



**Universidade Federal de São Paulo - Unifesp
Campus Baixada Santista
Programa de Pós-graduação em Bioproductos e Bioprocessos - PPGBB**

Avaliação dos efeitos associados à interação de microplástico com o hormônio sintético 17 α Etnilestradiol e o antimicrobiano Triclosan em caranguejos da espécie *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763)

Leticia Fernanda da Silva

Santos, São Paulo
2021

Universidade Federal de São Paulo - Unifesp
Campus Baixada Santista
Programa de Pós-graduação em Bioprodutos e Bioprocessos - PPGBB

Avaliação dos efeitos associados à interação de microplástico com o hormônio sintético 17α Etnilestradiol e o antimicrobiano Triclosan em caranguejos da espécie *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763)

Leticia Fernanda da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Bioprodutos e Bioprocessos da Universidade Federal de São Paulo, como exigência para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração: Bioensaios e Ecotoxicologia

Orientador: Prof. Dr. Augusto Cesar

Coorientadora: Profa. Dra. Paloma Kachel Gusso Choueri

Santos, São Paulo
2021

**Ficha catalográfica elaborada por sistema automatizado
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

S586a

Silva, Letícia Fernanda da.

Avaliação dos efeitos associados à interação de microplástico com o hormônio sintético 17a Etinilestradiol e o antimicrobiano Triclosan em caranguejos da espécie *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763). / Letícia Fernanda da Silva; Orientador Augusto Cesar; Coorientadora Paloma Kachel Gusso Choueri. -- Santos, 2021.

100 p. ; 30cm

Dissertação (Mestrado - Pós-Graduação em Bioprodutose Bioprocessos) -- Instituto Saúde e Sociedade, Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo, 2021.

1. Micropartículas plásticas. 2. Crustáceo. 3. Fármacos e produtos de cuidados pessoais. 4. Toxicidade. 5. Carreamento. I. Cesar, Augusto, Orient. II. Título.

CDD 660.6

Dedico este trabalho à minha família que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, assim como minha amiga Thaís, que sempre estiveram me dando força e apoio para seguir em frente, especialmente durante o período de pandemia.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha família, que são a minha base e força para continuar e à minha amiga Thaís. Também agradeço ao Caio que por tantos anos vêm acreditando em mim e no meu trabalho, dando todo o suporte necessário para realizá-lo. Às vezes me faltam palavras para expressar minha gratidão. Também gostaria de agradecer imensamente à Profa. Paloma e ao Prof. Rodrigo Choueri por todo aprendizado adquirido, também por acreditar em mim.

Ao meu orientador Prof. Augusto Cesar que vêm me apoiando desde o início da minha jornada acadêmica, é uma honra poder seguir toda essa trajetória ao lado de pessoas tão importantes para mim. Também gostaria de agradecer ao Prof. Camilo Dias Seabra Pereira que também sempre esteve à disposição, assim como. Prof. Denis Abessa.

A minha imensa gratidão à Prof. Renata de Britto Mari por me acolher de braços abertos em sua equipe, me fazendo sentir parte dela desde o primeiro contato, também sendo fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado Alexandre pelo conhecimento compartilhado e pela amizade, assim como Natália e Gabriela, obrigado por sempre estarem à disposição quando precisava recorrer para sanar minhas dúvidas. Obrigada de coração à toda a equipe Labmam.

Também gostaria de agradecer à Deus, Deusas e ao Universo por tudo, toda proteção e toda a força que tive, mesmo com obstáculos ocasionados pela pandemia, sabendo que me dediquei por inteiro para que meu trabalho tivesse a qualidade que eu esperava. Apesar dos pesares acredito hoje ainda mais que vale a pena acreditar nos nossos sonhos e seguir quando temos um objetivo.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar.”

