Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

Departamento de Fisiologia Geral

Liv Goldstein Ascer

Efeitos de Microplásticos na Fisiologia do Mexilhão *Perna perna* (Bivalvia:Mytilidae)

São Paulo

2015

Liv Goldstein Ascer

Efeitos de Microplásticos na Fisiologia do Mexilhão *Perna perna* (Bivalvia:Mytilidae)

Microplastics effects on the physiology of the Mussel *Perna perna* (Bivalvia:Mytilidae)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Reis Custódio

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Ascer, Liv Goldstein.
Efeitos de Microplásticos na Fisiologia do Mexilhão Perna perna (Bivalvia: Mytilidae) / Liv Goldstein Ascer ; orientador Márcio Reis Custódio. -- São Paulo, 2015.

88f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral.

1. Microplásticos. 2. Estresse. 3. Mexilhão. I. Custódio, Márcio Reis. II. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia Geral. III. Título.

Comissão Julgadora:

_____

Prof(a).Dr.(a)

_____

Prof.(a) Dr(a).

_____

Prof. Dr. Márcio Reis Custódio

Orientador

Dedico este trabalho àquele que me ensinou a amar e respeitar o mar e que infelizmente não está mais presente para vê-lo finalizado.

Vô Sanyi, levarei para sempre comigo seu legado, seus ensinamentos e sua positividade.

“Most people say that it is the intellect which makes a great scientist. They are wrong: it is character.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradecer sempre me pareceu uma palavra muito forte. Até hoje. Ao pensar em todos que permitiram que este trabalho pudesse ser realizado, só tenho esta palavra para definir minha gratidão.

Primeiramente eu gostaria de agradecer a orientação calma e segura do Prof. Dr. Márcio Reis Custódio. Obrigada pelas explicações, opiniões e conversas. Sem essa tranquilidade eu provavelmente teria sofrido mais para chegar até aqui. Agradeço também a co-orientação do Prof. Dr. Alexander Turra. Obrigada por me introduzir ao mundo dos plásticos e descobrir meu lugar no mundo.

Ao meu pai, grande médico e pesquisador, agradeço o exemplo de perseverança, força, garra de sempre ir em frente, independente dos desafios que a vida nos traz. À minha mãe, pela alma de artista, leve e feliz, mas que não perde a oportunidade de defender suas opiniões com convicção e paixão, traços que levo comigo. Aos dois, eu agradeço por cada conversa interminável, cada ajuda psicológica e financeira, cada barreira superada. Vocês são meus exemplos e meus orgulhos. À minha avó, Nina, que sempre esteve preocupada com meu bem-estar físico e mental esse tempo todo. Ao meu irmão Andor, pelos valiosos conselhos e por me permitir amadurecer tanto neste período. À família Goldstein Ascer, por sempre me ouvir, muitas vezes sem me entender, e vibrar a cada conquista. Obrigada pelo apoio e amor incondicional.

Àquele que se tornaria, no meio da escrita desta dissertação, um parceiro para a vida, eu só tenho a agradecer pela paciência e pelo amor que recebi de você não só nesses 2 anos e meio de mestrado, mas nos últimos 6! Jô, obrigada por ter sempre me escutado, se interessado, muitas vezes secado minhas lágrimas e dado risada ao meu lado. Esse trabalho com certeza não seria o mesmo sem sua força e seu carinho. Eu te amo.

Agradeço à vida por ter colocado no meu caminho um exemplo de organização, bondade e paciência, com a qual tive o prazer de colaborar. Marina, trabalhar ao seu lado foi e é uma honra. Obrigada por cada cronograma, cada cobrança e ensinamento. Essa parceria, espero, é para vida, pois além de uma excelente pesquisadora, você se tornou uma grande amiga.

Aproveito para agradecer os demais colaboradores, professores Camilo Seabra e Denis Abêssa e suas equipes, por terem aberto as portas de seus laboratórios e dividido seus

conhecimentos. Aos colegas de LabCel, Hermann, Nilvea, Isa, Paty, Jaque, Pri, Vinicius, Michelle e Leo, obrigada pela paciência e pelos inúmeros cafés! Ao Vágner pelos litros e litros de reagentes! À galera do LabManejo, vocês são muitos, mas estão todos no meu pensamento! Obrigada por sempre me receberem tão bem! Aos amigos de longa data, Gi, Ju, Alex e Ká, agradeço cada dia que passa por ter vocês comigo. Estela, Ariane, Ligia, Clau e Bia, obrigada pelo apoio sempre! Agradeço à CAPES pelo auxílio financeiro fornecido nesses dois anos e a SisBio pela concessão da licença para coleta dos mexilhões.

A todos aqueles que indireta ou diretamente contribuíram para a realização deste trabalho: Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO 1

ABSTRACT 2

1. Introdução 3

1.1 Lixo Marinho 3

1.2 Poluição por plástico 4

1.2.1 Os Macroplásticos 6

1.2.2 Os Microplásticos 6

1.3 Aditivos e Contaminantes 7

1.3.1 Aditivos 7

1.3.2 Contaminantes 9

1.4 Impactos dos microplásticos em organismos marinhos 10

2. Objetivos 12

3. Materiais e Métodos 13

3.1 Organismo Modelo 13

3.2 Modelo de microplástico 13

3.3 Desenho Experimental 14

3.4 Ensaios biocelulares 15

3.4.1 Quantificação das proteínas totais das amostras analisadas. 15

3.4.2 Ensaio de Lipoperoxidação 17

3.4.3 Ensaio de Precipitação Alcalina 17

3.4.4 Ensaio do Tempo de Retenção do Vermelho Neutro 18

3.4.5 Ensaio de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 19

3.5 Análise da ocorrência de contaminação por microplásticos in situ 20

3.5.1 Digestão ácida e identificação de microplásticos 22

3.6 Análise de dados 22

4. Resultados 23

4.1 Caracterização dos microplásticos presentes em cosméticos. 23

4.2. Caracterização dos microplásticos adquiridos da indústria. 23

4.2.1 Identificação 23
4.2.2 Liberação de ftalatos 25
4.2.3 Morfologia dos microplásticos 25
4.3 Lipoperoxidação 26
4.4 Dano ao DNA 29
4.5 Tempo de Retenção do Vermelho Neutro (TRVN) 33
4.6 Proteínas de Estresse 35
4.6.1 Allograft Inflammatory Factor 1 – (AIF-1) 35
4.6.2 Heat Shock Protein 70 (HSP70) 39
4.6.3 Phosphorylated P38 Mitogen Activated Protein Kinase (pP38-MAPK) 41
4.7 Presença de microplásticos nos organismos em campo. 43
5. Discussão 45
5.1. Caracterização dos microplásticos presentes em cosmético 45
5.2. Caracterização dos microplásticos adquiridos da indústria. 45
5.3. Lipoperoxidação 47
5.4 Dano ao DNA 49
5.5 Tempo de Retenção do Vermelho Neutro 50
5.6 Proteínas de Estresse 51
5.6.1 Allograft inflammatory factor 1 (AIF-1) 51
5.6.2 Heat-Shock Protein 70 (HSP70) 52
5.6.3 Phosphorylated p38 mitogen activated protein kinase (pP38-MAPK). 53
5.7 Avaliação Global dos Biomarcadores 54
5.8. Contaminação por microplástico no campo 54
6. Conclusões 56
7. Referências 58
LISTA DE ILUSTRAÇÕES 73
LISTA DE TABELAS 77
LISTA DE ABREVIAÇÕES 78

RESUMO

Dentre as diferentes poluições presentes nos oceanos, o plástico é provavelmente, aquele que leva aos maiores impactos ambientais, sendo encontrado de praias e manguezais à giros no meio dos oceanos. Os macroplásticos, cujo tamanho é superior a 5mm, são maiores em volume e provocam um impacto socioambiental importante, porém os microplásticos, fragmentos menores que 5mm, estão em maior quantidade e podem provocar danos em organismos marinhos filtradores como mexilhões e ostras. Apesar da sua grande presença nos oceanos, ainda não se estabeleceu com clareza se causam efeitos somente físicos, por um aumento de material particulado não orgânico ingerido, ou se seus efeitos podem ser de origem química, devido à quantidade de contaminantes que possuem. Para estudar o impacto que essas partículas têm em organismos filtradores, o mexilhão *Perna perna*, espécie bioindicadora abundante na costa brasileira, foi exposto a partículas de polietileno encontradas em cosméticos nacionais. O microplástico foi adquirido diretamente da indústria e precisou ser identificado. A análise de FT-IR mostrou que o plástico era polietileno de baixa densidade. Os organismos então foram expostos ao polietileno, virgem ou lixiviado, em duas concentrações (0,5 g/L e 2,5 g/L) por diferentes períodos (12,24,48,96 e 144 horas). Após os experimentos, os mexilhões foram coletados e dissecados e a resposta de seis biomarcadores foi analisada: O Tempo de Retenção do Vermelho Neutro nos hemócitos, Danos ao DNA e Lipoperoxidação nas brânquias e os níveis de três proteínas de estresse (AIF-1, pP38-MAPK e HSP-70) nas glândulas digestivas. Todos os biomarcadores foram afetados pela exposição ao polietileno, porém um padrão no resultado não pôde ser observado. Os fatores de exposição analisados (Concentração, Período e Tratamento do Plástico) individualmente, ou combinados, levaram a respostas diferentes e até mesmo opostas em alguns casos. A coleta de indivíduos de *P. perna in situ* na região do Porto de Santos mostrou que todos os bancos naturais possuem organismos contaminados. Os resultados deste trabalho mostram que a fisiologia do mexilhão *P. perna* é modificada após a exposição aguda ao polietileno. Um maior número de biomarcadores deve ser analisado futuramente para elucidar quais vias estão efetivamente sendo ativadas ou inibidas. O alto nível de contaminação dos mexilhões da região do porto de Santos é um fator alarmante que deve ser discutido pela sociedade com o intuito de se criar soluções para o problema da poluição por plástico nos oceanos antes que este afete a saúde humana.

PALAVRAS-CHAVE: Microplásticos, microesferas, cosméticos, polietileno, mexilhão, poluição marinha.

ABSTRACT

Among all different pollutants, plastic debris is one of the main environmental impacts, being found from beaches and mangrove to gyres in the middle of the oceans. Macroplastics, with size above 5mm, are larger in volume and are an important social and environmental problem, but microplastics, fragments less than 5mm can be most harmful for filter feeding animals such as mussels and oysters. However, it is still debatable if its effects are physical, due to the increase in indigestible material; or chemical, due to plastic additives such as phthalates or PCBs. To study the impact that these particles can have in those animals, the brown mussel *Perna perna* (Bivalvia) an abundant and an organism easy to maintain in the laboratory, was exposed to virgin or leached polyethylene (PE) microbeads, used as abrasives in Brazilian cosmetics. Polyethylene was acquired directly from the industry and therefore needed to be identified. Analysis of FT-IR showed that the plastic was Low Density Polyethylene. The microplastic exposure had two concentrations (0.5 and 2.5g/l) and different periods of time (12, 24, 48, 96 and 144 hours). After the experiment, the organisms were dissected and the levels of six biomarkers were analyzed: Neutral Red Retention Time by the Hemocytes, Lipid Peroxidation and DNA Damages in the Gills and the response levels of three stress proteins (pP38-MAPK, AIF-1 and HSP-70) in the Digestive Glands. All biomarkers were affected by the PE exposure, but the results did not follow a pattern. The exposure factors analyzed (Concentration, Period of Time and Plastic Treatment), alone or combined, led to different and sometimes opposite responses. *In Situ* collected samples in the Santos Harbour area showed that all natural mussel's beds analyzed had microplastics contaminated mussels. The results of this work showed that microplastics acute exposure in *P. perna* modifies its physiology. More biomarkers should be used to clarify which pathways are being activated or inhibited. The high levels of contamination of important commercial mussel's beds in the Santos Harbour area, is an alarming sign for the community, that should start working together to solve the plastic pollution problem in our oceans before starts to affect human health.

KEYWORDS: Microplastics, microbeads, cosmetics, polyethylene, mussel, marine pollution.

1. Introdução

1.1 Lixo Marinho

Lixo Marinho é qualquer sólido persistente, manufaturado ou processado que foi disposto, descartado ou abandonado em ambiente marinho ou costeiro. Faz parte também qualquer detrito (em especial elementos como madeira, plásticos, metais, vidros, borracha, roupas, papeis entre outros) que chega a esses ambientes, intencionalmente ou acidentalmente, por transporte natural como rios, ventos ou tempestade (Galgani *et al.*, 2010). Os ambientes marinhos, hoje, se encontram poluídos da superfície ao fundo de todos os oceanos, nas costas e nos estuários (Thompson *et al.* 2009a). A geração de lixo persistente nos oceanos aumenta proporcionalmente à população mundial e sua produção industrial (Duhec *et al.*,2015). A falta de preocupação com o manejo do lixo produzido e um despreparo da população com relação à bons hábitos de descarte fizeram com que este se tornasse um problema ambiental crítico (Duhec *et al.* 2015). A quantidade de lixo marinho encontrada nas últimas décadas nos oceanos é fonte de preocupação por prejudicar tanto a saúde da biodiversidade aquática quanto a dos seres humanos (Coe e Rogers, 2012; Derraik, 2002; Gregory, 2009; Rochman *et al.*, 2013). Por serem persistentes, podem transportar contaminantes para regiões muito distantes da fonte de contaminação marinha inicial (Gaylor *et al.*, 2012; Holmes *et al.*, 2012; Mato *et al.*, 2001; Rochman *et al.*, 2012; Teuten *et al.*, 2009). Como um impacto adicional, tem-se a própria presença do material, que esteticamente afeta o ambiente, levando a degradação visual das praias e causando prejuízos socioeconômicos no cenário costeiro (Mouat *et al.*, 2010). A poluição por lixo marinho é considerada uma das maiores ameaças aos organismos marinhos e estes elementos são considerados poluentes globais pela facilidade com que são transportados. O lixo marinho flutuante pode se acumular tanto em regiões isoladas, como é o caso, entre outros, das remotas ilhas Alphonse, nas Seychelles (Duhec *et al.*, 2015), como praias e restingas de zonas costeiras (Turra *et al.*, 2014). O lixo marinho, porém, não se acumula somente em terra, mas pode também ser encontrado em áreas de convergências oceânicas, chamadas de giros. Estas regiões oceânicas são conhecidas por serem, naturalmente, fonte de alimento para diversas espécies marinhas, como por exemplo aves, mas também por serem zonas de acúmulo do lixo que se encontra nos oceanos (Van Franeker e Law**,** 2015) (Fig.1). Os cinco maiores e mais importantes giros são subtropicais (dois no Atlântico, dois no Pacífico e um no Oceano Índico).

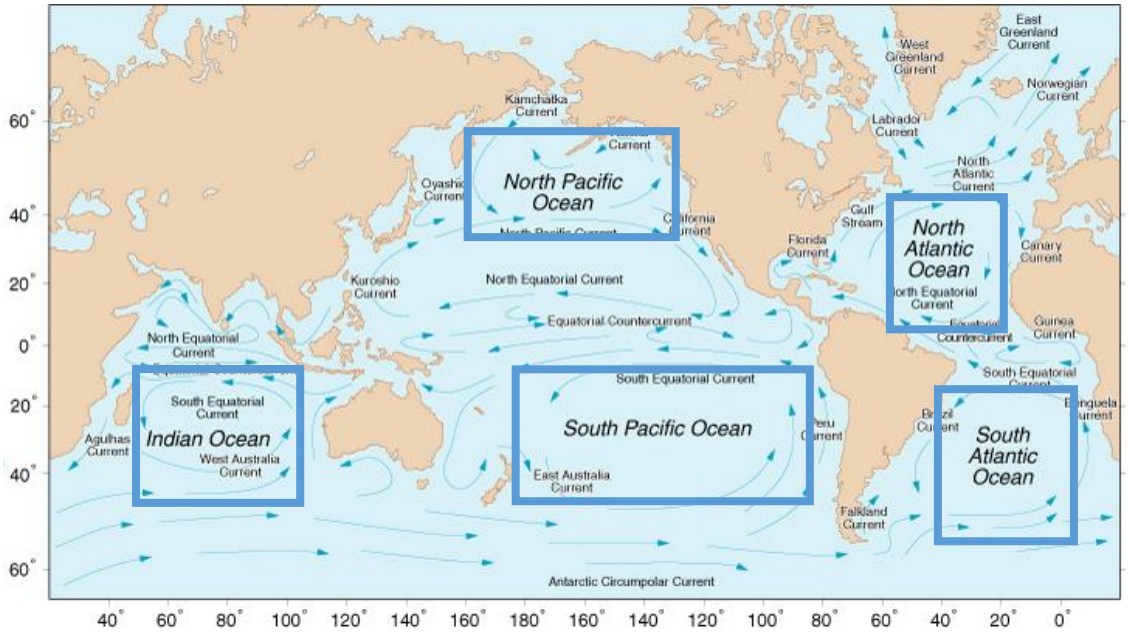


Figura 1: Correntes de superfície oceânicas causadas por ventos. Assinalado em azul, as zonas de convergência subtropicais, chamadas de Giros. Adaptado de Sociedade Americana de Metereologia, 2005

O impacto do lixo sobre a vida marinha é grande e compromete a natureza de diferentes formas (Gall e Thompson, 2015). As primeiras notificações de animais em contato com lixo marinho foram nos anos 60 (Caldwell *et al.*, 1965; Brongersma, 1968), onde os primeiros impactos por plástico também foram relatados. O lixo marinho é responsável por inúmeras fatalidades entre grupos mais vulneráveis e expostos à essa poluição como é o caso das aves, tartarugas, peixes e mamíferos marinhos (Laist, 1997, GEF, 2012). Também pode permitir o transporte de espécies invasivas, como o bivalve *Pinctada imbricata* que foi encontrado em sua forma juvenil associado à cordas, na costa do Uruguai, região onde ele não se encontra habitualmente, evidenciando a introdução desta espécie com a ajuda de lixo marinho (Goldstein *et al.*, 2012; Pace *et al.*, 2007, Marques e Breves, 2015).

Dentre todos os materiais presentes nos oceanos, o plástico se destaca como o maior poluidor (OSPAR, 2007; Thompson *et al.*, 2004; UNEP-CAR/RCU, 2008; UNEP, 2005, 2009).

1.2 Poluição por plástico

O plástico é um polímero orgânico produzido a partir de óleo ou gás (Derraik, 2002; Rios *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2009b). Desde sua criação, em 1907, as mais diversas formas de produção e uso se desenvolveram, transformando o plástico em um produto

leve, não corrosivo e inerte, utilizando em torno de 8% do total da produção do petróleo mundial para sua fabricação (Thompson *et al.*, 2009b). Sua ampla diversidade de uso o tornou sem dúvidas um dos materiais mais procurados para manufatura de diversos produtos, que vão desde tubulações até produtos hospitalares, passando por móveis e brinquedos. Porém, sua utilização se tornou um problema ambiental grave, pois as qualidades que o torna tão atrativo, também impedem uma bio-degradação no ambiente (Barnes *et al.*, 2009; Sivan, 2011). Por seu baixo preço de produção e venda, e impulsionado pelo consumo dos produtos plásticos descartáveis, o plástico hoje representa 10% do lixo produzido no mundo (Barnes *et al.*, 2009). Apesar de uma parte deste lixo plástico ser reciclado, a grande maioria acaba em aterros onde sua fragmentação e decomposição levará séculos (Barnes *et al.*, 2009; Moore, 2008).

A poluição marinha por plástico é de grande impacto por sua grande abundância e sua persistência nos oceanos: nas últimas décadas, a produção de produtos plásticos global passou de 5 milhões de toneladas em 1960 a 280 milhões de toneladas em 2011 (PlasticsEurope, 2012), demonstrando o poder de consumo deste material.

As pesquisas sobre este assunto se concentram essencialmente em avaliar a quantidade de plástico presente nas superfícies dos oceanos e nas costas, e suas quantidades variam amplamente entre regiões (Barnes *et al.*, 2009; Derraik, 2002). Apesar das iniciativas governamentais de limpeza dos oceanos e das restrições sobre o descarte de esgoto não tratado em alguns países, a quantidade de plástico parece aumentar em algumas regiões (Harper e Fowler, 1987; Thompson *et al.*, 2004; Goldstein *et al.*, 2012). Este dado vem do fato de que o plástico não é biodegradável, formando assim partículas cada vez menores, fazendo com que esse tipo de poluição só aumente com o tempo (Andrady, 2011). Considera-se, hoje que 10% do lixo plástico produzido acabe por poluir o ambiente marinho (Thompson *et al.*, 2009a), onde pode persistir e se acumular, apesar das legislações que reconhecem o plástico como importante poluente dos oceanos e que tentam impedir seu descarte inapropriado (Gregory, 2009; Lozano e Mouat, 2009).

Os plásticos podem ser classificados de acordo com seu tamanho (Ericksen *et al.*, 2014). Maiores que 5mm, são considerados “macroplásticos” e menores são considerados “microplásticos”. Estes criam impactos ambientais com características pouco semelhantes.

1.2.1 Os Macroplásticos

O impacto que macroplásticos causam na fauna marinha é documentada desde os anos 60 (Caldwell *et al.*, 1965, Brongersma, 1968) e há muitos anos é objeto de pesquisas ambientais. A presença de macroplásticos no ambiente costeiro causa problemas de ordem estética, gerando prejuízos a instalações turísticas, bem como de ordem física, como na indústria marítima representada entre outros pela indústria da pesca, o transporte marítimo e a aquicultura, onde macroplásticos podem impedir atividades e danificar equipamentos. Além disso, podem levar à morte de animais marinhos por ingestão e estrangulamento e modificam o habitat natural de espécies (Browne *et al.* 2015).

1.2.2 Os Microplásticos

Pequenos fragmentos plásticos, menores que 5mm, foram identificados já nos anos 70 (Carpenter *et al.*, 1972). Nas décadas seguintes, as pesquisas realizadas com este tema se multiplicaram (Andrady, 2011), mas foi somente em 2004 que foi criada a definição para as pequenas partículas: o "microplástico". Termo este que após inúmeras discussões foi definido para partículas menores de 5 milímetros pela NOAA.

Microplásticos nos oceanos podem possuir duas diferentes origens: podem provir da fragmentação de objetos plásticos maiores já descartados nos oceanos, que se deterioram por ação de ventos, correntezas e incidência de raios ultravioletas (Andrady, 2011). Podem também adentrar o ambiente como micropartículas já produzidas inicialmente em pequenos diâmetros (Fendall e Sewell, 2009; Cole *et al.*, 2011). Estas podem ter forma esférica, chamada de *plastic pellets,* ou forma de pó. Suas características físicas, no entanto, variam conforme sua composição química e propósito de uso. Os *plastic pellets* apresentam tamanhos entre 1 a 5 mm e diferentes cores. São usados como matéria prima da indústria plástica para a produção de inúmeros produtos com essa matriz. Já os microplásticos em pó têm tamanhos micrométricos, formas esféricas ou irregulares e diferentes cores. Podem fazer parte da composição de cosméticos com propriedades abrasivas (Fendall and Sewell, 2009), como sabonetes e pastas de dente. No caso de as partículas serem produzidas em tamanhos microscópicos, estas podem adentrar o ambiente marinho de diferentes formas: pelo descarte inadequado de materiais (pós-consumo), e as perdas de matéria-prima (pré-consumo).

As perdas dos *plastic pellets* assim como outros microplásticos utilizados como matéria prima da indústria se dão principalmente pelo transporte inadequado, situação já reconhecida pelo setor logístico da maior produtora de plástico nacional, a Braskem. Já

os plásticos que passam pelo consumo, principalmente doméstico, chegam ao ambiente marinho por descarte inadequado e pela falta de coleta e tratamento. Quando estes existem, pequenas partículas como os abrasivos presentes em cosméticos não são retidas, chegando, inevitavelmente, aos rios e consequentemente aos oceanos (Fendall e Sewell, 2009).

1.3 Aditivos e Contaminantes

Em ambientes terrestres e aquáticos, a sorção e a dessorção são os mecanismos mais importantes para a distribuição, persistência e impacto de contaminantes antropogênicos hidrofóbicos. Elementos plastificantes como os ftalatos, ou contaminantes aquáticos como PCBs e PAHs podem se associar a materiais sorventes orgânicos e serem transportados, levando a contaminação à áreas onde inicialmente não se encontravam (Teuten *et al.*, 2009). Foi observada, porém, que essa afinidade pela matéria orgânica não era tão forte quanto àquela que os contaminantes tinham por alguns plásticos, como o polietileno e o PVC (Teuten *et al.*, 2007). Isto fez com que pesquisas em torno da relação plástico-contaminante/aditivo fossem realizadas, uma vez que as quantidades de plástico nos oceanos não param de crescer, tornando-o o maior veículo de transporte e transferência de contaminantes nos oceanos.

