e robustos sobre este tema tão relevante e ainda tão pouco compreendido.

Apesar do crescente clamor da sociedade para que os fabricantes busquem alternativas mais sustentáveis ao uso dos plásticos, os materiais biodegradáveis utilizados atualmente não são uma solução a longo prazo, pouco de fato se estudou sobre eles. Principalmente sobre a importância de se utilizar concentrações ambientalmente relevantes e a brânquia como órgão alvo de estudo para que se possa compreender os efeitos em níveis bioquímicos desses produtos mais sustentáveis.

Baseado nos fatos apresentados, o presente estudo parte da hipótese que polímeros plásticos oxi-biodegradáveis e hidrossolúveis, podem conter substâncias químicas tóxicas e atuarem como vetores dessas substâncias para o ambiente marinho e assim causarem efeitos subletais em mexilhões.

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos tóxicos de diferentes composições poliméricas: *pellets* virgens e polímeros plásticos, oxi-biodegradáveis e hidrossolúveis expostos a sedimentos marcados, utilizando mexilhões da espécie *Mytella charruana*. A partir da análise dos biomarcadores de exposição (GST e GPX) e de efeito (ChE, danos em DNA, LPO e estabilidade da membrana lisossômica) nos organismos marinhos a fim de se compreender a toxicidade dos polímeros plásticos biodegradáveis. A caracterização química dos *pellets* e polímeros também foi alvo de estudo para que assim possa compreender mais sobre os aditivos químicos incorporados nesses materiais e os possíveis efeitos nos organismos em estudo.

2.1 Objetivos específicos

- Composição química das diferentes amostras de *pellets* virgens (Polietileno (PE), Poliestireno (PS) e Polipropileno (PP)) e dos polímeros oxi-biodegradável e solúvel em água, quanto a sua caracterização polimérica e a presença de substâncias potencialmente tóxicas, aplicando as seguintes técnicas: Pirólise acoplada à cromatografia gasosa e á espectrometria de massas; Fluorescência de raios-x por energia dispersiva.
- Avaliação dos efeitos tóxicos a partir dos biomarcadores de exposição (GST e GPX) e de efeito ChE, estabilidade da membrana lisossômica, peroxidação lipídica (LPO) e danos em DNA) nos mexilhões da espécie *Mytella charruana*.

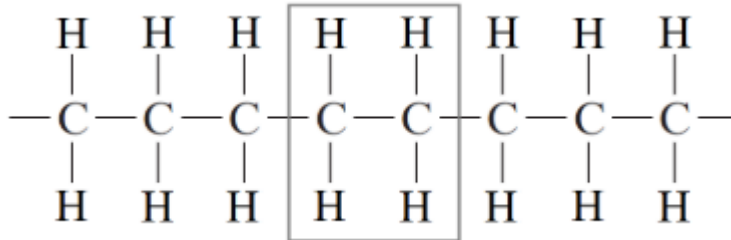
3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Plásticos

A exploração e utilização dos plásticos teve início na segunda metade do século XIX, quando o primeiro material produzido foi baseado na celulose, que era produzida da madeira ou palha e, com passar dos anos, novas substâncias surgiram para a produção de novos produtos (LIMA, 2001). Devido ao seu baixo custo e suas propriedades como, alta resistência a corrosão, baixo peso, resistência à impactos mecânicos, resistência à água e impermeabilidade ao ar esses materiais foram produzidos em grande escala (CALLISTER, 2009).

Os mais utilizados são o polipropileno (PP) e o polietileno (PE) que juntos com o policloreto de vinilo (PVC), poliestireno (PS) e o polietileno tereftalato (PET) correspondem um total de 90% da demanda de plástico. Além destes também são utilizados a poliamida (PA), acetato de polivinila (PVA) e acrilonitrila butadieno estireno (ABS) (ANDRADY e NEAL, 2009). Apesar do grande avanço no processamento e na fabricação, o petróleo, que é uma fonte não renovável, continua sendo a principal matéria prima (THOMPSON et al., 2004; NG e OBBARD, 2006; RIOS et al., 2007). Os polímeros são formados por moléculas denominadas monômeros ligados entre si por ligações covalentes e suas longas cadeias de repetições. Portanto, monômeros são unidades químicas iguais, que se repetem ao longo da cadeia polimérica, como exemplo, o polietileno formado pela repetição do monômero etileno, como demonstrado na Figura 1 (CALLISTER, 2009).

Figura 1 - Trecho da cadeia de polietileno. A parte em destaque é a unidade repetitiva.



Fonte: BOSCARO, 2014.

Quase todos os aspectos da vida diária envolvem plásticos, incluindo roupas, calçados, produtos, embalagens, peças automobilísticas, equipamentos eletrônicos, materiais de construção, materiais hospitalares, utensílios domésticos entre outros (ANDRADY, 2003; ANDRADY e NEAL, 2009). Esses materiais tão comuns, no entanto, são capazes de causar grandes preocupações ambientais devido ao enorme descarte e à grande resistência desses materiais a degradação natural, levando ao acúmulo de plásticos em solos, aterros, rios e oceanos (LUCAS et al., 2008).

Com o objetivo de reduzir o impacto gerado por esses resíduos alguns procedimentos foram implantados, como a reciclagem e a incineração. Segundo dados obtidos entre os anos 1950 e 2014, somente 9% dos plásticos fabricados no mundo foram reciclados e cerca de 12% foi incinerado (GEYER et al., 2017). O Brasil, segundo dados da WWF de 2019, recicla apenas 1,28% dos plásticos produzidos no país, o que corresponde a um percentual muito baixo em comparação à média mundial. Mesmo com essas estratégias adotadas, o acúmulo desses plásticos continua a crescer, então nos últimos anos, foi desenvolvido vários polímeros mais suscetíveis à degradação natural: os polímeros biodegradáveis (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006).

3.1.1 Polímeros Biodegradáveis

A matéria-prima utilizada para a fabricação deste polímero plástico pode ser proveniente de fontes fósseis ou fontes naturais renováveis como milho, batata, cana-de-açúcar, madeira e outras. Podem também ser sintetizados por bactérias a partir de moléculas como o ácido butírico ou serem de fonte animal, como a quitina (BRITO et al., 2011). Esses polímeros estão ganhando

um grande reconhecimento mundial, principalmente os obtidos a partir de fontes renováveis, devido ao menor impacto ambiental, já que podem ser provenientes de fontes que tem capacidade de serem reabastecidas em curto espaço de tempo (SECOM, 2007; BRITO et al., 2011).

A biodegradação ocorre através da ação de enzimas e/ou deterioração química associada a organismos vivos, bactérias, fungos e algas sob condições adequadas de temperatura, umidade, luz, oxigênio e nutrientes (AMASS et al., 1998). Esses plásticos biodegradáveis então, devem possuir uma estrutura química compatível com processos de decomposição, ou possuírem princípios ativos, como degradação fotoquímica ou oxi-degradação que podem acelerar sua degradação (SECOM, 2007). Apresentam os mesmos problemas relacionados aos polímeros convencionais não-biodegradáveis, em questão da geração de resíduos, pois eles terminam não sendo biodegradáveis quando descartados em locais não propícios para sua degradação, como os lixões e aterros sanitários (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006).

Mundialmente existem normas que definem padrões para avaliação de plásticos biodegradáveis e compostáveis, pois para que um material seja caracterizado e certificado desta maneira ele precisa passar por ensaios/testes. Esses padrões são estabelecidos por diferentes organizações como a *International Standards Organization* - ISO 14855, *European Standardization Committee* EN 13432 e *American Society for Testing and Materials* - ASTM D6400 e D883. No Brasil, a norma específica para plásticos compostáveis ou biodegradáveis, onde estipula limites para elementos tóxicos, é a ABNT NBR – 15448. Alguns desses materiais biodegradáveis/compostáveis são apropriados para se degradarem em condições que ocorrem em composteiras industriais, nas quais as temperaturas devem atingir 70°C. Algumas normas são direcionadas para testes de biodegradação baseados em laboratório usando medições de demanda de oxigênio ou evolução de CO₂ (BRITO et al., 2011; NAPPER e THOMPSON, 2020).

3.1.2 Polímeros oxi-biodegradáveis

São plásticos que, devido a sua composição sofrem mais rapidamente degradação oxidativa que outros plásticos, pois possuem em sua composição aditivos pró-oxidantes. Os plásticos convencionais como o polipropileno (PP) e o polietileno (PE), são resistentes à degradação microbológica, mas tendem a sofrer degradação oxidativa quando expostos a certas

condições ambientais (WILES, 2005; AMMALA et al., 2011). Os oxi-biodegradáveis, por outro lado, podem se tornar frágeis e se desintegrar mais rapidamente, devido ao aditivo que se destina a quebrar a cadeia molecular dentro do polímero, o que levará à sua biodegradação (NAPPET e THOMPSON, 2020).

O termo oxi-biodegradável é caracterizado por possuir duas etapas em sua degradação. Na primeira etapa ocorre um processo abiótico que envolve o polímero reagindo com o oxigênio do ar. As cadeias de carbono do polímero são oxidadas resultando em uma formação de pequenos fragmentos moleculares e em novos grupos funcionais, tais como ácidos carboxílicos e ésteres. Os hidrocarbonetos que anteriormente eram hidrofóbicos passam a ser mais hidrofílicos, permitindo assim que seus fragmentos interajam com água e com micro-organismos. A segunda etapa é a biodegradação através de micro-organismos, tais como bactérias, fungos e algas, que consomem os fragmentos de baixa massa molar da cadeia carbônica oxidada, produzindo CO₂, H₂O e biomassa (AMMALA et al., 2011).

3.1.3 Polímero solúvel em água

Atualmente, vários materiais são feitos de plásticos solúveis em água (WSPs do inglês *WATER-SOLUBLE POLYMERS*) e suas aplicações geralmente facilitam sua liberação direta ou indiretamente no ambiente. Podem ser encontrados em agentes de lavagem, produtos de cuidados pessoais, produtos farmacêuticos e nas indústrias, como por exemplo a têxtil (KOLTZENBURG et al., 2014). Esses plásticos também estão presentes nas formulações de alguns pesticidas, fertilizantes e outros produtos que são utilizados durante o cultivo de lavouras. Esses produtos são aplicados diretamente nos campos, portanto, os polímeros solúveis em água podem se dissolver no solo e nas plantações, infiltrar-se nas águas subterrâneas e serem levados durante as chuvas para as águas superficiais (KOLTZENBURG et al., 2014; HUPPERTSBERG et al., 2020).

Sua produção em combinação com suas aplicações, podem resultar em uma fonte potencial dos plásticos solúveis em água para o meio ambiente. Os efeitos indiretos desses materiais podem ser causados por uma de suas principais características: facilitar a solubilidade e, portanto, ocasionar o aumento da biodisponibilidade de substâncias químicas não polares. A ocorrência e as concentrações ambientais ainda são desconhecidas e, portanto, o impacto gerado no ecossistema é incerto (REEMTSMA et al., 2016; HUPPERTSBERG et al., 2020).

Segundo Huppertsberg (2020), dependendo do tipo de polímero e do comprimento da cadeia, as moléculas de WSP podem ter tamanhos de dezenas a centenas de nanômetros. Conseqüentemente, podem existir monômeros que são dissolvidos em polímeros particulados como os nanoplásticos.

3.2 Impactos dos plásticos no ambiente marinho

Desde que sua exploração e utilização se tornou amplamente disponível na década de 1950, os plásticos tiveram em constante crescimento. Nesta época a produção mundial de plásticos era de 1,5 milhões de toneladas, com uma porcentagem de acréscimo de 9% ao ano, e em 2009 esse valor passou a ser 230 milhões de toneladas. No ano de 2018 esse valor atingiu 359 milhões de toneladas, sendo a China a maior produtora de plásticos do mundo (ANDRADY e NEAL, 2009; PLASTIC EUROPE, 2010; PLASTIC EUROPE 2019). Segundo dados da organização não governamental WWF (do inglês *WORLD WILDE FUND*), o volume de plástico anual que chega nos oceanos é de aproximadamente 10 milhões de toneladas. Se continuar nesse ritmo, até 2030, existe uma previsão do equivalente a 26 mil garrafas de plástico no mar a cada km².

Ao mesmo tempo que esses materiais são conhecidos e utilizados pela sua durabilidade, esse aumento na produção mundial gerou um problema relacionando ao descarte do resíduo, já que a maioria é descartada de maneira imprópria. Parte deste plástico então polui o ambiente marinho devido a gestão inadequada de resíduos sólidos e atividades costeiras e marítimas (FOTOPOLUI e KARAPANAGIOTI, 2012). Os plásticos têm recebido uma atenção maior nas últimas décadas, evidenciada pelo aumento de sua presença no ambiente marinho, representando de 60% a 80% do lixo encontrado nesse ambiente (GONÇALVES, 2016). Encontrando-se plástico a flutuar na superfície, emaranhado em animais marinhos, em suspensão na coluna de água e depositado nos sedimentos de fundo e nos sedimentos praias em diferentes tamanhos: macroplásticos, mesoplástico, microplástico e nanoplástico (SOBRAL et al., 2011; GESAMP, 2015).

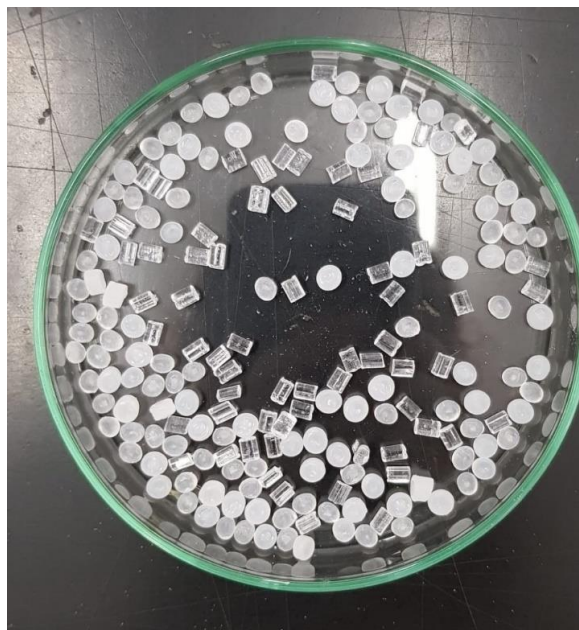
Os principais riscos que os plásticos e seus resíduos, oferecem ao meio ambiente estão relacionados a sua grande capacidade de persistência e dispersão, principalmente no ambiente marinho, sua afinidade por contaminantes, como os poluentes persistentes orgânicos, sua

capacidade de lixiviar aditivos químicos, sua ingestão pela biota e a transferência para a cadeia trófica (PEREIRA et al., 2011; ANDRADY e NEAL, 2009; CAPOLUPO et al., 2020).

São bastante resistentes à degradação natural quando descartados no ambiente marinho, e a quantidade de tempo para se degradarem completamente é desconhecida. Quando expostos às propriedades oxidativas da atmosfera, às propriedades da água do mar e à radiação UV da luz solar esses plásticos se quebram em pedaços cada vez menores, até atingirem o tamanho dos micros e nanoplásticos. Essa persistência leva a uma abundância crescente no oceano, o que torna os detritos de plástico mais disponíveis ao plâncton e outras formas de vida marinha (RIOS et al., 2007; FRANCHETTI e MARCONATO, 2006; MOORE, 2008).

Também são encontrados no meio ambiente como na forma de *pellets* plásticos, que são liberados involuntariamente durante a fabricação ou transporte dos *pellets* virgens, podendo ser transportado pelo escoamento superficial até a zona costeira e oceanos (OGATA et al. 2009). Os mais encontrados são os *pellets*, demonstrados na Figura 2, do tipo polipropileno (PP), polietileno (PE) e poliestireno (PS), pois são os mais utilizados no mundo. Podem ser produzidos de várias formas (esféricas, ovóides, cilíndricas), tamanhos (de 1 a 5mm) e cores (claras, brancas ou transparentes). São utilizados como matéria-prima em indústrias de transformação, onde são derretidos, e moldados de acordo com o produto plástico final (EPA, 1992).

Figura 2 - *Pellets* virgens de Polietileno (PE), Polipropileno (PP) e Poliestireno (PS).



Fonte: Autora da dissertação.

Devido à sua persistência ambiental, os pellets são amplamente distribuídos no oceano e encontrados em praias e superfícies aquáticas em todo mundo (COSTA et al., 2009; TURRA, et al., 2014; IZAR et al., 2019; FOTOPOLU e KARAPANAGIOTI, 2012; MATO et al., 2001; HOLMES et al., 2011; ANTUNES et al., 2013; MCDERMID e MCMULLEN, 2004).

Os primeiros registros de resíduos plásticos no ambiente marinho foram no oceano Atlântico, na década de 70 (CARPENTER et al., 1972; COLTON et al., 1974) e segundo Barnes (2002) no Reino Unido a sua quantidade duplicou nas décadas seguintes. Desde então muitos estudos observaram e relataram ao longo dos anos a existência desses materiais nos oceanos, nas praias, e a ingestão por animais marinhos (LAIST, 1997; GREGORY, 2009; BRANDÃO et al., 2011; VON MOOS et al., 2012; BASTO et al., 2019).

Os plásticos e seus resíduos podem absorver e concentrar contaminantes ambientais, principalmente substâncias tóxicas bioacumulativas persistentes (PBTs), poluentes orgânicos persistentes (POPs) e PCBs. Dessa forma apresentam elevado potencial para atuar como vetores e transportadores para o ambiente, podendo interagir com organismos marinhos e causar efeitos adversos (TEUTEN et al., 2009; BOWNMER e KERSHAW, 2010; OGATA et al., 2009; ANTUNES et al., 2013). O polietileno parece mais apto a concentrar algumas substâncias como os PCBs que chegam nos oceanos através do descarte inapropriado de produtos elétricos (MATO et al., 2011). Um estudo laboratorial realizado por Rochman e colaboradores (2013) observou a ingestão e transferência de contaminantes associados aos plásticos em peixes, concluindo que a ingestão de polietileno é um vetor para a bioacumulação de PBTs em peixes, e que a toxicidade resultante da ingestão de plástico é uma consequência tanto dos contaminantes sorvidos quanto do material plástico.