Chico Xavier

SUMÁRIO

1 Introdução geral e justificativas	1
1.1 Microplásticos.....	1
1.2 Fármacos e Produtos de Cuidados Pessoais (FPCPs)	2
1.3 Interação microplásticos e FPCPs - Problemática	3
1.4 <i>Ucides cordatus</i> como biomodelo.....	4
1.5 Biomarcadores	5
1.6 Hipótese.....	6
2 Objetivos	7
2.1 Objetivo geral	7
2.2 Objetivos específicos.....	7
Capítulo I. Microplásticos associados à fármacos e produtos de cuidados pessoais: O que biomarcadores não destrutivos podem informar sobre efeitos dessa associação?	8
1 Introdução.....	10
2 Material e métodos.....	13
2.1 Fortificação dos microplásticos	13
2.2 Quantificação de TCS e EE2 em microplástico e água.....	14
2.3 Organismo-teste	15
2.4 Bioensaio de toxicidade.....	16
2.5 Análises dos Biomarcadores.....	17
2.5.1 Peroxidação lipídica	17
2.5.2 Ensaio de Precipitação Alcalina (DNA strand breaks).....	17
2.5.3 Atividade da colinesterase	17
2.5.4 Estabilidade da membrana lisossômica	18
2.6 Análise de dados	18
3 Resultados.....	20
3.1 Quantificação de EE2 e TCS em microplástico e água.....	20
3.2 Biomarcadores	20
3.3 Abordagem integrada	25
3.3.1 PERMANOVA multivariada	25
3.4 Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR).....	25
4 Discussão	27
5 Conclusões.....	32
Referências	33

Capítulo II. Exposição à microplásticos contaminados com fármacos e produtos de cuidados pessoais: efeitos histológicos em <i>Ucides cordatus</i>	43
1 Introdução	45
2 Material e métodos	48
2.2 Identificação e quantificação de TCS e EE2 em microplástico e água	49
2.3 Desenho experimental	49
2.4 Biomarcadores morfológicos	50
2.4.1 Análises Histoanatométricas	51
2.4.2 Análises Histopatológicas	52
2.5 Análise dos dados	54
3 Resultados	55
3.1 Identificação e quantificação de EE2 e TCS em microplástico e água	55
3.2 Análises histológicas	55
4 Discussão	66
5 Conclusões	73
Referências	74
Conclusões gerais	82
Referências	83

RESUMO

Atualmente podem ser encontrados diversos tipos de resíduos nos mares e oceanos e estima-se que cerca de 90% destes resíduos sejam plásticos. Microplásticos ao serem descartados via efluentes podem vir a adsorver outros contaminantes como o hormônio sintético 17α Etinilestradiol (EE2) e o antimicrobiano Triclosan (TCS). Levando a interações que podem causar possíveis efeitos deletérios para os organismos aquáticos. Considerando este problema, o objetivo geral deste estudo foi avaliar os efeitos biológicos oriundos da interação de microplástico primário associado ao hormônio sintético anticoncepcional 17α Etinilestradiol e ao bactericida Triclosan, por meio da exposição de crustáceos Decapoda *Ucides cordatus* empregando biomarcadores subcelulares, celulares e histológicos. O objetivo geral foi perseguido a partir de objetivos específicos trabalhados dentro de dois artigos. O primeiro artigo teve o objetivo de avaliar a efetividade da hemolinfa, empregando biomarcadores (LPO, DNA strand break, ChE e TRCVN) como uma técnica não destrutiva em estudos de microplásticos e FPCPs em espécies ameaçadas. O segundo artigo teve o objetivo de avaliar alterações a nível tecidual (histopatológicas e histomorfométricas) nas brânquias desta mesma espécie. Em ambos artigos, a exposição dos organismos foi realizada em quatro tratamentos: i) água do mar (C); ii) água do mar + microplásticos virgens (MP); iii) água do mar + microplásticos virgens fortificados com 17α Etinilestradiol (MPE) e iv) água do mar + microplásticos virgens fortificados com Triclosan (MPT). Foram coletadas amostras de hemolinfa e brânquias em dois períodos distintos (3 e 7 dias) para análises de biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica. Os resultados do primeiro artigo demonstraram alterações na hemolinfa, em 3 dias relacionadas à presença de FPCPs, e em 7 dias os efeitos parecem ser aditivos, relacionados à presença dos microplásticos, demonstrando alterações no metabolismo dos organismos. No segundo artigo, alterações a nível tecidual foram mais pronunciadas em organismos expostos à tratamentos contendo FPCPs em ambos os tempos de exposição, demonstrando que o efeito carreador seja mais importante quando se trata de efeitos neste tecido.