1.3.1 Aditivos

Polímeros plásticos são considerados inertes e logo não causariam efeitos nocivos ao serem consumidos, caso não levassem à danos físicos como os já citados acima. Porém estes quase nunca são utilizados puros. Para alterar as suas características de origem, diferentes compostos químicos são adicionados aos polímeros para lhes dar as propriedades necessárias ao seu propósito final de uso (Deanin, 1975). Podem ser citados os corantes, estabilizadores, retardantes de chamas entre outros. Dentre estes aditivos se encontram também os plastificantes, utilizados para alterar as características de maleabilidade e suavidade dos polímeros, alterando seu ponto de fusão. Os plastificantes mais utilizados hoje são os ftalatos, produtos provenientes do ácido ftálico. O Bis (2-etilhexil) ftalato (DEHP, em inglês) (Fig. 2), é um dos membros desta família mais consumidos pelos seres humanos (Tab. 1)

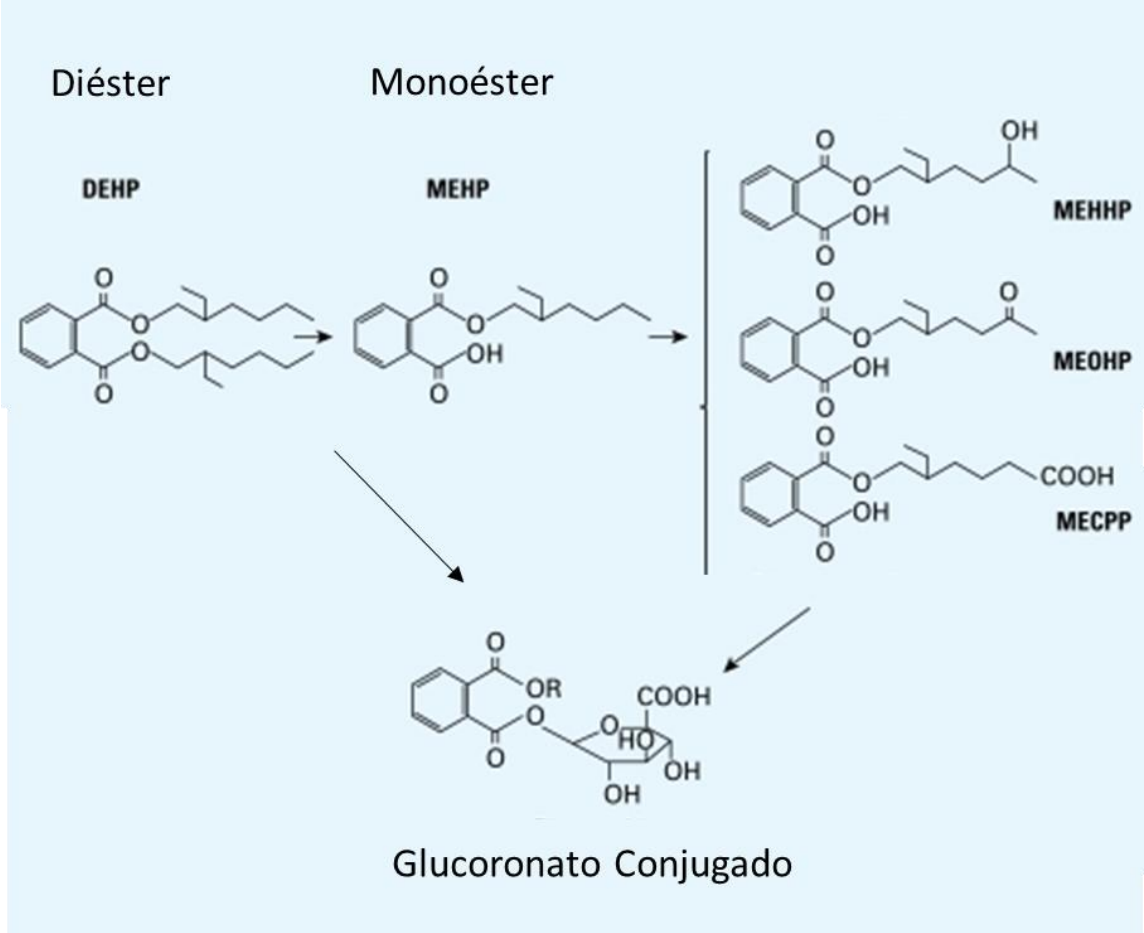


Figura 2: Metabolismo sugerido do DEHP em seres humanos (adaptado de Silva *et al.*, 2006)

Tabela 1: Estimativa do Consumo Diário de Ftalatos por adultos

Ftalato	Consumo Médio (mg/pessoa/dia)	Consumo Máximo (mg/pessoa/dia)
DPrP	0,004	0,009
DIBP	0,008	0,018
DBP	0,13	0,031
DEHP	0,15	0,30

(MAFF UK, 1996)

Suas propriedades permitem a incorporação entre os polímeros, aumentando o volume livre entre as cadeias sem que haja ligações físicas entre aditivo e o polímero. As quantidades variam de 20 a 50% da composição total do plástico (Deanin, 1975) e são encontrados em uma diversidade de produtos com propriedades maleáveis, como chupetas, mamadeiras e plástico-filme para alimentos (Meeker *et al.* 2009). Em estudos clínicos, o composto se mostrou com alto poder migratório. Ele pode ser transferido

facilmente de insumos hospitalares plásticos à corrente sanguínea de crianças tratadas por estes (Calafat *et al.*, 2004), além de modificar a estrutura dos órgãos reprodutivos em crianças do sexo masculino (Swan *et al.*, 2005). Apesar da sua importância na composição do plástico, pode ser liberado no ambiente em um processo que encurta a vida útil do polímero (Boyer, 1951) e afeta os organismos que estão em contato com os aditivos. Com o consumo generalizado e o descarte inadequado de produtos plásticos, o entendimento dos impactos causados pelos ftalatos nos organismos vivos se tornou fonte de pesquisa (Meeker *et al.* 2009). A hipótese principal é a de que possam se comportar como disruptores endócrinos, levando à problemas de desenvolvimento e reprodução nos organismos expostos (NRC 1999). Em seres humanos, essas moléculas e seus metabólitos mostraram características hepatotóxicas, teratogênicas e carcinogênicas (Matsumoto *et al.* 2008). Comprometem também processos como a reprodução, provocando danos aos espermatozóides (Rozati *et al.*, 2002). Esta substância está associada a puberdade precoce em mulheres (Wolff *et al.*, 2010), e a inibição da síntese de testosterona em cultura de células de testículo humano (Desdoits-Lethimonier *et al.*, 2012), podendo levar a infertilidade (Rozati *et al.*, 2002; Tranfo *et al.*, 2012). Outros estudos mostraram que estes compostos podem também causar alergias (Bornehag *et al.*, 2004; Jaakkola *et al.*, 2000) e defeitos no desenvolvimento neural (Engel *et al.*, 2010; Miodovnik *et al.*, 2011). Dado o risco potencial dos ftalatos para a saúde humana e do meio ambiente, a regulação destes compostos se tornou de preocupação global. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2004), os níveis de DEHP na água potável devem ser menores que 8µg/L. Estados-Unidos, Austrália, Japão e Nova Zelândia recomendam os níveis máximos de 6, 9, 100 e 10 µg/L respectivamente (Maycock *et al.*, 2008), mostrando a inconsistência das regulamentações pelo mundo. O aumento desses polímeros aditivados nos oceanos pode levar a alterações fisiológicas dos organismos ali presentes.

1.3.2 Contaminantes

Além de aditivos presentes na composição de plásticos, contaminantes podem ser adsorvidos uma vez em contato com as resinas no ambiente marinho. A primeira observação de contaminação de microplásticos nos oceanos foi feita em 1972 (Carpenter *et al.*, 1972), onde foram detectadas moléculas de bifenilos policlorados (PCB em inglês), hidrocarbonetos utilizados entre outros em capacitores e transformadores elétricos por sua característica termo resistente. As conclusões, porém, não levavam em conta que PCBs podem fazer parte do grupo de aditivos que compõem os plásticos, e após 30 anos,

Mato *et al.* (2011) observaram, que de fato, os *plastic pellets* podem adsorver os PCBs do ambiente em grandes quantidades, e que o polietileno parecia o polímero mais apto a concentrá-lo. A presença deste contaminante nos oceanos se dá ao descarte inapropriado de produtos elétricos antigos contendo PCBs no meio ambiente, como televisões e refrigeradores (Mohr e Costabeber, 2012). A partir destas observações, foi criado o *International Pellet Watch*, programa internacional que visa utilizar a análise dessa contaminação como indicador de poluição das praias. As análises do programa indicam maior contaminação por PCBs na costa oeste dos Estados Unidos, no Japão e na Europa, estando de acordo com a sua produção e utilização (Fig.3) (Teuten *et al.* 2009).

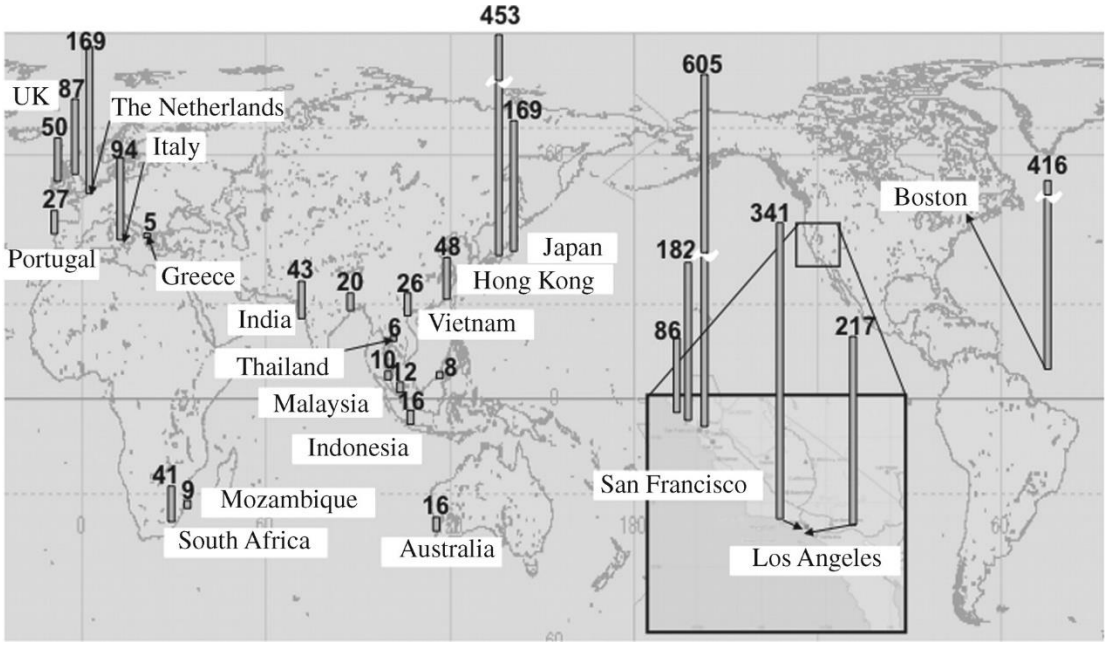


Figura 3: Concentração de PCBs (ng/g de pellet) em pellets de plástico coletados em praias. (Teuten *et al.*, 2009)

1.4 Impactos dos microplásticos em organismos marinhos

A transferência de contaminantes e sua consequente ingestão por organismos pode se dar por diferentes mecanismos como sua inalação, absorção dérmica e ingestão. Nos organismos em contato com plásticos contaminados, essas três opções são viáveis, de acordo com o ambiente e os hábitos dos mesmos, porém a maior rota de transferência de contaminantes presentes nos plásticos seria a de ingestão (Teuten *et al.* 2009). A ingestão de plástico pode ser direta, como em tartarugas, mamíferos e aves marinhas (Laist, 1997) ou indireta, onde organismos se alimentam de outros que o ingeriram (Eriksson e Burton, 2003). Essa ingestão pode causar problemas físicos como inanição, bloqueio do trato

gastrointestinal e sufocamento e em geral são causadas por macroplásticos. Outra causa menos estudada de impactos dos plásticos ingeridos por organismos aquáticos é o da transferência dos contaminantes para os tecidos. A liberação dos contaminantes parece ser mais propícia em ambientes gástricos (Sakai *et al.* 2010) e a correlação entre a quantidade de plástico ingerida e o grau de contaminação de organismos (Ryan *et al.* 1988) nos levam a crer na transferência de contaminantes aos organismos aquáticos mediada por plásticos.

Os impactos dos microplásticos em organismos marinhos começaram a ser estudados na década de 70 (Wilson, 1973). Os danos que podem causar nos organismos marinhos provêm da facilidade com que possam interagir ou serem ingeridos pelas diferentes espécies. Seletividade do material ingerido é o principal mecanismo de alimentação de um grande número de organismos marinhos e essa seletividade se estende aos microplásticos. Com isso, um número relevante de organismos foi e está sendo utilizado por laboratórios para o estudo dos impactos de microplásticos. Dentre organismos detritívoros, Thompson e colaboradores (2009b) observaram ingestão de microplásticos no anfipoda *Orchestia gammarellus* e no poliqueta *Arenicola marina*. Segundo Murray e Cowie (2011) estes poderiam ser, em princípio, consumidores primários de microplásticos. Ingestão de microplásticos foi observada também em holontúrias marinhas, como *Thyonella gemmate, Holothuria floridana, H. grisea* e *Cucumaria frondosa* (Wright *et al.*, 2013). Murray e Cowie também observaram, no ambiente e em laboratório, a ingestão de fragmentos por *Nephrops norvegicus*, crustáceo predador e bentônico. Dentre os organismos filtradores, larvas de equinodermos capturam e ingerem microplásticos graças à presença de células ciliadas em torno de suas bocas (Hart, 1991) e copépodes como *Acartia tonsa* (Wilson 1973) ingerem microplásticos durante sua alimentação, em laboratório. Os organismos filtradores bentônicos também são suscetíveis à sua ingestão. *Mytilus edulis*, o organismo mais estudado dentre os filtradores, filtra e ingere partículas plásticas de diversos tamanhos (Browne *et al.*, 2008; Ward e Kach, 2009; Ward e Targett, 1989; Ward *et al.*,2003). Organismos maiores, como aves marinhas, crustáceos e peixes podem também ingerir microplásticos (Blight and Burger, 1997; Tourinho *et al.*, 2010) como fibras, fragmentos e filmes, de maneira voluntária ou por ingestão de organismos já contaminados. Apesar de existirem inúmeras linhas de pesquisas indicando a ingestão de microplásticos por organismos marinhos em laboratório e/ou *in situ*, pouco se sabe sobre os impactos fisiológicos que eles acarretam.

2. Objetivos

O objetivo deste projeto foi avaliar os possíveis impactos fisiológicos da exposição à microesferas abrasivas de polietileno, utilizando o mexilhão *Perna perna* como modelo biológico. Foram investigados:

1- As características físicas dos microplásticos presentes em cosméticos, tendo como produto de investigação as pastas de dentes presentes no mercado brasileiro, contendo microesferas de polietileno.

2- Os efeitos da exposição ao microplástico "virgem" e "pós-lixiviado", em diferentes tempos de exposição e diversas concentrações, sobre variáveis fisiológicas do mexilhão *P. perna* tais como expressão de proteínas de estresse, possíveis danos ao DNA e membranas e viabilidade celular

3- O real risco de contaminação por microplásticos de mexilhões *P. perna* coletados em ambiente poluído, como a região do Porto de Santos.

3. Materiais e Métodos

3.1 Organismo Modelo

O bivalve *P. perna* (Linnaeus, 1758) (Mytiloida: Mytilidae) é abundante e pode ser encontrado em costões rochosos do Espírito Santo a Santa Catarina. De fácil acesso o ano todo, estes organismos toleram flutuações de temperatura e salinidade além de outras variáveis aquáticas, sendo assim de fácil manutenção em laboratório. São considerados excelentes bioindicadores por serem filtradores e sésseis, podendo viver longos períodos. Portanto são indicadores diretos da qualidade da água, e podem revelar impactos ambientais nem sempre muito evidentes (Resgalla *et al.*, 2008)

Para os experimentos, 1,000 organismos foram coletados em um cultivo comercial em uma área preservada no litoral norte de São Paulo (Ubatuba, praia da Lagoinha) e foram aclimatados por 5 dias em um tanque de 500 litros com fluxo contínuo de água do mar na base *Clarimundo de Jesus*, do Instituto Oceanográfico, USP (23°30'0"S 45°7'9"W). A água utilizada é proveniente de uma área em mar aberto da baía de Ubatuba e os níveis de nitrogênio e oxigênio, pH, salinidade e temperatura foram monitorados diariamente com a ajuda de uma sonda multiparâmetro (Horiba, série W-20). Durante todo o período de aclimatização e experimentos os mexilhões não receberam alimentação suplementar, tendo disponível apenas o particulado já presente na água do mar utilizada. Todos os organismos foram limpos de epibiontes, como cracas e algas, antes dos experimentos serem realizados.

3.2 Modelo de microplástico

O microplástico utilizado nos experimentos é de cor azulada (Fig. 4) sendo produzido por um fabricante nacional para a indústria de cosméticos, onde faz parte da composição de produtos com propriedades abrasivas, como pastas de dente e esfoliantes faciais e corporais.

A caracterização das partículas foi feita após a lavagem de 0,5g de uma pasta de dente vendida no mercado brasileiro em 10 ml de água destilada aquecida a 60º C e o homogeneizado foi filtrado com a ajuda de uma rede de 0,01 mm. O material retido passou por duas a três lavagens com água destilada para retirada do máximo de resíduos e as microesferas foram montadas com lâmina e lamínula para observação em microscópio (Nikon Eclipse E200 e câmera digital Opticon TA0124-D). As imagens

obtidas das 100 primeiras microesferas foram analisadas com o auxílio do software ImageJ (NIH), sendo medido o maior diâmetro das partículas

A compra dos microplásticos direto da indústria não nos permitiu saber com exatidão qual tipo de polietileno era utilizado. Portanto, análises de espectroscopia em infravermelho em modo de reflexão total atenuada (ATR-FTIR em inglês) foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

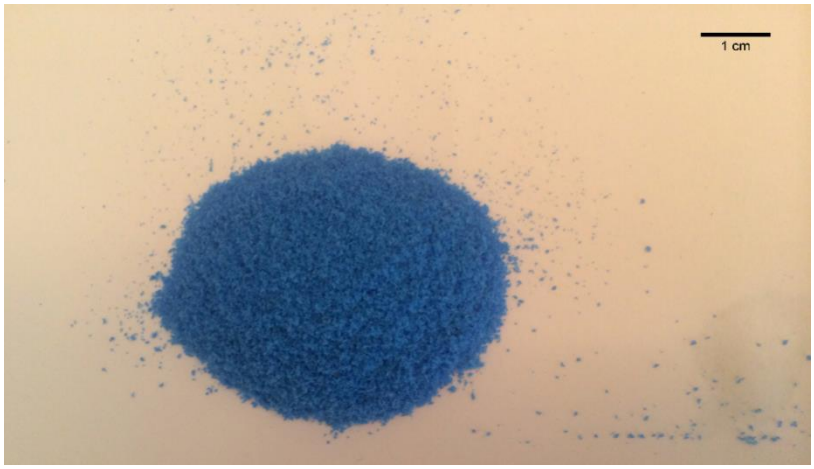


Figura 4: Microplástico abrasivo de polietileno utilizado nos experimentos.

3.3 Desenho Experimental

Para avaliar a ingestão do plástico, os mexilhões foram expostos durante 0, 12, 24, 48, 96 e 144 horas, a duas concentrações de plásticos utilizadas em estudos prévios: 2,5g/L e 0,5g/L, (Browne *et al.*, 2008, Von Moos *et al.*, 2012). Os tempos de exposição levaram em conta o tempo de resposta dos organismos ao estresse tanto em um nível molecular quanto celular. Para testar o efeito de substâncias carreadas pelos pellets, o plástico estudado nos experimentos foi lixiviado artificialmente com o intuito de eliminar eventuais resíduos de aditivos. Para este fim, foram utilizados béqueres contendo 2,5g/L de polietileno abrasivo em 1 L de água do mar que foram agitados com a ajuda de agitadores magnéticos por 10, 20 ou 30 dias a fim de ser obtida uma curva de liberação de compostos na água. As amostras foram analisadas por Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massa (Souza *et al.*, 2012) na empresa CEIMIC Análises Ambientais, para a detecção de ftalatos e outros compostos semi-voláteis.

Após passarem por secagem em estufa à 60ºC, os abrasivos lavados (pós-lixiviados) foram disponibilizados aos mexilhões paralelamente aos experimentos de ingestão do plástico virgem. Os tempos de exposição e os ensaios foram os mesmos para ambos. Os controles também foram condicionados em tanques onde não houve exposição aos microplásticos e retirados para as análises nos mesmos tempos que os grupos expostos.

Para cada tempo de exposição os organismos foram divididos em grupos de dez, distribuídos em dois aquários de 7 litros cada, denominados de "Controle" (um grupo por tempo de exposição) ou "Expostos" (expostos aos microplásticos). Este último grupo foi dividido em quatro sub-grupos: Os expostos à duas diferentes concentrações (0,5 e 2,5 g/L) de microplástico virgem e os expostos à duas diferentes concentrações (0,5 e 2,5 g/L) de microplástico pós-lixiviado. A cada tempo de exposição os organismos do grupo lixiviado foram retirados dos aquários para dissecção e análise sempre às 6 horas da manhã, os organismos expostos aos microplásticos virgens às 12 horas e os organismos controles às 18 horas, evitando assim uma possível variação cronobiológica da sua resposta. A temperatura, pH, salinidade, oxigenação e níveis de amônia dos aquários foram monitorados diariamente.

Após o tempo de exposição, os organismos foram retirados dos aquários e dissecados. Após a extração da hemolinfa (para detalhes do procedimento, ver item 3.4.4), as conchas dos organismos foram abertas com a ajuda de uma faca de dissecção e os tecidos-alvo para as análises (brânquias e glândulas digestivas) foram condicionados separadamente em tubos de silicone tipo Eppendorf, rotulados e congelados à -80ºC até as análises.

3.4 Ensaios biocelulares

3.4.1 Quantificação das proteínas totais das amostras analisadas.

BCA

As proteínas totais das amostras analisadas por ELISA para detecção de proteínas de estresse foram quantificadas pelo kit comercial BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit. Thermo Scientific) e a curva padrão foi feita com albumina (25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 µg/ml) O ensaio, conhecido por método do ácido bicinconinico (BCA 4,4'-dicarboxi-2,2'- biquinolina) (Walker, 1994), se baseia na reação de cobre (II) com proteínas, em meio alcalino, produzindo cobre (I) e formando um complexo com o BCA, que absorve fortemente na região de 560 nm (Fig. 5).

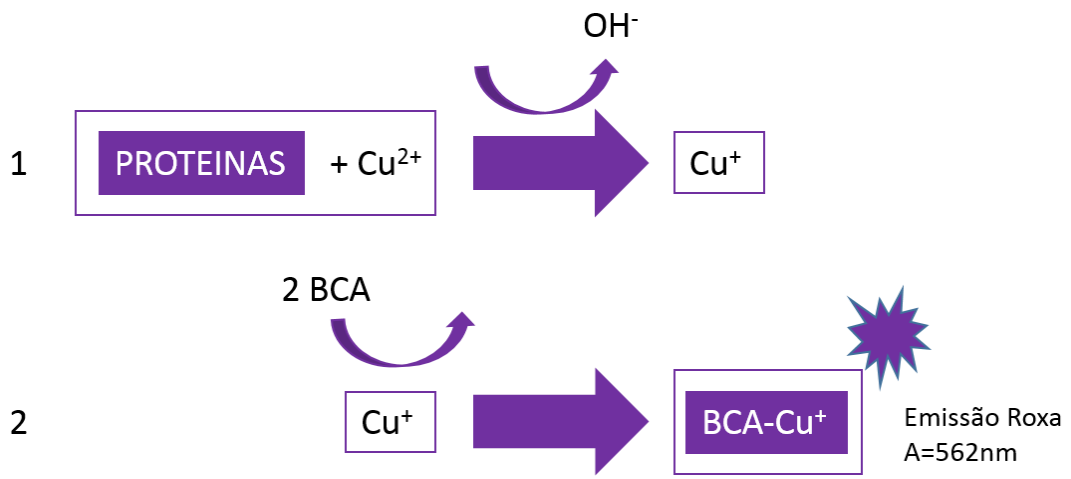


Figura 5: Princípios Químicos do teste do ácido bicinconinico (Adaptado de Walker, 1994)

Bradford

As proteínas totais para os ensaios de Lipoperoxidação e de Precipitação Alcalina do DNA foram quantificadas pelo método de Bradford (Kruger, 1994). O reagente, em sua forma catiônica emite uma cor vermelha na faixa dos 465 nm. Uma vez em contato com proteínas perde seus prótons e passa a emitir uma cor azulada, na faixa dos 595 nm (Fig 6). As amostras extraídas foram diluídas em tubos de silicones em TBS 1X (0.5M Tris Base, 9% NaCl, pH 8.4) nas concentrações de 1:2 e 1:10. 50 µl de cada diluição foi adicionada à 50 µl de reagente Bradford (Sigma) em microplacas pretas de 96 poços em duplicata. A placa então foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos no escuro e lida por espectrofotômetro (SpectraMAX 250 – Molecular Devices) a 595nm.