Os plásticos acumulam principalmente em zonas de convergências e nos centros dos giros oceânicos formados pelo movimento da Terra, correntes marinhas e ventos. No Giro do Pacífico Norte, foi descoberta uma área de acumulação de resíduos sólidos com uma concentração de plástico 6 vezes maior à de plâncton, colhido na superfície, por uma rede específica de malha 0,333 μm . (MOORE et al., 2001). Os cinco maiores e mais importantes giros oceânicos são subtropicais presentes no Atlântico, Pacífico e Índico (VAN FRANEKER e LAW, 2015).

Os sedimentos marinhos são os principais destinos das substâncias que são introduzidas nos oceanos e que muitas vezes acabam acumulando estes compostos em níveis mais elevados quando comparamos com aqueles na coluna de água adjacente. Por esse motivo eles são importantes indicadores ambientais dos ecossistemas aquáticos (ABESSA, 2002).

Para avaliar o risco desses materiais no meio ambiente, são necessárias informações sobre os níveis de exposição e seus efeitos nos organismos, bem como estudar os seus efeitos adversos, como os efeitos físicos (tamanho da partícula, forma e concentração) e, efeitos químicos (substâncias químicas perigosas associadas aos plásticos) (NOBRE, 2016).

O impacto da transferência de contaminantes que os plásticos podem causar é preocupante, pois ao entrarem em contato com o meio ambiente podem liberar químicos provenientes dos aditivos, como os retardantes de chamas, plastificantes, ftalatos e corantes, que são incorporados para fornecer propriedades específicas a determinados produtos ou para facilitar no processo de fabricação (HERMABESSIERE et al., 2017). Esses aditivos podem melhorar a resistência a abrasão, resistência mecânica, flexibilidade, ductilidade, permitir que o plástico se deteriore mais lentamente entre outras características (CALLISTER, 2009). Segundo ambiente Geyer e colaboradores (2017), em média, um produto plástico comercial é composto por 93% de resina polimérica e 7% de aditivos.

3.3 Aditivos químicos e metais

Alguns metais e outros elementos químicos podem estar relacionados aos aditivos químicos presentes nos *pellets* virgens e materiais plásticos, como por exemplo o elemento titânio, que pode estar associado como uma carga metálica para melhorar as propriedades mecânicas dos polímeros, oferecendo uma propriedade de alta resistência (RESHETOV et al., 2017; SZAFRANSKA et al., 2019). Existem alguns aditivos que são mais facilmente lixiviados dos produtos por não estarem quimicamente ligados na matriz polimérica como no caso dos ftalatos (TAUTEN et al, 2009; TALNESS et al., 2009; MEEKER et al., 2009). Após a migração desses aditivos da matriz polimérica, eles entram em contato com o meio que estão inseridos, como exemplos a água do mar e sedimentos, e essa migração pode ser maior ou menor devido a presença de sais ou materiais orgânicos que possuem diferentes afinidades. As condições ambientais também influenciam na taxa de migração desses lixiviados, podendo ser mais rápidas ou mais lentas (MOORE, 2008).

Muitos estudos estão investigando a liberação dos aditivos químicos dos plásticos e seus produtos de degradação, pois alguns desses possuem propriedades tóxicas e são desreguladores endócrinos. Como é o caso do Bisfenol A (BPA), amplamente utilizado para obter plásticos transparentes e resistentes, e dos ftalatos, utilizados como plastificantes e como solventes em

produtos de cuidados pessoais. Esses aditivos já foram detectados no ambiente aquático e em lixiviados de aterros, que são fontes potencialmente significativas para o ambiente, pois quantidades consideráveis de plásticos são descartadas diariamente em aterros municipais (YAMOTO et al., 2001; FROMME et al., 2002; GOLSHAN et al., 2015; SCHMIDT et al., 2019).

Outros compostos, como éteres de difenila polibromado (PBDE do inglês polybrominated diphenyl ethers) e seus derivados, têm sido utilizados como marcadores ambientais de contaminação química por plástico, devido a sua ocorrência nos oceanos. Esse aditivo, PBDE, é utilizado como retardante de chamas em diversos produtos, como eletrônicos e em espumas de poliuretano (ROCHMAN et al., 2014; NOBRE, 2016).

Análise de metais presentes no sedimento marinho e na água do mar associados aos *pellets* estão em foco nos últimos anos. Segundo Izar e colaboradores (2019) *pellets* encontrados em regiões consideradas com baixos níveis de contaminação podem apresentar toxicidade maior do que aqueles encontrados em regiões mais contaminadas. Isto sugere que os *pellets* são capazes de transportar contaminação para áreas remotas e regiões livres de contaminação. Esse estudo corrobora com os dados de Holmes e colaboradores (2012), onde verificou que os plásticos podem ser o principal transportador de metais no meio aquático. Esses mesmos pesquisadores em outro estudo verificaram a adsorção de metais em *pellets* virgens e encalhados em estuários. Em todos os experimentos a adsorção de metais foi maior para os plásticos encalhados do que para os *pellets* virgens (HOLMES et al. 2014).

3.4 Ecotoxicologia e meio ambiente

Somente os resultados das análises químicas não retratam o impacto ambiental causado pelos contaminantes e suas misturas complexas, pois não demonstram os efeitos sobre o ambiente aquático, ou seja, é preciso observar o comportamento dos poluentes (biodisponibilidade, bioacumulação e biotransformação), bem como os efeitos biológicos, bioquímicos, celulares ou comportamentais induzidos pelos xenobióticos em organismos para assim avaliar ou prever o impacto das substâncias químicas nos ecossistemas aquáticos (VAN DER OOST et al., 2003). A utilização de biomarcadores bioquímicos e moleculares é de grande importância, visto que as respostas observadas indicam as primeiras alterações que ocorrem no

organismo, servindo assim de alerta antes que essas consequências alcancem níveis de organização biológica (MOORE, 1988).

As respostas desses biomarcadores podem ser utilizadas como um indicativo de efeitos tóxicos, visto que os danos causados inicialmente por xenobióticos nos organismos envolvem perturbações nos processos bioquímicos e moleculares no interior das células, e que posteriormente podem dar origem aos efeitos em níveis maiores. Entre os biomarcadores utilizados, o ensaio de retenção do corante vermelho neutro em hemócitos de bivalves tem sido utilizado a fim de detectar alterações na permeabilidade das membranas lisossômicas, que podem ocorrer quando o organismo é exposto a contaminantes ambientais. Os lisossomos podem acumular uma variedade de substâncias, sendo assim essa organela têm sido objeto de estudo para observar os efeitos de estresse químico causados por diversos contaminantes (DAILIANIS et al., 2003; MAMACA et al., 2015).

Os xenobióticos passam por biotransformações de fase I e fase II e as enzimas envolvidas nesses processos também vêm sendo amplamente estudadas como biomarcadores em estudos ambientais, visto que desempenham um papel na manutenção da homeostase celular (WINSTON, 1990).

Algumas moléculas polares são eliminadas a partir da fase I de biotransformação, e em seguida são conjugadas pela família de enzimas Glutathione-S-Transferase (GST). A GST faz parte da segunda fase de reações do metabolismo de detoxificação e está associada ao processo de conjugação da glutathione para converter xenobióticos em compostos mais solúveis, e, portanto, mais facilmente excretados pelo organismo (VAN DER OOST et al., 2003).

As alterações no sistema de defesa antioxidante dos organismos aquáticos podem ser consequência de um aumento na síntese de espécies reativas ao oxigênio (ERO) induzido pela exposição do organismo à contaminantes ambientais, associado ao estresse oxidativo, quando os mecanismos de defesa são sobrecarregados por agentes pró-oxidantes. Essa atividade pode ser avaliada pela enzima glutathione peroxidase (GPX), responsável por reduzir os radicais livres e, assim, prevenir o estresse oxidativo (CHEUNG et al., 2001). Quando o sistema antioxidante está sobrecarregado podem ocorrer efeitos como a peroxidação lipídica (LPO) devido à oxidação de ácidos graxos e radicais livres, degradação de proteínas, danos no DNA entre outros. A colinesterase (ChE) é importante pois tem uma função no sistema nervoso e pode ser inibido por compostos neurotóxicos. Essa inibição pode ocasionar o acúmulo de acetilcolina na sinapse, causando uma interrupção na função nervosa (BONNES-TAOUREL et al., 1992).

Uma vez observado a presença de lixiviados de aditivos químicos no meio ambiente, estudos ecotoxicológicos vêm sendo empregados para verificar os possíveis efeitos desses poluentes nos ecossistemas. Testes com biomarcadores vêm sendo utilizados para observar os efeitos da toxicidade dos aditivos químicos e da ingestão dos plásticos em organismos marinhos. Juhel e colaboradores (2016) observaram que exposição ao BPA em concentrações ambientalmente relevantes resultou em efeitos imunomoduladores, genotóxicos e desreguladores endócrinos em mexilhões da espécie *Perna viridis*. Esses dados corroboram com o estudo realizado por Canesi e colaboradores (2007) onde diferentes concentrações de BPA (3-60 ng/g) foram injetados no molusco bivalve *Mytilus galloprovincialis*. O BPA induziu alterações na atividade da catalase, GSH transferase (GST) e GSSG redutase (GSR), e no conteúdo total de glutatona. Uma diminuição na estabilidade da membrana lisossomal também foi observada. Outros estudos demonstraram que a exposição e a ingestão de microplásticos virgens e associados a contaminantes ambientais, como PAH e triclosan, ocasionam efeitos nos tecidos e em nível celular em mexilhões (VON MOOS et al., 2012; AVIO et al., 2015; ASCER, 2015; RIST et al., 2016; WEBB et al., 2020).

Bejgarn e colaboradores (2015) em um estudo laboratorial observaram que 38% dos plásticos e seus lixiviados estudados causaram toxicidade aguda na espécie de copépode *Nitokra spinipes*. Foi demonstrado também através do estudo realizado por Hamlin e colaboradores (2015) em peixes de recifes, que dois lixiviados de produtos plásticos diferentes, mas com a mesma composição polimérica, polietileno (PE), mostraram toxicidade, sendo um com uma taxa de mortalidade maior, demonstrando que os aditivos plásticos incorporados em cada plástico possuem toxicidades diferentes e na maioria das vezes suas composições exatas permanecem desconhecidas.

Estudos em laboratórios com *pellets* virgens e coletados em praias do litoral brasileiro apresentaram toxicidade em testes de desenvolvimento embriolarval de ouriço-do-mar e de mexilhões, onde Nobre e colaboradores (2016) observaram que *pellets* coletados na praia apresentaram uma toxicidade menor do que os virgens. Já o estudo realizado por Silva (2016) demonstrou que a toxicidade dos *pellets* nos embriões de mexilhão é mais tóxica nos *pellets* encontrados nas praias, podendo ter absorvido e concentrado outros contaminantes ambientais. Ambos os estudos foram realizados no litoral sul do estado de São Paulo, na baía de Santos, sendo que os *pellets* utilizados por Silva foram coletados de uma área de proteção marinha costeira. Rendell-Bhatti e colaboradores (2021) também demonstraram que *pellets* virgens (PVC), encalhados nas praias e flutuantes, provocam anormalidades de desenvolvimento

severas, consistentes e específicas ao tratamento em *Paracentrotus lividus* nos estágios embrionários e larvais.

Embora muitos compostos químicos possam ser lixiviados dos plásticos, eles podem estar em concentrações inferiores aos limites de detecção analítica ou não estar incluídos em protocolos de análise desses materiais. Isso reduz a capacidade para identificar e quantificar a composição química dos lixiviados e, conseqüentemente estabelecer possíveis ligações entre a toxicidade observada (CAPOLUPO et al., 2020).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

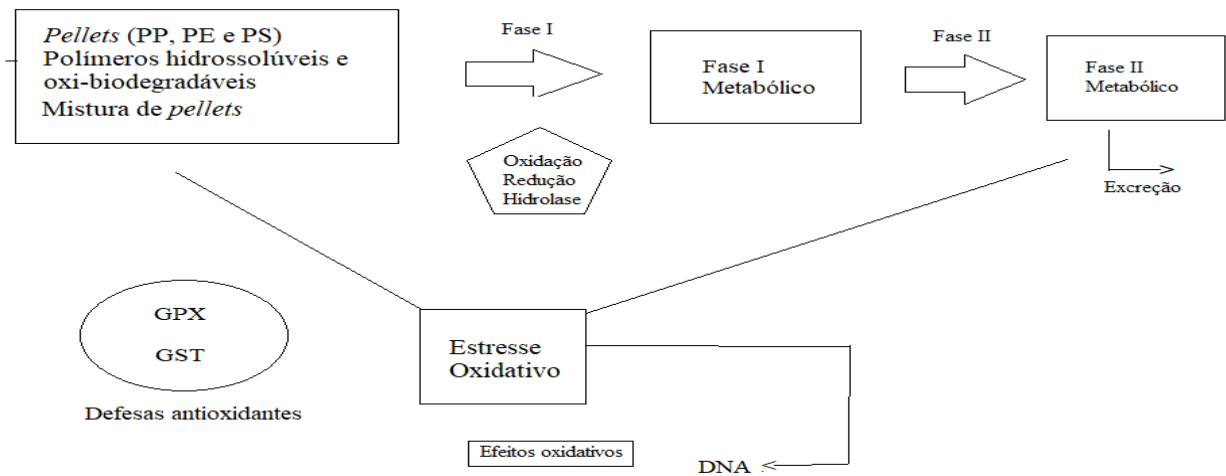
4.1 Desenho experimental

A fim de avaliar os efeitos do sedimento marcado com plásticos, solúvel em água e oxi-biodegradável, *pellets*: polipropileno (PP), polietileno (PE), poliestireno (PS) e da mistura dos três *pellets* (PP, PE e PS) por meio de biomarcadores em mexilhões foram determinados e avaliados dois fatores:

1. Composição polimérica (polímeros plásticos, oxi-biodegradável e solúvel em água, *pellets*: PP, PE e PS);
2. Tempo de exposição (24 horas e 168 horas).

As concentrações de *pellets* no sedimento marcado se basearam nos trabalhos desenvolvidos por Turra et al. (2014) e por Izar et al. (2019), onde para a avaliação no sedimento, considerou-se uma concentração de 10 *pellets* para 100 g de sedimento, pois é uma concentração ambientalmente relevante e para os demais plásticos as concentrações foram definidas por peso, equivalente dos 10 *pellets*. Durante todo o tempo de exposição o experimento foi monitorado diariamente e foi mantido em condições controladas: temperatura da água do mar a 20 ± 2 , salinidade 30, oxigênio dissolvido: $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ e pH 7,7. Ao final de cada exposição foi realizado o ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro nas hemolinhas dos mexilhões, e em seguida os mesmos foram dissecados e suas brânquias foram armazenadas e congeladas $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ em tubos de Eppendorfs em um ultra freezer para posterior análises dos demais biomarcadores (GST, GPX, ChE, danos em DNA e LPO).

Figura 3 – Fluxograma da exposição dos organismos aos *pellets* virgens e polímeros plásticos em respostas das atividades enzimáticas.



Fonte: Autora da dissertação.

4.2 Coleta e manutenção dos organismos-teste

Para realização deste trabalho, mexilhões da espécie *Mytella charruana* foram utilizados para avaliação de biomarcadores de exposição e efeitos oxidativos e fisiológico (estabilidade da membrana lisossômica por meio do ensaio vermelho neutro). Os mexilhões foram coletados de um cultivo em Bertiooga, pois são considerados referência de qualidade. Colocar referencias

Os organismos foram transportados vivos em uma caixa térmica até o Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília, em Santos, onde foram mantidos em tanques para aclimação com água do mar e aeração constante até o momento dos ensaios. Os mexilhões permaneceram durante 4 dias para aclimação. A água utilizada é proveniente do aquário do Guarujá, onde é coletado em mar aberto e os níveis de oxigênio, pH, salinidade e temperatura foram monitorados diariamente. Durante todo o período de aclimação e experimentos os mexilhões não receberam alimentação suplementar, tendo disponível apenas o material particulado presente na água do mar. Todos os mexilhões foram limpos superficialmente antes de serem colocados no tanque.

4.3 Avaliação dos sedimentos

4.3.1 Coleta de sedimentos

As amostras de sedimento foram coletadas na praia do Itaguapé, localizada no município de Bertioga, litoral norte de São Paulo. Em 2018, o monitoramento realizado pela CETESB, no qual se refere a qualidade das águas costeiras no estado de São Paulo, indicou que o sedimento da praia do Itaguapé possui “classificação Ótima”, através dos resultados de ensaios ecotoxicológicos (CETESB, 2019).

As amostras foram coletadas utilizando uma pá de metal, armazenadas em sacos plásticos apropriados e mantidas em caixas térmicas durante o transporte até o Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília, em Santos. No laboratório, as amostras foram mantidas em torno de uma temperatura de 4 °C e ao abrigo da luz.

4.2.3 Mistura do sedimento com os plásticos

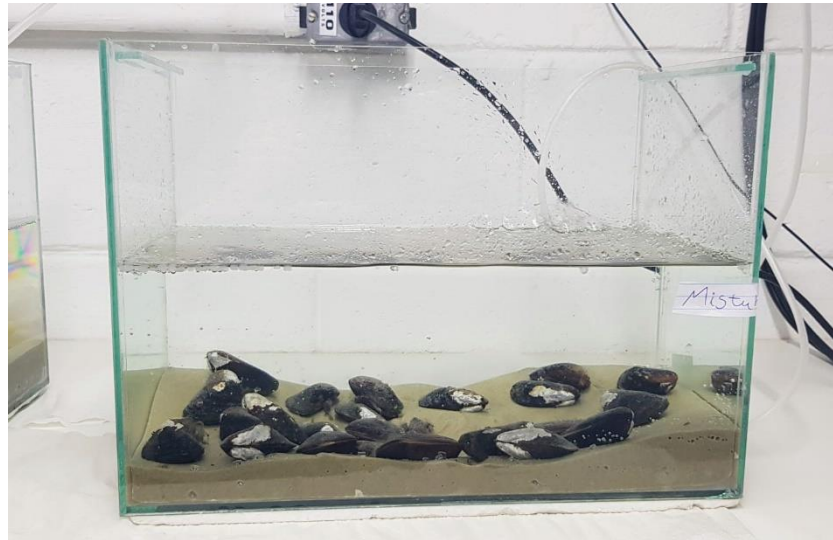
A marcação do sedimento ocorreu através de uma técnica adaptada por Nobre (2016), onde ele misturou *pellets* com sedimento seco, antes usados para substâncias químicas. Essa adaptação seguiu a metodologia *spiked* da USEPA (2001). Para os *pellets* o procedimento de marcação se baseou nos trabalhos desenvolvidos por Turra et al. (2014) e por Izar et al. (2019), onde para a avaliação dos biomarcadores, considerou-se uma concentração de 10 *pellets* para 100 g de sedimento, pois é uma concentração ambientalmente relevante e para os demais polímeros as concentrações foram definidas por peso, equivalente dos 10 *pellets*.