Palavras-chave: Micropartículas plásticas; crustáceo; fármacos e produtos de cuidados pessoais; toxicidade, carreamento.

ABSTRACT

Currently, several types of waste can be found in the seas and oceans and it is estimated that around 90% of this waste is plastic. Microplastics, when discarded via effluents, may adsorb other contaminants such as the synthetic hormone 17 α Ethinylestradiol (EE2) and the antimicrobial Triclosan (TCS). Leading to interactions that could cause possible harmful effects to aquatic organisms. Considering this problem, the general objective of this study was to evaluate the biological effects arising from the interaction of primary microplastic associated with the synthetic contraceptive hormone 17 α Ethinylestradiol and the bactericide Triclosan, through the exposure of Decapoda *Ucides cordatus* crustaceans using subcellular, cellular and histological biomarkers. The general objective was pursued from specific objectives worked within two articles. The first article aimed to evaluate the effectiveness of hemolymph, using biomarkers (LPO, DNA strand break, ChE and NRRT) as a non-destructive technique in studies of microplastics and PPCPs in threatened species. The second article aimed to evaluate tissue changes (histopathological and histomorphometric) in the gills of this same species. In both articles, the exposure of organisms was carried out in four treatments: i) sea water (C); ii) sea water + virgin microplastics (MP); iii) sea water + virgin microplastics fortified with 17 α Ethinylestradiol (MPE) and iv) sea water + virgin microplastics fortified with Triclosan (MPT). Hemolymph and gill samples were collected at two different periods (3 and 7 days) for analysis of biomarkers at different levels of biological organization. The results of the first article showed alterations in the hemolymph, in 3 days related to the presence of PPCPs, and in 7 days the effects seem to be additive, related to the presence of microplastics, demonstrating alterations in the organisms' metabolism. In the second article, tissue level changes were more pronounced in organisms exposed to treatments containing PPCPs at both times of exposure, demonstrating that the carrier effect is more important when it comes to effects on this tissue.

Key words: Microplastics; crustacean; pharmaceuticals and personal care products; toxicity; transport.

1 INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVAS

1.1 Microplásticos

Os oceanos fornecem inúmeros serviços ecossistêmicos (NOAA, 2018), entretanto vem sofrendo diversos tipos de pressões antrópicas, tais como o descarte de produtos plásticos nos mares e oceanos (Duarte, 2014; Ostle et al., 2019). Estima-se que cerca de 4,8 a 12,7 milhões de toneladas métricas de partículas plásticas entram nos oceanos a cada ano (Jambeck et al., 2015; Boucher & Friot et al., 2017). De acordo com Eriksen et al., (2014), estima-se também que aproximadamente 5 trilhões de partículas plásticas pesando 268.940 toneladas encontram-se flutuando pelos mares e que cerca de 92,4% deste lixo plástico é composto por microplásticos.

Os microplásticos, são partículas plásticas que possuem tamanhos menores que 5 mm e podem ser divididos em 2 categorias: microplásticos primários, que são produzidos em tamanho micro pela indústria (Lahens et al., 2018) e microplásticos secundários, que são resultantes da fragmentação de plásticos de maiores dimensões devido à exposição a estressores ambientais (Murphy et al., 2016). Microplásticos primários, detectados no ambiente marinho, em sua grande maioria, são de origem continental (Boucher & Friot et al., 2017) e possuem como principal fonte de origem efluentes domésticos. Estima-se globalmente que 356,2 bilhões m³ de efluentes não são tratados, despejando cerca de 38 quatrilhões de micropartículas plásticas (Uddin et al., 2020) em ambientes aquáticos.