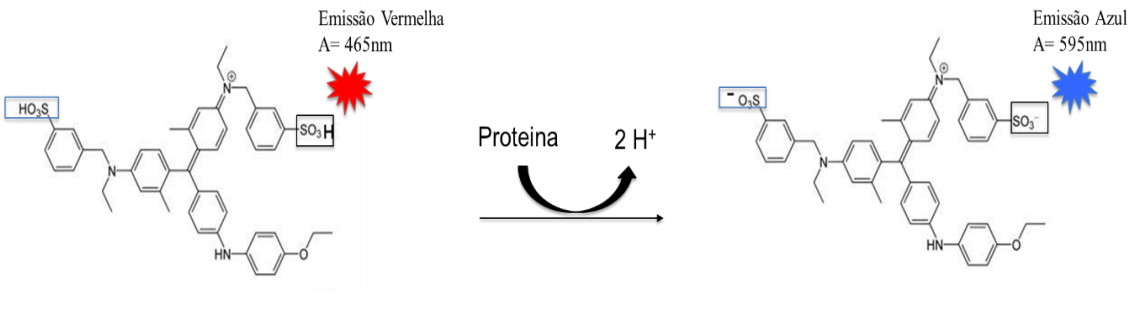


Figura 6: Princípios Químicos do teste de Bradford (Adaptado de Kruger, 1994)

3.4.2 Ensaio de Lipoperoxidação

O ensaio do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS, Wills 1987) foi usado para analisar a lipoperoxidação das membranas das células de brânquias dos organismos expostos a 24 horas ou mais aos microplásticos. Este ensaio mede a quantidade de Malonaldeído (MDA), um dos principais subprodutos da cadeia da lipoperoxidação. Após exposição, os organismos foram dissecados e as brânquias extraídas e conservadas em tubos de silicone à -80ºC. Para as análises, em torno de 0,5 cm^3 dos tecidos foram pesados e homogeneizados com quatro vezes o volume de tampão (NaCl 100 mM, HEPES-NaOH 25 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM, pH 7,5. Maranhão, 2012). Em seguida, 150 µl de homogeneizado foram adicionados à 300 µl de uma solução de Ácido Tricloroacético 10% em $FeSO_4$ 1M e 150 µl de solução de Ácido Tiobarbitúrico 0,67% em água deionizada. Após inversão manual, as amostras foram incubadas em banho-maria à 70ºC durante 10 minutos. Em seguida, 200 µl do sobrenadante foram coletados e pipetados em microplacas pretas de 96 poços em duplicatas e analisados em espectrofluorímetro (Synergy HT, BioTek) com excitação a 360nm e emissão a 450nm. A curva padrão foi realizada utilizando o Tetrametoxipropano 0,001% diluído em HCl 0,1M. As concentrações finais usadas na curva padrão foram: 0,0; 0,6; 1,5; 3,0; 4,0; 6,0; 10,0 µM. Os resultados foram expressos em µg de TBARS/µg de proteína total, ou pela razão expostos/controles.

3.4.3 Ensaio de Precipitação Alcalina

Os possíveis danos no DNA foram analisados por precipitação alcalina (Olive, 1988). Brânquias de todos os organismos controles e expostos à microplástico foram pesadas e homogeneizadas com quatro vezes o volume em tampão (NaCl 100 mM, HEPES-NaOH 25 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM, pH 7,5). Um volume de 25 µl do homogeneizado foi misturado à 200 µl de SDS 2% contendo 10 Mm EDTA, 10 mM Tris–base e 40 mM NaOH. Após inversão manual, 200 µl de KCl 0,012 M foram adicionados às amostras, que foram então incubadas à 60ºC por 10 minutos em banho-maria. Após incubação, as amostras foram novamente agitadas por inversão e incubadas a 4ºC por 30 minutos. A mistura foi então centrifugada por 5 minutos a 8.000 x g a 4ºC. As amostras foram adicionadas em duplicata em microplacas pretas de 96 poços, com 150 µl do corante Hoechst na concentração de 1 µg/ml em uma solução contendo 0,4 M NaCl, 4 mM, colato de sódio e 0,1 M Tris–acetato (pH 8,5–9,0. Gagné e Blaise, 1993). As placas foram

agitadas por 5 minutos antes de serem analisadas em um espectroflorímetro (Synergy HT, BioTek) com excitação a 360 nm e emissão a 450 nm. O padrão de DNA genômico usado neste teste consistiu em curva padrão de DNA de esperma de salmão (Sigma) diluído no tampão sem DTT, nas seguintes concentrações (µg/ml): 0,0; 0,46; 0,91; 2,27; 4,55; 9,09 e 11,36. Os resultados foram expressos em µg de DNA/µg de proteína total, ou pela razão expostos/controles.

3.4.4 Ensaio do Tempo de Retenção do Vermelho Neutro

Após cada período de exposição ao microplástico, antes das dissecções, 0,5mL de hemolinfa de todos os organismos foi coletada do músculo adutor posterior, com a ajuda de uma perfuração na concha e uma seringa de 3 ml (Fig. 7) contendo 0,5 mL de solução salina fisiológica (0,02M HEPES; 0,43M NaCl; 0,11M $MgSO_4$; 0,01M KCl; 0,01M CaCl, pH 7,36,) e recolhida em tubos Eppendorfs devidamente rotulados. Após os tubos serem homogeneizados, 40 µl desta solução foram depositados em lâminas tratadas previamente com ágar e incubados por 15 minutos em câmara escura e úmida para adesão dos hemócitos. Após a incubação, 40 µl de solução do corante Vermelho Neutro (Moore, 1990) foram adicionados sobre os hemócitos e as lâminas obtidas foram analisadas a cada 15 min em microscópio óptico. O tempo de retenção do corante pelos hemócitos é definido como o tempo em que 50% das células apresentam extravasamento do vermelho neutro no citosol e/ou deformações das membranas ou alterações em sua morfologia (Pereira *et al.* 2007). Os resultados são expressos em minutos ou pela razão expostos/controles

Figura 7: Extração da hemolinfa de mexilhões *P.perna* (Ubatuba/SP)

3.4.5 Ensaio de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Para verificar o nível de resposta sistêmica dos mexilhões aos abrasivos foram empregados três marcadores ativados por estresse e já descritos em invertebrados: AIF-1 (Allograft Inflammatory Factor-1, Li *et al.*, 2013), pp38-MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase p38, Gaitanaki *et al.*, 2004) e HSP-70 (Heat Shock Protein 70, Banni *et al.*, 2015). Por questões logísticas, o número de organismos analisados nestes testes foi reduzido à 5 por cenário de exposição.

Extração das proteínas totais.

Proteínas foram extraídas de 0,5 cm^3 das glândulas digestivas dos organismos analisados homogeneizando as amostras em 540 µl de tampão de extração contendo TBS 1X (0.5M Tris Base, 9% NaCl, pH 8.4) e EDTA 1mM e 60µl de coquetel inibidor de protease (Amresco). A mistura foi macerada manualmente com a ajuda de pistilos de plástico de ponta arredondada em tubos de 1,5 ml e centrifugada por 10 min (1200 rpm, 4°C). Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e colocado em tubos novos. A extração foi repetida com o pellet até que o sobrenadante estivesse translúcido. A quantificação das proteínas totais foi realizada pelo método do BCA, como descrito previamente.

Análise por ELISA.

Após a quantificação, 50 µg de proteína foram adicionados à microplacas de 96 poços em duplicata. Duas diluições de 1:10 e 1:2 com PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4) foram feitas nos poços seguintes e os volumes ajustados com PBS 1X para 200 µl no final das diluições. As placas com as amostras foram incubadas a 4ºC por 24 horas. Em seguida, as amostras foram descartadas e as placas lavadas com PBST (PBS 1X + Tween 0,05%) três vezes, com um minuto para cada lavagem. Os sítios de ligação inespecíficos foram bloqueados com solução composta por leite em pó desnatado (Molico) 5% em PBS por 2:30 horas. A solução de bloqueio foi então descartada e as placas lavadas novamente com PBST, por três vezes de um minuto cada a 4ºC. Os anticorpos primários específicos a cada proteína (anti-HPSP70 e anti-AIF de coelho; e anti-pP38 de cabra, todos da Santa Cruz) foram diluídos 1:500 em solução de bloqueio 1% e incubados por 2:30 horas a 30ºC. Após a incubação, as placas foram lavadas com PBST e receberam os anticorpos secundários conjugados à peroxidase (Santa Cruz), específicos para cada anticorpo primário e diluídos na solução de bloqueio 1% em concentração 1:1000 por mais 2:30 horas. Ao final, as placas foram lavadas com

PBST, sendo adicionados 100 µl do Kit de revelação TMB (KPL) por 10 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 50µl de ácido sulfúrico 2mM. A leitura foi feita por espectrofotometria em leitor de ELISA a 450 nm (SpectraMAX 250 – Molecular Devices).

3.5 Análise da ocorrência de contaminação por microplásticos *in situ*

A área escolhida para coleta dos organismos foi a da região do Porto de Santos (Fig. 8) A região da baixada santista é reconhecidamente poluída por fatores antropogênicos (David, 2007) e recebe o maior porto da América do Sul, o Porto de Santos. Não só o porto e suas embarcações, como o complexo industrial de Cubatão e o fluxo turístico em alta temporada podem levar à uma contaminação marinha importante da região.

A via marítima é o método de escolha para transporte de microplásticos. Portanto esta é a região do litoral paulista mais suscetível de ser contaminada por estes. Além deste fato, existem, às margens do canal do Porto de Santos, ocupações irregulares, ou palafitas, onde a descarga de esgoto é realizada diretamente, a poucos metros da baia. A região escolhida é então apropriada tanto para a avaliação da contaminação por microplásticos pré-consumo, como pós-consumo, dentre os quais se encontram os abrasivos presentes em cosméticos.

Em setembro de 2014, os organismos foram coletados em 6 pontos diferentes onde havia presença de bancos de *P. perna* entre o Porto de Santos e a Baia de Santos (Fig 9, Tab. 2), passando pelo terminal 35 de Libra, onde se reconhece a atividade de carga e descarga de microplásticos, as regiões de descarga de esgoto de ocupações irregulares, e piers onde existe atividades humanas. Em cada ponto, 10 organismos foram coletados e medidos (4,3 ± 0,99cm) bem como identificados para as futuras análises.

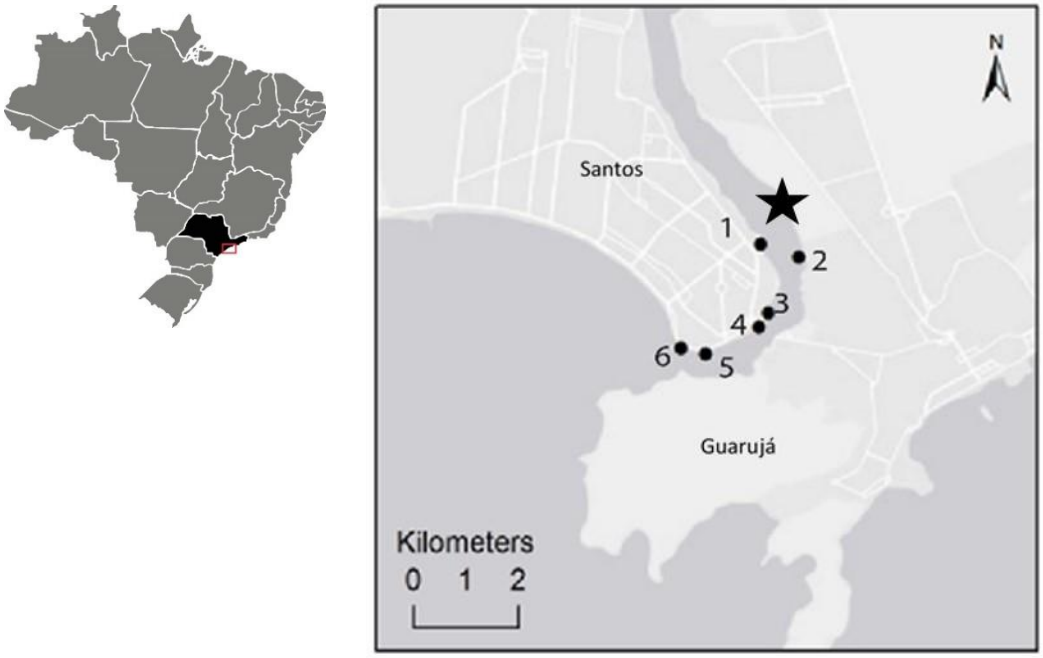


Figura 8: Pontos de Coleta na região do Porto de Santos. Detalhe: Estado de São Paulo. Números de 1 a 6 representam os pontos de coleta em bancos naturais de *P.perna*. A estrela indica a localização do Porto de Santos

Tabela 2: Latitude, longitude e descrição dos pontos de coleta da área do Porto de Santos / SP

Ponto	Localização	Descrição
#1	23˚58.446 S, 46˚17.598 W	Terminal 35/ Libra
#2	23˚58.3428 S, 46˚17.1247 W	Ocupações irregulares
#3	23˚59.675 S, 46˚17.3107 W	Entreposto de Pesca
#4	23˚59.1485 S, 46˚17.3697 W	Balsa Santos - Guarujá
#5	23˚59.3062 S, 46˚18.988 W	Píer Edgar Perdigão
#6	23˚59.2708 S 46˚18.2479 W	Píer dos Pescadores

Figura 9: A: Canal do Porto de Santos. **B:** Ponto #2, banco natural em frente a ocupações irregulares

3.5.1 Digestão ácida e identificação de microplásticos

No momento da análise, cinco organismos escolhidos aleatoriamente de cada ponto foram medidos e dissecados. Cada organismo foi dividido em dois e depositado em tubos de ensaio, onde 10 ml de ácido nítrico (HNO_3 22,5M) foram adicionados para realização da digestão ácida por 24 horas a temperatura ambiente, seguido de ebulição por 15 minutos e diluição em água destilada (adaptado de Claessens *et al.*, 2013). O material inorgânico restante foi filtrado com a ajuda de uma seringa de vidro de 50 ml e filtros Whatmann de fibra de vidro de 0,7µm. O material retido no filtro foi seco a 60ºC por 24 horas e depositado em lâminas para visualização em microscopia óptica com luz polarizada (Microscópio Leica DM750, Filtro de luz polarizada universal, Leica).

3.6 Análise de dados

Para cada biomarcador, dois testes foram realizados: ANOVA de uma via para comparação entre controles de tempos de exposição diferentes e para comparação entre grupos de um mesmo tempo de exposição. Esses dados foram transformados para arcoseno (Zar, 1999) se não seguissem as premissas do teste. Para a análise total, contendo todos os fatores, foi realizada uma ANOVA multifatorial, sendo os fatores estabelecidos *Tempo, Concentração e Tratamento* dos microplásticos, todos ortogonais. Quando os dados não seguiram as premissas do teste, passaram pela mesma transformação citada. As diferenças, quando detectadas, foram avaliadas pelo teste *post hoc* SNK. Os dados desta análise sempre foram apresentados relativizados pelos controles, para minimizar as variações naturais dos organismos.

4. Resultados

4.1 Caracterização dos microplásticos presentes em cosméticos.

Os microplásticos extraídos de pasta de dentes, após passarem por processo de lavagem e filtração foram avaliados por microscopia óptica. Sua forma se mostrou irregular, com tamanhos muito diversos. A maioria das partículas avaliadas estava na faixa de 100 a 200 µm, mas tamanhos maiores que 500 µm podem ser encontrados (chegando à 700 µm). A média das amostras analisadas foi de 300 µm (Fig. 11 A e B).

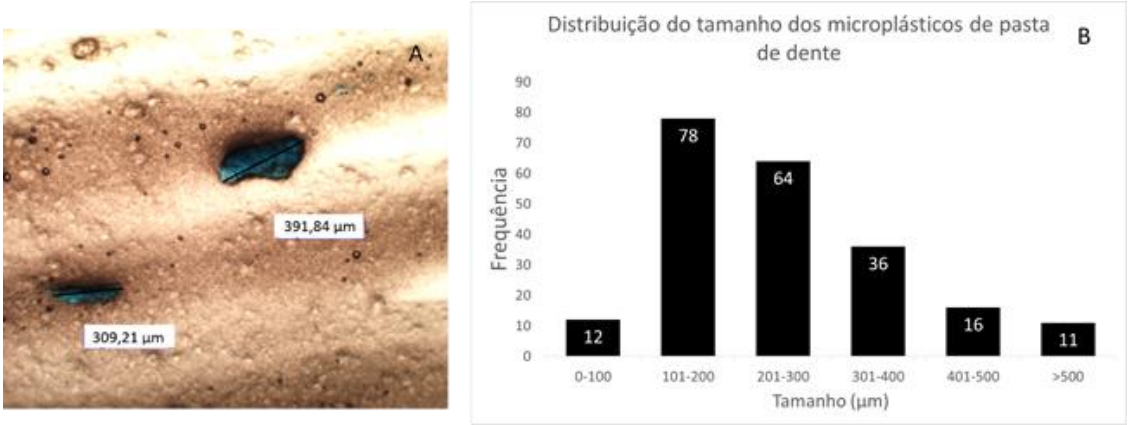


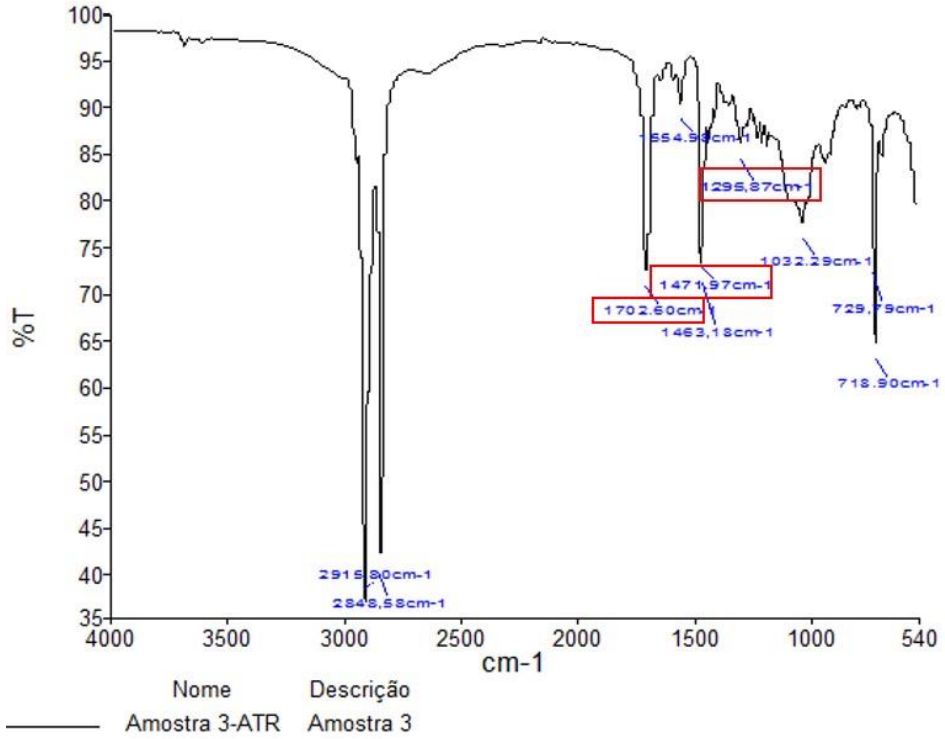
Figura 10: A: Medição dos microplásticos sob o microscópio óptico. **B**: Distribuição e frequência dos microplásticos analisados.

4.2. Caracterização dos microplásticos adquiridos da indústria.

4.2.1 Identificação

A análise por ATR-FTIR mostrou que o espectro em infravermelho do microplástico se assemelha com um de polietileno de baixa densidade (Fig. 11A. B. Uribe *et al*., 2010). As diferenças observadas podem ser causadas pelos aditivos, cuja composição é mantida em sigilo pela empresa fabricante, que foram incorporados ao polímero para lhe conferir suas características, como a cor azulada.

A



B

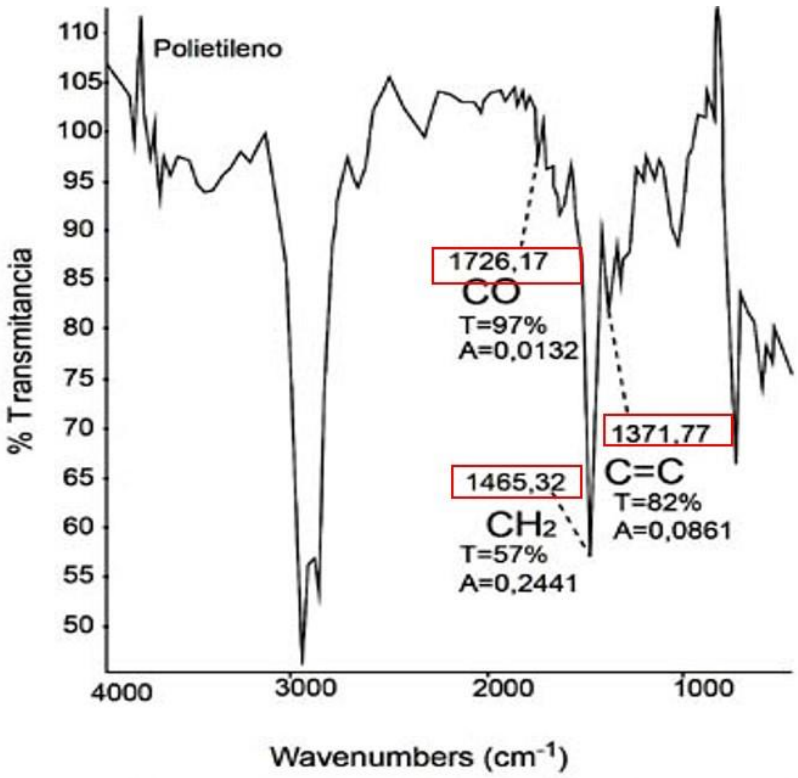


Figura 11: A: Espectro FT-IR obtido por ATR do polietileno abrasivo usado neste trabalho. **B**: Espectro obtido por Uribe *et al* (2010) de polietileno de baixa densidade. Os retângulos vermelhos representam as ligações características do polietileno de baixa densidade presentes nos dois espectros.

4.2.2 Liberação de ftalatos

O ftalato presente em maior concentração na água após a lixiviação foi o Di-n-butilftalato (Fig. 12), que apresentou maiores níveis após 10 dias de lavagem. Quantidades detectáveis de Di-etilftalato e e Di-metilftalato também foram observadas neste período. Os níveis diminuíram em 20 dias, mas o Di-n-butilftalato permaneceu detectável, mesmo após 30 dias. Baseado nesta análise, o tempo escolhido para lixiviação dos microplásticos neste trabalho foi de 20 dias, uma vez que este composto continua sendo liberado após este período, apesar da sua possível degradação na água do mar.

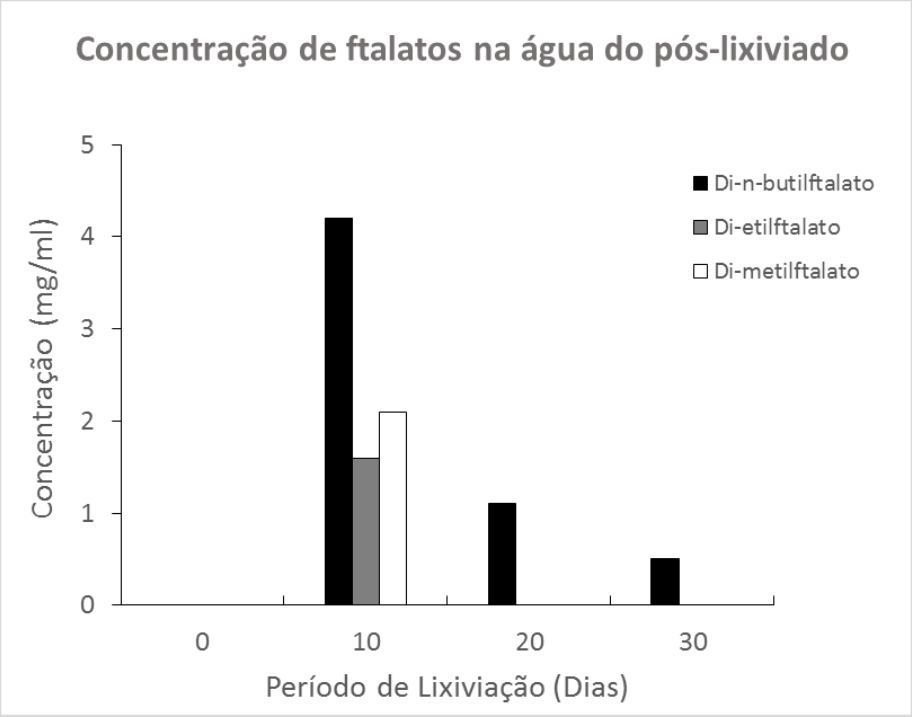


Figura 12: Quantidade de ftalatos (mg/ml) liberados na água durante o período de lixiviação dos microplásticos.

4.2.3 Morfologia dos microplásticos

Após submeter os plásticos à uma lixiviação artificial por 10, 20 ou 30 dias e comparando-os ao plástico virgem pode-se perceber modificação na morfologia das microesferas com o passar do tempo (Fig. 13). Quando as partículas virgens são observadas, em sua grande maioria (88%), apresentam forma esférica e compacta (Fig 13A, Tab.3). Após 10 e 20 dias estas esferas formam pequenas expansões (Fig.13B e C) que aumentaram de tamanho até se transformarem em fibras compridas, não tendo nenhuma semelhança com a forma original (Fig. 13D). Entre as esferas virgens

evidenciaram-se maioria de esferas compactas (χ^2=213,920, p<0,001) e este aspecto foi dando lugar às outras formas até que, após 30 dias, as quatro formas analisadas tiveram a mesma frequência nas partículas observadas (Tab.3).

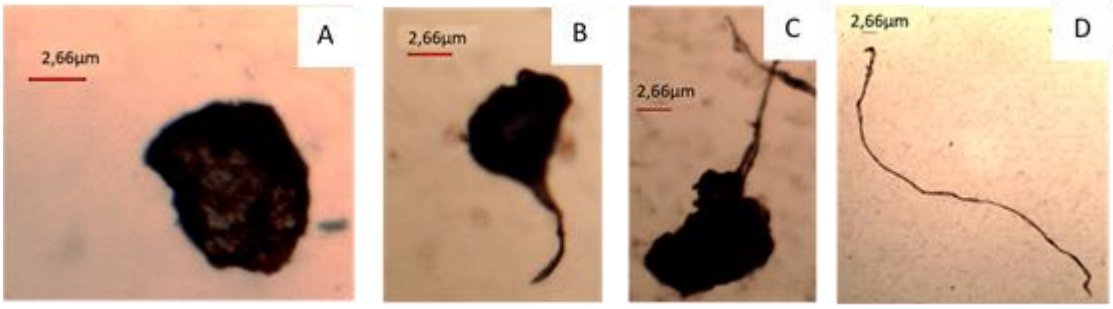


Figura 13: Diferentes formas de microesferas de polietileno encontradas entre grupos virgens e lixiviado. Os grupos **A, B, C** e **D** foram criados dependendo do tamanho e do número de expansões que as esferas apresentavam e seu tempo de lixiviação.