O sedimento foi seco em estufa com temperatura em torno de 60 °C e a umidade foi posteriormente recomposta. As concentrações finais de água foram as mesmas para todos os tratamentos. O sedimento marcado foi agitado por 15 minutos.

Após a marcação, frascos com os sedimentos marcados foram mantidos por sete dias a uma temperatura de 4 °C e com ausência de luz, para fim de ocorrer o equilíbrio químico entre os polímeros, *pellets* e o sedimento. Após esse processo, o sedimento marcado, foi utilizado na exposição denominada de sedimento integral (SI), onde os organismos-teste foram expostos diretamente ao sedimento marcado com os polímeros e *pellets*. Além de estarem presentes no

sedimento os *pellets* e polímeros ficam suspensos na água. A Figura 3 ilustra a exposição de sedimento integral (SI) com os organismos-teste expostos ao sedimento contaminado com mistura de *pellets* (PP, PE e PS).

Figura 4. Indivíduos expostos ao sedimento integral contaminado com mistura de *pellets* (PP, PE e PS).



Fonte: autora da dissertação.

4.3 Exposição dos organismos

Para realização desse experimento, organismos adultos da espécie *Mytella charruana* (n=24) foram expostos ao sedimento integral com diferentes composições poliméricas: solúvel em água e oxi-biodegradável, *pellets*: PP, PS, PE e uma mistura dos três *pellets* (PP, PE e PS), por dois períodos, um de 24 horas e outro de 168 horas, onde 12 indivíduos foram retirados em cada período. Durante o experimento os aquários foram monitorados diariamente, onde a salinidade 30‰, pH 7,7 e temperatura $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ foram controladas. Foram utilizadas 4 réplicas para os polímeros e *pellets*, incluindo o controle, com 2 kg de sedimento marcado e 8 litros de água do mar, na proporção 1:4 (sedimento-água).

A fim de avaliar os efeitos dos diferentes tratamentos sobre os organismos ao final da exposição foram realizadas análises denominadas biomarcadores a fim de compreender os efeitos dos *pellets* e polímeros na bioquímica e na fisiologia do organismo. O biomarcador fisiológico teste de retenção do vermelho neutro foi realizado após as 24 horas e 168 horas de exposição. Para os demais biomarcadores (GST, GPx, ChE, LPO e danos no DNA), tecidos das brânquias precisaram ser removidos, após o teste do vermelho neutro, armazenados em tubos

de Eppendorfs e congelados $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em um ultra freezer para posterior análise. Como este organismo é pequeno, foi necessário utilizar um “pool” de organismos para cada réplica ($n=3$), totalizando 12 organismos ($n=12$), pois foram 4 réplicas no total, para cada período.

4.4 Biomarcadores bioquímicos

Essa etapa foi realizada no laboratório da Universidade Federal do Estado de São Paulo – UNIFESP no campus da Baixada Santista, em Santos e no laboratório da Universidade Estadual do Estado de São Paulo – UNESP no campus de São Vicente. Os biomarcadores analisados nesta etapa foram a glutaciona-S-transferase (GST), glutaciona peroxidase (GPx), colinesterase (ChE), danos em DNA e peroxidação lipídica (LPO). Para as análises das atividades enzimáticas de *M. Charruana*, foi utilizado o tecido da brânquia dos organismos.

4.4.1 Solução Tampão de Homogeneização

A brânquia foi homogeneizada para cada “pool” de organismo ($n=3$). Para 500 mL de água mili-Q, foram pesadas 3,0284 g de trizma base 50 mM, 0,1862 g de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, 0,0772 de ditioneitol (DDT) 1 mM, 85,575 de sacarose 0,5 M e 5,5812 de cloreto de potássio (KCL) 0,15 M. Essa solução foi misturada através de um agitador magnético. Essa solução pode ser preparada um dia antes do uso e precisa ser acondicionada em geladeira. Uma solução estoque de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) também foi preparada e para isso, 0,00523 g de (PMFS) 30 mM foram pesadas e adicionadas em 1 mL de Etanol P.A. Através de uma inversão, a solução foi misturada e adicionada por último na solução estoque de homogeneização. Essa solução de PMFS precisou ser preparada no dia do uso.

O pH foi ajustado para 7,6, utilizando NaOH ou HCl e a solução de homogeneização precisou ser acondicionada sobre o gelo.

Após a homogeneização, foram separadas amostras das brânquias para análise de danos ao DNA e peroxidação lipídica (LPO). Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas a 1200 giros por dois minutos e o sobrenadante foi separado para análise de atividades de glutaciona-S-transferase (GST), glutaciona peroxidase (GPx) e colinesterase (ChE). Todas as análises de

biomarcadores foram realizadas em um leitor de microplacas (Biotek-Synergy) (GUSSO-CHOUERI et al., 2015).

4.4.2 Glutathione S-transferase (GST)

O procedimento de determinação da atividade da GST foi quantificado através da metodologia descrita por Keen e colaboradores (1976). A atividade foi analisada utilizando 42 nM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e 2 nM de GSH em um meio contendo tampão fosfato de potássio. Um produto da ação enzimática é formado, S-2,4-dinitrofenilglutathione, e quantificado pelo aumento de absorvância a 340 nm a 25 °C, durante 120 segundos, utilizando-se 9,6 mM. Os resultados são expressos em $\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína total.

4.4.3 Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade de GPx foi quantificada pelo uso do método descrito por Sies et al. (1979). O método é baseado na diminuição da absorvância a 340 nm, promovido durante a redução da GSSG, catalisada pela GR, em presença de NADPH. Para isto foi preparado e utilizado o meio da reação composto por tampão fosfato de sódio (0,1 mM), azida de sódio (NaN_3 0,2 mM), NADPH (0,2 mM), GR (1 U/mL) e GSH (2 mM). Após dois minutos de reação foi acrescentado uma solução de H_2O_2 , contendo 1,5 mM de H_2O_2 + 0,1 M de tampão fosfato de sódio. Os resultados são expressos em $\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína total.

4.4.4 Danos no DNA (strand breaks)

Os danos no DNA (*strand breaks*), foram medidas usando o ensaio de precipitação alcalina (OLIVE, 1988; GAGNE e BLASE, 1995). Esse ensaio é baseado na precipitação de dodecilsulfato de potássio de DNA genômico ligado a proteínas, que deixa as quebras de fita de DNA livre de proteína no sobrenadante. Essas fitas de DNA são quantificadas usando fluorescência (λ_{ex} 360 nm e λ_{em} 450 nm) após coloração com corante Hoechst 33342. Padrões de DNA de espermatozoides de salmão foram utilizados para calibração. As concentrações de proteínas

foram determinadas espectrofotometricamente a 595 nm, com BSA como padrão. Os resultados são expressos em $\mu\text{g DNA mg}^{-1}$ de proteína total.

4.4.5 Colinesterase (ChE)

A atividade da ChE foi determinada utilizando o método colorimétrico descrito por Ellman et al. (1961), utilizando a acetiltiocolina (ACTI) como substrato. Nesta metodologia, a tiocolina que foi produzida por hidrólise enzimática de ATC reage com 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) para produzir o íon 2-nitro-5-tiobenzoato que absorve 415 nm do comprimento de onda, onde a taxa de aumento na absorção é monitorada. As enzimas de Che foram degradadas no meio ácido de DTN. Os resultados são expressos em $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína total.

4.4.6 Peroxidação Lipídica (LPO)

O método utilizado para analisar os níveis de peroxidação lipídica (LPO) foi descrito por Wills (1987). Os produtos foram determinados através da quantificação da concentração de substratos reativos ao ácido 1-tiobarbitúrico (TBARS) por meio de fluorescência (λ_{ex} 532 nm e λ_{em} 556 nm). Os brancos e os padrões de tetrametoxipropano foram preparados em solução de homogeneização. Os resultados são expressos em $\mu\text{M TBARs mg}^{-1}$ de proteína total.

4.5 Ensaio de estabilidade da membrana lisossômica

O método utilizado para avaliar a citotoxicidade da membrana lisossomal dos hemócitos dos bivalves foi o ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (NRRT, do inglês *neutral red retention time*), que seguiu a metodologia descrita por Lowe et al. (1995). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília – UNISANTA em Santos, SP.

Este ensaio baseia-se na capacidade dos lisossomos de células saudáveis de reter o corante Vermelho Neutro (VN) ao longo de um certo período e, quando comprometida devido

a danos a membrana lisossomal, esses conteúdos lisossomais acabam vazando para o citosol mais rapidamente.

4.5.1 Preparo das soluções

4.5.2 Solução fisiológica

No dia anterior do primeiro encerramento, 24 horas, uma solução fisiológica foi preparada. Foram pesadas 0,477 g de HEPES (agente tamponante de ácido sulfônico), 2,548 g de cloreto de sódio, 1,306 g de sulfato de magnésio, 0,075 g de cloreto de potássio e 0,147 g de cloreto de cálcio, e adicionados em 100 ml de água destilada, em um balão de vidro volumétrico. Os compostos químicos foram dissolvidos na água destilada com auxílio de um agitador magnético. Essa solução foi utilizada para manter as células do mexilhão em um meio semelhante ao encontrado no organismo, para que não haja estresse dos hemócitos.

Antes de começar cada encerramento, o pH da solução salina foi ajustado para 7,36 utilizando NaOH ou HCl.

4.5.3 Solução de vermelho neutro

A solução do corante Vermelho Neutro (VN) foi preparada no dia de cada encerramento. A solução-estoque do NR foi preparado no solvente dimetilsulfóxido (DMSO).

Para esta solução, foi pesado 0,0288 g de VN, colocado em um becker fechado com papel alumínio e, posteriormente 0,1 mL de DMSO foi adicionado. O VN foi dissolvido no DMSO com uma leve agitação. Essa solução estoque foi armazenada em um refrigerador dentro de um recipiente à prova de luz porque o VN é fotossensível.

4.5.4 Solução de trabalho

A solução de trabalho foi preparada a partir da solução-estoque, por diluição em solução fisiológica. Para a preparação da solução de trabalho, a solução-estoque foi retirada da geladeira

e deixado em temperatura ambiente. Foi colocado 0,5 mL de solução fisiológica em um frasco escuro e 1 µL de solução-estoque. Esse volume foi adicionado na solução fisiológica.

4.5.5 Extração e manuseio da hemolinfa

Após cada período de exposição aos polímeros, hidrossolúvel e oxi-biodegradável, *pellets*, mistura dos *pellets* e controle, foram selecionados 12 indivíduos, e amostras de hemolinfas foram extraídas de cada mexilhão.

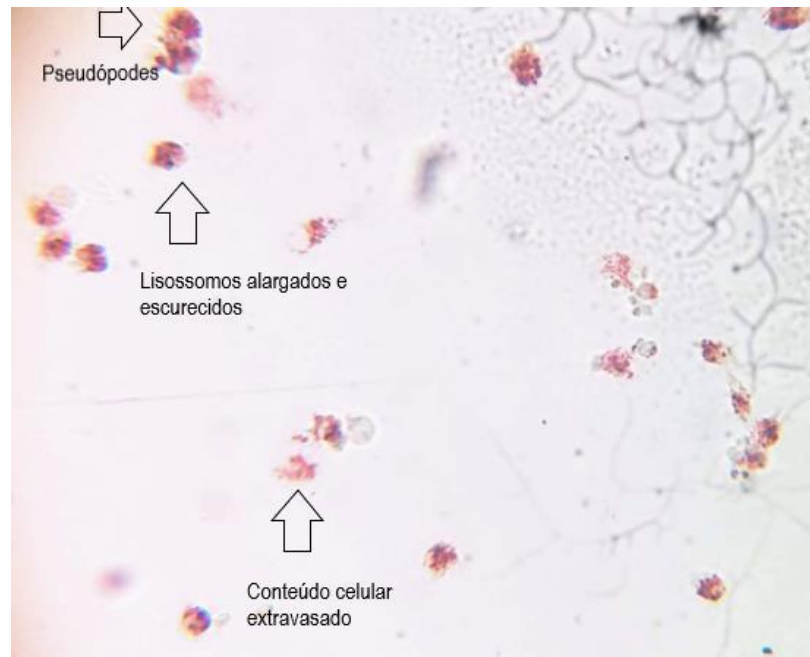
Para a extração da hemolinfa, com auxílio de uma perfuração na concha com uma seringa hipodérmica de 2 mL contendo 0,5 mL de solução fisiológica, foi extraído 0,5 mL de hemolinfa do músculo adutor posterior. A agulha foi inserida na superfície do músculo para essa extração.

O conteúdo da seringa foi transferido para tubos de Eppendorfs com volume de 2 mL onde foram mantidos por 20 minutos. Após esse tempo, os tubos de Eppendorfs foram homogeneizados. Foi pipetado 40 µL desta solução sobre a superfície de uma lâmina.

As lâminas então foram colocadas em uma câmara úmida à prova de luz e incubadas por 15 minutos para adesão dos hemócitos. Após a incubação, 40 µl de solução de trabalho do corante Vermelho Neutro foram adicionados sobre os hemócitos de cada lâmina, dentro da câmara escura e úmida. Após 15 minutos na câmara foram colocadas as lamínulas nas lâminas para posterior leitura. As lâminas com as células da hemolinfa tratadas com o vermelho neutro foram examinadas a cada 15 minutos em microscópio.

O tempo de retenção do corante pelos lisossomos foi obtido pela estimativa da proporção de células exibindo “vazamento” dos lisossomos para o citosol e/ou exibindo anormalidades das membranas ou alterações em sua morfologia. A Figura 4 ilustra os hemócitos tratados com corante vermelho neutro observados sob microscópio óptico.

Figura 5 - Hemócitos tratados com corante vermelho neutro observados sob microscópio óptico (400x). As setas pretas indicam exemplos de alguns dos critérios analisados.



Fonte: Autora da dissertação.

O encerramento do teste foi colocado quando 50% ou mais das células exibiram anormalidades estruturais ou perda do corante para o citosol (TE50 – tempo necessário para que se observe efeito adverso em 50% das células-teste). Os resultados são expressos em minutos ao último período anotado para cada organismo. A Tabela 1 apresenta os critérios analisados na observação das lâminas com hemócitos tratados com vermelho neutro.

Tabela 1 - Critérios analisados na observação das lâminas com hemócitos tratados com vermelho neutro para diferenciar células saudáveis das estressadas.

Critério	Células saudáveis	Células estressadas
Formato das células	Irregular	Arredondado
Tamanho das células	Aumentado	Diminuído
Número de lisossomos	Aumentado	Diminuído
Tamanho dos lisossomos	Menores	Alargados
Cor dos lisossomos	Rosado	Vermelho ou rosa escuro
Pseudópodes	Ausente	Presente
Corante extravasado no citosol	Ausente	Presente

Fonte: Adaptação de PUSCEDDU, 2016.

4.6 Análise química dos *pellets* e polímeros

4.6.1 Pirólise acoplada à cromatografia a gás e à espectrometria de massas

O método da pirólise é utilizado na degradação química de determinados materiais, por energia térmica. O pirolisador quando combinado com a cromatografia à gás e à espectrometria de massas é utilizado para obter informações estruturais sobre macromoléculas através da análise de seus produtos de degradação térmica. Esses processos têm como resultado um conjunto de moléculas menores, que estão relacionadas a composição original da amostra. É necessário o uso associado de outras técnicas com o pirolisador, como a cromatografia a gás e a espectrometria de massas para verificar a separação e a identificação qualitativa das espécies por comparação com pirogramas de polímeros-padrão (SILVÉRIO e BARBOSA et al., 2008; FRIES et al., 2013).

A metodologia utilizada no presente estudo teve como base os trabalhos desenvolvidos por Fries et al. (2013) e Gimiliani (2021), o qual analisou amostras de polímero (polietileno, polipropileno e poliestireno) por Pi-CG/EM. Esta etapa ocorreu em um dos laboratórios do Centro de Química e Meio Ambiente (CEQMA) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) em São Paulo.

As amostras de *pellets* utilizadas nessas análises foram obtidas por raspagem com auxílio de lâmina, de modo que obtivesse massa < 0,5 mg. Já a amostra do polímero oxibiodegradável foi obtida através de um corte com auxílio de uma tesoura e de uma lâmina. Todas as amostras foram pirolisadas a 700 °C por 60 segundos. O pirolisador utilizado (*Frontier Labs*, modelo PY-3030D) é do tipo *single-shot* (pirólise da amostra em uma única vez) com microforno e conectado ao sistema CG/EM, Shimadzu modelo QP5000. Os gases resultantes da queima foram separados e quantificados pelo sistema CG/EM.

Para cada tipo de polímero foram aplicados diferentes métodos na programação do cromatógrafo. Na Tabela 2 é apresentada a programação do cromatógrafo utilizado nas análises.

Tabela 2 - Diferentes métodos na programação do cromatógrafo.

	Temp. da coluna inicial	Taxa de aquecimento inicial	Temp. da coluna final	Taxa de aquecimento final
Oxi-biodegradável	40°C por 2 min	15°C min ⁻¹	320°C por 26 min	15°C min ⁻¹
<i>Pellet PE</i>	40°C a 180°C	15°C min ⁻¹	300°C por 12 min	5°C min ⁻¹
<i>Pellet PP</i>	40°C por 2 min	15°C min ⁻¹	320°C por 26 min	15°C min ⁻¹
<i>Pellet PS</i>	50°C por 2 min	30°C min ⁻¹	300°C por 26 min	30°C min ⁻¹

Fonte: Autora da dissertação.

A temperatura de injeção do CG e, a de interface CG/EM foi de 300 °C. A faixa de leitura no sistema EM para os *pellets* PE e PS variou de 50 a 400 m/z (massa/carga), do *pellet* PP e do Oxi-biodegradável variou de 60 a 650 m/z (massa/carga). O *split* aplicado para PE foi de 31, para o PP e Oxi-biodegradável foi 44 e para o PS foi 34.