Dentre os microplásticos primários lançados por esta via estão aqueles oriundos da utilização de produtos da indústria cosmética e farmacêutica que os contêm em sua formulação. Este tipo de microplástico primário representa mais de 90% dos microplásticos desta categoria detectados no ambiente marinho (Gouin et al., 2015; Guerranti et al., 2019), contribuindo para o aumento da concentração ambiental deste tipo de contaminante que já apresenta valores variando de 1 até mais de 30 milhões de partículas por m³ em águas superficiais próximas à áreas costeiras (Mai et al., 2018), podendo chegar até áreas remotas (Lacerda et al., 2019) incluindo áreas protegidas (Dharmadasa et al., 2021).

Após serem descartadas e carreadas para o meio ambiente, essas micropartículas podem causar efeitos aos organismos que residem nesses ecossistemas, visto que aditivos

químicos que podem estar presentes nestes microplásticos e monômeros podem vir a ser liberados, contaminando o ambiente (Nobre et al., 2015).

Organismos também podem assimilar microplásticos tanto pela ingestão quanto pela respiração (Tanaka & Takada, 2016; Bour et al., 2020). Estudos demonstraram o acúmulo de microplásticos no trato gastrointestinal de caranguejos sendo identificados e quantificados em tecidos como intestino, hepatopâncreas e estômago (Waite et al., 2018; Yu et al., 2018; Costa et al., 2019).

Após a ingestão, estes microplásticos podem ainda ser translocados para outros órgãos através de fluídos corporais (Farrel & Nelson et al., 2013). O contato direto, também propiciaria que os microplásticos ficassem retidos em órgãos como brânquias (Brenneck et al., 2015; Watts et al., 2016; Waite et al., 2018; Yu et al., 2018; Costa et al., 2019; Villegas et al., 2021).

Estudos têm demonstrado que micropartículas de polietileno podem alterar proteínas (Green et al., 2019) e também levar a desestabilização de membranas lisossomais na hemolinfa de moluscos (Avio et al., 2015). Nas brânquias, efeitos têm sido observados em moluscos, como alterações em enzimas do metabolismo de xenobióticos e redução da atividade da enzima colinesterase (Avio et al., 2015; Nobre et al., 2020).

1.2 Fármacos e Produtos de Cuidados Pessoais (FPCPs)

Ambientes marinhos também têm sido afetados por outros contaminantes considerados “de preocupação emergente”, que são classificados como aqueles que podem apresentar algum risco ao ecossistema e ainda não são legislados (Montagner et al., 2017). Dentre estes contaminantes estão fármacos e antimicrobianos (Deblond et al., 2011; U.S.EPA, 2015).

O estrogênio 17 α Etilestradiol (EE2), um hormônio sintético utilizado como contraceptivo, é um fármaco de “preocupação emergente”. Como característica apresenta baixa solubilidade em água (4.8 mg/L e Kow > 3), o que assegura sua natureza hidrofóbica, apresentando também baixa degradabilidade (Adeel et al., 2017; Barreiros et al., 2016).

Estudos prévios detectaram concentrações de EE2 em estações de tratamento de efluentes em ng/L (Pessoa et al., 2014), entretanto, considerando localidades em que não há tratamento sanitário adequado, esse cenário pode ser ainda pior. Segundo Adeel et al., (2017) países da América do Sul, incluindo o Brasil, apresentam uma grande ocorrência

de estrogênios em cursos d'água que posteriormente chegam aos mares e oceanos, conforme também já detectado em estudos prévios (20 - 86 ng/g de sedimento superficial) (Pusceddu et al., 2019), podendo causar efeitos adversos à biota, como estresse oxidativo, neurotoxicidade e anormalidade em gônadas conforme já fora observado (Maranho et al, 2014; Smolarz et al., 2017; Almeida et al., 2020).