Tabela 3: Distribuição e frequência das esferas nos diferentes grupos formados e resultado do teste qui-quadrado para cada tempo de lixiviação.

	Grupos				Qui-Quadrado	p
	1	2	3	4		
Virgem	88	10	2	0	213.920	p<0,001
10 dias	73	23	3	1	134.720	p<0,001
20 dias	35	39	16	10	24.080	p<0,001
30 dias	25	30	22	24	1,376	p=0,711

4.3 Lipoperoxidação

Todos os grupos expostos ao microplástico apresentaram níveis de lipoperoxidação menores do que os controles. As maiores diferenças foram observadas após 96h, quando estes apresentaram de 75 a 85% menos LPO que os controles (Fig. 14). Não foram observadas diferenças significativas entre cenários para as exposições de 24 horas (A), 48 horas (B) e 96 horas (C), porém após 144 horas (D) observam-se que os organismos expostos à maior concentração de plástico (2,5 g/L) apresentaram maiores níveis de LPO. Estes, mesmo assim, foram muito menores que o controle. (Fig 14). Para analisar a influência de cada fator sobre a resposta ao microplástico, foi realizada uma ANOVA de duas vias contendo três fatores: Tempo de Exposição (24, 48, 96 e 144 horas);

Concentração de Microplástico (0,5 e 2,5 g/L) e Tratamento (virgem ou lixiviado) (Tab. 4, Fig.15).

Ao analisarmos os níveis de LPO nos organismos, agrupados entre tempo de exposição e concentração às quais eles foram submetidos, observamos que a lipoperoxidação não variou homogeneamente entre os grupos (Fig. 16). Após 24 horas, o grupo exposto a maior concentração apresentou menor nível de LPO, enquanto que após 48 horas, o grupo exposto à maior concentração apresentou maior nível de LPO. Apesar da dinâmica se repetir visualmente nos tempos seguintes (96 e 144 horas) não houve diferenças significativas, mostrando assim uma tendência a estabilização dos níveis entre concentrações. Apesar das diferenças citadas acima, se observa que, em geral houve uma tendência a diminuição nos níveis de LPO nas duas concentrações de exposição até 96 horas, que volta a crescer após 144 horas.

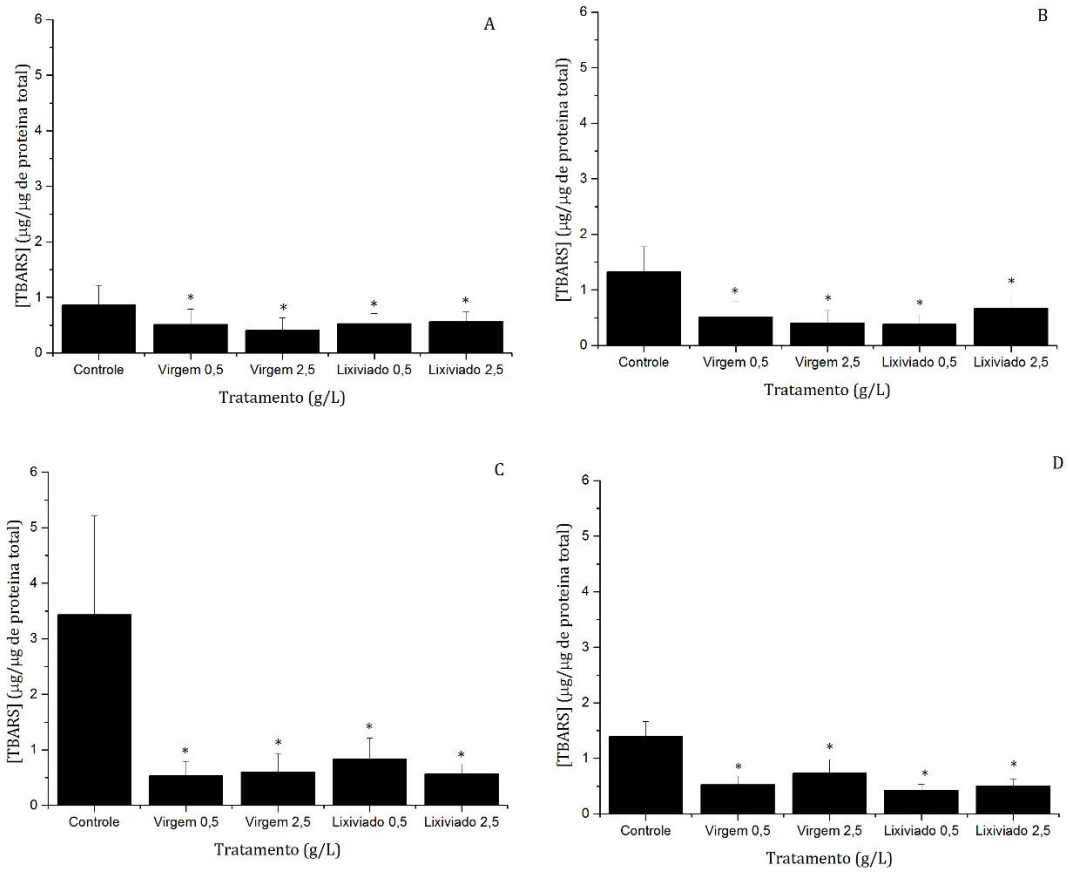


Figura 14: Lipoperoxidação dos organismos controle e expostos em cada tempo de exposição. **A**: 24 horas, **B**: 48 horas, **C**: 96 horas e **D**: 144 horas. Asteriscos indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre grupos expostos e controles.

Tabela 4: Resultado da ANOVA para o teste de Lipoperoxidação. Quando p<0,005, o fator em questão ou interação entre fatores é significativa.

	SC	Grau de liberdade	MC	F	p
Tratamente (Trat)	0,0938	1	0,0938	0,700	0,404156
Concentração (Conc)	0,4346	1	0,4346	3,243	0,073827
Tempo (Temp)	**13,5842**	**3**	**4,5281**	**33,789**	**0,000000**
Trat * Conc	0,0000	1	0,0000	0,000	0,993351
Trat * Temp	1,0673	3	0,3558	2,655	0,050814
Conc * Temp	**1,1481**	**3**	**0,3827**	**2,856**	**0,039293**
Trat*Conc*Temp	0,4885	3	0,1628	1,215	0,306490
Erro	19,2973	144	0,1340		

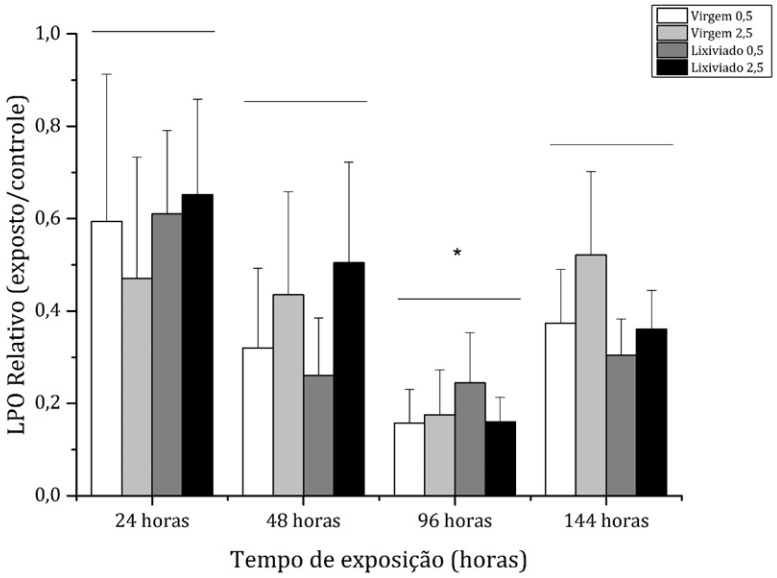


Figura 15: Níveis de LPO relativo (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição, diferentes concentrações e tratamentos. As barras horizontais indicam a igualdade entre tratamentos de um mesmo tempo de exposição. O asterisco representa que os grupos pertencentes a um tempo de exposição apresentam diferença significativa com os demais (p<0,05). O nível do controle é definido como 1,0.

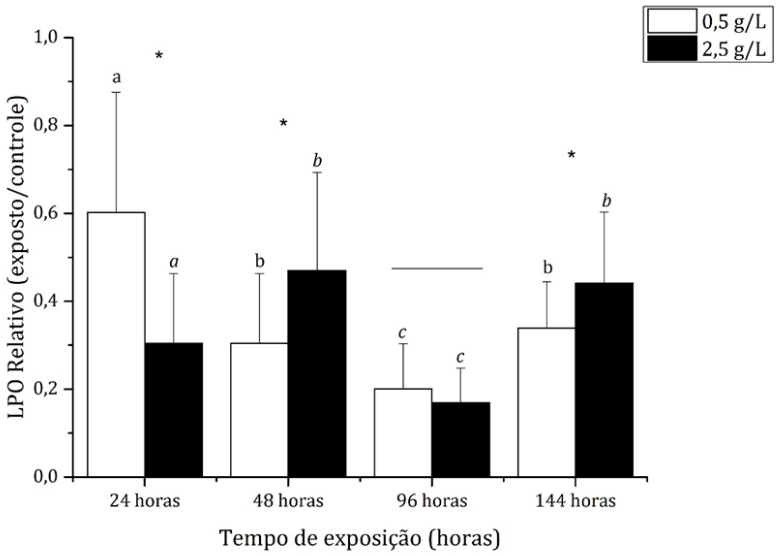


Figura 16: Níveis de LPO relativo (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição, a diferentes concentrações. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. O asterisco representa que os grupos pertencentes a um tempo de exposição apresentam diferenças significativas com o restante ($p<0,05$). As letras representam diferenças entre grupos expostos à mesma concentração, mas em tempos diferentes. O nível do controle é definido como 1,0.

4.4 Dano ao DNA

O dano ao DNA se apresenta de forma inconstante entre os tempos e grupos expostos (Fig. 17): Após 24 horas (A) de exposição, os grupos tratados apresentaram maiores níveis de dano ao DNA (entre 1,6 e 8,6 µg de DNA danificado por mg de proteína) que o controle (1,4 µg), com a concentração mais alta de exposição levando a um dano ao DNA mais consistente. Após 48 horas de exposição (B), os organismos expostos e controle não evidenciaram diferenças quanto ao dano, 2,1 e 2,9 µg, apesar de apresentarem uma tendência ao aumento de dano quando expostos. Após 96 horas (C), todos os grupos expostos apresentam menores danos ao DNA (entre 1,4 e 2,1 µg) em relação ao grupo controle (4,0 µg). Após 144 horas de exposição (D), uma mistura de cenários é observada, onde os organismos expostos à menor concentração (0,5 g/L) apresentam tendência a menor níveis de danos (1,3 e 2,0 µg) que o controle (2,3 µg) e os grupos expostos à maior concentração (2,5 g/L) apresentam níveis maiores de dano ao DNA (2,8 e 3,6 µg) que o controle.

Para analisar a influência de cada fator sobre a resposta ao microplástico, foi realizada uma ANOVA de duas vias contendo três fatores: Tempo de Exposição (24, 48, 96 e 144 horas); Concentração de microplástico (0,5 e 2,5 g/L) e Tratamento (virgem ou lixiviado) (Tab. 5, Fig.18). Ao analisarmos os níveis de dano nos organismos expostos, agrupados entre tempo de exposição e concentração, observamos que organismos expostos à maior concentração de microplástico apresentam maiores danos ao DNA, consistentes em 24 e 144 horas e tendência após 48 e 96 horas. (Fig. 19). O tratamento pelo qual o plástico foi submetido também aparece como fator determinante ao dano ao DNA após 24 e 144 horas de exposição (Fig.20). No primeiro tempo, foram os plásticos virgens que causaram maiores danos (35% a mais que o lixiviado) e no segundo tempo o oposto foi observado, sendo que o lixiviado levou a um maior dano ao DNA (25% a mais que o virgem).

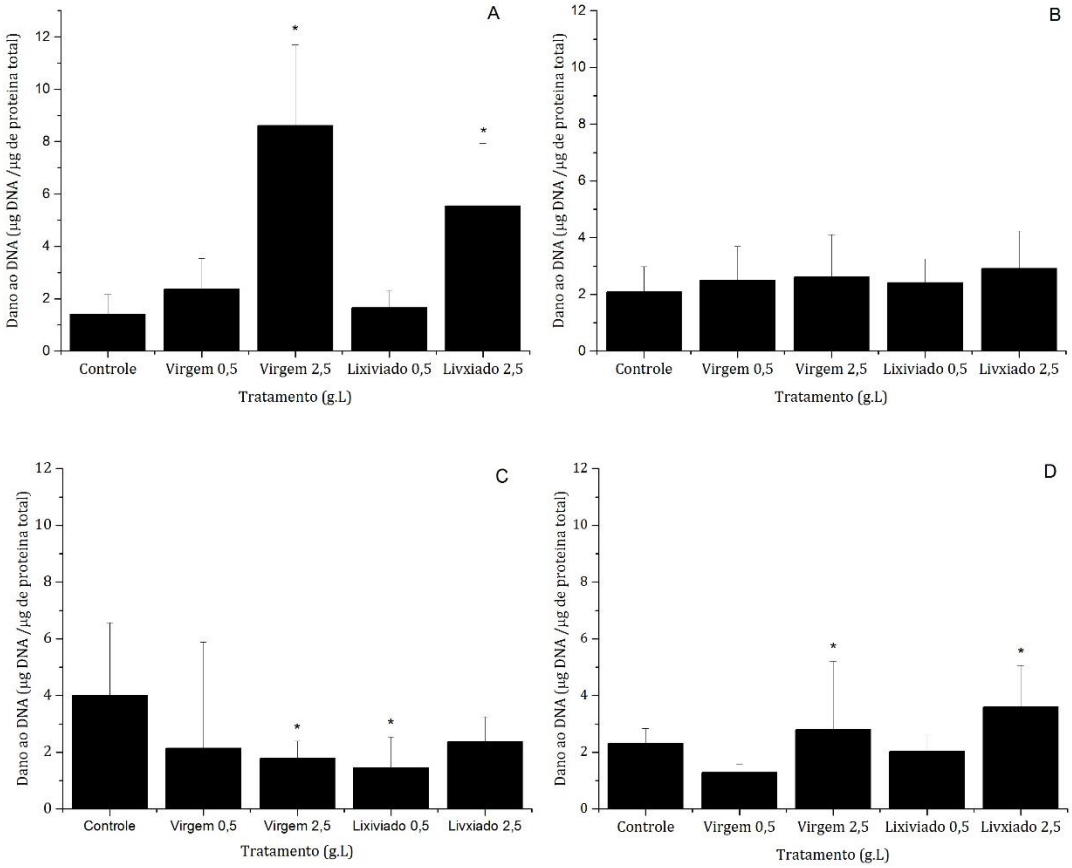


Figura 17: Dano ao DNA dos organismos controles e expostos em cada tempo de exposição. **A**: 24 horas, **B**: 48 horas, **C**: 96 horas e **D**: 144 horas. Asteriscos indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre grupos expostos e seus controles.

Tabela 5: Resultado da ANOVA para o teste de Dano ao DNA. Quando p<0,005, o fator em questão ou interação entre fatores é significativa.

	SC	Grau de liberdade	MC	F	p
Tratamento (Trat)	0,24593	1	0,24593	0,69227	0,406772
Concentração (Conc)	**17,15057**	**1**	**17,15057**	**48,27758**	**0,000000**
Tempo (Temp)	**72,59175**	**3**	**24,19725**	**68,11346**	**0,000000**
Trat * Conc	0,01070	1	0,01070	0,03011	0,862482
Trat * Temp	**3,91999**	**3**	**1,30666**	**3,67816**	**0,013659**
Conc * Temp	**5,93534**	**3**	**1,97845**	**5,56918**	**0,001211**
Trat*Conc*Temp	0,10350	3	0,03450	0,09712	0,961515
Erro	51,15588	144	0,35525		

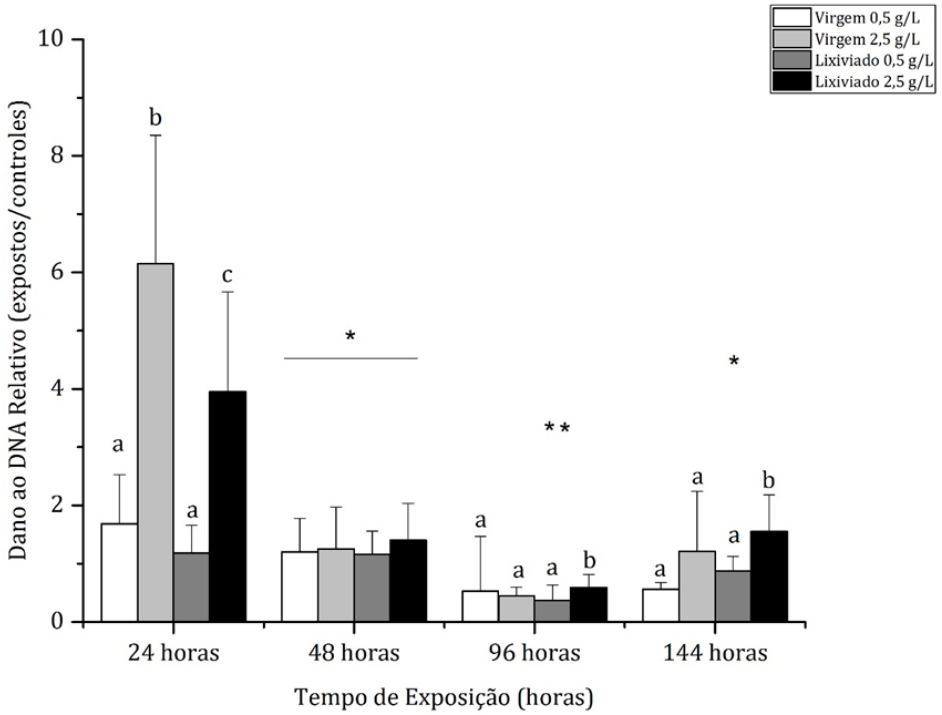


Figura 18: Níveis de dano ao DNA relativo (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição, concentrações e tratamentos. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. Os asteriscos representam os tempos de exposição que apresentam diferenças significativas (p<0,05) com os demais (p<0,05). O nível do controle é definido como 1,0.

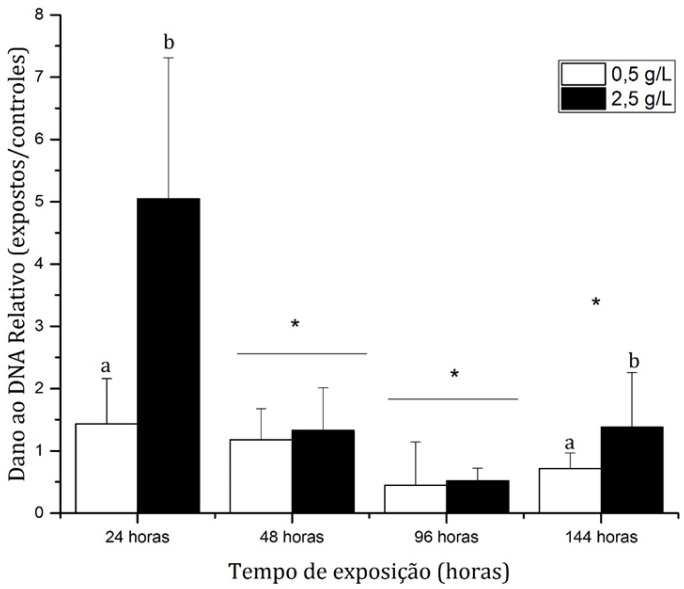


Figura 19: Níveis de dano ao DNA relativo (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição e concentrações. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. As letras representam diferenças significativas (p<0,05) entre grupos de um mesmo tempo de exposição. Os asteriscos representam os tempos de exposição que apresentam diferenças significativas (p<0,05) com os demais. O nível do controle é definido como 1,0.

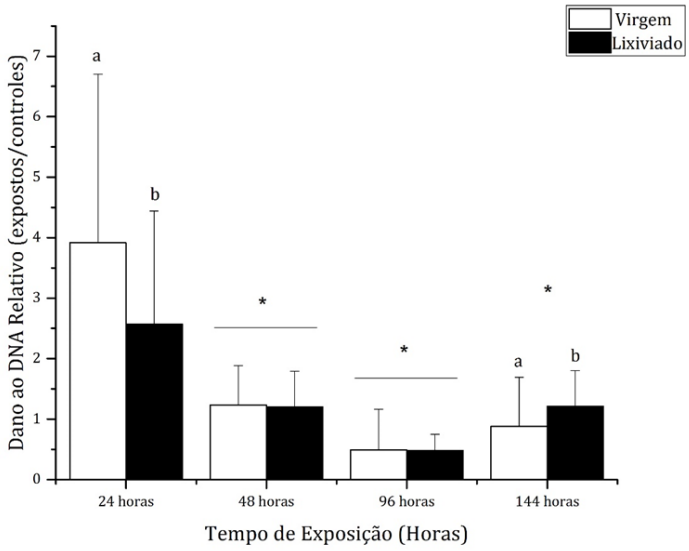


Figura 20: Níveis de dano ao DNA relativo (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição e diferentes tratamentos. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. As letras representam diferenças significativas (p<0,05) entre grupos de um mesmo tempo de exposição. Os asteriscos representam os tempos de exposição que apresentam diferença significativa (p<0,05) com os demais. O nível do controle é definido como 1,0

4.5 Tempo de Retenção do Vermelho Neutro (TRVN)

Dentre todos os tempos de exposição ao plástico observados (Fig.21 A (24h), B (48h), C (96h) e D (144h)), apenas o último tempo apresentou diferença acentuada em relação ao resultado observado para o controle. Apesar deste fato, houve nos demais tempos, uma tendência de aumento do tempo de retenção com relação ao controle, porém estes permaneceram iguais entre si.

A ANOVA multifatorial foi realizada (Tab. 6, Fig. 22). O fator concentração, quando analisado separadamente (Fig.23) mostra que o TRVN parece ser dose-dependente, com menor tempo de retenção nos lisossomos de organismos expostos à maior concentração. Boa parte deste resultado se dá a importante queda do tempo na maior concentração após 144 horas de exposição.

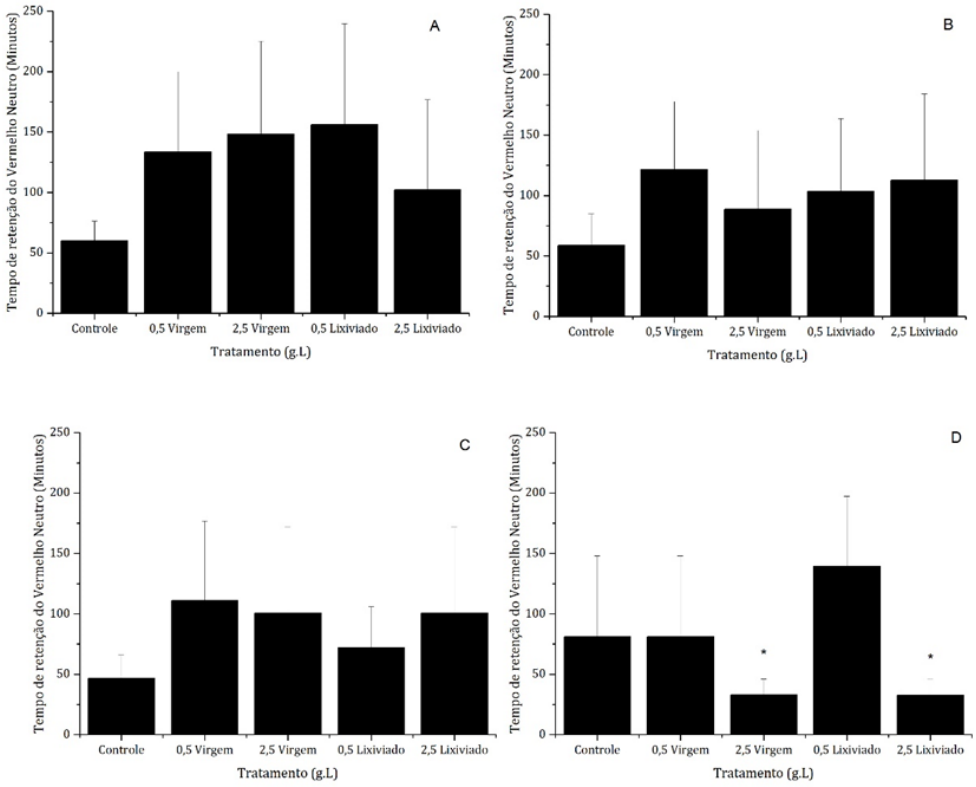


Figura 21: Tempo de retenção do Vermelho Neutro dos organismos controles e expostos em cada tempo de exposição ($p<0,05$). **A**: 24 horas, **B**: 48 horas, **C**: 96 horas e **D**: 144 horas. Asteriscos indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre grupos expostos e seus controles.

Tabela 6: Resultados da ANOVA para o ensaio de TRVN. Quando p<0,005, o fator em questão ou interação entre fatores é significativa.