Na Tabela 3 é apresentada a faixa de leitura no sistema EM para as amostras dos *pellets* e oxi-biodegradável.

Tabela 3 - Faixa de leitura no sistema EM para amostras poliméricas.

	Faixa de leitura	Split
<i>Pellet PE</i>	50 a 400 m/z	31
<i>Pellet PS</i>	50 a 400 m/z	34
<i>Pellet PP</i>	60 a 650 m/z	44
Oxi-biodegradável	60 a 650 m/z	44

Fonte: Autora da dissertação.

Os gases resultantes da queima das amostras foram transferidos pelo gás de arraste hélio pela coluna Ultra ALLOY-5 (apolar), cujas dimensões são: 30 m de comprimento, 0,25 µm de espessura e 0,25 mm de diâmetro. O fluxo da coluna variou para cada tipo polimérico: 1,2 mL min⁻¹ para PE, 0,9 mL min⁻¹ para PP e 1,1 mL min⁻¹ para PS.

Antes da injeção das amostras, realizou-se uma análise do branco nas mesmas condições cromatográficas de análises para avaliar possíveis interferentes nos tempos de retenção das amostras.

4.6.2 Fluorescência de raios-x por energia dispersiva

A fluorescência de raios-x por energia dispersiva é bastante utilizada para a caracterização de plásticos pois seu método permite identificar a ampla gama de aditivos presentes nesses materiais. Entre todos os elementos, aqueles que são de particular interesse são Cl, Br, Sb e Ti, pois são encontrados em pigmentos e retardadores de chamas. Outros elementos como por exemplo, Pb, Cd, Zn, Si, P, S, Ca e Fe também são analisados qualitativa ou semi-quantitativamente, pois estão presentes em muitos produtos plásticos (RIISE et al., 2000). A metodologia utilizada neste estudo teve como base o trabalho desenvolvido por Boscaro (2014), o qual identificou metais presentes em amostras de *pellets* virgens e sacolas oxi-biodegradáveis.

Essa metodologia consiste no bombardeamento da amostra com raios-x que possuem uma energia tão alta que são capazes de extrair um elétron K ou L de muitos átomos. Os elétrons de uma camada superior preenchem a vaga desse elétron que foi extraído. Se um elétron L ir para a órbita K, a radiação $K\alpha$ é emitida e a radiação $K\beta$ quando um elétron M ir para a órbita K (RIISE et al., 2000). Essas energias (keV) emitidas são particularmente características do elemento independentemente da matriz, ou seja, é possível identificar quais elementos estão presentes na amostra com base nas energias do pico observados.

As amostras de polímeros, oxi-biodegradável e hidrossolúvel, e de *pellets* (PP, PE e PS) foram analisadas por fluorescência de raios-x por energia dispersiva. As amostras dos polímeros foram cortadas e os *pellets* foram derretidos e transformados em filmes plásticos para posterior análise. Todas as amostras foram fixadas em uma cubeta de raios X. As amostras e o padrão foram analisados em triplicata num espectrômetro Shimadzu, modelo EDX-720, localizado no Laboratório de Fluorescência de raios-x no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

A excitação de amostras e padrão foram realizadas por um tubo de raios X com ânodo de ródio (Rh), utilizando um filtro de Ag, operado na tensão de 50 keV e corrente de 1000 μ A. A detecção foi feita com um detector de raios X de Si (Li). O tempo de análise variou de 60 a 500 segundos. Para a determinação da sensibilidade, foram utilizados padrões de filme fino produzidos pela MasterFlex - 3520 Polypropylene SPEX SamplePrep.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados por meio de análise de variância permutacional (PERMANOVA) para todos os biomarcadores considerando os fatores: tempo (24 horas e 168 horas) e contaminação por *pellets* (PP, PE e PS) e polímeros plásticos (oxi-biodegradável e hidrossolúvel). A homogeneidade das variâncias foi analisada por meio do PERMDISP no software PRIMER, versão 6.0. Os testes de PERMANOVA foram conduzidos em matrizes de distância Euclidiana. Os dados sobre biomarcadores foram integrados usando o sistema de resposta de biomarcador integrado aprimorado (EIBR) proposto por Liu e colaboradores (2013).

Foi realizado o SIMPER na intenção de aprofundar e entender se algumas variáveis poderiam diferenciar das demais nos tempos de exposição. Na tabela 4 os resultados mostram que no tempo 24 horas as variáveis que mais contribuíram foram o vermelho neutro (VN), em seguida o biomarcador GPX e por último os danos em DNA.

Tabela 4 - SIMPER realizado com resultados de biomarcadores bioquímicos (GST, GPX, LPO, ChE e Danos em DNA) e fisiológico (vermelho neutro) em 24 horas de exposição na brânquia de *Mytella charruana*.

Variável	Av. value	Av. Sq. Dist	Sq. Dist/SD	Contrib%	Cum.%
LPO	-5,08E-2	8,42E-2	0,39	2,93	2,93
ChE	-0,247	0,112	0,40	3,89	6,81
GST	-0,273	0,246	0,47	8,56	15,37
DNA	-3,26E-2	0,406	0,32	14,10	29,48
GPX	-0,29	0,893	0,48	31,02	60,50
VN	0,286	1,14	0,44	39,50	100,00

Fonte: Autora da dissertação.

Na tabela 5, estão os resultados do SIMPER no tempo de exposição 168 horas. As variáveis que mais contribuíram foram os biomarcadores LPO, ChE e GST.

Tabela 5 - SIMPER realizado com resultados de biomarcadores bioquímicos (GST, GPX, LPO, ChE e Danos em DNA) e fisiológico (vermelho neutro) em 168 horas de exposição na brânquia de *Mytella charruana*.

Variável	Av. value	Av. Sq. Dist	Sq. Dist/SD	Contrib%	Cum.%
VN	-0,286	0,731	0,47	8,39	8,39
GPX	0,29	0,97	0,48	11,13	19,51
DNA	3,26E-2	1,63	0,23	18,70	38,21
GST	0,273	1,64	0,36	18,79	57,00
ChE	0,247	1,8	0,23	20,65	77,65
LPO	5,08E-2	1,95	0,20	22,35	100,00

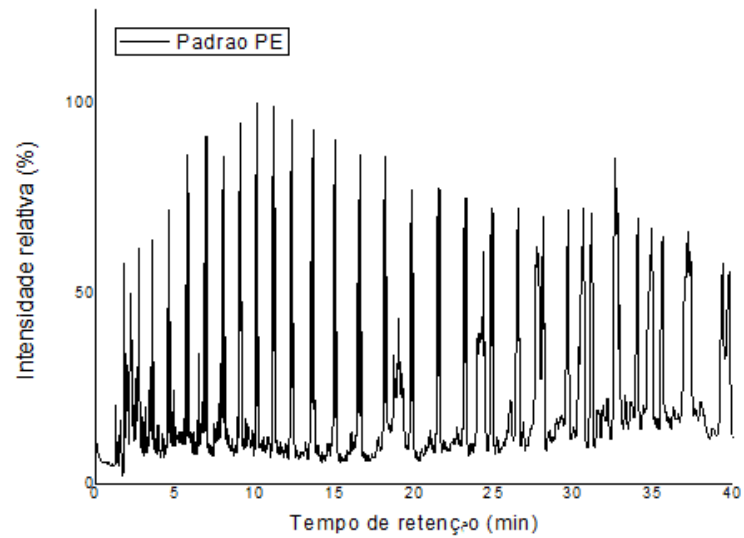
Fonte: Autora da dissertação.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização dos *pellets* e polímeros por pirólise acoplada à cromatografia a gás e à espectrometria de massas

A Figura 6 apresenta o resultado de um cromatograma da amostra de *pellets* virgens de PE, em que foram observados tripletos (picos triplos) representando um dieno, alqueno e alceno, que são muito característicos das poliolefinas (SILVÉRIO et al., 2008). A Figura 7 ilustra os tripletos representando um dieno, alqueno e alceno. Este cromatograma representa um dos três tipos de reações de fragmentação que ocorrem em polímeros através da degradação térmica: as cisões aleatórias de cadeia, onde as ligações da “espinha dorsal” do polímero são quebradas, produzindo pequenos fragmentos de hidrocarbonetos. Os outros tipos de fragmentação são: cisão de cadeia lateral e despolimerização ou *unzipping* (SILVÉRIO et al., 2008).

Figura 6 - Cromatograma da amostra de *pellet* PE.



Fonte: Autora da dissertação.

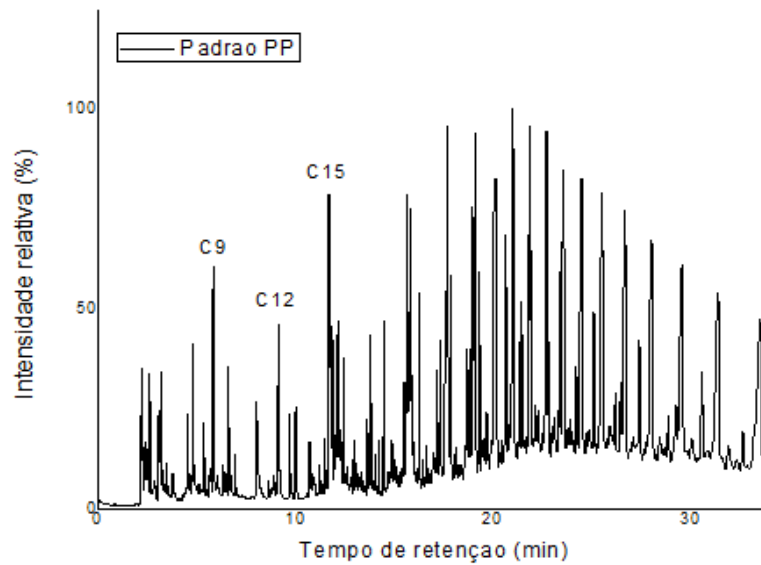
Figura 7 - Tripletos representando um dieno, alqueno e alceno.



Fonte: Adaptação de (SILVÉRIO *et al.*, 2008).

A figura 8 refere-se aos resultados de um cromatograma da amostra de *pellets* virgens de PP. A amostra de PP apresentou formação de fragmentos típicos para esse tipo polimérico. Os principais grupos de monômeros observados foram: trímeros (pico simples), tetrâmeros (pico duplo) e pentâmeros (pico triplo).

Figura 8 - Cromatograma da amostra de *pellet* PP.

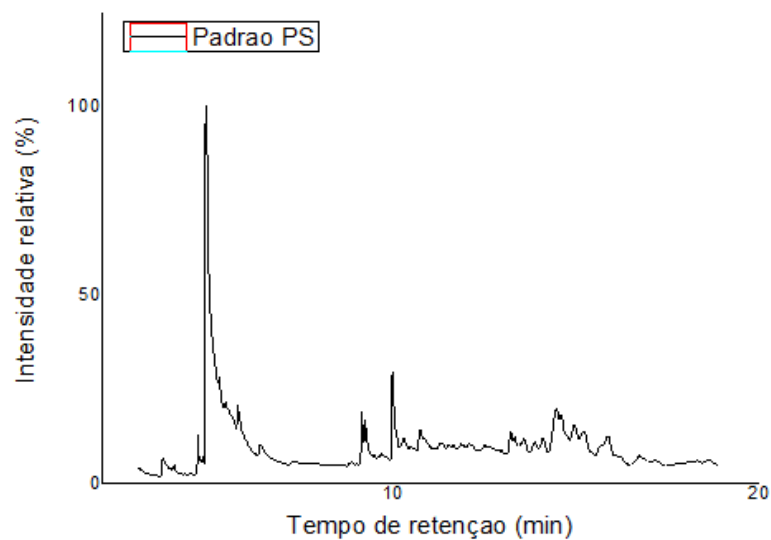


Fonte: Autora da dissertação.

A Figura 9 apresenta o cromatograma da amostra de *pellets* virgens de PS. O estireno é o principal produto da pirólise do PS, com cerca de 80 % de todos os picos, enquanto dímeros e trímeros representam 6 e 5 %, respectivamente e os tetrâmetros apenas 0,05 % (SILVÉRIO et al., 2008). A Figura 10 ilustra um pirograma de poliestireno (PS).

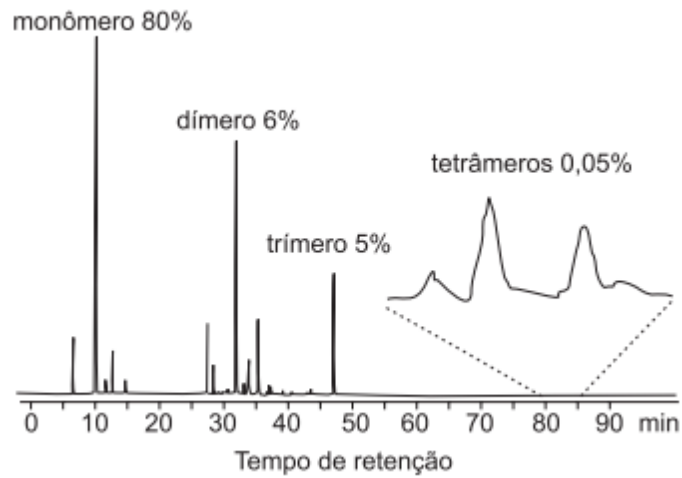
Os compostos formados são provenientes da despolimerização, processo de degradação pelo qual o PS se transforma quase integralmente em monômeros (SILVÉRIO et al., 2008).

Figura 9 - Cromatograma da amostra de *pellet* PS.



Fonte: Autora da dissertação.

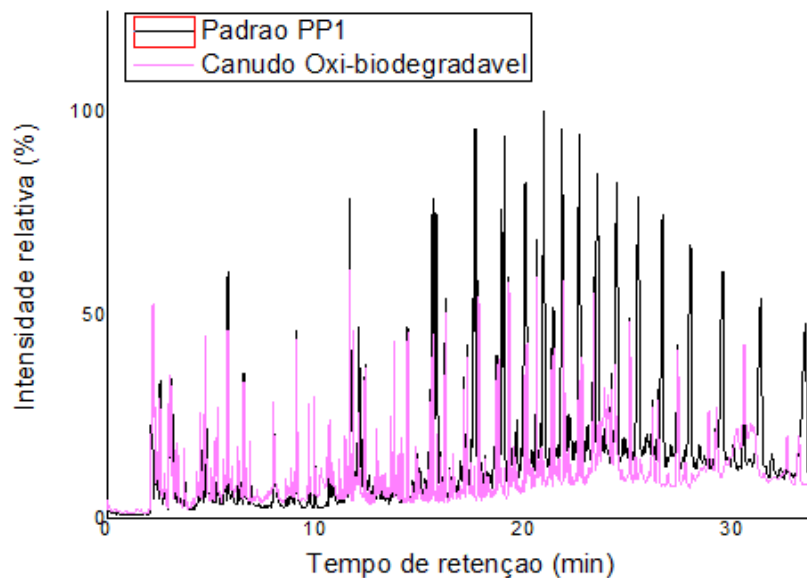
Figura 10 - Pirograma de poliestireno (PS).



Fonte: SILVÉRIO *et al.*, 2008.

A Figura 11 refere-se aos resultados de dois cromatogramas das amostras de canudo oxi-biodegradável e de *pellet* PP, considerado padrão, onde a amostra do oxi-biodegradável demonstrou através dos padrões dos picos ser composto do polímero polipropileno (PP).

Figura 11 - Cromatograma das amostras de *pellet* PP e canudo Oxi-biodegradável.



Fonte: Autora da dissertação.

6.2 Análises por fluorescência de raios-x por energia dispersiva

As amostras de *pellets* (PP, PE e PS) e de polímeros, oxi-biodegradável e hidrossolúvel, foram analisadas por fluorescência de raios-x por energia dispersiva. O cálculo para avaliar a aceitabilidade das características de precisão do método foi a partir da equação de HORWITZ.

A forma mais adequada para isto é o uso dos valores da HORRAT (INMETRO, 2016). O seu valor é dado pela equação:

$$\frac{DPR_{(R)} \text{ derivado do estudo colaborativo}}{DPR_{(R)} \text{ previsto da equação de Horwitz}}$$

Fonte: INMETRO, 2016.

O valor HORRAT para repetibilidade, é o valor do desvio padrão relativo da repetibilidade dividido pelo valor do desvio padrão relativo da repetibilidade calculado a partir da equação de Horwitz, na concentração utilizada. Se os valores de HORRAT forem menores ou iguais a 2, os valores do método podem ser considerados satisfatórios.

O valor de Horwitz é derivado da equação de Horwitz e este valor independe da matriz/analito. Tendo os principais valores de Horwitz expressos a seguir na Tabela 6:

Tabela 6 - Valores de Horwitz.

Razão de Concentração	PDP _R
1 (100%)	2
10 ⁻¹	2,8
10 ⁻² (1%)	4
10 ⁻³	5,6
10 ⁻⁴	8
10 ⁻⁵	11
10 ⁻⁶ (ppm)	16
10 ⁻⁷	23
10 ⁻⁸	32
10 ⁻⁹ (ppb)	45

Fonte: INMETRO, 2016.

Pode-se observar na Tabela 7, que os valores obtidos são menores que 2, sendo assim os resultados são considerados satisfatórios. O material analisado é o material de referência certificado 3520 Polypropylene SPEX SamplePrep.

Tabela 7 - Concentrações (mg kg⁻¹) dos elementos químicos no material de referência obtidos por EDXRF.

Elemento	Número Atômico (Z)	Taxa de contagem (cps)	Concentração	HORRAT
Na	11	0,0126	2390,9	0,3101
Al	13	0,0050	54,5	0,5478
S	16	1,7762	649,0	0,3773
K	19	0,0514	46,0	0,5620
Ca	20	0,0311	18,4	0,6451

Fe	26	0,2666	7,4	0,7399
Cu	29	0,6691	9,5	0,7126

Fonte: Autora da dissertação.

A Tabela 8 apresenta as concentrações de sódio (Na), alumínio (Al), silício (Si), fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), cálcio (Ca), titânio (Ti), cromo (Cr), manganês (Mn), ferro (Fe), níquel (Ni), cobre (Cu) e zinco (Zn) obtidos por EDXRF em três amostras de *pellets* PP, PE e PS e duas amostras de polímeros, oxi-biodegradável e hidrossolúvel. Essas amostras incluem os *pellets* virgens não processados, o canudo oxi-biodegradável de coloração branca, comercialmente disponível e o polímero hidrossolúvel, em forma de filme, comercialmente disponível. As concentrações diferem de amostra para amostra e de elemento para elemento, sendo que para alguns elementos as concentrações foram abaixo do limite de quantificação do método e por isso não foram detectados.

O resultado demonstrou que os *pellets* virgens são materiais puros, ainda assim há concentrações de alguns elementos químicos que podem ser derivados de cargas ou aditivos manuseados durante o processo.

Tabela 8 - Concentrações (mg kg⁻¹) dos elementos químicos em *pellets* e polímeros obtidos por EDXRF.

Elemento	Pellet PP	Pellet PE	Pellet PS	Oxi-Bio	Hidrossolúvel
Na	ND	ND	ND	1550,0	2191,8
Al	ND	ND	ND	0,0142	44,5
Si	ND	ND	ND	ND	1825,0
P	ND	ND	ND	33,5	537,9
S	86,93	115,9	99,56	476,5	ND
K	ND	ND	ND	33,0	40,5
Ca	23,4	ND	ND	43,7	91,2
Ti	ND	ND	11,66	ND	ND
Cr	ND	ND	ND	2,6673	ND
Mn	ND	ND	ND	8,0	ND
Fe	6,37	5,1	2,36	222,1	43,2
Ni	ND	ND	ND	7,4	ND
Cu	2,13	2,4	2,13	7,1	9,1
Zn	ND	ND	2,76	ND	ND

*ND = Não detectado

Fonte: Autora da dissertação.

6.3 Respostas biológicas

A Tabela 9 apresenta os dados obtidos analisados por meio de análise de variância permutacional (PERMANOVA) para todos os biomarcadores. A homogeneidade das variâncias foi analisada usando PERMDISP no software PRIMER, versão 6.0. A partir dessa análise não houve diferença estatisticamente significativa para os fatores Tempo x Tratamento, mas ocorreu uma diferença entre os dois tempos de exposição e entre os tratamentos.

Tabela 9 - Análise da Permanova para polímeros, hidrossolúvel e oxi-biodegradável, e para *pellets* (PP, PE e PS) para fatores “tempo” e tipo polimérico. Os valores em negrito são para indicar $p < 0,05$.

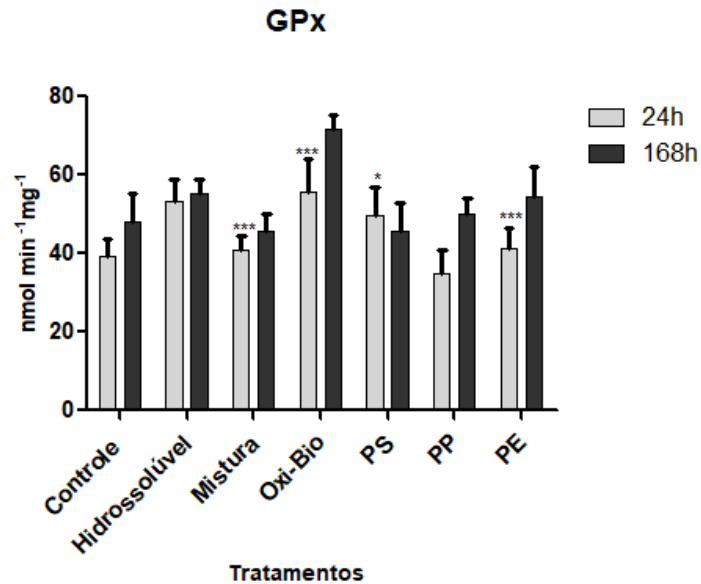
	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
Tempo	1	17,083	17,083	3,3104	0,003
Tratamentos	6	59,077	9,8462	1,908	0,002
Tempo x Tratamento	6	37,102	6,1836	1,1983	0,179
Residual	42	216,74	5,1604		

Fonte: Autora da dissertação.

A permanova também apresentou através do P de Monte Carlo (0,014) que este experimento quando se diz a respeito dos tempos, 24 horas e 168 horas, demonstrou diferença estatisticamente significativa. Esse resultado indica que existe influência dos tempos nas respostas dos biomarcadores.

A partir das análises de permanova foi possível observar as diferenças estaticamente significativas para cada biomarcador. Para GPx houve um aumento nos tratamentos oxi-biodegradável, e nos *pellets* PS e PE em 24 horas e 168 horas de exposição. Já o tratamento mistura de *pellets* (PP, PE e PS) para 24 horas houve também um aumento e em 168 horas uma diminuição (Figura 12).

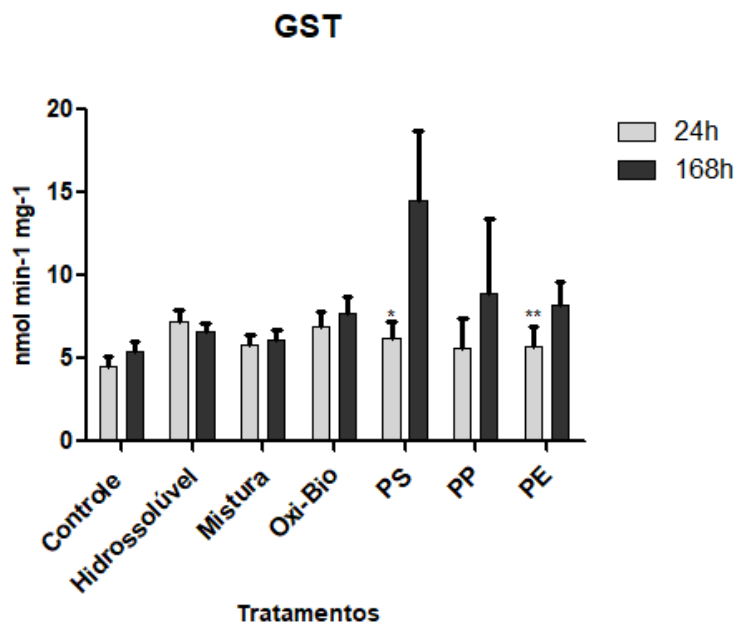
Figura 12 – Biomarcador GPx após 24 horas e 168 horas de exposição. * Relação de diferença significativa para o controle ($p < 0,05$). ** Diferença significativa relativa para outro tratamento ($p < 0,05$). *** Relação de diferença significativa ao controle e outro tratamento ($p < 0,05$).



Fonte: Autora da dissertação.

Na enzima GST a diferença estatisticamente demonstrou um aumento na produção desta enzima nos tratamentos de *pellets* PS e PE nos dois tempos de exposição (Figura 13).

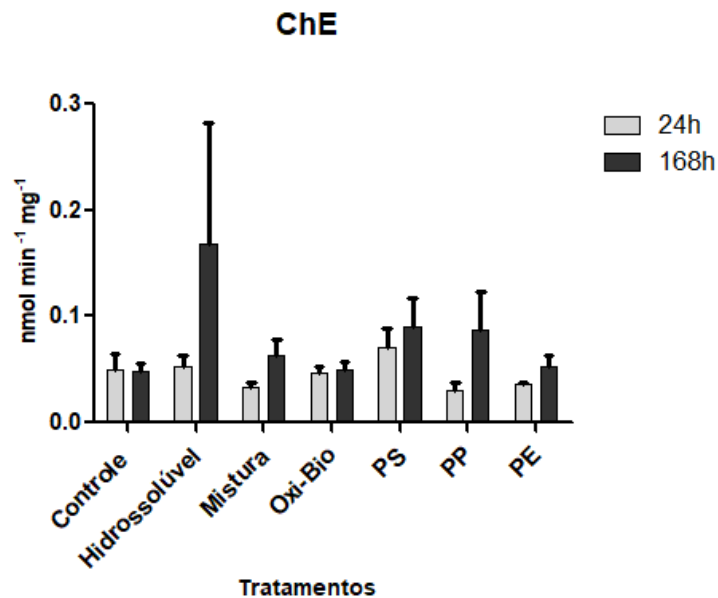
Figura 13 – Biomarcador GST após 24 horas e 168 horas de exposição. * Relação de diferença significativa para o controle ($p < 0,05$). ** Diferença significativa relativa para outro tratamento ($p < 0,05$). *** Relação de diferença significativa ao controle e outro tratamento ($p < 0,05$).



Fonte: Autora da dissertação.

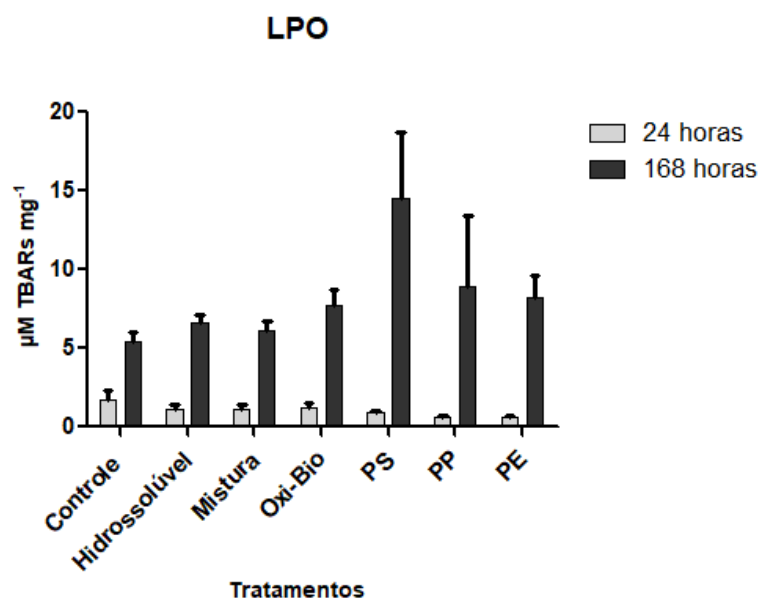
Para os biomarcadores ChE (Figura 14) e LPO (Figura 15) não houveram diferenças estatisticamente significativas, entretanto no biomarcador Danos no DNA houve diferença nos tratamentos mistura de *pellets* (PP, PE e PS), oxi-biodegradável, *pellets* PS e PE (Figura 16).

Figura 14 – Biomarcador ChE após 24 horas e 168 horas de exposição. * Relação de diferença significativa para o controle ($p < 0,05$). ** Diferença significativa relativa para outro tratamento ($p < 0,05$). *** Relação de diferença significativa ao controle e outro tratamento ($p < 0,05$).



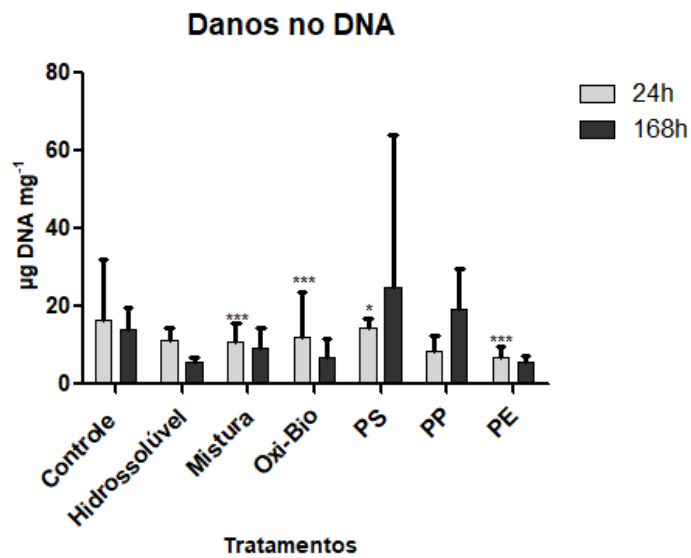
Fonte: Autora da dissertação.

Figura 15 – Biomarcador LPO após 24 horas e 168 horas de exposição. * Relação de diferença significativa para o controle ($p < 0,05$). ** Diferença significativa relativa para outro tratamento ($p < 0,05$). *** Relação de diferença significativa ao controle e outro tratamento ($p < 0,05$).



Fonte: Autora da dissertação.

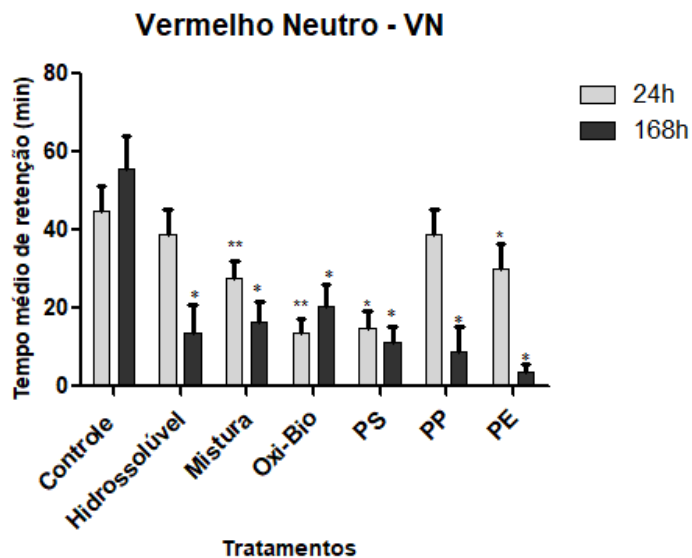
Figura 16 – Biomarcador Danos no DNA após 24 horas e 168 horas de exposição. * Relação de diferença significativa para o controle ($p < 0,05$). ** Diferença significativa relativa para outro tratamento ($p < 0,05$). *** Relação de diferença significativa ao controle e outro tratamento ($p < 0,05$).



Fonte: Autora da dissertação.

Para vermelho neutro (VN) houve diferença significativa nos tratamentos mistura de *pellets* (PP, PE e PS), oxi-biodegradável e *pellets* PS e PE em 24 horas e em 168 horas houve diferença em todos os tratamentos (Figura 17).

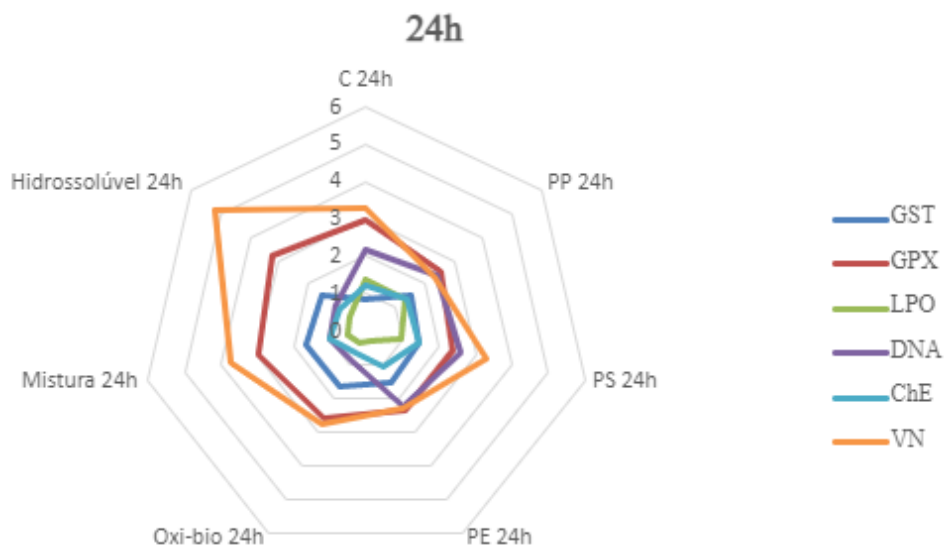
Figura 17 – Biomarcador VN após 24 horas e 168 horas de exposição. * Relação de diferença significativa para o controle ($p < 0,05$). ** Diferença significativa relativa para outro tratamento ($p < 0,05$). *** Relação de diferença significativa ao controle e outro tratamento ($p < 0,05$).



Fonte: Autora da dissertação.

Na Figura 18 podemos observar o Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores no tempo de exposição 24 horas. Este índice demonstra quais biomarcadores influenciaram mais nas respostas biológicas do organismo em estudo. Nos tratamentos poliestireno (PS), polietileno (PE) e polipropileno (PP), este último em menor escala, apesar de não demonstrarem dano oxidativo, em membrana, estão tendo uma resposta antioxidante (GPX) e um maior dano em DNA. O vermelho neutro nesses tratamentos também é pronunciado. No tratamento hidrossolúvel o dano em membrana está aumentando com a GPX.

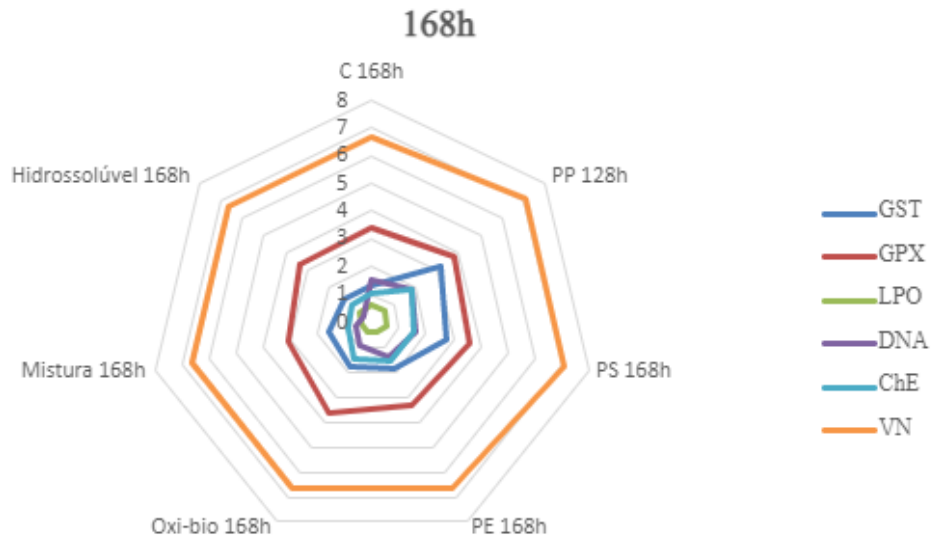
Figura 18 - Respostas combinadas de biomarcadores nas amostras de brânquia. A imagem mostra o comportamento dos biomarcadores nos tratamentos no tempo 24 horas.



Fonte: Autora da dissertação.