	SS	Grau de liberdade	MS	F	p
Tratamento (Trat)	0,04873	1	0,048726	0,10602	0,745190
Concentração (Conc)	**6,69329**	**1**	**6,693285**	**14,56416**	**0,000201**
Temperatura (Temp)	**27,33883**	**3**	**9,112944**	**19,82918**	**0,000000**
Trat * Conc	0,06956	1	0,069556	0,15135	0,697823
Trat * Temp	1,94202	3	0,647339	1,40857	0,242745
Conc * Temp	**5,91195**	**3**	**1,970649**	**4,28801**	**0,006235**
Trat*Conc*Temp	**3,69030**	**3**	**1,230100**	**2,67662**	**0,049417**
Erro	66,17842	144	0,459572		

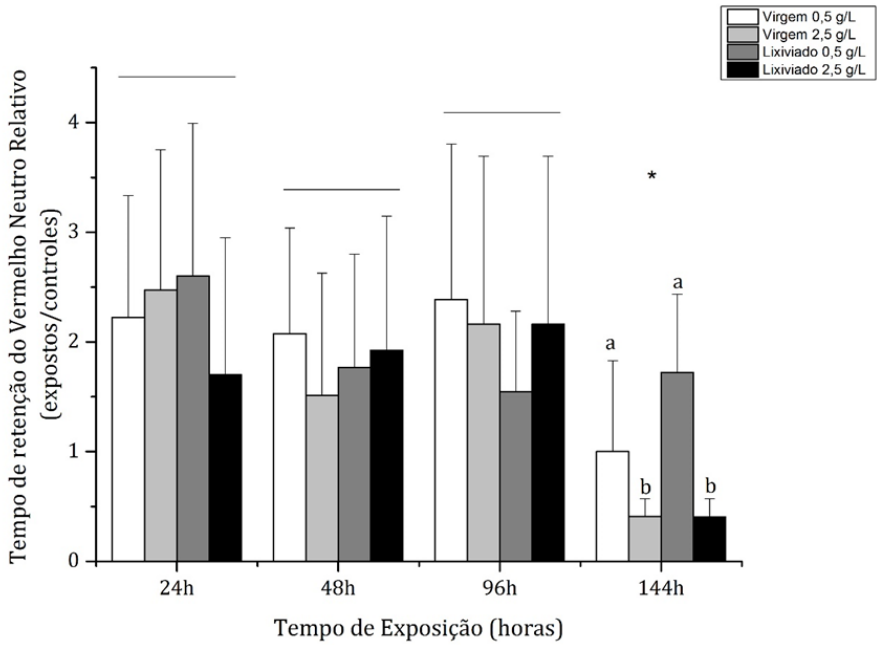


Figura 22: Tempo de retenção do Vermelho Neutro Relativo (expostos/controles) em organismos expostos ao microplásticos em diferentes tempos de exposição, diferentes concentrações e tratamentos. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. Os asteriscos representam os tempos de exposição que apresentam diferença significativa (p<0,05) com os demais. As letras representam diferenças significativas (p<0,05) dentro de um tempo de exposição. O nível do controle é definido como 1,0

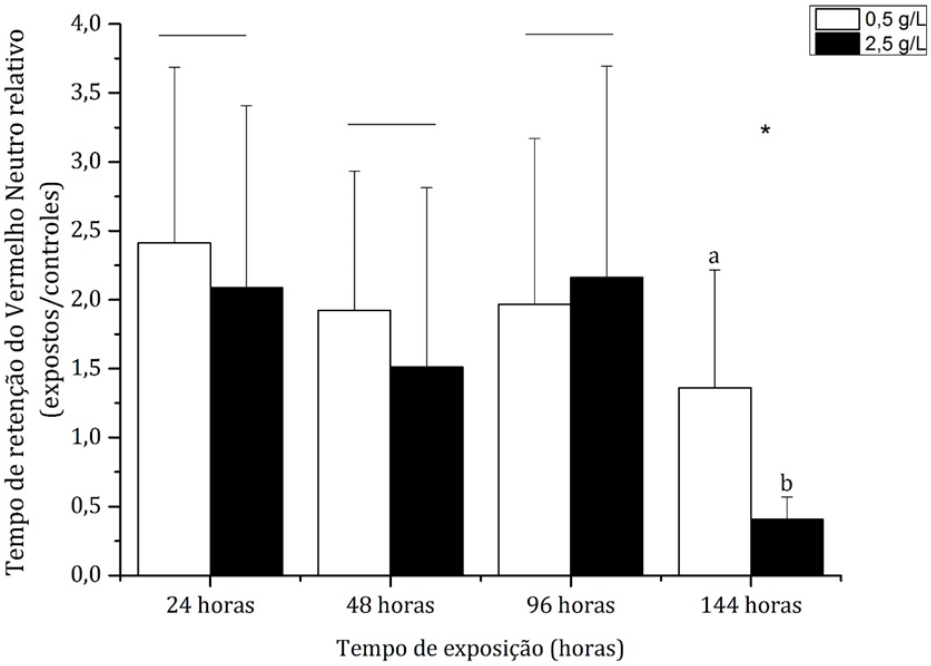


Figura 23: Tempo de retenção do Vermelho Neutro relativo (expostos/controles) em organismos expostos ao microplásticos em diferentes tempos de exposição e concentrações. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. As letras representam diferenças ($p<0,05$) entre grupos de um mesmo tempo de exposição. Os asteriscos representam os tempos de exposição que apresentam diferença ($p<0,05$) significativa com os demais. O nível do controle é definido como 1,0.

4.6 Proteínas de Estresse

4.6.1 Allograft Inflammatory Factor 1 (AIF-1)

Assim como os demais biomarcadores analisados os resultados obtidos para AIF-1 variam de acordo com o grupo e o tratamento aplicado. Ao analisarmos todos os fatores (Tab. 7 e Fig. 24) observamos que nas primeiras 12 horas, os organismos expostos à menor concentração de plástico responderam com um aumento da expressão de AIF-1 em relação ao controle (de 10 a 70%). O oposto é observado após 24 horas, onde a exposição à maior concentração levou a um aumento de AIF-1 consistente. O maior nível é observado no grupo exposto ao plástico virgem a 2,5 g/L, com aumento entre 150 e 300% em relação ao controle, sendo 20% a menos e 80% a mais nos expostos à 0,5 g/L. Após 48 horas de exposição os níveis de AIF-1 caem bruscamente, entre 60 a 90% em relação ao controle, voltando a apresentar variações similares aos de 24 horas após 144 horas. A resposta após 144 horas, porém, é menor, com aumento entre 20 e 110 % para

os organismos expostos à 2,5 g/L e entre 20 e 30% a menos que os controles para os organismos expostos 0,5 g/L

Dentre os fatores que influenciaram mais fortemente estes resultados está primeiramente o tempo. As variações da expressão a partir de 24 horas são consistentes, após 24 e 144 horas ocorre um aumento, e após 48 horas uma intensa redução (Fig. 25). A interação tempo/concentração (Fig. 26) nos mostra que dentro das variações temporais observadas anteriormente, nos tempos 12 e 48 horas os organismos expostos à menor concentração apresentam maiores níveis de AIF. Estes foram 40% a mais e 60% a menos que os controles para os organismos expostos por 12 horas e 60% a 80% menores que os controles para os organismos expostos por 48 horas. O contrário é observado em 24 e 144 horas, onde organismos em contato com maior concentração apresentam maiores níveis de AIF-1. Em organismos expostos por 24 horas estes níveis foram de 30% e 210% maiores que o controle, enquanto que nos expostos por 144 horas foram 30% menores e 50% maiores. A interação Concentração e Tratamento (Fig. 27), mostra que os organismos expostos a 0,5 g/L de plástico lixiviado em geral responderam com maior intensidade que os expostos a 0,5 g/L de material virgem. No caso da maior concentração, foi a exposição aos plásticos virgens que levou à uma maior expressão de AIF-1.

Tabela 7: Resultado da ANOVA para o teste de quantificação de AIF-1 por ELISA. Quando p<0,005, o fator em questão ou interação entre fatores é significativa.

	SC	Grau de liberdade	MC	F	p
Tratamento (Trat)	0,002507	1	0,002507	0,1610	0,689618
Concentração (Conc)	0,032830	1	0,032830	2,1074	0,151476
Tempo (Temp)	**1,351666**	**3**	**0,450555**	**28,9214**	**0,000000**
Trat*Conc	**0,143854**	**1**	**0,143854**	**9,2341**	**0,003437**
Trat*Temp	0,060368	3	0,020123	1,2917	0,284896
Conc*Temp	**0,726762**	**3**	**0,242254**	**15,5504**	**0,000000**
Trat*Conc*Temp	0,114400	3	0,038133	2,4478	0,071730
Erro	0,997033	64	0,015579		

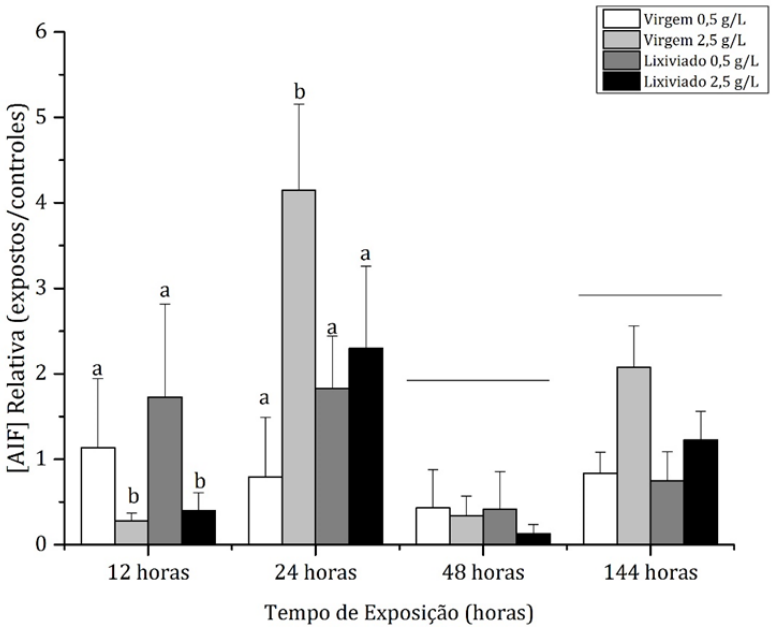


Figura 24: Concentração relativa de AIF-1 (expostos/controles) em organismos expostos ao microplásticos em diferentes tempos de exposição, concentrações e tratamentos. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. Os asteriscos representam os tempos de exposição que apresentam diferenças significativas com os demais. As letras representam diferenças dentro de um tempo de exposição. A seta preta representa o nível dos controles.

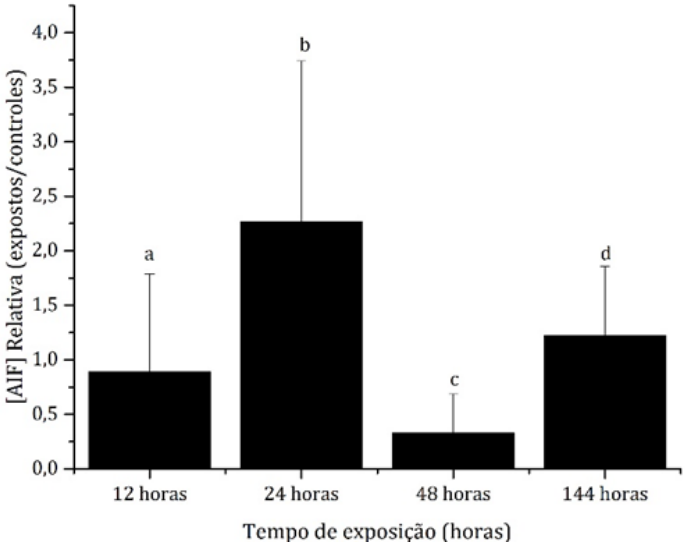


Figura 25: Concentração relativa de AIF-1 (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição. As letras representam diferenças ($p<0,05$) entre grupos. O nível do controle é definido como 1,0.

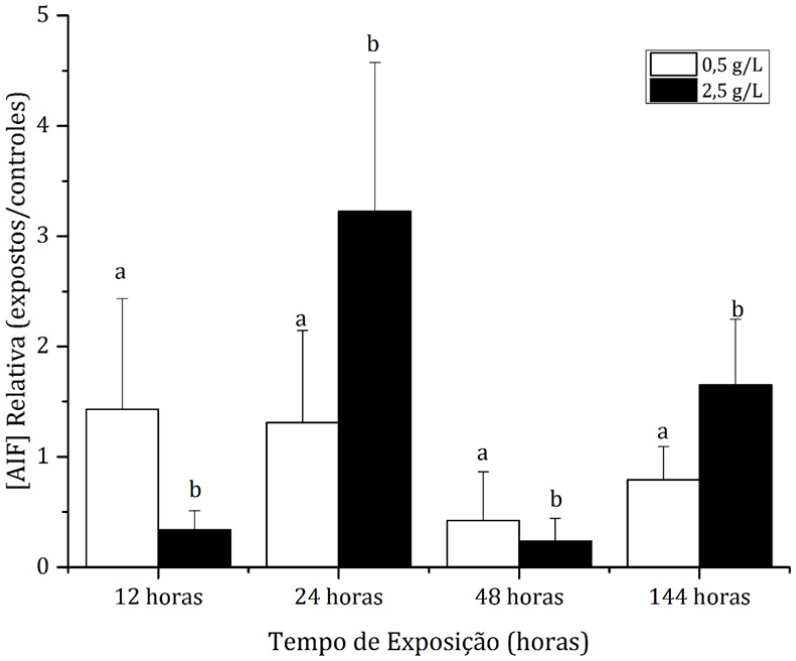


Figura 26: Concentração relativa de AIF-1 (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição e concentrações. As letras representam diferenças ($p<0,05$) entre grupos de um mesmo tempo de exposição. O nível do controle é definido como 1,0.

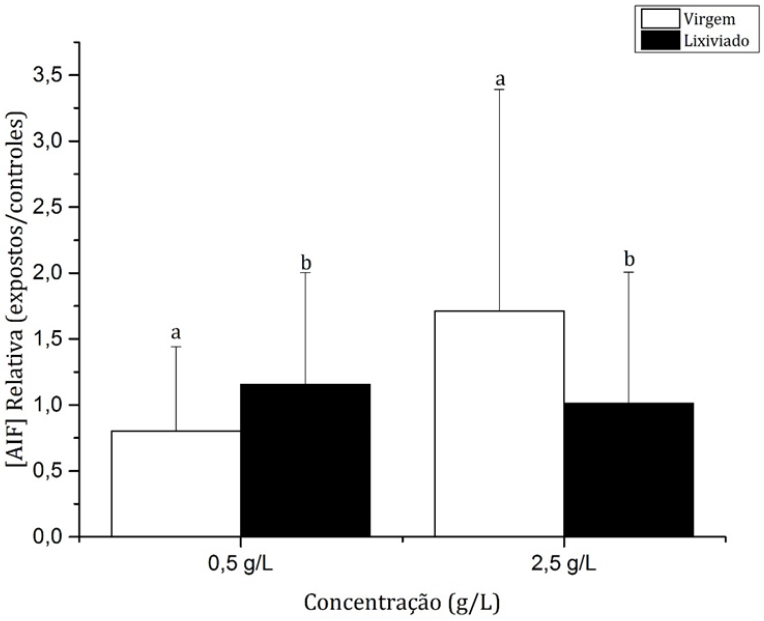


Figura 27: Concentração relativa de AIF-1 (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico a diferentes concentrações e tratamentos. As letras representam diferenças ($p<0,05$) entre grupos de um mesmo tempo de exposição. O nível do controle é definido como 1,0.

4.6.2 Heat Shock Protein 70 (HSP70)

A expressão de HSP70 ao longo do tempo mostrou-se variável, e diversos fatores mostraram-se responsáveis (Tab.8). Existe uma tendência significativa ao aumento de expressão ao longo do tempo de exposição dos organismos ao microplástico (Fig. 28), apresentando então uma resposta tempo-dependente. Uma maior expressão de HSP70 é observada após 48 horas nos organismos expostos à 0,5 e 2,5 g/L de plástico lixiviado (Fig. 28), sendo esta também uma resposta tratamento-dependente. Além do tempo e do tratamento do plástico, a concentração também exerce efeitos. Após 48 horas, na menor concentração há um aumento da expressão de HSP70. O inverso é observado após 144 horas, onde organismos expostos à 2,5 g/L de polietileno apresentaram maiores níveis de HSP70 (Fig. 29).

Tabela 8: Resultado da ANOVA para o teste de quantificação de HSP70 por ELISA. Quando p<0,005, o fator em questão ou interação entre fatores é significativa.

	SC	Grau de liberdade	MC	F	p
Trat	0,009234	1	0,009234	0,7768	0,381427
Conc	0,023661	1	0,023661	1,9903	0,163153
Temp	**0,555864**	**3**	**0,185288**	**15,5861**	**0,000000**
Trat*Conc	0,000147	1	0,000147	0,0123	0,911931
Trat*Temp	**0,194189**	**3**	**0,064730**	**5,4449**	**0,002132**
Conc*Temp	**0,356466**	**3**	**0,118822**	**9,9951**	**0,000017**
Trat*Conc*Temp	0,035239	3	0,011746	0,9881	0,404111
Erro	0,760833	64	0,011888		

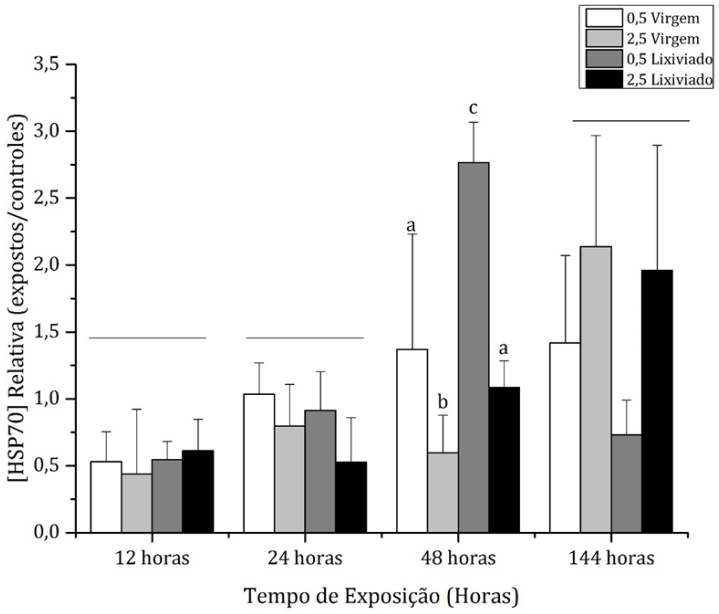


Figura 28: Concentração Relativa de HSP70 (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição, concentrações e tratamentos. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. Os asteriscos representam os tempos de exposição que apresentam diferença significativa ($p<0,05$) com o restante. As letras representam diferenças significativas ($p<0,05$) dentro de um tempo de exposição. O nível do controle é definido como 1,0.

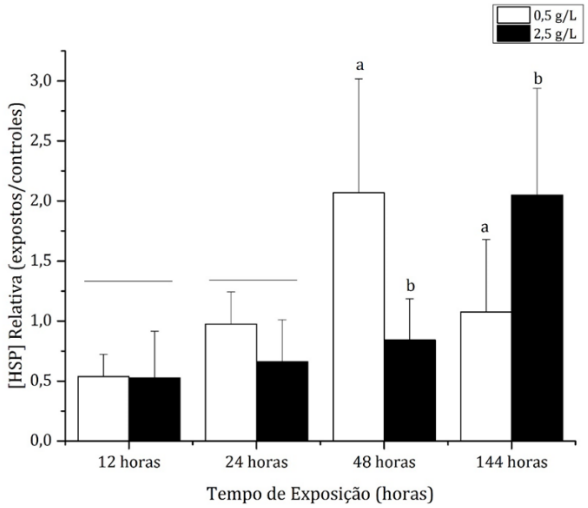


Figura 29: Concentração Relativa de HSP70 (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição a diferentes concentrações. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. As letras representam diferenças significativas ($p<0,05$) dentro de um tempo de exposição. O nível do controle é definido como 1,0.

4.6.3 Phosphorylated P38 Mitogen Activated Protein Kinase (pP38-MAPK)

Assim como as demais proteínas de estresse analisadas, os níveis de pP38 e os fatores responsáveis variam muito entre os grupos observados (Tab. 9). Os níveis de pP38 quando analisados por tempo de exposição imposto aos plásticos (Fig. 30) mostram-se elevados em 12h de exposição, entre 30% a mais e a menos que o controle. Esses valores decrescem com o passar do tempo, chegando aos menores níveis após 48 horas, mas voltam a subir em 144 horas. Sendo que há um aumento significativo de pP38 entre os organismos expostos a 144 horas à 2,5 g/L de microplásticos virgens. Dentre os fatores que podem explicar esses níveis estão o tempo (Fig. 31), cuja exposição a 12 horas gira em torno do controle, porém diminui para metade ou menos da metade entre 24 horas e 48 horas, para mais tarde subir para os níveis de controle após 144h. O fator concentração estabelece que maiores níveis de pP38 foram observados em organismos expostos à 2,5 g/L de plástico mostrando um efeito dose-dependente (Fig. 32). Em geral, há uma diminuição nos níveis de pP38 até 48h (bem abaixo dos controles), que voltam a subir após 144h.

.

Tabela 9: Resultado da ANOVA para o teste de quantificação de pP38 por ELISA. Quando p<0,005, o fator em questão ou interação entre fatores é significativa.

	SC	Grau de liberdade	MC	F	p
Tratamento (Trat)	0,70129	1	0,70129	2,2177	0,141344
Concentração (Conc)	**3,50807**	**1**	**3,50807**	**11,0939**	**0,001441**
Tempo (Temp)	**11,93705**	**3**	**3,97902**	**12,5832**	**0,000001**
Trat*Conc	**1,34526**	**1**	**1,34526**	**4,2542**	**0,043216**
Trat*Temp	2,38165	3	0,79388	2,5106	0,066517
Conc*Temp	1,88709	3	0,62903	1,9892	0,124449
Trat*Conc*Temp	**3,97587**	**3**	**1,32529**	**4,1911**	**0,009023**
Erro	20,23784	64	0,31622		

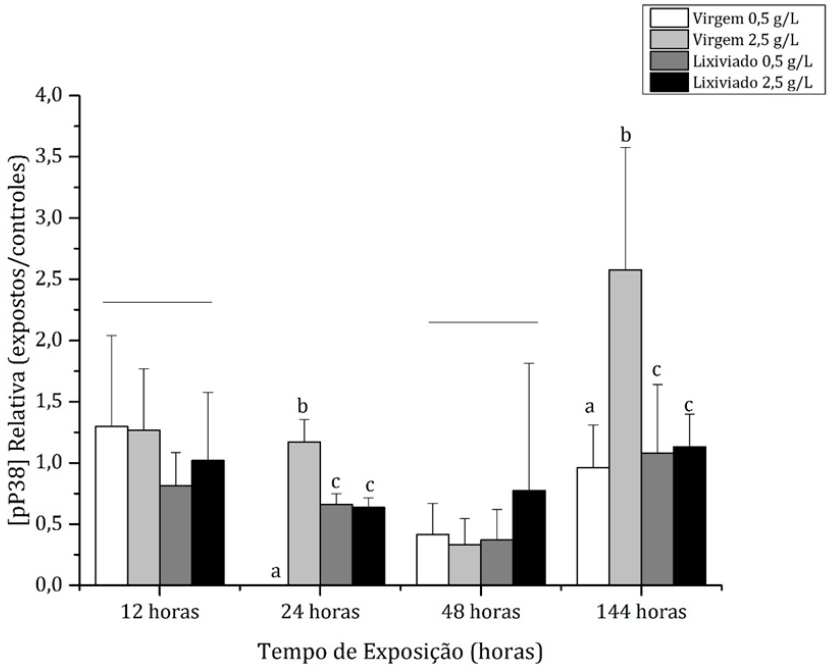


Figura 30: Concentração Relativa de pP38-MAPK (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição, diferentes concentrações e tratamentos. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. As letras representam diferenças significativas ($p<0,05$) dentro de um tempo de exposição. O nível do controle é definido como 1,0.

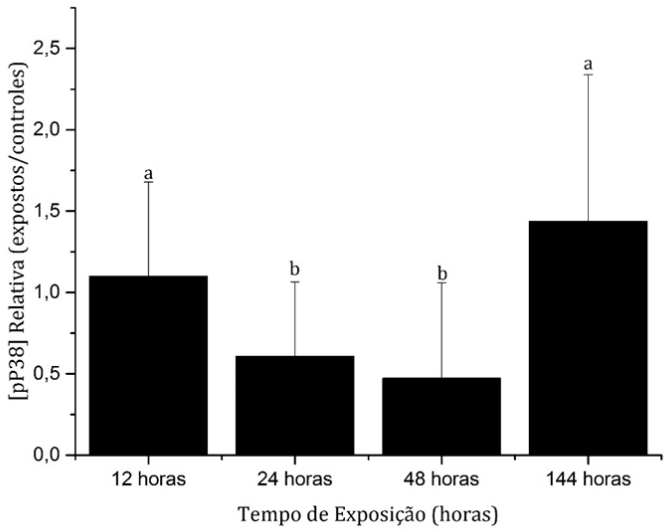


Figura 31: Concentração Relativa de pP38-MAPK (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição. As letras representam diferenças significativas ($p<0,05$) entre os grupos. O nível do controle é definido como 1,0.