Na Figura 19 podemos observar o Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores no tempo de exposição 168 horas. Através deste índice é possível verificar que para todos os tratamentos o biomarcador vermelho neutro teve um comportamento biológico maior em todos os tratamentos em relação ao tempo 24 horas. Neste tempo de exposição novamente não se observa dano oxidativo nos tratamentos. Nos tratamentos PP e PS observa-se a GST ativada.

Figura 19 - Respostas combinadas de biomarcadores nas amostras de brânquia. A imagem mostra o comportamento dos biomarcadores nos tratamentos no tempo 168 horas.



Fonte: Autora da dissertação.

Através deste índice é possível verificar que o biomarcador vermelho neutro após 168 horas teve um comportamento biológico maior em todos os tratamentos em relação ao período 24 horas. O biomarcador GPX nos tratamentos oxi-biodegradável, *pellet* PS e PP também teve maiores respostas em 168 horas de exposição. Nos tratamentos *pellet* PP e *pellet* PS em 168 horas verificou-se um aumento nas respostas do biomarcador GST em comparação ao período 24 horas.

7 DISCUSSÃO

7.1 Análises de metais presentes nos *pellets* e polímeros por fluorescência de raios-x por energia dispersiva

O sódio, o enxofre e o silício são os elementos químicos com as concentrações mais elevadas para determinadas amostras. As amostras não processadas (*pellets* virgens) evidenciaram a ausência do sódio e silício, ou estão presentes em concentrações abaixo do limite de detecção do método. Já os polímeros, oxi-biodegradável e hidrossolúvel, apresentaram altas concentrações de sódio, proveniente de aditivos.

As altas concentrações de sódio encontradas nos polímeros, oxi-biodegradável (1550,0 mg kg⁻¹) e hidrossolúvel (2191,8 mg kg⁻¹), podem estar relacionadas com os alginatos isolados das paredes celulares de algas marrons, e que são sintetizados por microorganismos. Esse

aditivo tem como característica melhorar as propriedades mecânicas, de barreira e de revestimentos do polímero. O alginato de sódio é um hidrocolóide não tóxico, biodegradável, biocompatível e mais acessível economicamente (GHEORGHITA et al., 2020; MAJDINASAB et al., 2018). Agentes antiestáticos também podem ter sido encontrados na composição do polímero oxi-biodegradável, devido à presença desse elemento usado na forma de dodecibenzeno sulfonato de sódio ($C_{18}H_{29}NaO_3S$) (SMITH, 1998).

O enxofre existente nas amostras de pellets PP ($86,93 \text{ mg kg}^{-1}$), PE ($115,9 \text{ mg kg}^{-1}$), PS ($99,56 \text{ mg kg}^{-1}$) e no polímero oxi-biodegradável ($476,5 \text{ mg kg}^{-1}$) pode estar presente em alguns aditivos como os compostos a base de silicatos, assim como o alumínio presente nos polímeros oxi-biodegradável ($0,0142 \text{ mg kg}^{-1}$) e hidrossolúvel ($44,5 \text{ mg kg}^{-1}$) (sílica 34-43%, alumínio 20-28%, enxofre 10-16% e óxido de enxofre 12-20%) (VEDOLIN, 2014).

O cálcio, presente no pellet PP ($23,4 \text{ mg kg}^{-1}$) e nos polímeros, oxi-biodegradável ($43,7 \text{ mg kg}^{-1}$) e hidrossolúvel ($91,2 \text{ mg kg}^{-1}$), é um elemento químico associado às cargas minerais, como o carbonato de cálcio e aos estearatos de cálcio (BOSCARO, 2014). O elemento zinco presente apenas no pellet PS ($2,76 \text{ mg kg}^{-1}$) está associado ao aditivo estearato de zinco, pois ele é utilizado essencialmente em poliestireno como lubrificante para prevenir o polímero de aderir às superfícies de metal durante o processo de produção (SMITH, 1998).

A concentração de potássio determinada nas amostras de polímeros, oxi-biodegradável ($33,0 \text{ mg kg}^{-1}$) e hidrossolúvel ($40,5 \text{ mg kg}^{-1}$) podem indicar a presença de agentes redutores utilizados nos processos de iniciação química dos polímeros, para minimizar a ocorrência de reações secundárias. Compostos com base de sais ferrosos e tiosulfato de potássio ($K_2S_2O_3$) são os mais utilizados como agentes redutores nas reações de oxirredução (MANO e MENDES, 2004).

O ferro está presente em todas as amostras, sendo mais elevada na amostra oxi-biodegradável, essa alta concentração pode estar associada ao aditivo pró-degradante utilizado nestes plásticos. No estudo realizado por Boscaro (2014), o ferro foi determinado em sacolas plásticas oxi-biodegradáveis comercializadas no Brasil e apresentaram concentrações entre $12,0 \text{ mg kg}^{-1}$ a $77,7 \text{ mg kg}^{-1}$, essas concentrações são menores do que os valores encontrados no presente estudo para o canudo oxi-biodegradável ($222,1 \text{ mg kg}^{-1}$). Este mesmo estudo determinou as concentrações de elementos químicos em uma amostra de aditivo pró-

degradante, sendo o cálcio, depois do ferro, o elemento com maior concentração. No atual estudo foi encontrado cálcio no pellet PP ($23,4 \text{ mg kg}^{-1}$), e em concentrações um pouco maiores nas amostras oxi-biodegradável ($43,7 \text{ mg kg}^{-1}$), e hidrossolúvel ($91,2 \text{ mg kg}^{-1}$).

O cromo foi determinado nas amostras do polímero oxi-biodegradável ($2,6673 \text{ mg kg}^{-1}$), em uma concentração baixa. Este elemento é usado em aditivos pró-degradantes e pigmentos à base de cromo ou catalisadores utilizados nos processos de fabricação (ROCHA-SANTOS e DUARTE, 2017; HAHLADAKIS et al., 2018).

O titânio encontrado na amostra de pellet de PS pode estar associado como uma carga metálica para melhorar as propriedades mecânicas deste polímero, oferecendo uma propriedade de alta resistência (RESHETOV et al., 2019; SZAFRANSKA et al., 2019).

A análise revela também a presença do níquel apenas no polímero oxi-biodegradável ($7,4 \text{ mg kg}^{-1}$). Esse metal pesado pode estar associado aos antioxidantes “Irgafos 168” e “Hostanox 24FF” encontrados em produtos plásticos e em aditivos anti-UV (LAHIMER et al., 2013).

Por fim, a alta concentração de silício ($1825,0 \text{ mg kg}^{-1}$) encontrado somente no polímero hidrossolúvel pode ter sido incorporado na matriz do polímero, como um nanocompósito, para tornar o material solúvel em água e flexível, pois o silicone, proveniente de silício e oxigênio, têm alta permeabilidade em alguns gases, principalmente oxigênio e vapor d'água (CALLISTER et al, 2017).

7.2 Biomarcadores

O presente estudo forneceu novas informações sobre os efeitos causados em uma espécie de mexilhão (*M. charruana*), de interesse comercial, sob aditivos químicos que foram lixiviados de *pellets* e polímeros no ambiente marinho. Considerando que grande parte dos resíduos sólidos produzidos no mundo acabam nos oceanos, podemos considerar que os polímeros hidrossolúveis e oxi-biodegradáveis entram nos oceanos e podem atuar da mesma forma que os outros detritos plásticos. Uma vez no ambiente marinho, os polímeros biodegradáveis já não possuem as condições ideais para a biodegradação. Estudos anteriores já confirmaram que os plásticos não biodegradáveis e *pellets* alteram as respostas dos

biomarcadores, o desenvolvimento do embrião, as taxas de alimentação, entre outros efeitos em bivalves.

Neste estudo, as alterações bioquímicas nas enzimas antioxidantes foram observadas na brânquia do organismo ao longo do período de exposição. Os resultados dos efeitos observados tenderam a mudar dependendo dos polímeros e *pellets*, aparentemente refletindo as diferentes composições e concentrações dos aditivos lixiviados.

As enzimas antioxidantes, GST e GPx, exibiram mudanças significativas em suas atividades; A GST, uma enzima de biotransformação da fase II, aumentou nas brânquias dos organismos expostos aos *pellets* PS em relação ao controle e aos *pellets* PE em relação ao polímero oxi-biodegradável, demonstrando assim a ativação de mecanismos de desintoxicação para superar o estresse causado pelos aditivos. Esse aumento está relacionado a uma melhor detoxificação dos xenobióticos através da formação de um complexo com a glutationa (KAAYA et al., 1999) e na proteção dos tecidos branquiais contra substâncias tóxicas pró-oxidantes (VIDAL-LIÑÁN et al., 2010).

A GST está envolvida na eliminação de H_2O_2 necessário, que pode ser convertido em radicais hidroxila, lidando principalmente com o peróxido produzido metabolicamente (REGOLI e GIULIANI, 2014), portanto, a hidroxila pode gerar espécies reativas de oxigênio (ERO), podendo contribuir para um aumento do estresse oxidativo (PUSCEDDU, 2016).

Esses resultados diferem daqueles relatados por Avio e colaboradores (2015) em seu estudo com o mexilhão *Mytilus galloprovincialis* em que não observaram mudanças na enzima GST exposto a partículas de PE virgem e enriquecidas com pireno em $1,5 \text{ gL}^{-1}$ ($<100 \mu\text{m}$). Um outro estudo realizado por NOBRE e colaboradores (2020), ostras da espécie *Crassos trea brasiliiana* foram expostas á microesferas de PE virgem e enriquecidas com a substância triclosan, exibiram uma diminuição na enzima GST após 7 dias de exposição. O tratamento *pellet* PE apresentou uma diferença significativa para enzima GST em relação ao canudo oxi-biodegradável e essa diferença pode estar relacionada aos metais incorporados ao *pellet*, que apresentou concentrações de Cu e Zn no presente estudo. Esses metais são conhecidos por induzir reações medidas pela ativação de GST na espécie *Mytilus* spp. (VIDAL-LIÑÁN et al., 2010; CANESI et al., 1999).

Os tratamentos mistura, oxi-biodegradável, PS e PE apresentaram neste estudo um aumento da enzima GPx. Santos e colaboradores (2020) observaram um aumento da atividade

enzimática GPx em um estudo com microplásticos enriquecidos com 125 µg/L de Cu em larvas de peixe *Danio rerio*. Sendo assim, foi observado que somente microplásticos não produziram efeitos significativos nas larvas. Além disso, estudos anteriores sobre respostas a poluentes ambientais indicaram inibição da atividade da GPx como uma resposta à exposição aos metais, como o Fe, Cu e Cr em bivalves (REGOLI et al., 1998; DE ALMEIDA et al., 2004).

O aumento observado no presente estudo pode estar relacionado a outros metais que estão presentes no polímero e/ou nos *pellets* ou que apresentaram concentrações maiores nesses tratamentos como o S para os *pellets* (PS e PE) e para o oxi-biodegradável, Ti e Zn para o *pellet* PS e Cr para o oxi-biodegradável. Um estudo realizado por Trevisan e colaboradores (2014), demonstrou que o aumento da GPx também pode estar associado ao Zn no mexilhão *P. perna* após 7 e 21 dias de exposição ao cloreto de zinco em concentrações de 2,6 µM/L. Esse aumento pode oferecer à célula uma proteção maior contra o estresse oxidativo, pois essa enzima desintoxica o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e hidroperóxidos em moléculas de hidróxido, sendo a GSH o cofator (LUSHCHAK, 2016).

Para todos os tratamentos expostos, os níveis de LPO não sofreram alterações significativas, indicando que não ocorreu dano oxidativo lipídico e que a resposta do sistema de defesa antioxidante superou o estresse dos *pellets* e polímeros. Isso pode estar relacionado com o aumento da atividade de GPx e GST, que são enzimas protetoras eficazes contra a peroxidação lipídica (LUSHCHAK, 2016; SANTOS et al., 2020).

As respostas do tempo de retenção do corante vermelho neutro demonstraram uma diminuição do tempo de retenção do corante na membrana lisossômica nos tratamentos de *pellets* PP, PE e PS, nos polímeros hidrossolúvel e oxi-biodegradável e na mistura dos três *pellets*. Segundo Ortega (2018), os mexilhões são considerados saudáveis quando o tempo de retenção do corante for ≥ 60 minutos, estressados, porém compensando quando for < 60 e ≥ 30 minutos e severamente estressados quando for ≤ 30 minutos. Neste trabalho para todos os tratamentos que houveram redução no tempo do corante vermelho neutro nos lisossomos foram considerados severamente estressados (≤ 30 minutos). Os lisossomos possuem uma membrana semipermeável e estruturas envolvidas na desintoxicação de poluentes ou objetos estranhos. As macroestruturas são engolidas e decompostas em um processo de autofagia (KHALID et al, 2021).

Alguns estudos reportaram a diminuição do tempo de retenção do corante vermelho neutro em polímeros PS, PP (CAPOLUPO et al., 2021) e em microplásticos de PE virgens e

contaminados (AVIO et al., 2015; NOBRE et al., 2020) em mexilhões e ostras. Von Moos e colaboradores (2012) relataram menor retenção de corante em lisossomos de *M. edulis* após 96 horas de exposição aguda de microplásticos PE (> 0–80 µm) com uma concentração de 2,5 g/L. Essa redução compromete a integridade e a funcionalidade do compartimento lisossomal e representa um indicador preditivo para lesões celulares e teciduais (MOORE et al., 2006). Um estudo realizado por Khalid e colaboradores (2021) reportou que não obteve resultados significantes no tempo da retenção do corante vermelho neutro em bivalve, esse estudo avaliou efeitos ecotoxicológicos de micropartículas de um plástico ácido polilático (PLA), biodegradável, em duas concentrações 10 e 100 µg/L, durante 8 dias.

Os xenobióticos são incorporados aos lisossomos para evitar lesões e uma possível sobrecarga nos lisossomos pode causar sua desestabilização e assim aumentar a autofagia e liberação da hidrolase no tecido circundante que vai resultar em um processo necrótico (VON MOOS et al., 2012). O estresse celular provocado por xenobióticos também pode causar efeitos na viabilidade de gametas de bivalves marinhos, e conseqüentemente, afetar o sucesso reprodutivo dessas populações a longo prazo, especialmente por estes compostos serem introduzidos de maneira contínua no meio ambiente (PUSCEDDU, 2016).

O desenvolvimento embriolarval de alguns invertebrados marinhos, como exemplo os mexilhões, é dependente de vitelo, que libera energia para a larva pelos lisossomos que, se estiverem comprometidos por conta do estresse celular, pode retardar ou inviabilizar o desenvolvimento das larvas (PUSCEDDU, 2016).

A acetilcolinesterase (AChE) é o biomarcador de neurotoxicidade mais utilizado em organismos aquáticos, pois é uma enzima chave do sistema nervoso, tendo um papel essencial na neurotransmissão. Essa enzima catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) responsável por transmitir impulsos nervosos entre os neurônios (STENESH, 1998). A atividade da AChE não mudou nos tratamentos do atual estudo. Esse resultado foi condizente com o estudo realizado por Khalid e colaboradores (2021), onde o mexilhão azul, *Mytilus edulis*, foi exposto por um período de 8 dias a micropartículas de um plástico biodegradável, ácido polilático (PLA), em duas concentrações, 10 e 100 µg/L e os resultados obtidos não apresentaram nenhuma alteração de neurotoxicidade. Esses resultados diferem do estudo realizado por SANTOS e colaboradores (2020), onde relatou a inibição da AChE em peixes (*Danio rerio*) quando expostos a microplásticos associados com Cu.

Um outro estudo demonstrou também uma inibição em mexilhões, *Mytilus galloprovincialis*, expostos a lixiviados de PVC (CAPOLUPO et al., 2021). Os aditivos químicos associados aos plásticos podem provocar então a inibição da enzima AchE, fazendo com que ocorra uma contínua produção de AchE, ocasionando estímulos nervosos nas junções neuromusculares (INOUYE e OLIVEIRA, 2004).

A oxidação do DNA por espécies reativas ao oxigênio (EROS) pode produzir quebras nas fitas e uma série de diferentes bases de DNA modificadas. Essas quebras representam uma classe importante de dano oxidativo ao DNA sob estresse oxidativo (CADET et al., 1997). Esses danos ao DNA em mexilhões envolvendo microplásticos podem estar relacionados à transferência das micropartículas para a hemolinfa e hemócitos de bivalves alimentadores de filtro como relatado em alguns estudos (AVIO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017). Como também podem estar associados à toxicidade indireta dos aditivos químicos aos plásticos, como relatado no presente estudo, onde foi observado uma diminuição nos tratamentos, mistura de *pellets*, oxi-biodegradável, *pellet PS e PE* em 24 horas de exposição. Já em 168 horas de exposição não foram observados danos ao DNA, apenas recuperação de danos ao longo do tempo de exposição.

Esses danos também foram relatados no estudo realizado por Alnajar e colaboradores (2021) onde observaram um aumento no dano ao DNA em mexilhões que foram expostos a fibras plásticas e associaram além dos efeitos diretos das fibras uma fonte adicional de toxicidade dos produtos químicos associados às microfibras que podem ser encontradas na água do mar e no trato digestivo do bivalve estudado *M. galloprovincialis*. Os produtos químicos associados as microfibras sintéticas e processadas são os monômeros, aditivos, corantes e resíduos catalíticos.

Esses desenhos experimentais e o presente estudo, demonstraram que tanto *pellets* virgens e contaminados, como polímeros biodegradáveis, apresentam toxicidade e que, portanto, os plásticos biodegradáveis não são mais seguros que os à base de petróleo. Essas respostas ecotoxicológicas evidenciam como a toxicidade não se deve exclusivamente à concentração de plástico ou seu tamanho, tornando assim as características químicas dos polímeros importantes.

Essas respostas dos biomarcadores neste estudo é mais uma evidência da complexidade da avaliação ecotoxicológica dos impactos causados por esses contaminantes físicos e químicos, quando em contato com o organismo, sendo por ingestão ou contato com seus

contaminantes lixiviados, e que conseqüentemente são dependentes do tamanho, forma, cor e composição polimérica, comprovando assim que a quantificação dos plásticos e a comparação entre locais de amostragem não são suficientes para fazer um retrato do perigo causado por estes poluentes.

Os resultados obtidos apresentaram valores ambientalmente relevantes (100 g de sedimento para 10 *pellets*) e os efeitos devem ser considerados, visto que materiais plásticos, tanto os *pellets*, como os polímeros convencionais e biodegradáveis, são liberados anualmente em grandes quantidades no meio ambiente, disponibilizando também seus aditivos químicos.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou respostas subletais referente as enzimas GST e GPX, danos no DNA e na membrana lisossomal do organismo em estudo. A partir dos resultados foi possível compreender que plásticos biodegradáveis podem alterar as funções celulares e enzimáticas dos organismos aquáticos marinhos, uma vez inseridos no meio ambiente em sua forma bruta, sem enriquecimento de alguma substância. Isso sugere que os polímeros deste estudo assim como os *pellets* virgens, liberaram seus lixiviados químicos e esses lixiviados causaram a toxicidade, pois nenhum material foi ingerido aparentemente. As respostas obtidas na matriz sedimento demonstraram a importância de se estudar diferentes vias de exposição, pois na literatura a maioria dos estudos contaminaram a água.

Observou-se maior toxicidade em 24 horas de exposição os tratamentos *pellets* virgens de polietileno (PE), poliestireno (PS) e polipropileno (PP) e o polímero hidrossolúvel. As amostras apresentaram alguns metais: Al, Si, P, S, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu e Zn. As amostras de polímeros oxi-biodegradáveis e hidrossolúveis apresentaram concentrações maiores desses metais em comparação aos *pellets* virgens. Essas maiores concentrações são dos aditivos químicos adicionados intencionalmente para que os produtos tivessem suas características específicas, como ser solúvel em água e oxi-biodegradável. A caracterização química dos materiais em estudo foi importante para a compreensão das respostas biológicas.

Sobre os polímeros hidrossolúveis ainda não há dados suficientes para saber os danos destes uma vez dissolvidos na água ou sedimento. Futuros ensaios serão necessários para

compreender mais sobre as possíveis micropartículas plásticas assim como as substâncias associadas a estes produtos sobre organismos aquáticos e terrestres.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática: toxicidade crônica de curta duração – método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea). NBR 15350, p.19, 2012. Disponível em <<https://www.normas.com.br/visualizar/abnt-nbr-nm/25082/abnt-nbr15350-ecotoxicologia-aquatica-toxicidade-cronica-de-curta-duracao-metodo-de-ensaio-com-ourico-do-mar-echinodermata-echinoidea>> Acesso em 18 de janeiro de 2021.

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

AMATO-LOURENÇO, L. F.; OLIVEIRA, R.C; JÚNIOR, G.R; GALVÃO, L; ANDO, R.A.; MAUAD, T. Presence of airborne microplastics in human lung tissue. **Journal of Hazardous Materials.**, v.416, 2021.

AMMALA, A.; BATEMAN, S.; DEAN, K.; PETINAKIS, E.; SANGWAN, P.; WONG, S.; YUAN, Q.; YU, L.; PATRICK, C.; LEONG, K. H. An overview of degradable and biodegradable polyolefins. **Progress in polymer science.**, p. 1015-1049, 2011.

AMASS, W.; AMASS, A.; TIGHE, B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyester, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. **Polymer International, London.**, v. 47, p.89-144, 1998.

ALMEIDA, E. A.; BAINY, A. C. D.; LOUREIRO, A. P. M.; MARTINEZ, G. R.; MIYAMOTO, S.; ONUKI, J.; BARBOSA, L. F.; GARCIA, C. C. M.; PRADO, F. M.; RONSEIN, G. E.; SIGOLO, C. A.; BROCHINI, C. B.; MARTINS, A. M.; MEDEIROS, M. H. G.; MASCIO, P. D. Oxidative stress in Perna perna and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. **Comparative Biochemistry and Physiology.**, v.147, p.588-600, 2007.

ANDELIC, I.; JOJE-BUSATTO, R.; UJEVIC, I.; VULETIC, N.; MATIJEVIC, S. Distribution of Bisphenol A in Sediment and Suspended Matter and Its Possible Impact on Marine Life in Kaštela Bay, Adriatic Sea, Croatia. **Journal of Marine Science and Engineering.**, v. 8, p. 480, 2020.

ANDRADY, A. L. In *Plastics and the environment* (ed. A. L. Andrady). **West Sussex, England: John Wiley and Sons**, 2003.

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

ANTUNES, J. C.; FRIAS, J. G. L.; MICAELLO, A. C.; SOBRAL, P. Resin pellets from beaches of the Portuguese coast and adsorbed persistent organic pollutants. **Estuarine, Coastal and Shelf Science.**, p.62-69, 2013.

ALNAJAR, N.; JHA, A. N.; TURNER, A. Impacts of microplastic fibres on the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*. **Chemosphere**, v. 262, p. 128-290, 2021.

ASCER, L. G. **Efeitos de microplástico na fisiologia do mexilhão Perna perna (Bivalvia: Mytilidae)**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral, 2015.

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

BABU, R. P.; CONNOR, K. O.; SEERAM, R. D. Current progress on bio-based polymers and their future trends. **Progress in Biomaterials.**, p.1-16, 2013.

BARNES, D. K. Invasions by marine life on plastic debris. **Nature.**, v. 416, p.808-809, 2002.
BASTO, M. N.; NICASTROA, K. R.; TAVARESA, A. I.; MCQUAIDB, C. D.; CASEROC, M.; AZEVEDOC, F.; ZARDI, G.I. Plastic ingestion in aquatic birds in Portugal. **Marine Pollution Bulletin.**, v. 138, p. 19-24, 2019.

BERTOLETTI, E. Toxicidade e Concentração de Agentes Tóxicos em Efluentes Industriais. **Revista Ciência e Cultura.**, v. 43, p. 271-277, 1990.

BEJGARN, S.; MACLEOD, M.; BOGDAL, C.; BREITHOLZ, M. Toxicity of leachate from weathering plastics: An exploratory screening study with *Nitocra spinipes*. **Chemosphere.**, p.114-119, 2015.

BRINGER, A.; THOMAS, H.; PRUNIER, G.; DUBILLOT, E.; BOSSUT, N.; CHURLAUD, C.; CLÉRANDEAU, C.; LE BIHANIC, F.; CACHOT, J. High density polyethylene (HDPE) microplastics impair development and swimming activity of Pacific oyster D-larvae, *Crassostrea gigas*, depending on particle size. **Environmental Pollution.**, v.260, p. 113978, 2020.

BRANDÃO, M. L.; BRAGA, K. M.; LUQUE, J. L. Marine debris ingestion by Magellanic penguins, *Spheniscus magellanicus* (Aves: Sphenisciformes), from Brazilian coastal zone. **Marine Pollution Bulletin.**, v. 62, p. 2246-2249, 2011.

BATLEY, G. E.; SIMPSON, S. L. **Assessing Sediment Quality: A practical Guide., second edition**, p.15-39, 2016.

BRITO, F. G.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos.*, v.6.2, p.127-139, 2011.

BOSCARO, M. E. **Determinação de elementos químicos em plásticos biodegradáveis naturais e sintéticos**. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2014.

BOWMER, T.; KERSHAW, P. Proceedings of the GESAMP International Workshop on Microplastic particles as a vector in transporting persistent, bio-accumulating and toxic substances in the ocean. **GESAMP Reports & Studies.**, n.8, 2010.

BONNES-TAOUREL D.; GUÉRIN M.C.; TORREILLES J. Is malonaldehyde a valuable indicator of lipid peroxidation? **Biochemical Pharmacology.**, v, 44, p. 985–988, 1992.

CARPENTER, E. J.; SMITH JR., K. L. Plastics on the Sargasso Sea surface. *Science.*, v.175, n.4027, p.1240-1241, 1972.

BLOME, C.; FOERSTL, K.; SCHLEPER, M.C. Antecedents of green supplier championing and greenwashing: An empirical study on leadership and ethical incentives, *J. Clean. Prod.*, v.152, p. 339-350, 2017.

CALLISTER W.D.; RETHWISCH D.G. **Materials science and engineering: an introduction**. New York: **John Wiley and Sons.**, p. 992, 2009.

CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D. G. **Materials science and engineering: an introduction**. Tenth Edition, **Wiley.**, p. 1-975, 2017.

CADET, J.; BERGER, M.; DOUKI, T.; RAVANAT, J.L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. **Reviews of Physiology Biochemistry Pharmacology.**, v. 131, p. 1–87, 1997.

CAPOLUPO, M.; SORENSEN, L.; JAYASENA, K. D. R.; BOOTH, A. M.; FABBRI, E. Chemical composition and ecotoxicity of plastic and car tire rubber leachates to aquatic organisms. **Water Research.**, v. 169, p. 115270, 2020.

CANESI, L.; BORGHI, C.; CIACCI, C.; FABBRI, R.; VERGANI, L.; GALLO, G. Bisphenol-A alters gene expression and functional parameters in molluscan hepatopancreas. **Molecular and cellular Endocrinology.**, v.276, p.36-44, 2007.

CHEUNG, C. C. C.; ZHENG, G. J.; LI, A. M. Y.; RICHARDSON, B. J.; LAM, P. K. S. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. **Aquatic Toxicology.**, v. 52, p. 189-203, 2001.

CHERIF, L. M.; AYED, N.; HORRICHE, J.; BELGAINED S. Characterization of plastic packaging additives: Food contact, stability and toxicity. **Arabian Journal of Chemistry.**, v.10, p. 1938–1954, 2017.

COSTA, M. F.; IVAIR DO SUL, J. A.; SILVA-CAVALCANTI, J. S.; ARAÚJO, M. C.; SPENGLER, Â.; TOURINHO, P. On the importance of size of plastic fragments and pellets on the strandline: A snapshot of a Brazilian beach. **Environmental Monitoring and Assessment.**, v. 168, p. 299-304, 2009.

COLTON, J. B.; KNAPP D. F.; BURNS R. B. Plastic particles in surface waters of the northwestern Atlantic. **Science.**, v.185, n.4150, p.491-497, 1974.

COONEY, J. D. **Sediment Tests. In: RAND, G.M. Fundamentals of aquatic toxicology. Effects, environmental fate and risk assessment.** Washington USA: Taylor & Francis., 1995.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em Ambientes Aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova.**, v. 31, p. 1820-1830, 2009.

DAILIANIS S.; DOMOUHTSIDOU G.P.; RAFTOPOULOU E.; KALOYIANNI M.; DIMITRIADIS V.K. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal trans-duction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. **Marine Environmental Research.**, v. 56, p. 443–470, 2003.

DOBRADARAN, S.; SCHMIDT, T. C.; NABIPOUR, I.; KHAJEAHMADI, N.; TAJBACHSH, S.; SAEEDI, R.; JAVAD MOHAMMADI, M.; KESHTKAR, M.; KHORSAND, M.; KARAJI G. F. Characterization of plastic debris and association of metals with microplastics in coastline sediment along the Persian Gulf. **Waste Management.**, v.78, p.649-658, 2018.

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

DE ALMEIDA, E. A.; BAINY, A. C. D.; LOUREIRO, A. P. M.; MARTINEZ, G. R.; MIYAMOTO, S.; ONUKI, J.; BARBOSA, L. F.; GARCIA, C. C. M.; PRADO, F. M.; RONSEIN, G. E.; SIGOLO, C. A.; BROCHINI, C. B.; MARTINS, A. M. G. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology.**, v. 146, p. 588-600, 2007.

EPA. Plastics Pellets in the Aquatic Environment: Sources and recommendations. Final Report. **Washington: EPA/842-B-92-010.**, 1992.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, JR. V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology.**, v 7, p. 88–95, 1961.

ENGLER, R. E. The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean. **Environmental Science e Technology.**, v. 46, p. 12302-12316, 2012.

EYHERAGUIBEL, B.; LEREMBOURE, M.; TRAIKIA, M.; SANCELME, M.; BONHOMME, S.; FROMAGEOT, D.; LEMAIRE, J.; LACOSTE, J.; DELORT, A. M.Environmental scenarii for the degradation of oxo-polymers, *Chemosphere.* v. 198, p. 182-190, 2018.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova.**, v.29, p.811-816, 2006.

FRIAS, J. P. G. L.; SOBRAL P.; FERREIRA, A.M. Organic pollutants in microplastics from two beaches of the Portuguese coast., **Marine Pollution Bulletin.**, v.60, p.1988-1992, 2010.
FRIES, E.; DEKIFF, J. H.; WILLMEYER, J.; NUELLE, M. T.; EBERT, M.; REMY, D. Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy. **Environmental sciences: Processes and Impacts.**, v. 15, p. 1949-1956, 2013.

FROMME, H.; KUCHLER, T.; OTTO, T.; PILZ, K.; MULLER, J.; WENZEL, A. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. **Water Research.**, v. 36, p. 1429–1438, 2002.

FOTOPOULOU, K. N.; KARAPANAGIOTI, K. H.; Surface properties of beached plastic pellets. **Marine Environmental Research.**, v. 81, p. 70-77, 2012.

FUENTES, C. How green marketing works: Practices, materialities, and images, *Scand. J. Manag.* v. 31, p. 192-205, 2015

GALLO, F.; FOSSI, C.; WEBER, R.; SANTILLO, D.; SOUSA, J.; INGRAM, I.; NADAL, A.; ROMANO, D. Marine litter plastics and microplastics and their toxic chemicals components: the need for urgent preventive measures. **Environmental Sciences Europe.**, v. 30, p. 1-14, 2018.

GAGNE, F.; BLASE, C. Evaluation of the genotoxicity of environmental contaminants in sediments to rainbow trout hepatocytes. **Environmental Toxicology Water Quality**, v. 10, p. 217–229, 1995.

GEYER, R.; JAMBECK, J.; LAVENDERLAW, K. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances.**, v. 3, 2017.

GESAMP – Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection. **Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: A global assessment**, 2015. Disponível em: < http://ec.europa.eu/environment/marine/good-environmental-status/descriptor-10/pdf/GESAMP_microplastics%20full%20study.pdf> Acesso em 15 de janeiro de 2020.

GHEORGHITA, R.; GUTT, G.; AMARIELO, S. The Use of Edible Films Based on Sodium Alginate in Meat Product Packaging: An Eco-Friendly Alternative to Conventional Plastic Materials. **Coatings.**, v. 20, 2020.

GONÇALVES, A. C. S. **Ocorrência de microplásticos em zonas intermareais e sua relação com variáveis ambientais**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Lisboa, Portugal, 2016.

GARDON, T.; HUVET, A.; PAUL-PONT, I.; CASSONE, A. L.; KOUA, M. S.; SOYEZ, C.; JEZEQUEL, R.; RECEVEUR, J.; LE MOULLAC, G. Toxic effects of leachates from plastic pearl-farming gear on embryolarval development in the pear oyster *Pinctada margaritifera*. **Water research.**, v. 179, p. 115890, 2020.

GUSSO-CHOUERI, P. K.; CHOUERI, R. B.; ARAÚJO, G.S.; CRUZ, A. C. F.; STREMEL, T.; CAMPOS, S.; ABESSA, D. M.S; RIBEIRO, C. A.O. Assessing pollution in marine protected areas: the role of a multi-biomarker and multi-organ approach. **Environmental science and pollution research.**, v. 22, 2015.

GIMILIANI, G. T. **Caracterização de microplásticos em amostras marinhos e estuarinas**. 2021. 167 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/CNEN/SP. São Paulo.

GREGORY, M. R. Environmental implications of plastic debris in marine settings - entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. **Philosophical Transactions of the Royal Society.**, v.364, p.1025-2013, 2009.

GOLSHAN, M.; HATEF, A.; SOCHA, M.; MILLA, S.; BUTTS, I. A. E.; CARNEVALI, O.; RODINA, M.; SOKOLOWSKA-MIKOLAJCZYK, M.; FONTAINE, P.; LINHART, O.; ALAVI, S. M. H. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate disrupts pituitary and testicular hormonal functions to reduce sperm quality in mature goldfish. **Aquatic Toxicology.**, v. 163, p. 16-26, 2015.

HAMLIN, H. J.; MARCIANO, K.; DOWNS, C. A. Migration of nonylphenol from food-grade plastic is toxic to the coral reef fish species *Pseudochromis fridmani*. **Chemosphere.**, v. 139, p. 223-228, 2015.

HAHLADAKIS, J.N.; VELIS, C.A.; WEBER, R.; IACOVIDOU, E.; PURNELL, P. An overview of chemical additives presents in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. **Journal of Hazardous Materials.**, v. 344, p. 179-199, 2018.

HERMABESSIERE, L.; ALEXANDRE, D.; IKA, P.; CAMILLE, L.; RONAN, J.; PHILIPPE, S. GUILLAUME, D. Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: a review. **Chemosphere.**, v. 182, p.781-793, 2017.

HEEMKEN, O. P.; REINCKE, H.; STACHEL, B.; THEOBALD, N. The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. **Chemosphere.**, v. 45, p. 245–259, 2001.

HOLMES, L. A.; TURNER, A.; THOMPSON, R. C. Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment. **Environmental Pollution.**, v. 160 p.42-48. 2011.

HUPPERTSBERG, S.; ZAHN, D.; PAUELSEN, F.; REEMTSMA, T.; KNEPPER, T. P. Making waves: Water-soluble polymers in the aquatic environment: An overlooked class of synthetic polymers?. **Water research**, v. 181, 2020.

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

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientações sobre validação de métodos analíticos (DOQ-CGCRE-008)**. Revisão 05-Agosto, 2016.

INOUYE, K.; OLIVEIRA, G.H. Avaliação crítica do tratamento farmacológico atual para doença de Alzheimer. **Infarma**. V. 15, p. 11-12, 2004.

JAMBECK, J. R.; GEYER, R.; WILCOX, C.; SIEGLER, T. R.; PERRYMAN, M.; ANDRADY, A.; NARAYAN, R.; LAW, K. L. Plastic waste inputs from land into the ocean. **Science**., v. 347, p. 768-771, 2015.

JUHEL, G.; BAYEN, S.; GOH, C.; LEE, W. K.; KELLY, B. C. Use of a suite of biomarkers to assess the effects of Carbamazepine, Bisphenol A, Atrazine and their mixture on green mussels, *Perna viridis*. **Environmental Toxicology and Chemistry**., v.36, p. 429-441, 2016.

KOENIG-LEWIS, N.; PALMER, A.; DERMODY, J.; URBYE, A. Consumers' evaluations of ecological packaging – Rational and emotional approaches, *J. Environ. Psychol.* v. 37., p. 94-105, 2014.