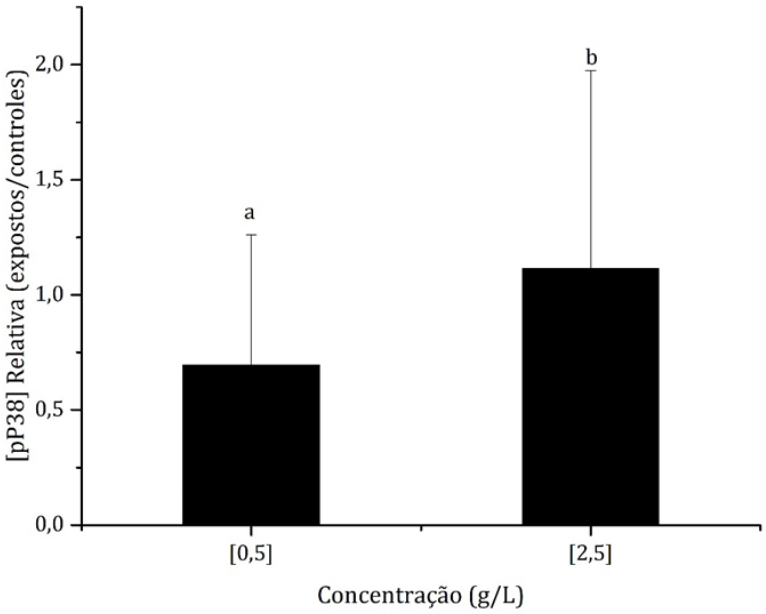


Figura 32: Concentração Relativa de pP38-MAPK (expostos/controles) em organismos expostos ao microplásticos em diferentes concentrações. As letras representam diferenças significativas ($p<0,05$) entre os grupos. O nível do controle é definido como 1,0.

4.7 Presença de microplásticos nos organismos em campo.

Após a digestão ácida dos organismos coletados, foi observado que em todos os pontos de coleta, havia contaminação por microplástico (Fig. 33), variando de 20 a 100% (Tab. 10). A maior contaminação estava presente em pontos dentro do Canal do Porto de Santos, enquanto que os mais limpos, no final do canal, mais próximo da Baía de Santos.

Tabela 10: Latitude, longitude e descrição dos pontos de coleta da área do Porto de Santos / SP

Ponto	**Descrição**	**Nível de Contaminação (% de organismos coletados)**
#1	Terminal 35/ Libra	100%
#2	Ocupações irregulares	80%
#3	Entreposto de Pesca	100%
#4	Balsa Santos - Guarujá	60%
#5	Píer Edgar Perdigão	83%
#6	Píer dos Pescadores	20%

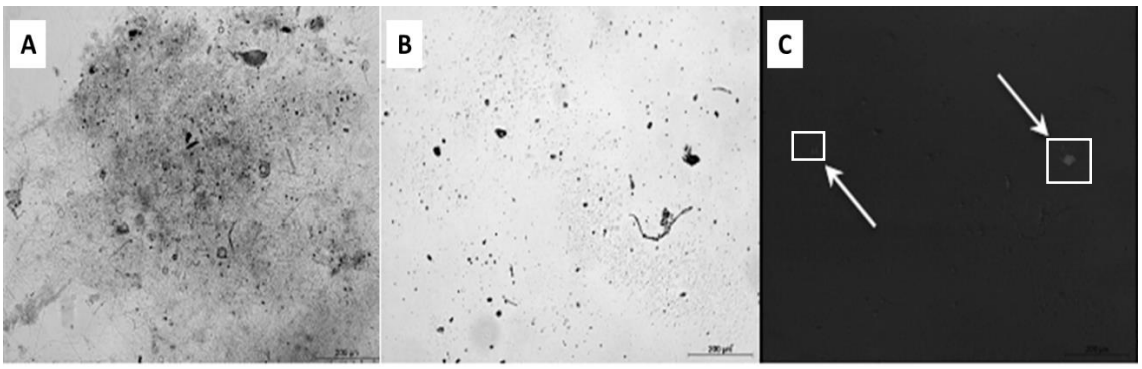


Figura 33: Fotomicrografias do processamento da glândula digestiva. **A:** Material antes da digestão ácida. **B:** Material residual após o tratamento com ácido. **C:** Mesma imagem de **B** sob a luz polarizada, evidenciando as partículas plásticas (setas).

5. Discussão

5.1. Caracterização dos microplásticos presentes em cosmético

O objetivo desta caracterização foi obter informações sobre como são os microplásticos que estão presentes em cosméticos brasileiros. Esta análise contempla somente uma marca de pastas de dente, mas permite observar que esses elementos não se parecem com aqueles que são apresentados em trabalhos internacionais. Os microplásticos observados têm tamanho médio de 300 µm variando de 60 a 700 µm e são irregulares, ao contrário das formas esféricas de outros países (Fendall e Sewell, 2009). Uma observação adicional foi que as partículas sofreram alterações por processos físicos (*viz*. agitação), tendendo a se tornar filamentosas. As partículas podem adentrar o meio ambiente por não serem retidas nos tratamentos de esgoto doméstico e este processo pode alterar seu destino no ambiente. Além do tamanho, o formato dos microplásticos pode também ser importante na captura da suspensão, estando disponíveis para organismos como mexilhões e outros filtradores, cujas capacidades de retenção são variadas (Riisgard e Larsen, 2010). A disponibilidade de microplásticos presentes em pastas de dentes brasileiras os tornam uma fonte de poluição importante e que demanda atenção, uma vez que a costa brasileira apresenta inúmeros organismos filtradores suscetíveis de ingerirem essas partículas

5.2. Caracterização dos microplásticos adquiridos da indústria.

A degradação dos plásticos nos ambientes costeiros se tornou foco de estudos quase que simultaneamente à descoberta dos impactos que causavam às espécies locais. Alarmados com os danos que plásticos poderiam causar à fauna marinha, se multiplicaram estudos sobre a degradação e deterioração dos fragmentos que poderiam ser encontrados nos oceanos, assim como sua abundância, tipos e frequência (Fok *et al.* 2015, Eriksen *et al.*, 2014, Cózar *et al.*, 2014). Para avaliar os impactos que esse tipo de poluição exerce sobre organismos filtradores, o modelo de microplástico utilizado nos experimentos foi adquirido da indústria, sem informações precisas sobre suas características, além de ser composto por polietileno. Foi então necessário que fossem obtidos mais detalhes sobre o tipo de plástico, possível presença de ftalatos e alterações de sua morfologia. A identificação do tipo de polímero nos permitiu verificar que eram partículas de polietileno de baixa densidade. (LDPE, em inglês). Este possui características diferentes dos dois outros tipos de polietileno fabricado: o de alta densidade (HDPE, em inglês) e a mistura dos dois o polietileno de baixa densidade linear

(LLDPE) (PlasticsEurope, 2015). Essa informação permite que dados aqui citados possam ser comparados com outros trabalhos que utilizaram este material.

Os aditivos presentes nos microplásticos também não foram informados. Dentre os mais nocivos ao ambiente estão os ftalatos, utilizados para tornar o plástico mais maleável (Thompson *et al.*, 2009). Ao lavar os microplásticos por 10, 20 e 30 dias, foi observada a liberação destes componentes na água. Apesar de não serem tão comuns em polietileno como são nos polímeros de PVC, esses dados mostram que eles existem e que são liberados na água do mar. Esse resultado permitiu que um período de lixiviação de 20 dias fosse estabelecido para os microplásticos utilizados nos experimentos.

Uma terceira característica avaliada no modelo de microplástico utilizado foi a deformação após esses períodos de lixiviação. Existem mecanismos físico-químicos capazes de degradar partículas plásticas, como por exemplo a radiação UV, pela exposição à luz solar, levando a uma fotodegradação; a umidade, que acelera as taxas de degradação por aumentar a oxigenação da matriz do plástico bem como o aumento da temperatura. Além disso, esse processo pode ser acelerado pela colonização e a ação de micro-organismos presentes na água (Andrady, 1990).

Em ambientes costeiros, quando no mar, os plásticos podem passar por degradação mecânica, com a colisão entre partículas associada ao arrasto e rolamento (Cooper e Corcoran, 2010). Esses processos produzem traços observáveis característicos na superfície das partículas, como por exemplo sulcos, fissuras, bitolas, fraturas lineares e crescentes entre outros, assim como proporciona a agregação de partículas e oxidação granular. (Zbyszewski e Corcoran, 2011). Zbyszewski e Corcoran, ao analisar partículas plásticas nas praias do Lago Huron, na região dos Grandes Lagos, no Canadá, observaram que a grande maioria coletada apresentava sinais de erosão mecânica, e que isso era proporcional às intempéries ocorridas no local. Há então um claro sinal de que partículas plásticas podem, ao se submeterem às pressões ambientais, modificar sua morfologia ao longo do tempo. Há evidências também de que o polietileno seria o material plástico mais resistente dentre os coletados na região dos Grandes Lagos. Foi surpreendente observar uma mudança tão marcante na morfologia dos abrasivos iniciada já com 10 dias e amplificando-se com 30 dias após o início da lixiviação artificial. Este tempo relativamente curto para estas modificações pode se dever a quantidade utilizada no experimento, com 2,5 g de partículas por litro de água do mar. Esta concentração propiciaria uma taxa de colisões mais frequente entre partículas do que aquelas ocorridas

naturalmente em ambientes costeiros. Esta concentração foi escolhida, pois pouco havia sido publicado sobre a temática dos microplásticos ao iniciar estes experimentos. Com relação à exposição em laboratório, um único artigo (Browne *et al.*, 2008) estava disponível e utilizava essas concentrações. Os autores não justificam, porém, a escolha desta quantidade, impedindo que uma decisão mais fundamentada pudesse ser feita neste caso. Portanto, as quantidades utilizadas neste experimento, e nos outros a serem discutidos, não são as que realmente se encontram no ambiente, salvo um evento acidental que levaria à descarga de microplástico na água. Vale ressaltar que as partículas abrasivas presentes em cosméticos não são produzidas com o intuito de serem resistentes como são os pellets plásticos utilizados como matéria prima da indústria. Desta forma, podem, na prática, receber menores quantidades de produtos químicos que elevem a sua resistência geral (Murphy, 2001). A lixiviação prévia nos mostrou então que a versão abrasiva do polímero não se apresenta tão resistente e que isso deve estar ligado ao seu processo de fabricação e dos aditivos incorporados à sua composição, das quais não tivemos acesso. Além de alterar as características de retenção como citado anteriormente, essa mudança na morfologia poderia acarretar um aumento da superfície em contato com o meio, e, portanto, torná-los mais aptos a absorver e/ou liberar poluentes.

5.3. Lipoperoxidação

A primeira barreira de interação de partículas externas com as células são as membranas celulares. Essas são responsáveis por inúmeras funções como entrada e saída de íons essenciais, homeostase, bom encaminhamento de proteínas entre outros (Cooper, 2000). Diferentes partículas de micro e nano plástico já foram observadas interiorizadas em células de organismos filtradores. Browne *et al.*, em 2008, observaram em *Mytilus edulis* o translocamento de partículas de poliestireno da cavidade gástrica para a hemolinfa e quanto menores eram as partículas, maiores as chances de atravessarem a membrana. Apesar dos autores não definirem qual o mecanismo pelo qual essas partículas foram interiorizadas, eles acreditam que o processo envolvido nesta passagem seja a endocitose já que partículas com escala micrométrica podem ser internalizadas por este meio. A presença de microesferas plásticas de polietileno já foi observada não apenas na hemolinfa como também em diferentes tecidos desta mesma espécie (Von Moos 2012). Já Giulia Rossi e colaboradores (2014), por simulação, mostraram as possíveis interações entre lipídios presentes em membranas biológicas e nanopartículas de poliestireno, alterando sua estrutura, reduzindo a difusão molecular e diminuindo sua rigidez.

Contaminantes aquáticos já se mostraram nocivos à saúde de organismos marinhos. Os metais pesados como o Cobre e Ferro fazem parte de uma grande lista de elementos químicos que impactam a fisiologia dos invertebrados aquáticos (Iwasaki *et al.*, 2009). Uma das vias de impactos dos contaminantes é o estresse oxidativo, processo pelo qual há acúmulo de intermediários reduzidos de oxigênio como o radical superóxido, levando a um aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos organismos. As EROs podem ter efeitos deletérios importantes em diversas vias fisiológicas e em funções de extrema importância para as células. Porém a estrutura celular mais impactada pelo acúmulo de EROs são os lipídios, que sofrem oxidação e podem levar a danos graves nas membranas. Dentre os subprodutos da lipoperoxidaçao, está o malonaldeído, que possui cor alaranjada e pode ser analisado por espectrofotometria. Este biomarcador já é usado a muitos anos como possível indicador de impacto ambiental uma vez que avalia indiretamente o estado de lipoperoxidação da célula (Lesser, 2006). Nossos resultados mostram que os níveis de lipoperoxidação das membranas dos organismos expostos aos microplásticos foram significativamente menores que os controles. Dentre os expostos, há uma redução nos valores de LPO gradativa até 96 horas de exposição, que volta a se elevar após 144 horas. O tempo de exposição parece ser o fator que influencia diretamente esta queda e seu aumento final. Os níveis de LPO avaliado pela quantificação das substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) dentre as quais está o malonaldeído, aumenta em invertebrados com a exposição a diferentes contaminantes (Giusto e Ferrari, 2014). Porém, apesar de Amachree e colaboradores (2014) observarem um aumento de TBARS em mexilhões expostos continuamente ao mercúrio, quando esta exposição é intermitente, estes níveis se estabilizam e chegam a diminuir após 21 dias. Os autores indicam simplesmente que o mercúrio não leva a um estresse oxidativo importante ao ponto de manter altos níveis de TBARS, apesar de uma elevação deste índice por mercúrio já ter sido vista anteriormente (Géret *et al.* 2002). No que diz respeito aos níveis após exposição à microplásticos, os resultados existentes indicam que os plásticos não influenciam na produção de TBARS quando livres de contaminantes externos como ftalatos ou pirenos em organismos marinhos (Oliveira *et al.*,, 2013), em concordância com nossos resultados.

Em condições normais os antioxidantes permitem, na célula, que os níveis de EROs estejam sempre em quantidade mínima para serem segundo mensageiros de eventos celulares ao invés de causar efeitos deletérios. Porém quando o impacto ambiental é muito intenso e o equilíbrio não é estabelecido, os antioxidantes também são produzidos em

excesso, com o objetivo de conter a quantidade de EROs livres na célula. Antioxidantes podem ser enzimas, como a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase e as Peroxidases, não enzimáticos como o Ácido Ascórbico, o Tocoferol ou carotenóides; ou ainda pequenas moléculas como o Ácido Úrico (Lesser, 2006). As defesas antioxidantes dos mexilhões são muito efetivas (Ribera *et al.*, 1991) talvez por ocuparem zonas de entremarés, onde mudanças de parâmetros do ambiente como os níveis de oxigênio, dessecação e quantidade de nutrientes podem ser bruscas e por longos períodos. Essa queda detectada nos níveis de LPO nos organismos expostos pode ter sido provocada pela alta quantidade de microplásticos sendo percebida como um aumento no material particulado no meio, levando a produção excessiva de antioxidantes. Este componente não deve produzir maiores níveis de EROs, mas como consequência do aumento dos antioxidantes ocorre a redução observada na lipoperoxidação.

5.4 Dano ao DNA

A exposição à contaminantes pode levar a alterações genéticas em organismos, tornando-os marcadores biológicos do impacto de reagentes específicos quando induzem danos característicos (Shugart *et al.*, 2000). Estes podem ser utilizados para avaliar os efeitos de um contaminante sem que interaja diretamente com o material genético, levando a resultados mais genéricos como quebras simples e duplas de fita (Shugart *et al.*, 2000). Por estes motivos, a quantificação de danos ao DNA se tornou um parâmetro essencial para a avaliação do impacto de uma poluição no ambiente (Kohn, 1983; National Research Council (NRC), 1987; Shugart *et al.* 1992).

Danos ao DNA provocados por diversos contaminantes já foram observados em organismos marinhos, como por exemplo estrelas do mar e peixes, onde se mostraram positivamente relacionados às quantidades de PCBs e PAHs na água (Everaarts *et al.*, 1998). Por outro lado, Nacci e colaboradores (1996) observaram que os danos em mexilhões expostos em laboratório a N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NNGM), um contaminante conhecidamente mutagênico e carcinogênico, não se mantinham consistentes após 48 horas. Em mamíferos marinhos, a exposição de leucócitos a PCBs também não levou a alterações na quantidade de dano, nas concentrações usadas (Taddei *et al.* 2001). Sendo assim, diversas análises em diversos organismos aquáticos revelam que os danos ao DNA iniciado por poluentes marinhos muitas vezes não são detectados com tanta clareza e consistência.

Os nossos resultados indicam que existe uma alteração nos níveis de quebra das fitas do DNA dos mexilhões expostos ao microplástico e que esse dano varia com o tempo de exposição ao poluente. Esse efeito é mais intenso com 24 horas e bastante significativo nos organismos submetidos a uma maior quantidade de plástico na água, fazendo com que a concentração pareça mais determinante para o impacto que suas propriedades químicas. O dano ao DNA parece estabilizar-se nos níveis próximos ao controle após 48 horas, chegando a diminuir consistentemente depois de 96 horas de exposição. Apesar de abaixo do dano após 24 horas, ele volta a ser maior que o controle após 144 horas, sempre na mesma dinâmica da dose-dependência. Isto se revelou de acordo com estudos que associam a concentração de outros contaminantes ao dano no DNA do organismo, como por exemplo, em mexilhões expostos a nanopartículas de cobre (Al-Subiai *et al.*, 2011) ou ratos ao dióxido de titânio (Trouiller *et al.* 2009). Estes casos podem se dever ao acúmulo desses elementos ao longo do tempo nos tecidos dos organismos estudados. Porém não há evidências que o microplástico se acumule nos organismos pelos quais são filtrados, o que nos leva a crer que possivelmente contaminantes presentes após lixiviação nesses microplásticos possam ser responsáveis pelo efeito observado.

5.5 Tempo de Retenção do Vermelho Neutro

Uma das maneiras de analisar o estresse fisiológico perante condições ambientais desfavoráveis é realizar o ensaio de Retenção do Vermelho Neutro. O teste já foi aplicado em diferentes condições e organismos (Ringwood *et al.*,1998; Viarengo *et al.*, 2000; Dailianis *et al.* 2003; Moore *et al.*, 2006; Coughlan *et al.*, 2009) e se baseia na capacidade dos lisossomos em reter elementos tóxicos, que eventualmente podem levar à desestabilização das suas membranas (Lowe e Pipe, 1994), liberando seu conteúdo no citosol e gerando um dano à célula. O vazamento do Vermelho Neutro, corante vital, pode então ser indicador da estabilidade da membrana do lisossomo, e em uma maior escala, da viabilidade celular. Diversos contaminantes já foram determinados como desestabilizadores da membrana lisossomal, como nanopartículas (Ringwood *et al.* 2009) e fármacos como o Triclosan (Binelli, 2008), drogas anti-inflamatórias (Parolini *et al.*, 2009) e metais como o cobre (Pereira *et al.*, 2007). Nossos resultados indicam que existe uma tendência de aumento do tempo de retenção do corante nos organismos expostos aos microplásticos até 96 horas. Nos organismos expostos à 144 horas há uma diminuição drástica de retenção na maior concentração (2,5 g/L). Haveria então uma dose-dependência nos resultados, como foi observado após exposição do bivalve *Ruditapes*

philippinarum à cafeína, ibuprofeno, carbamazepina e novobiocina (Aguirre-Martínez *et al.* 2013).

Assim como na diminuição nos níveis de LPO, um aumento no tempo de retenção do Vermelho Neutro pode indicar que o organismo está se respondendo a uma ameaça externa, se tornando mais resistente. Porém, um número maior de biomarcadores seria necessário para indicar quais vias podem estar sendo inibidas e/ou ativadas, como por exemplo enzimas ligadas à produção de EROs (catalase [CAT], glutathione-S-transferase [GST], cholinesterase [ChE]) (Pereira *et al.*, 2007).

5.6 Proteínas de Estresse

5.6.1 Allograft inflammatory factor 1 (AIF-1)

O AIF-1 é uma proteína reconhecida por iniciar a resposta imune durante a ativação de macrófagos, e exerce um papel não somente nestas como também em estímulos anti-inflamatórios (de Zoyza *et al.* 2010). Já foi identificada em invertebrados marinhos como esponjas, onde sua expressão é aumentada em processos de autógrafos evidenciando seu papel no sistema imune desses organismos (Kruse *et al.*, 1999), no bivalve *Chlamys farreri* (Wang, 2013) e na ostra *Pinctada martensii*, (Li *et al.* 2013), entre outros organismos aquáticos.

No gastrópode *Lymnaea stagnalis*, o AIF-1 foi reduzido tanto por coquetéis de remédios psiquiátricos quanto antibióticos, evidenciando seu efeito no estímulo inflamatório que esses remédios inibem (Gust *et al.*, 2013). A expressão de RNAm de AIF-1 foi alterada significativamente entre 6 e 12 horas após o desafio bacteriano imposto a ostra *Pinctada martensii* (Li *et al.* 2013). Resultados semelhantes foram observados nos *P. perna* expostos aos microplásticos e a expressão de AIF-1 parece seguir um sistema dose-dependente relativamente rápida. As primeiras 12 horas parecem afetar a expressão de AIF-1 nos organismos expostos à 0,5 g/L de microplásticos na água, seguido por um cenário oposto em 24 horas. Isto indica pode existir um impacto inflamatório e/ou imunológico pelos microplásticos, e que as primeiras horas de exposição aos contaminantes são essenciais na resposta mediada por esta proteína.

5.6.2 Heat-Shock Protein 70 (HSP70)

As proteínas de choque térmico (Heat-Shock Proteins) são chaperonas presentes de bactérias a mamíferos, e bastante conservadas (Schlesinger *et al.*, 1982). Constitutivamente, estão presentes nas células para o desempenho das mais diversas funções como endereçamento e enovelamento de outras proteínas (Feder e Hofmann, 1999). São divididas em diversas famílias com base em seus pesos moleculares, como as HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 e HSP100 (Nover e Scharf, 1997). A HSP70, de peso molecular 70 kDa é um bom biomarcador de estresse térmico, metais pesados e venenos como o arsênico (Shelton *et al.* 1986; Dyer *et al.* 1993). Porém, a variação do marcador pode não estar sempre associada a um evento recente, e sim ao histórico de mudanças ambientais aos quais os organismos estiveram em contato.

Ostras (*Crassostrea virginica*) expostas a argilas contaminadas por diversas concentrações de PAH apresentaram aumento significativo nos níveis de HSP70 apenas após 40 dias de exposição (Cruz-Rodrıguez e Chu, 2002). Por outro lado, para *M. galloprovincialis*, uma exposição à 30ºC eleva a HSP70 a um nível significativamente superior ao controle após 1 hora de estresse, tendo sua máxima expressão após 2 horas (Gourgou *et al.*, 2010). A expressão de HSP70 em diversos organismos estuarinos durante estresse térmico apresenta variações e limiares diferentes, sendo intimamente relacionados às condições ambientais do habitat (Madeira *et al.*.2012). Em *P. perna*, a exposição ao microplástico resultou em um aumento significativo de HSP70 após 48 horas em alguns grupos de organismos, principalmente os expostos à menor concentração de microplásticos. Apesar de menor, essa resposta se inverte após 144 horas de exposição nos grupos expostos à maior concentração, evidenciando uma resposta semelhante ao observado com AIF-1, embora com algum tempo de retardo. É possível que ambas as respostas estejam relacionadas, uma vez que as HSPs também são conhecidas pelas suas funções em reações anti-inflamatórias: estão associadas a altas expressões de proteína C reativa em mulheres com pré-eclampsia (Molvarec *et al.*, 2009), a proteção das membranas contra EROs, danos ao DNA e proteção mitocondrial em humanos (Jacquier-Sarlin *et al.*, 1994). Sendo assim, os microplásticos poderiam estar ativando uma via de resposta comum a estes dois marcadores.

5.6.3 Phosphorylated p38 mitogen activated protein kinase (pP38-MAPK).

Parte da resistência dos mexilhões se daria por uma inibição coordenada do metabolismo e inativação da fosforilação de diversas enzimas, como as que estão presentes na glicólise, levando a produção de diferentes produtos finais do metabolismo (Canesi *et al.* 2002.) As proteínas fosforiláveis, por sua função reversível, podem ser consideradas elemento fundamentais na capacidade de resistência ao estresse, principalmente na reorganização anaeróbica quando muitas delas são inibidas. Nos mexilhões, estresses como mudanças de temperatura, choque osmótico e hipóxia podem levar a ativação da pP38-MAPK (Canesi *et al.*, 2002). As MAPK são proteínas Ser/Thr quinases, e pertencentes a um grande grupo de enzimas muito conservadas na evolução das espécies (Widmann *et al.*, 1999). Existem três famílias pertencentes ao grupo das MAPK: ERKs (Extracellular-signal-Regulated Kinases), JNKs (c-Jun N-terminal Kinase), e as P38. As duas últimas, porém, são as que estão mais relacionadas à resposta a um estresse (Widmann *et al.*, 1999). Nos *P. perna*, a exposição aos microplásticos levou a uma inibição da pP38-MAPK de maneira tempo-dependente, com menores níveis de expressão após 96 horas, e um aumento marcado após 144 horas. Alterações semelhantes também já foram observadas em outros organismos. Em *M. galloprovinciallis* observou-se que exemplares expostos a quantidades subletais de metais pesados apresentaram níveis elevados de P38 fosforilados nos 120 minutos seguintes a exposição. Um aumento dos níveis de pP38-MAPK em resposta ao estresse oxidativo, hipóxia e hipo e hipersalinidade da água, com níveis máximos observados entre 15 minutos e 8 horas de exposição também já foram relatados (Kefaloyianni *et al.*, 2005, Gaitanaki *et al.*, 2004). Os trabalhos, porém, não observaram a exposição mais longa dos organismos aos eventos estressantes, impossibilitando uma real comparação com os nossos dados. Os resultados obtidos mostram que, após 12 horas de exposição aos microplásticos, há uma expressão de pP38 maior que o controle, e que esta não se mantém durante o tempo, com uma queda drástica e abaixo dos níveis controles até 96 horas. Mesmo a constatação de que em 12 horas, estas, não chegam ao nível de aumento observado por Gatanaki e colaboradores. (2004), onde os mexilhões apresentaram até nove vezes mais pP38 que os controles. Embora sejam espécies diferentes, isso pode vir do fato que a ativação da proteína ocorra de maneira mais eficaz nas primeiras horas de exposição aos contaminantes. Por consequência não estaríamos observando a janela de tempo ideal para esta análise.