LAIST, D. W. Impacts of marine debris: entanglement of marine life in marine debris including a comprehensive list of species with entanglement and ingestion records. *Marine Debris. Springer*., p. 99–139, 1997.

KAAYA, A.; NAJIMI, S.; RIBERA, D.; NARBONNE, J.F.; MOUKRIM, A. Characterization of glutathione S-transferases (GST) activities in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* used as a biomarker of pollution in the Agadir Marine Bay (South of Morocco). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**., v. 62, p. 623–629, 1999.

KHALID, A.; VERGNOUX A.Z.; BENALI, S.; MINCHEVA, R.; RAQUEZ J.M.; BERTRAND, S. POIRIER, L. Are bio-based and biodegradable microplastics impacting for blue mussel (*Mytilus edulis*)?. **Marine Pollution Bulletin**., v. 167, 2021.

KEEN J.H.; HABIG W.H.; JAKOBY W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**., v. 251, p. 6183– 6188, 1976.

KOLTZENGURG, S.; MASKOS, M.; NUYKEN, O. Polymere: Synthese, Eigenschaften und Anwendungen. **Polymere**, 2014.

LAHIMER, M. C.; AYED, N.; HORRICHE, J.; BELGAIED. Characterization of plastic packaging additives: Food contact, stability and toxicity. **Arabian Journal of Chemistry**., v. 10, 2013.

LIMA, A. M. F. **Estudo da cadeia produtiva do Polietileno Tereftalato (PET) na Região Metropolitana de Salvador como subsídio para análise do ciclo de vida**. Monografia

(Cursos de Especialização em Gerenciamento e Tecnologias Ambientais na Indústria). Escola Politécnica. Departamento de Hidráulica e Saneamento. Rede de Tecnologias Limpas (TECLIM). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2001.

LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.**, v. 37, p.293-303, 2001.

LI, H.-X.; GETZINGER, G.J.; FERGUSON, P.L.; ORIHUELA, B.; ZHU, M.; RITTSCHOF, D. Effects of toxic leachate from commercial plastics on larval survival and settlement of the barnacle *Amphibalanus amphitrite*. **Environmental Science Technology.**, v. 50, p.924-931, 2016.

LIU, C.; CHANG, V.W.; GIN, K.Y. Environmental toxicity of PFCs: an enhanced integrated biomarker assessment and structure–activity analysis. **Environmental Toxicology Chemistry.**, v.32, p. 2226–2233, 2013.

LUCAS, N.; BIENAIME, C.; BELLOY, C.; QUENEUDEC, M.; SILVESTRE, F.; NACA-SAUCEDO, J.E. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. **Chemosphere.**, v.73, n.4, p.429-442, 2008.

LUSHCHAK, V.L. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish physiology and biochemistry.**, v. 42; p. 711-747, 2016.

LOWE, D. M.; FOSSATO, V.U.; DEPLEDGE, M. H. Contaminant-induced lysosomal membranedamage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an in vitro study. *Marine Ecology Progress Series.*, v. 129, p. 189–196, 1995.

MATO, Y.; ISOBE, T.; TAKADA, H.; KANEHIRO, H.; OHTAKE, C.; KAMINUMA, T. Plastic Resin Pellets as a Transport Medium for Toxic Chemicals in the Marine Environment. **Environmental Science and Technology.**, v. 35 p. 318-324, 2001.

MAJDINASAB, M.; HOSSEINI, S. M. H.; SEPIDNAME, M.; NEGAHDARIFAR, M.; LI, P. Development of a novel colorimetric sensor based on alginate beads for monitoring rainbow trout spoilage. **J. Food Science Technol.**, v. 55, p. 1695–1704, 2018.

MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. F. A ECOTOXICOLOGIA COMO FERRAMENTA NO BIOMONITORAMENTO DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS. **Oecologia Brasiliensis.**, v.12, p.355-381, 2008.

MANO, E.B.; MENDES, L.C. Introdução a polímeros. 2ª ed. Editora Edgard Blucher: São Paulo, 2004.

MAMACA E.; BECHMANN R.K.; TORGRIMSEN S.; AAS E.; BJØRNSTAD A.; BAUSSANT T.; LE FLOCH S. The neutral red lysosomal retention assay and Comet assay on haemolymph cells from mussels (*Mytilus edulis*) and fish (*Symphodus melops*) exposed to styrene. **Aquatic Toxicology**, v. 75, 2015.

MEEKER, J. D.; SATHYARAYANA, S.; SWAN, S. H. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 364, p. 2097-2113, 2009.

MCDERMID, K. J.; MCMULLEN, T. L. Quantitative analysis of small-plastic debris on beaches in the Hawaiian archipelago. **Marine Pollution Bulletin**, p.790-794, 2004.

MOORE, M.N. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. **Marine Ecology Progress Series**, v. 46, p. 81–8, 1998.

MOORE, C. J.; MOORE, S. L.; LEECASTER, M. K.; WEISBERG, S. B. A Comparison of Plastic and Plankton in the North Pacific Central Gyre. **Marine Pollution Bulletin**, v.42, p.1297-1300, 2001.

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

NAZARETH, M; MARQUES, M.R.C; LEITE, M.C.A; CASTRO, Í. B. Commercial plastics claiming biodegradable status: Is this also accurate for marine environments?. **Journal of Hazardous Materials**, v. 366, p. 714-722., 2019.

NAPPET, I. E.; THOMPSON, R. C. Environmental Deterioration of Biodegradable, Oxo-biodegradable, Compostable, and Conventional Plastic Carrier Bags in the Sea, Soil, and Open-Air Over a 3-Year Period. **Environmental Science and Technology**, v. 53, p. 475-478, 2019.

NOBRE, C. R. **Avaliação da Toxicidade de Microplásticos em Matrizes Ambientais Utilizando Invertebrados Marinhos**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, Santos, SP, 2016.

NOBRE, C. R.; MORENO, B. B.; ALVES, A. V.; ROSA, J. L.; FRANCO, H. R.; ABESSA, D. M.; MARANHO, L. A.; GUSSO-CHOUERI, P. K.; PEREIRA, C. D. S. Effects of Microplastics Associated with Triclosan on the Oyster *Crassostrea brasiliana*: An Integrated Biomarker Approach. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 79, p. 101-110, 2020.

NG, K. L.; OBBARD, J. P. Prevalence of microplastics in Singapore's coastal marine environment. **Marine Pollution Bulletin.**, v.52, n.7, p.761-767, 2006.

OGATA, Y.; TAKADA, H.; MIZUKAWA, K.; et al. International pellet watch: global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs. **Marine pollution bulletin.**, v.58, n.10, p.1437-1446, 2009.

OLIVIERO, M.; TATO, T.; SCHIAVO, S.; FERNÁNDEZ, V.; MANZO, S.; BEIRAS, R. Leachates of micronized plastic toys provoke embryotoxic effects upon sea urchin *Paracentrotus lividus*. **Environmental Pollution.**, v. 247, p. 706-715, 2019.

OLIVE, P. L. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis.**, v. 11, 487-49, 1988.

ORTEGA, A. D. S. B. Análise da citotoxicidade e genotoxicidade do crack empregando o organismo-teste *Perna perna*, 2018.

PEREIRA, F. C.; OLIVEIRA, A. L.; TURRA, A. Gestão de resíduos sólidos no ambiente marinho: pellets plásticos. **Simpósio Brasileiro de Oceanografia.**, 2011.

PEARSE, J. Ecological role of purple sea urchins. **Science**, v.314, p. 940-941, 2006.

PLASTICS EUROPE - Association of Plastics Manufacturers 2010. **Plastics e the Facts 2010. An analysis of European plastics production, demand and recovery for 2009**, 2010.

PLASTICS EUROPE - Association of Plastics Manufactures, 2019. **Plastics e the Facts 2019. An analysis of european plastics production, demand and wast data**, 2019.

PUSCEDDU, F. H. **Avaliação do risco ambiental de sedimentos contaminados com triclosan, ibuprofeno e 17 α -Ethinilestradiol empregando invertebrados marinhos bentônicos**. 2016, p. 149 (Tese - Doutorado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, São Paulo.

RAGUSA, A.; SVELATO, A.; SANTACROCE, C.; CATALANO, P.; NOTARSTEFANO, V.; CARNEVALI, O.; RONGIOLETTI, M. C. A.; BAIOTTO, F.; DRAGHI, S.; D'AMORE, E.; RINALDO, D.; MATTA, M.; GIORGINI, E. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. **Environment International.**, v. 146, 2021.

RIOS, L. M.; MOORE, C.; JONES, P. R. Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. **Marine Pollution Bulletin.**, v.54, n.8, p.1230-1237, 2007.

RIBEIRO, F.; GARCIA, A.R. PEREIRA, B.P.; FONSECA, M.; MESTRE, N.C.; FONSECA, T.G.; ILHARCO, L.M.; BEBIANNO, M.J. Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. **Marine Pollution**, 2017.

RÜDIGER H. W. MARQUART H., SCHÄFER S. G., MCCLELLAN R., WELSCH F. Biomonitoring in occupational medicine (eds.). **Toxicology. San Diego: Academic Press.** p.1027-39. 1999.

RIISE, B. L.; BIDDLE, M. B.; FISHER, M. M. X-Ray Fluorescence Spectroscopy in Plastics Recycling. **R'2000 Proceeding, 5th World Congress**, p.5-13, 2000.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology.** Washington., p. 665, 1985.

RESHETOV, A.; KULAGIN, R.; KORSHUNOV, A.; BEYGELZIMER Y. The Occurrence of Ideal Plastic State in CP Titanium Processed by Twist Extrusion. **Advance engineering materials**, v.20, 2019.

RENDELL-BHATTI, F.; PAGANOS, P.; POUCH, A.; MITCHELL, C.; D'ANIELLO, S.; GODLEY, B. J.; PAZDRO, K.; ARNONE, M. I.; JIMENEZ-GUR, E. Developmental toxicity of plastic leachates on the sea urchin *Paracentrotus lividus*. **Environmental Pollution**, v. 269, p. 115744, 2021.

REGOLI, F.; GIULIANI, M.E. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. **Marine Environmental Research**, v. 93, 2014.

REEMTSMA T.; BERGER U.; ARP, H.P.H.; GALLARD H.; KNEPPER T.P.; NEUMANN M. Mind the Gap: Persistent and Mobile Organic Compounds Water Contaminants That Slip Through. **Environmental Science Technology**, v.19, 2016.

RIST, S. E.; ASSIDGI, K.; ZAMANI, N. P.; APPEL, D.; PERSHLKE, M.; HUHN, M.; LENZ, M. Suspended micro-sized PVC particles impair the performance and decrease survival in the Asian green mussel *Perna viridis*. **Marine Pollution Bulletin**, v.111, p.213-220, 2016.

ROCHMAN, C. M.; HOH, E.; KUROBEL, T.; TEH, S. J. Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. **Scientific Reports**, v.3, p. 1-3, 2013.

ROCHA-SANTOS, T.A.P.; DUARTE, A.C. Comprehensive analytical chemistry: Characterization and analysis of microplastics. **Elsevier**, 2017.

SANTOS, D.; FÉLIX, L.; LUZIO, A.; PARRA, S.; CABECINHA, E.; BELLAS, J.; MONTEIRO, S. M. Toxicological effects induced on early life stages of zebrafish (*Danio rerio*)

after an acute exposure to microplastics alone or co-exposed with copper. **Chemosphere.**, v, 261, 2020.

SECOM – SETOR DE PRODUÇÃO COMERCIAL. Estudo de mercado – Bioplásticos. **Embaixada do Brasil em Tóquio.**, p. 1-14, 2007.

SILVA, P. P. G. **Contaminação e toxicidade de microplásticos em uma área de proteção marinha costeira.** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Ciências da Engenharia Ambiental - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2016.

SIES, H.; KOCH O.R.; MARTINO, E., BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters.**, p.287–290, 1979.

SCHMIDT, N.; FAUVELLE, V.; ODY, A.; CASTRO-JIMENEZ, J.; JOUANNO, J.; CHANGEUX, T.; THIBAUT, T.; SEMPÉRÉ, R. The amazon river: a major source of organic plastic additives to the tropical north atlantic?. **Environmental Science e Technology.**, v. 53, p. 7513-7521, 2019.

SZAFRANSKA, A.; ANTOLAK-DUDKA, A.; BARANOWSKI, P.; BOGUSZ P.; ZASADA, D.; MALACHOWSKI J.; CZUIKO, T. Identification of Mechanical Properties for Titanium Alloy Ti-6Al-4V Produced Using LENS Technology. **Materials Journal.**, v.20, 2019.

STENESH, J. Book - **Biochemistry.** New York: Plenum, 1998.

SMITH, S.H. Extraction of additives from polystyrene and subsequent analysis. Polytechnic Institute and State University, Faculty of Virginia, Blacksburg, Virginia, 1998.

STENESH, J. Bioindicadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao Chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudos de caso preliminar no Rio Ribeira (SP/PR) (COSTA, J. R. M. A), 1998.

SILVÉRIO, F. O.; BARBOSA, L. C. A. A pirólise como técnica analítica. **Química nova.**, v. 31, p. 1543-1552, 2008.

SOBRAL, P.; FRIAS, J.; MARTINS, J. Microplásticos nos oceanos - um problema sem fim à vista. **Ecologia.**, p.12-21, 2011.

TAUTEN, E. L.; SAQUING, J. M.; KNAPPER, D. R. U.; BARLAZ, M. A.; JONSSON, S.; BJORN, A.; ROWLAND, S. J.; THOMPSON, R. C.; GALLOWAY, T. S.; YAMASHITA, R.; OCHI, D.; WATANUKI, Y.; MOORE, C.; VIET, P. H.; TANA, T. S.; PRUDENTE, M.; et al. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. **Philosophical Transactions of the Royal Society B.**, v.364, p. 2027-2045, 2009.

TALNESS, C. E.; ANDRADE, A. J.; KURIYAMA, S. N. Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. **Philosophical Transactions of the Royal Society B.**, v.364, p. 2079-2096, 2009.

TREVISAN, R.; FLESCHE, S.; MATTOS, J.J.; MILANI, M.R.; BAINY, A.C.D. Dafre AL. Zinc causes acute impairment of glutathione metabolism followed by coordinated antioxidant defenses amplification in gills of brown mussels *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C.**, v. 159, p. 22-30, 2014.

THOMPSON, R. C.; OLSEN, Y.; MITCHELL, R. P; DAVIS, A.; ROWLAND, S. J; JOHN, A. W. G.; MCGONIGLE, D.; RUSSELL, A. E. Lost at sea: where is all the plastic? **Science.**, v.304, n.5672, p.838, 2004.

TURRA, A.; MANZANO, A. B.; DIAS, R. J. S.; MAHIQUES, M. M.; BARBOSA, L.; B VEDOLIN, M. C. Estudo da distribuição de metais em plásticos no litoral de São Paulo: avaliação da poluição por meio da análise de pellets. Dissertação. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, p. 73, 2014. ALTHAZAR-SILVA, D.; MOREIRA, F. T. Three-dimensional distribution of plastic pellets in sandy beaches: shifting paradigms. **Scientific reports.**, v.4, 2014.

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

VAN FRANEKER, J. A.; LAW, K. L. Seabirds, gyres and global trends in plastic pollution. **Environmental Pollution.**, v. 203, p.89-96, 2015.

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

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

VEDOLIN, M. C. **Estudo da distribuição de metais em plásticos no litoral de São Paulo: avaliação da poluição por meio da análise de pellets.** 2014, p.73 (Dissertação). Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.

VIDYASAKAR, A.; KRISHNAKUMAR, S.; KASILING, K.; NEELAVANNAN, K.; ARUN BHARATHI, V.; GODSON, P. S.; PRABHA, K.; MAGESH, N; S; Characterization and distribution of microplastics and plastic debris along Silver Beach, Southern India. **Marine Pollution Bulletin.**, v.150, 2020.

VIDAL-LIÑÁN, L.; BELLAS, J.; CAMPILLO, J. C.; BEIRAS, R. Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain). **Chemosphere**, v. 78, p. 265-272, 2010.

VON MOOS, N.; BURKHARD-HOLM, P.; KOHLER, A. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. **Environmental Science and Technology**., v.46, p. 11327-11335, 2012.

ZHU, J.; WANG, C. Biodegradable plastics: Green hope or greenwashing. **Marine Pollution Bulletin**., v. 161, 2020.

WEGNER, A.; BESSELING, E.; FOEKEMA, E. M.; KAMERMANS, P.; KOELMANS, A. A. Effects of nanopolystyrene on the feeding behavior of the blue mussel (*Mytilus edulis*). **Environmental Toxicology and Chemistry**., v.31, p.2490-2497, 2012.

WINSTON G.W.; LIVINGSTONE D.R.; LIPS F. Oxygen reduction metabolism by the digestive gland of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. **Journal of Experimental Zoology**. 1990.

WILES, D. M. Oxo-biodegradable polyolefins. Biodegradable polymers for industrial applications. 1 ed. **Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.**, 437-450, 2005.

WIDDOWS, J.; DONKIN, P. Role of physiological energetics in ecotoxicology. **Comparative Biochemistry and Physiology**., v.100, n.1, p. 69-75, 1991.

WILLS, E.D. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: Snell K, Mullack B (eds) **Biochemical toxicology: a practical approach**. **IRL Press, Oxford**, 1987.
WIDDOWS J.; DONKIN P. Role of physiological energetics in ecotoxicology. **Comparative Biochemistry and Physiology**., v. 100; p. 69-75, 1991.

WWF - World Wide Fund. **Brasil é o 4º país do mundo que mais gera lixo plástico.**, 2019. Disponível em <<https://www.wwf.org.br/?70222/Brasil-e-o-4-pais-do-mundo-que-mais-gera-lixo-plastico>> Acesso em 15 de janeiro de 2020.

WEBB, S.; GAW, S.; MARSDEN, I. D.; MCRAE, N. K. Biomarker responses in New Zealand green-lipped mussels *Perna canaliculus* exposed to microplastics and triclosan., **Ecotoxicology and Environmental Safety**., v. 201, p. 110871, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles-Environmental Health Criteria**., 155, 1993.

YAMAMOTO, T.; YASUHARA, A.; SHIRAISHI, H.; NAKASUGI, O. Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. **Chemosphere.**, v. 42, p. 415-418, 2001.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.