5.7 Avaliação Geral dos Biomarcadores

As três proteínas de estresse utilizadas neste trabalho indicam que o impacto da exposição ao microplástico não leva a uma resposta uniforme ou vias claras de ativação de defesa no mexilhão *P. perna*. Observa-se que as respostas de AIF-1 e HSP70 parecem convergir, com um tempo diferente de resposta indicando uma possível ativação destas vias durante a exposição ao plástico. Diferentemente da resposta a contaminantes mais comumente estudados dos oceanos, como PAHs, PCBs e metais pesados, as variações das proteínas indicadoras de estresse escolhidas não apontam a um dano nos organismos como estaríamos acostumados a observar. No entanto, apesar de respostas diferentes, os fatores fisiológicos analisados levam a crer que o plástico exerce sim um impacto na saúde desses organismos, fazendo variar parâmetros importantes de regulação em diversos níveis celulares e em diferentes tempos de exposição.

A variação nos momentos iniciais das proteínas indicadoras de estresse evidenciou que existe uma atividade de resposta aos microplásticos importante nas primeiras 12 a 24 horas de exposição. O tempo de Retenção do Vermelho Neutro indica que os danos aos lisossomos parecem estar ligados a um tempo mais longo, depois de 144 horas, onde a retenção do corante cai drasticamente nos organismos expostos à maior concentração de plástico. A avaliação da lipoperoxidação não evidencia um estresse oxidativo importante, indicando que este material não deve interagir diretamente com as membranas como outros metais e poluentes marinhos. Por outro lado, a redução dos níveis de LPO até 96 horas pode indicar algum mecanismo de proteção. As quebras de fita de DNA que levam a danos importantes do material genético parecem estar mais concentradas nos organismos expostos aos microplásticos por 24 horas. Porém esses resultados não se mantêm constantes, pois não foi observado morte nos organismos estudados. O impacto do plástico não leva então a danos irreversíveis ao DNA

5.8. Contaminação por microplástico no campo

A região do porto de Santos foi escolhida para a procura por mexilhões contaminados, pois concentra diversas atividades que poderiam levar a um aporte de microplásticos no canal que deságua na baia de Santos. Atividades econômicas como o transporte de PVC em pó por navios e as ocupações irregulares no leito do canal, podem ser vistos como possíveis fontes de contaminação crônica. Os dados obtidos mostram que grande parte

dos *P. perna* coletados contém micropartículas plásticas. Apesar de não tão evidente, um gradiente pôde ser detectado, mostrando que os organismos mais perto do porto ou das ocupações irregulares possuem maior contaminação por microplásticos. O píer Edgard Perdigão é o principal ponto de saída de passeios de escuna em Santos. Esse turismo pode vir acompanhado de falta de cuidado ao descartar produtos plásticos, levando assim a um aumento da contaminação por microplástico na região.

No Brasil, o cultivo de mexilhões se estabeleceu da metade para o fim dos anos 80, na região de Santa Catarina. A produção passou de menos de 200 toneladas métricas/ano na época, a 10.000 toneladas métricas no ano de 2000 (Ferreira e Magalhães, 2005). O consumo de pescado pelo brasileiro nos últimos 2 anos cresceu quase 15% (MPA, 2013), elevando a quantidade por habitante para os níveis mínimos de consumo recomendado pela OMS (12 kilos). Essa tendência de aumento influencia diretamente o consumo dos mariscos, fonte importante destas proteínas. No Brasil, a espécie mais comercializada é o *P. perna*, consumido por parte da população o ano inteiro (Baraj *et al.*, 2003). A contaminação observada em bancos naturais de Santos é um fator preocupante quanto à qualidade dos organismos consumidos pelos habitantes da região. Apesar das características inertes dos polímeros plásticos, seus aditivos e contaminantes podem ser liberados em ambientes ácidos como o suco gástrico em seres humanos (Sakai *et al.* 2010). Não existem dados sobre o impacto do consumo de microplásticos em seres humanos, porém os resultados aqui apresentados sugerem que estaríamos sendo expostos a eles mesmo que em baixas concentrações, dentre outras vias, pelo consumo de alimentos contaminados. Esta afirmação poderia criar uma base para futuros estudos sobre a ação de microplásticos na saúde humana.

6. Conclusões

O trabalho apresentado foi fruto da recente, mas intensa, preocupação do mundo acadêmico em entender uma fonte de poluição antropogênica cada vez mais presente e impactante dos oceanos: os plásticos. Em 2015, foi estimado que existam mais de 250.000 toneladas de micropartículas de plástico somente na superfície dos oceanos (Eriksen *et al.*, 2014). O que chamamos de microplástico hoje pode apresentar uma ameaça real à fauna marinha, tendo sido encontrado no trato digestório de diversos organismos como camarões, ostras, mexilhões entre outros (Devriese *et al.*, 2015; Van Cauwenberghe *et al.*, 2014), em sua maioria, espécies com valor comercial de consumo. Apesar de sua presença nos oceanos, os impactos fisiológicos que essas micropartículas podem ocasionar nos organismos que as ingerem apenas recentemente começaram a ser fonte de pesquisas.

O objetivo deste trabalho foi o de observar como se comportam diversos biomarcadores em mexilhões *P. perna* após a exposição a microplásticos que são utilizados em todos os lares brasileiros e que muitas pessoas nem sequer sabem que existem - os abrasivos de cosméticos. Observou-se que apesar desses biomarcadores não se comportarem tradicionalmente como quando são avaliados após exposição à contaminantes mais comuns como metais pesados e derivados de petróleo, há uma clara evidência que nos níveis biológicos estudados (molecular e celular) há uma alteração dos padrões em relação aos controles não expostos. Isso significa que, apesar de não representarem, *a priori*, uma grande preocupação aos seres humanos que os utilizam diariamente, essas partículas podem estar afetando a fisiologia dos organismos que os ingerem em ambiente marinho. As concentrações utilizadas nesse projeto usam valores utilizados nos poucos trabalhos que na época anterior a sua realização, tinham sido publicados (Browne *et al.* 2008; Von Moos *et al.*, 2012). Essas quantidades estão bem acima das que, hoje, sabemos presentes nos oceanos (Cole *et al.*, 2011). Por outro lado, estas partículas podem permanecer no ambiente por vários anos. Por isso, para a continuidade do trabalho, seria desejável expor os organismos a concentrações de microplásticos mais próximas as encontradas nos ambientes, e se possível acompanhar um ciclo de vida inteiro ou mesmo gerações. Os ensaios realizados não nos permitem identificar especificamente onde as vias de sinalização estão sendo ativadas pela presença dos plásticos, mas indicam possíveis caminhos a serem seguidos em futuras análises.

Os microplásticos ainda são elementos de poluição pouco entendidos. Por este motivo as pesquisas nesta área tendem a crescer, como têm acontecido nos últimos anos. Uma diversidade de efeitos descritos em inúmeros organismos potencialmente impactados nos permite hoje uma melhor, porém ainda pequena, compreensão da ameaça dos microplásticos na saúde dos oceanos. Como notado por Browne e colaboradores (2008), esses resultados endossam a preocupação do consumo exacerbado de materiais plásticos e a falta de descarte adequado e de políticas públicas que sejam efetivas no seu reuso e reciclagem. Assim como outras pesquisas preconizam, os resultados aqui citados demonstram que os microplásticos alteram a fisiologia do mexilhão *P. perna*, e esse dado, aliado à futuras pesquisas, poderia ser a base de uma proposta para que estes elementos sejam considerados danosos ao serem transportados e consumidos. Isto pode levar à criação de uma legislação e fiscalização efetiva assim como uma maior conscientização da comunidade internacional sobre os possíveis efeitos nocivos para a biota marinha e para os oceanos.

7. Referências

AGUIRRE-MARTÍNEZ, G. V., BURATTI, S., FABBRI, E., DELVALLS, A. T., & MARTÍN-DÍAZ, M. L. 2013. **Using lysosomal membrane stability of haemocytes in *Ruditapes philippinarum* as a biomarker of cellular stress to assess contamination by caffeine, ibuprofen, carbamazepine and novobiocin**. J. Environ. Sci. 25, 1408-1418.

AL-SUBIAI, S. N., MOODY, A. J., MUSTAFA, S. A., JHA, A. N. 2011. **A multiple biomarker approach to investigate the effects of copper on the marine bivalve mollusc, *Mytilus edulis***. Ecotox. Environ. Safe. 74, 1913-1920.

AMACHREE, D., MOODY, A., HANDY, J., RICHARD, D. 2014. **Comparison of intermittent and continuous exposures to inorganic mercury in the mussel, Mytilus edulis: Accumulation and sub-lethal physiological effects**. Ecotox. Environ. Safe., 109, 133-142,

ANDRADY, A. L. 1990**. Environmental degradation of plastics under land and marine exposure conditions.** In Proceedings of the Second International Conference on Marine Debris, eds. R. S. Shomura and M. L. Godfrey, pp. 848–869. April 2–7, 1989. Honolulu, Hawaii. US Department of Commerce, NOAA Technical Memorandum NMFS, NOAA-TM-NMFS-SWFC-154

ANDRADY, A.L., 2011. **Microplastics in the marine environment**. Mar. Pollut. Bull. 62, 1596–1605.

BARAJ, B., NIENCHESKI, L.P., CORRADI, C. 2003. **Trace metal content trend of mussel Perna perna (Linnaeus, 1758) from the Atlantic Coast of Southern Brazil**. Water Air Soil. Poll., 145,205-214.

BARNES, D. K. A., GALGANI, F., THOMPSON, R. C., BARLAZ, M., 2009. **Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments**. Philos. Trans. Roy. Soc. B 364, 1985–1998.

BINELLI, A., RIVA, C., COGNI, D., PROVINI. A. 2008. **Assessment of the genotoxic potential of benzo(α)pyrene and pp′-dichlorodiphenyldichloroethylene in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*)** Mutat. Res., 649, 135–145

BLIGHT, L.K., BURGER, A.E., 1997. **Occurrence of plastic particles in seabirds from the eastern North Pacific**. Mar. Pollut. Bull. 34, 323–325.

BORNEHAG, C.G., SUNDELL, J., WESCHLER, C.J., SIGSGAARD, T., LUNDGREN, B., HASSELGREN, M., HAGERHED-ENGMAN, L., 2004. **The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case-control study**. Environ. Health Persp. 112, 1393–1397

BOYER, R. F. 1951. **Relation of tensile strength to brittle temperature in plasticized polymers**. J. Appl. Phys. 12, 723–728.

BRONGERSMA, L. 1968. Notes upon some turtles from the Canary Islands and from Madeira Proc. K. Ned. Akad. Wet. Ser. C Biol. Med. Sci., 71 , pp. 128–136 (*apud* Balazs, G. (1985) Impact of ocean debris on marine turtles: entanglement and ingestion. In: Shomura, R., Yoshida, H. (Eds.). Proceedings of the workshop on the fate and impact of marine debris, 1927–1929 November 1984, Honolulu, US Department of Commerce (1985), NOAA Technical Memorandum NMFS SWFC-1954. pp. 1387–1429)

BROWNE M.A., UNDERWOOD AJ, CHAPMAN MG, WILLIAMS R, THOMPSON RC, VAN FRANEKER JA. 2015. **Linking effects of anthropogenic debris to ecological impacts**. Proc. R. Soc. B 282: 2014-2929.

BROWNE, M.A., DISSANAYAKE, A., GALLOWAY, T.S., LOWE, D.M., THOMPSON, R.C., 2008. **Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.).** Environ. Sci. Technol. 42, 5026–5031.

CALAFAT, A.M., NEEDHAM, L.L., SILVA, M.J., LAMBERT, G. 2004. **Exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit**. Pediatrics. 113, 429-34

CALDWELL, D., CALDWELL, M., RICE, D., 1965. Observations on captive and wild Atlantic bottlenosed dolphins, *Tursiops truncates*, in the northeastern Gulf of Mexico. Los Angeles City Museum Contrib. Sci. 91, 2–10. (*apud* Walker, W., Coe, J. 1990. Survey of marine debris ingestion by Odontocete cetaceans. In: Shomura, R., Godfrey, M. 1990. (Eds.). Proceedings of the second international conference on marine debris). U.S. Department of Commerce, NOAA Technical Memorandum. NMFS. NOAA-TM-NMFS-SWFSC-1154. pp. 1747-1774.

CANESI, L., SCARPATO, A., BETTI, M., CIACCI, C., PRUZZO, C., & GALLO, G. 2002. **Bacterial killing by Mytilus hemocyte monolayers as a model for investigating**

the signaling pathways involved in mussel immune defence. Mar. Environ Res, 54, 547-551.

CARPENTER, E. J., ANDERSON, S. J., HARVEY, G. R.,MIKLAS, H.P., PECK, B. B. 1972. **Polystyrene spherules in coastal waters**. Science 178, 749–750.

CLAESSENS, M.; CAN CAUWENBERGHR, L.; VANDEGEHUCHTE, M.B.; JANSSEN, C.R. 2013. **New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms**. Mar. Pollut. Bull.,70, 227–233.

COE, J. M., ROGERS, D. (Eds.). 2012. **Marine debris: sources, impacts, and solutions**. Springer Science & Business Media. 432p

COLE, M., LINDEQUE, P., HALSBAND, C., GALLOWAY, T.S., 2011. **Microplastics as contaminants in the marine environment: a review.** Mar. Pollut. Bull. 62, 2588–2597

COOPER G. M. 2a Edição. **The Cell: A Molecular Approach**. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. 832p.

COOPER, D. A., CORCORAN, P. L. 2010. **Effects of mechanical and chemical processes on the degradation of plastic beach debris on the island of Kauai, Hawaii**. Mar. Pollut. Bull. 60, 650-654.

COUGHLAN, B. M., MORONEY, G. A., VAN PELT, F. N. A. M., O'BRIEN, N. M., DAVENPORT, J., & O'HALLORAN, J. 2009. **The effects of salinity on the Manila clam (Ruditapes philippinarum) using the neutral red retention assay with adapted physiological saline solutions**. Mar. Pollut. Bull, 58, 1680-1684.

CÓZAR, A., ECHEVARRÍA, F., GONZÁLEZ-GORDILLO, J.I., IRIGOIEN, X., UBEDA, B., HERNÁNDEZ-LEÓN, S., PALMA, A.T., NAVARRO, S., GARCÍA-DE-LOMAS J, RUIZ A, FERNÁNDEZ-DE-PUELLES ML, DUARTE CM. 2014. **Plastic debris in the open ocean**. Proc Natl Acad Sci USA. 111, 10239-44.

CRUZ-RODRIGUEZ, L. A., CHU, F-L.E. 2002. **Heat-shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, Crassostrea virginica, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments**. Aquatic Toxicol. 60, 157-168

DAILIANIS, S., DOMOUHTSIDOU, G. P., RAFTOPOULOU, E., KALOYIANNI, M., & DIMITRIADIS, V. K. (2003). **Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring**. Marine Environ. Res., 56, 443-470.

DAVID, J.A.O. 2007. **Estudo de Mytella falcata (MOLLUSCA, BIVALVIA) como indicadora de efeitos genotóxicos no estuário de Santos**, SP. Thesis (phd). Universidade Estadual Paulista, Institute of Biology 205 p.

DE ZOYSA, M., NIKAPITIYA, C., KIM, Y., OH, C., KANG, D. H., WHANG, I. LEE, J. 2010. **Allograft inflammatory factor-1 in disk abalone (Haliotis discus discus): molecular cloning, transcriptional regulation against immune challenge and tissue injury**. Fish Shellfish Immunol., 29, 319-326.

DEANIN, R. D. 1975. **Additives in plastics**. Environ. Health. Persp. 11, 35-39.

DERRAIK, J.G.B., 2002. **The pollution of the marine environment by plastic debris: a review**. Mar. Pollut. Bull. 44, 842–852.

DESDOITS-LETHIMONIER, C., ALBERT, O., LE, B.B., PERDU, E., ZALKO, D., COURANT, F., LESNE, L., GUILLE, F., DEJUCQ-RAINSFORD, N., JEGOU, B., 2012. **Human testis steroidogenesis is inhibited by phthalates**. Hum. Reprod. 27, 1451–1459.

DEVRIESE, L. I., VAN DER MEULEN, M. D., MAES, T., BEKAERT, K., PAUL-PONT, I., FRÈRE, L., ROBBENS, J., VETHAAK, A. D. 2015. **Microplastic contamination in brown shrimp (Crangon crangon, Linnaeus 1758) from coastal waters of the Southern North Sea and Channel area**. Mar. Pollut. Bull., 98, 179-187.

DUHEC, A. V., JEANNE, R. F., MAXIMENKO, N., HAFNER, J. 2015. **Composition and potential origin of marine debris stranded in the Western Indian Ocean on remote Alphonse Island, Seychelles**. Mar Pollut Bull. 96, 76-86.

DYER, S.D., BROOKS, G.L., DICKSON, K.L., SANDERS, B.M., ZIMMERMAN, E.G., 1993. **Synthesis and accumulation of stress proteins in tissues of arsenite-exposed fathead minnows *Pimephales promelas***. Environ. Toxicol. Chem. 12, 913–924.

ENGEL, S.M., MIODOVNIK, A., CANFIELD, R.L., ZHU, C., SILVA, M.J., CALAFAT, A.M., WOLFF, M.S., 2010. **Prenatal phthalate exposure is associated with childhood behavior and executive functioning**. Environ. Health Persp 118, 565–571

ERIKSEN, M., LEBRETON, L. C. M., CARSON, H. S., THIEL, M., MOORE, C. J., BORERRO, J. C., GALGANI, F., RYAN, P.G., REISSER, J. 2014. **Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea**. PloS one, 9, e111913.

ERIKSSON, C., BURTON, H. 2003 **Origins and biological accumulation of small plastic particles in fur seals from Macquarie Island**. Ambio 32, 380–384.

EVERAARTS, J. M., DEN BESTEN, P. J., HILLEBRAND, M. T. J., HALBROOK, R. S., SHUGART, L. R. 1998. **DNA strand breaks, cytochrome P-450-dependent monooxygenase system activity and levels of chlorinated biphenyl congeners in the pyloric caeca of the seastar (*Asterias rubens*) from the North Sea**. Ecotoxicology, 7, 69-79.

FEDER, M. E., HOFMANN, G.E. 1999. **Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology**. Annu. Rev. Physiol. 61,243-282.

FENDALL, L.S., SEWELL, M.A., 2009. **Contributing to marine pollution by washing your face: microplastics in facial cleansers.** Mar. Pollut. Bull. 58, 1225–1228.

FERREIRA, J. F., MAGALHÃES, A. R. M. 2010. **Cultivo de Mexilhões**. Disponível em: https://bgnaescola.files.wordpress.com/2010/09/cultivo_mexilhoes.pdf Acessado dia 10.09.2015. 33p.

FOK, L., CHEUNG, P. K. 2015. **Hong Kong at the Pearl River Estuary: A hotspot of microplastic pollution**. Mar. Pollut. Bull. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.07.050.

GAGNÉ, F.; BLAISE, C. 1993. **Hepatic metallothionein level and mixed function oxidase activity in fingerling rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) after acute exposure to pulp and paper mill effluents**. Wat. Res., 27, 1669–1682.

GAITANAKI, C., KEFALOYIANNI, E., MARMARI, A., BEIS, I. 2004. **Various stressors rapidly activate the p38-MAPK signaling pathway in Mytilus galloprovincialis (Lam.)**. Mol. Cell. Biochem, 260, 119-127.

GALGANI, F., FLEET, D., VAN FRANEKER, J., KATSANEVAKIS, S., MAES, T., MOUAT, J., OOSTERBAAN, L. POITOU, I. HANKE, G. THOMPSON, R. AMATO, E. BIRKUN, A. JANSSEN, C. 2010. **Marine Strategy Framework 97 Directive: Task Group 10 Rerport on marine litter.** JRC Scientific and Technical Reports.

GALL, S. C.; THOMPSON, R. C. 2015. **The impact of debris on marine life**. Mar. Pollut. Bull, 92, 170-179.

GAYLOR, M. O., HARVEY, E., HALE, R. C. 2012. **House crickets can accumulate polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) directly from polyurethane foam common in consumer products**. Chemosphere, 86, 500–505.

GEF, 2012. **Impacts of marine debris on biodiversity: current status and potential solutions.** Montreal Technical Series No. 67, 61p

GÉRET, F., JOUAN, A., TURPIN, V., BEBIANNO, M. J., COSSON, R. P. 2002. **Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*).** Aquat. Living Resour., 15, 61-66.

GIUSTO, A., FERRARI, L. 2014. **Biochemical responses of ecological importance in males of the austral South America amphipod *Hyalella curvispina Shoemaker*, 1942 exposed to waterborne cadmium and copper.** Ecotox. Environ. Safe. 100, 193-200.

GOLDSTEIN, M.C., ROSENBERG, M., CHENG, L., 2012. **Increased oceanic microplastic debris enhances oviposition in an endemic pelagic insect**. Biol. Lett. 8, 817–820.

GOURGOU, E., AGGELI, I. K., BEIS, I., & GAITANAKI, C. 2010. **Hyperthermia-induced Hsp70 and MT20 transcriptional upregulation are mediated by p38-MAPK and JNKs in *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck); a pro-survival response**. J. Exp. Biol, 213, 347-357.

GREGORY, M.R., 2009. **Environmental implications of plastic debris in marine settings: entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions.** Philos. T. Roy. Soc. B. 364, 2013–2025.

GUST, M., FORTIER, M., GARRIC, J., FOURNIER, M., GAGNÉ, F. 2013. **Effects of short-term exposure to environmentally relevant concentrations of different pharmaceutical mixtures on the immune response of the pond snail *Lymnaea stagnalis*.** Sci.Total Environ., 445, 210-218.

HARPER, P.C., FOWLER, J.A., 1987. **Plastic pellets in New Zealand storm-killed prions (*Pachyptila spp*.),** 1958–1977. Notornis 34, 65–70.

HART, M.,W. 1991. **Particle captures and the method of suspension feeding by echinoderm larvae**. Biol. Bull., 180(1), 12-27.

HOLMES, L., TURNER, A., THOMPSON, R. 2012. **Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment.** Environ. Pollut. 160, 42-48.

IWASAKI, Y., KAGAYA, T, MIYAMOTO, K, MATSUDA, H. 2009. **Effects of heavy metals on riverine benthic macroinvertebrate assemblages with reference to potential food availability for drift-feeding fishes.** Environ Toxicol Chem. 28, 354-63.

JAAKKOLA, J.J.K., VERKASALO, P.K., JAAKKOLA, N., 2000. **Plastic wall materials in the home and respiratory health in young children**. Am. J. Public Health 90, 797–799

JACQUIER-SARLIN, M. R., FULLER, K., DINH-XUAN, A. T., RICHARD, M. J., POLLA, B. S. 1994. **Protective effects of hsp70 in inflammation**. Experientia, 50, 1031-1038.

KEFALOYIANNI, E., GOURGOU, E., FERLE, V., KOTSAKIS, E., GAITANAKI, C., & BEIS, I. 2005. **Acute thermal stress and various heavy metals induce tissue-specific pro-or anti-apoptotic events via the p38-MAPK signal transduction pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.)**. J. Exp. Biol., 208, 4427-4436.

KOHN, K.,W. 1983. **The significance of DNA-damage assays in toxicity and carcinogenicity assessment**. Ann. N.Y. Acad. Sci. 407, 106-118.

KRUGER N. **The Bradford method for protein quantitation**.1994. Methods Mol Biol. 32, 9-15

KRUSE, M., STEFFEN, R., BATEL, R., MULLER, I. M., MULLER, W. E. 1999. **Differential expression of allograft inflammatory factor 1 and of glutathione peroxidase during auto- and allograft response in marine sponges**. J. Cell Sci. 112:4305–4313.

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

LESSER, M., P. 2006. **Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology**. Annu. Rev. Physiol. 68, 253-278.

LI J, CHEN J, ZHANG Y, YU Z. 2013. **Expression of allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) in response to bacterial challenge and tissue injury in the pearl oyster, *Pinctada martensii*.** Fish Shellfish Immunol. 34, 365-71

LOWE, D. M., PIPE, R. K. 1994.**Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study**. Aquat. Toxicol. 30, 357-365.

LOZANO, R., L., MOUAT, J., 2009. **Marine Litter in the North-East Atlantic Region: Assessment and Priorities for Response**. KIMO International.

MADEIRA, D., NARCISO, L., CABRAL, H. N., VINAGRE, C., DINIZ, M. S. 2012. **HSP70 production patterns in coastal and estuarine organisms facing increasing temperatures**. J. Sea Res., 73, 137-147.

MARQUES, R.C., BREVES, A. 2014. **First record of Pinctada imbricata Röding, 1798 (Bivalvia: Pteroidea) attached to a rafting item: a potentially invasive species on the Uruguayan coast**. Mar Biodivers Rec. 45, 333-337

MARANHÃO, L. A., PEREIRA, C,D.S., CHOUERI, R.B., CESAR, A., GUSSO-CHOUERI, P. R., TORRES, R.J., ABESSA, D.M.S., MORAIS, R.D., MOZETO, A. A., DELVALLS, T.A., MARTÍN-DIAZ, M.L. 2012. **The application of biochemical responses to assess environmental quality of tropical estuaries: field surveys.** J. Environ. Monit. 2012, 14, 2608

MATO, Y., ISOBE T., TAKADA, H., KANEHIRO, H., OHTAKE, C., KAMINUMA, T., 2001. **Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment.** Environ. Sci. Technol. 35, 318–324.

MATSUMOTO, M., HIRATA-KOIZUMI, M., EMA, M. 2008. **Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction**. Regul Toxicol Pharm 50:37–49

MAYCOCK, D.; FAWELL, J.; MERRINGTON, G.; WATTS, C. **Review of England and Wales monitoring data for which a national or international standard has been set.** Guidel. Drinking Water Qual. 2008, 1−148.

MEEKER JD, SATHYANARAYANA S, SWAN SH. 2009. **Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes.** Philos. Trans. Roy. Soc. B. 364, 2097-2113

MIODOVNIK, A., ENGEL, S.M., ZHU, C., YE, X., SOORYA, L.V., SILVA, M.J., CalafAT, A.M., WOLFF, M.S., 2011. **Endocrine disruptors and childhood social impairment.** NeuroToxicology 32, 261–267

MOHR, S., COSTABEBER, I., H. 2012. **Aspectos toxicológicos e ocorrência dos bifenilos policlorados em alimentos**. Cienc. Rural. .42, 559-566

MOLVAREC, A., RIGÓ Jr, J., LÁZÁR, L., BALOGH, K., MAKÓ, V., CERVENAK, L., MÉZES, M., PROHÁSZKA, Z. 2009. **Increased serum heat-shock protein 70 levels reflect systemic inflammation, oxidative stress and hepatocellular injury in preeclampsia**. Cell Stress Chaperones, 14, 151-159.

MOORE, C.J., 2008. **Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat**. Environ Res. 108, 131–139.

MOORE, M. N. 1990. **Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring.** Histochem. J. 22, 189-191.

MOUAT, T., LOPEZ LOZANO, R., BATESON, H. 2010. **Economic Impacts of Marine Litter.** KIMO (Kommunenes Internasjonale Miljøorganisasjon/Local Authorities International Environmental Organisation).

MPA. **Consumo de pescado no Brasil aumenta 23,7% em dois anos**. 2013. Disponível em http://www.mpa.gov.br/ultimas-noticias/832-consumo-de-pescado-no-brasil-aumenta-23-7-em-dois-anos%20acessado%2002.10.15. Acessado 02.10.15

MURPHY, J. 2a Edição. **Additives for plastics handbook**. Elsevier Science, 2001, 484p.

MURRAY, F., COWIE, P.R., 2011**. Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758).** Mar. Pollut. Bull. 62, 1207–1217.

NACCI, D., E, CAYULA, S, JACKIM, E. 1996. **Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay**. Aquat. Toxicol. 35, 197-210.

NOVER, L., SCHARF, K-D. 1997**. Heat stress proteins and transcription factors**. Cell Mol Life Sci 53, 80-103.

NRC, 1987. **Biological markers in environmental health research**. Environ. Health Perspect., 74, 3–9

NRC. 1999. **Hormonally active agents in the environment**. National Research Council, National Academies Press. Washington, DC

OLIVE, P.L. 1998. **DNA precipitation Assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells**. Environ. Mol. Mutagen., v. 11, p. 487–495.

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

OMS (Organização Mundial da Saúde). 2004. **Guidelines for drinking-water quality: volume 1: recommendations**. Stylus pub llc, 515p.

OSPAR, 2007. **OSPAR Pilot Project on Monitoring Marine Beach Litter: Monitoring of marine litter on beaches in the OSPAR region.** OSPAR Commission, London.

PACE, R., DIMECH, M., CAMILLERI, M. 2007. **Litter as a source of habitat islands on deep water muddy bottoms.** Rapp. Comm. int. Mer Médit., 38, 567.

PAROLINI, O., SONCINI, M., EVANGELISTA, M., SCHMIDT, D. 2009. **Amniotic membrane and amniotic fluid-derived cells: potential tools for regenerative medicine?** Regen. Med. 4, 275-291

PEREIRA, C.D., ABESSA, D.M., BAINY, A.C., ZARONI, L.P., GASPARRO, M.R., BÍCEGO, M.C., TANIGUCHI, S., FURLEY, T.H., DE SOUSA, E.C. 2007. **Integrated**

assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil. Environ Toxicol Chem. 26, 462-9

PLASTICSEUROPE. 2012. **Plastic-The facts 2012: An analysis of european plastic production, demand and waste data for 2011**. Plastics Europe, Brussels, 2012.

PLASTICSEUROPE. 2015 **The ABC of Polyethylene**. 3p. Disponível em: http://www.plasticseurope.org/information-centre/education-portal/resources-room/abc-of-plastics/the-abc-of-polyethylene.aspx Acesso dia 17/09/2015.

RESGALLA J. R. C., WEBER, L. I., CONCEIÇÃO, M. B. 2008. **O mexilhão Perna perna: Biologia, ecologia e aplicações**. Editora Interciência, 324p.

RIBERA, D., NARBONNE, J. F., MICHEL, X., LIVINGSTONE, D. R., O'HARA, S. 1991. **Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure**. Comp. Biochem. Phys. C. 100, 177-181.

RIISGÅRD, H. U., LARSEN, P. S. 2010. **Particle capture mechanisms in suspension-feeding invertebrates**. Mar Ecol Prog Ser. 418, 255–293

RINGWOOD, A. H.; CONNERS, D. E.; HOGUET, J. 1998. **Effects of natural and anthropogenic stressors on lysosomal destabilization in oysters *Crassostrea virginica*.** Mar. Ecol. Prog. Ser., 166,163-171.

RINGWOOD, A. H., MCCARTHY, M., BATES, T. C., CARROLL, D. L. 2010. **The effects of silver nanoparticles on oyster embryos**. Mar. Environ. Res. 69, S49-S51.

RIOS, L.M., MOORE, C., JONES, P.R., 2007. **Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment.** . Mar. Pollut. Bull 54, 1230–1237.

ROCHMAN, C.M., HOH, E., HENTSCHEL, B.T., KAYE, S., 2012. **Long-term field measurement of sorption of organic contaminants to five types of plastic pellets: implications for plastic marine debris**. Environ. Sci. Technol. 47, 1646– 1654.

ROCHMAN, C.M., HOH, E., KUROBE, T., THE, S.,J. 2013. **Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress.** Sci Rep. 3, 3263.

ROSSI, G.; MONTICELLI, L. **Modeling the effect of nano-sized polymer particles on the properties of lipid membranes.** Journal of Physics: Condensed Matter, 26. 50, p. 503101, 2014.

ROZATI, R., REDDY, P.P., REDDANNA, P., MUJTABA, R., 2002. **Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility**. Fertil Steril 78, 1187–1194

RYAN, P. G., CONNELL, A. D., GARDENER, B. D. 1988. **Plastic ingestion and PCBs in seabirds: is there a relationship?** Mar. Pollut. Bull. 19, 174–176.

SAKAI, S., URANO, S., TAKATSUKI, H. 2000. **Leaching behavior of PCBs and PCDDs/DFs from some waste materials**. Waste Manag. 20, 241–247.

SCHLESINGER, M. J., ASHBURNER, M. and TISSIERES, A. 1a Edição.. **Heat Shock Proteins: From Bacteria to Man**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1982. 440p

SHELTON, K. R., TODD,J.M., EGLE,P.M. 1986. **The induction of stress-related proteins by lead**. J. Biol. Chem. 261, 1935-1940.

SHUGART, L. R. 1990. **DNA damage as an indicator of pollutant-induced genotoxicity.** In Aquatic toxicology and risk assessment (Vol. 13, pp. 348-355)..

SHUGART, L. R. 2000. **DNA damage as a biomarker of exposure**. Ecotoxicology, 9, 329-340.

SILVA, M. J., SAMANDAR, E., PREAU, J.L. Jr., NEEDHAM, L.L., CALAFAT, A.M. 2006. **Urinary oxidative metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate in humans**. Toxicology. 219, 22-32

SIVAN, A. 2011. **New perspectives in plastic biodegradation**. Curr Opin Biotech. 22, 422–426.

SOUZA, R. R., MARTINS, E. A. J., OTOMO, J. I., FURUSAWA, H. A., PIRES, M. A. F. 2012. **Determinação de plastificantes em água potável utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massas**. Química Nova, 35, 1453-1458.

SWAN S.H., MAIN K.M., LIU F, STEWART S.L., KRUSE R.L., CALAFAT A.M., MAO C.S., REDMON J.B., TERNAND C.L., SULLIVAN S., TEAGUE J.L. 2005. **Study for Future Families Research Team.: Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure.** Environ Health Perspect. 113, 1056-61. Erratum in: Environ Health Perspect. 2005, 113,A583.

TADDEI, A., MAISON, C., ROCHE, D., ALMOUZNI, G. 2001. **Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases**. Nat. cell biol., 3, 114-120.

TEUTEN, E. L., ROWLAND, S. J., GALLOWAY, T. S., THOMPSON,R. C. 2007. **Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants**. Environ. Sci. Technol. 41, 7759–7764.

TEUTEN, E.L., SAQUING, J.M., KNAPPE, D.R., BARLAZ, M.A., JONSSON, S., BJÖRN, A., ROWLAND, S.J., THOMPSON, R.C., GALLOWAY, T.S., YAMASHITA, R., 2009. **Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife.** Philos. Trans. Roy. Soc. B 364, 2027–2045.

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

THOMPSON, R.C., MOORE, C.J., vom SAAL, F.S., SWAN, S.H., 2009a. **Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends.** Philos. Trans. Roy. Soc. B 364, 2153–2166

THOMPSON, R.C., SWAN, S.H., MOORE, C.J., vom SAAL, F.S., 2009b. **Our plastic age**. Philos. T. Roy .Soc. B. 364, 1973–1976.

TOURINHO, P.S., IVAR DO SUL, J.A., FILLMANN, G., 2010. **Is marine debris ingestion still a problem for the coastal marine biota of southern Brazil?** Mar. Pollut. Bull. 60, 396–401.

TRANFO, G., CAPOROSSI, L., PACI, E., ARAGONA, C., ROMANZI, D., DE, C.C., DE, R.M., CAPANNA, S., PAPALEO, B., PERA, A., 2012. **Urinary phthalate monoesters concentration in couples with infertility problems**. Toxicol. Lett. 213, 15–20

TROUILLER, B., RELIENE, R., WESTBROOK, A., SOLAIMANI, P., & SCHIESTL, R. H. 2009. **Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice**. Cancer Res. 69, 8784-8789.

TURRA A, MANZANO AB, DIAS RJ, MAHIQUES MM, BARBOSA L, BALTHAZAR-SILVA D, MOREIRA FT. 2014. **Three-dimensional distribution of plastic pellets in sandy beaches: shifting paradigms.** Sci Rep. Mar 27; 4435.

UNEP. 2005. **Marine Litter an Analytical Overview**. United Nations Environment Program, (UNEP), Kenya, p. 47.

UNEP. 2009. **Marine Litter: A Global Challenge**. United Nations Environment Program (UNEP), Nairobi, p. 232.

UNEP-CAR/RCU, 2008. **Marine Litter in the Wider Caribbean Region: A Regional Overview**. United Nations Environment Programme, Nairobi, p. 81.

URIBE, D., GIRALDO, D., GUTIÉRREZ, S., MERINO, F. 2010. **Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario**, Lima, Perú. Rev. Peru. Biol. 17, 133-136.

VAN CAUWENBERGHE, L., JANSSEN, C. R. 2014. **Microplastics in bivalves cultured for human consumption**. Environ. Pollut., 193, 65-70.

VAN FRANEKER, J.A., LAW, K.L. 2015. **Seabirds, gyres and global trends in plastic pollution**. Environ Pollut, 203,89-96.

VIARENGO, A., MARRO, A., MARCHI, B., & BURLANDO, B. 2000. **Single and combined effects of heavy metals and hormones on lysosomes of haemolymph cells from the mussel *Mytilus galloprovincialis*.** Mar. Biol., 137, 907-912.

VON MOOS, N., BURKHARDT-HOLM, P., KÖHLER, A. 2012. **Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure**. Environ. Sci. Technol. 46, 11327-11335.

WALKER J. 1994**. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation**. Methods Mol Biol. 32, 5-8

WANG J, ZHANG H, WANG L, QIU L, YUE F, YANG C, SONG L. 2013.**Molecular cloning and transcriptional regulation of an allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) in Zhikong scallop *Chlamys farreri***. Gene.530, 178-84.

WARD, J.E., KACH, D.J., 2009. **Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves**. Mar. Environ. Res. 68, 137-142.

WARD, J.E., LEVINTON, J.S., SHUMWAY, S.E., 2003. **Influence of diet on pre-ingestive particle processing in bivalves: I: transport velocities on the ctenidium**. J. Exp. Mar. Biol. Ecol 293 (2), 129e149

WARD, J.E., TARGETT, N.M., 1989. **Influence of marine microalgal metabolites on the feeding behavior of the blue mussel *Mytilus edulis***. Mar. Biol. 101, 313-321

WIDMANN, C., GIBSON, S., JARPE, M.,B. JOHNSON, G.,L. 1999. **Mitogenactivated protein kinase: Conservation of a three-kinase module from yeast to human**. Physiol. Rev. 79: 143–180,

WILLS, E.D. 1987. **Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes.** In: Snell, K.; Mullock, B. Biochemical Toxicology: A Practical Approach. Washington: IRL Press, p. 127–150.

WILSON, D.S., 1973. **Food size selection among copepods.** Ecology 54, 909–914

WOLFF, M.S., TEITELBAUM, S.L., PINNEY, S.M., WINDHAM, G., LIAO, L., BIRO, F., KUSHI, L.H., ERDMANN, C., HIATT, R.A., RYBAK, M.E., CALAFAT, A.M., 2010. **Investigation of relationships between urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols and pubertal stages in girls**. Environ. Health. Persp. 118, 1039–1046

WRIGHT, S. L., THOMPSON, R. C., GALLOWAY, T. S. 2013. **The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review**. Environ. Pollut., 178, 483-492.

ZAR, J. H. 1999. **Biostatistical analysis**. Pearson Education India, 960 p.

ZBYSZEWSKI, M., P., L. CORCORAN. 2011. **Distribution and degradation of fresh water plastic particles along the beaches of Lake Huron, Canada**. Water Air Soil Poll. 220, 365-372.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Correntes de superfície oceânicas causadas por ventos. Assinalado em azul, as zonas de convergência subtropicais, chamadas de Giros. Adaptado de Sociedade Americana de Metereologia, 2005..... 4

Figura 2: Metabolismo sugerido do DEHP em seres humanos (adaptado de Silva *et al.*, 2006)..... 8

Figura 3: Concentração de PCBs (ng/g de pellet) em pellets de plástico coletados em praias. (Teuten *et al.*, 2009)..... 10

Figura 4: Microplástico abrasivo de polietileno utilizado nos experimentos..... 14

Figura 5: Princípios Químicos do teste do ácido bicinconinico (Adaptado de Walker, 1994)..... 16

Figura 6: Princípios Químicos do teste de Bradford (Adaptado de Kruger, 1994)..... 16

Figura 7: Extração da hemolinfa de mexilhões P.perna (Ubatuba/SP) 18

Figura 8: Pontos de Coleta na região do Porto de Santos. Detalhe: Estado de São Paulo. Números de 1 a 6 representam os pontos de coleta em bancos naturais de P.perna. A estrela indica a localização do Porto de Santos 21

Figura 9: A: Canal do Porto de Santos. **B:** Ponto #2, banco natural em frente a ocupações irregulares 21

Figura 10: A: Medição dos microplásticos sob o microscópio óptico. **B**: Distribuição e frequência dos microplásticos analisados..... 23

Figura 11: A: Espectro FT-IR obtido por ATR do polietileno abrasivo usado neste trabalho. **B**: Espectro obtido por Uribe et al (2010) de polietileno de baixa densidade. Os retângulos vermelhos representam as ligações características do polietileno de baixa densidade presentes nos dois espectros. 24

Figura 12: Quantidade de ftalatos (mg/ml) liberados na água durante o período de lixiviação dos microplásticos..... 25

Figura 13: Diferentes formas de microesferas de polietileno encontradas entre grupos virgens e lixiviado. Os grupos **A, B, C** e **D** foram criados dependendo do tamanho e do número de expansões que as esferas apresentavam e seu tempo de lixiviação..... 26

Figura 14: Lipoperoxidação dos organismos controle e expostos em cada tempo de exposição. **A**: 24 horas, **B**: 48 horas, **C**: 96 horas e **D**: 144 horas. Asteriscos indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre grupos expostos e controles. 27

Figura 15: Níveis de LPO relativo (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição, diferentes concentrações e tratamentos. As barras horizontais indicam a igualdade entre tratamentos de um mesmo tempo de exposição. O asterisco representa que os grupos pertencentes a um tempo de exposição apresentam diferença significativa com os demais (p<0,05). O nível do controle é definido como 1,0. 28

Figura 16: Níveis de LPO relativo (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição, a diferentes concentrações. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. O asterisco representa que os grupos pertencentes a um tempo de exposição apresentam diferenças significativas com o restante (p<0,05). As letras representam diferenças entre grupos expostos à mesma concentração, mas em tempos diferentes. O nível do controle é definido como 1,0. 29

Figura 17: Dano ao DNA dos organismos controles e expostos em cada tempo de exposição. **A**: 24 horas, **B**: 48 horas, **C**: 96 horas e **D**: 144 horas. Asteriscos indicam diferenças significativas (p<0,05) entre grupos expostos e seus controles. 30

Figura 18: Níveis de dano ao DNA relativo (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição, concentrações e tratamentos. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. Os asteriscos representam os tempos de exposição que apresentam diferenças significativas (p<0,05) com os demais (p<0,05). O nível do controle é definido como 1,0. 31

Figura 19: Níveis de dano ao DNA relativo (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição e concentrações. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. As letras representam diferenças significativas (p<0,05) entre grupos de um mesmo tempo de exposição. Os asteriscos representam os tempos de exposição que apresentam diferenças significativas (p<0,05) com os demais. O nível do controle é definido como 1,0. 32

Figura 20: Níveis de dano ao DNA relativo (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição e diferentes tratamentos. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. As letras representam diferenças significativas (p<0,05) entre grupos de um mesmo tempo de exposição. Os asteriscos representam os tempos de exposição que apresentam

diferença significativa (p<0,05) com os demais. O nível do controle é definido como 1,0 32

Figura 21: Tempo de retenção do Vermelho Neutro dos organismos controles e expostos em cada tempo de exposição (p<0,05). **A**: 24 horas, **B**: 48 horas, **C**: 96 horas e **D**: 144 horas. Asteriscos indicam diferenças significativas (p<0,05) entre grupos expostos e seus controles. 33

Figura 22: Tempo de retenção do Vermelho Neutro Relativo (expostos/controles) em organismos expostos ao microplásticos em diferentes tempos de exposição, diferentes concentrações e tratamentos. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. Os asteriscos representam os tempos de exposição que apresentam diferença significativa (p<0,05) com os demais. As letras representam diferenças significativas (p<0,05) dentro de um tempo de exposição. O nível do controle é definido como 1,0 34

Figura 23: Tempo de retenção do Vermelho Neutro relativo (expostos/controles) em organismos expostos ao microplásticos em diferentes tempos de exposição e concentrações. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. As letras representam diferenças (p<0,05) entre grupos de um mesmo tempo de exposição. Os asteriscos representam os tempos de exposição que apresentam diferença (p<0,05) significativa com os demais. O nível do controle é definido como 1,0. 35

Figura 24: Concentração relativa de AIF-1 (expostos/controles) em organismos expostos ao microplásticos em diferentes tempos de exposição, concentrações e tratamentos. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. Os asteriscos representam os tempos de exposição que apresentam diferenças significativas com os demais. As letras representam diferenças dentro de um tempo de exposição. A seta preta representa o nível dos controles. 37

Figura 25: Concentração relativa de AIF-1 (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição. As letras representam diferenças (p<0,05) entre grupos. O nível do controle é definido como 1,0. 37

Figura 26: Concentração relativa de AIF-1 (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição e concentrações. As letras representam diferenças (p<0,05) entre grupos de um mesmo tempo de exposição. O nível do controle é definido como 1,0. 38

Figura 27: Concentração relativa de AIF-1 (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico a diferentes concentrações e tratamentos. As letras representam diferenças (p<0,05) entre grupos de um mesmo tempo de exposição. O nível do controle é definido como 1,0. 38

Figura 28: Concentração Relativa de HSP70 (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição, concentrações e tratamentos. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. Os asteriscos representam os tempos de exposição que apresentam diferença significativa (p<0,05) com o restante. As letras representam diferenças significativas (p<0,05) dentro de um tempo de exposição. O nível do controle é definido como 1,0. 40

Figura 29: Concentração Relativa de HSP70 (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição a diferentes concentrações. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. As letras representam diferenças significativas (p<0,05) dentro de um tempo de exposição. O nível do controle é definido como 1,0. 40

Figura 30: Concentração Relativa de pP38-MAPK (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição, diferentes concentrações e tratamentos. As barras horizontais representam a igualdade entre grupos de um mesmo tempo de exposição. As letras representam diferenças significativas (p<0,05) dentro de um tempo de exposição. O nível do controle é definido como 1,0. 42

Figura 31: Concentração Relativa de pP38-MAPK (expostos/controles) em organismos expostos ao microplástico em diferentes tempos de exposição. As letras representam diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos. O nível do controle é definido como 1,0. 42

Figura 32: Concentração Relativa de pP38-MAPK (expostos/controles) em organismos expostos ao microplásticos em diferentes concentrações. As letras representam diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos. O nível do controle é definido como 1,0. 43

Figura 33: Fotomicrografias do processamento da glândula digestiva. **A:** Material antes da digestão ácida. **B:** Material residual após o tratamento com ácido. **C:** Mesma imagem de **B** sob a luz polarizada, evidenciando as partículas plásticas (setas). 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativa do Consumo Diário de Ftalatos por adultos 8

Tabela 2: Latitude, longitude e descrição dos pontos de coleta da área do Porto de Santos / SP..... 21

Tabela 3: Distribuição e frequência das esferas nos diferentes grupos formados e resultado do teste qui-quadrado para cada tempo de lixiviação. 26

Tabela 4: Resultado da ANOVA para o teste de Lipoperoxidação. Quando p<0,005, o fator em questão ou interação entre fatores é significativa. 28

Tabela 5: Resultado da ANOVA para o teste de Dano ao DNA. Quando p<0,005, o fator em questão ou interação entre fatores é significativa. 31

Tabela 6: Resultados da ANOVA para o ensaio de TRVN. Quando p<0,005, o fator em questão ou interação entre fatores é significativa. 34

Tabela 7: Resultado da ANOVA para o teste de quantificação de AIF-1 por ELISA. Quando p<0,005, o fator em questão ou interação entre fatores é significativa..... 36

Tabela 8: Resultado da ANOVA para o teste de quantificação de HSP70 por ELISA. Quando p<0,005, o fator em questão ou interação entre fatores é significativa..... 39

Tabela 9: Resultado da ANOVA para o teste de quantificação de pP38 por ELISA. Quando p<0,005, o fator em questão ou interação entre fatores é significativa..... 41

Tabela 10: Latitude, longitude e descrição dos pontos de coleta da área do Porto de Santos / SP 43

LISTA DE ABREVIAÇÕES

AIF-1: Allograft Inflammatory Factor 1

ANOVA: Análise de Variância

ATR: Attenuated total reflectance (Reflectância Total Atenuada)

BCA: Bicinchoninic Acid (Ácido Bicinconínico)

DBP: Di-Butil ftalato

DEHP: Bis (2-etilexil) ftalato/ Di-Etilhexil ftalato

DIBP: Di-Isolbutil ftalato

DNA: Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucléico)

DPrP: Di-Propil ftalato

DTT: Dithiothreitol (Ditiotreitol)

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourrier)

GEF: Global Environemental Facility

HDPE: High Density Polyethylene (Polietileno de Alta Densidade)

HSP-70: Heat Shock Protein 70

JNK: c-Jun N-terminal kinases (quinase c-Jun N-terminal)

LDPE: Low Density Poliethylene (Polietileno de Baixa Densidade)

LLDPE: Linear Low-Density Polyethylene (Polietileno Linear de baixa densidade)

LPO: Lipoperoxidação

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase (Proteína-quinases ativadas por mitógenos)

MPA: Ministério da Pesca e Agricultura

NIH: National Institute of Health - USA (Instituto Nacional de Saúde - Estados Unidos)

NOAA: National Oceanic and Athmospheric Administration

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAH Polycyclic aromatic hydrocarbons (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclico)

PBS: Phospate-Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)

PCB: Polychlorinated Biphenyl (Bifenilos Policlorados)

PVC: Polyvinyl Chloride (policloreto de polivinila)

TBA: Thiobarbituric Acid (Ácido Tiobarbitúrico)

TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Susbtances (Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)

TBS: Tris-Buffered Saline (Tampão Tris Salino)

TRVN : Tempo de Retenção do Vermelho Neutro

UNEP: United Nation Environmental Programme