O Triclosan (TCS, 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)-fenol) é um agente bactericida, cuja produção global ultrapassa 1500 toneladas e que é utilizado pela indústria cosmética e de cuidados pessoais (Chen et al., 2012, Cortez et al, 2012; Zhang et al, 2019). Por também possuir características lipofílicas ($K_{ow} > 4$), apresenta alta persistência e poder de bioacumulação, sendo um contaminante com uma preocupação global (Binelli et al, 2011; Dhillon et al., 2015).

A presença de triclosan também já tem sido amplamente detectada em efluentes (Behera et al., 2011; Montagner et al., 2014; Mohan & Balakrishnan, 2019), em concentrações que variam de mais de 100 a mais de 200 ng/L após passarem por estações de tratamento (Halden & Paul, 2005; Yueh & Tukey, 2016). E além disso, este cenário pode ser ainda agravado em locais em que não há grande cobertura de tratamentos de esgoto.

O triclosan pode derivar em metiltriclosan, que apresenta uma maior persistência ambiental (Balmer et al., 2004; Yueh & Tukey, 2016). Estudos relatam a ocorrência de triclosan em diferentes matrizes ambientais (mais de 20 a mais de 95 ng/L em água e em sedimento até 15 ng/g) e esgotos, assim como efeitos adversos em organismos aquáticos, como aumento de atividades enzimáticas, instabilidade da membrana lisossomal, alterações no desenvolvimento embriolarval, alteração na reprodução, assim como mortalidade em algas e bactérias (Ricart et al., 2010; Peng et al, 2013; Pusceddu et al., 2018).

1.3 Interação microplásticos e FPCPs - Problemática

Estudo recente, mostrou que muitos microplásticos, ao longo de sua trajetória até os ambientes marinhos podem vir a adsorver outros contaminantes como Triclosan e 17α Etinilestradiol (Wu et al., 2016) e assim atuar como carreador destas substâncias potencialmente tóxicas à biota local.

Microplásticos fabricados a partir de polietileno poderiam aumentar as concentrações de triclosan em *Perna canaliculus*, assim como um significativo aumento

de alterações nas brânquias, como o aumento da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e peroxidação lipídica (Webb et al., 2020). Nobre et al., 2020 também observaram que microplásticos fortificados com Triclosan podem levar à alterações em *Crassostrea brasiliiana*, como desestabilização de membranas celulares.

Neste contexto, a introdução de microplásticos via emissários submarinos em zonas costeiras pode ser particularmente preocupante (Ogata et al, 2009; Zarfl & Matthies, 2010; Bakir et al, 2012; Wang et al, 2016; Guo & Wang, 2019; Ohgaki et al., 2021). Logo, estudos que abordem efeitos que possam surgir da interação de microplásticos e FPCPs, em espécies de maiores níveis tróficos, se mostram necessários.

1.4 *Ucides cordatus* como biomodelo

A espécie de caranguejo *Ucides cordatus*, endêmica de manguezal, e popularmente conhecido como caranguejo Uçá, pode ser uma das espécies suscetíveis a processos de poluição por microplásticos que possam conter FPCPs adsorvidos, visto que manguezais têm sido considerados sumidouros de microplásticos (Deng et al., 2021) sendo detectado já neste ambiente na costa brasileira (Lima et al., 2016).

Pertencente à família Ucididae, *U. cordatus* se trata de uma espécie de caranguejos semiterrestres eurialinos, que possuem a capacidade de se adaptar à um grande range de salinidade (2 - 33%) (Martinez et al., 1999). Já foi detectado o valor acima de 30 nas águas das tocas de indivíduos desta espécie em área de proteção ambiental (Pinheiro et al., 2013). As brânquias de *U. cordatus* são responsáveis pela respiração e por possuir mecanismos osmorregulatórios, também são responsáveis pela homeostase nestes ambientes (Martinez et al., 1999).

Possui ampla distribuição na costa do continente americano, apresentando grande relevância ecológica em termos de cadeia alimentar. Se trata de uma espécie protegida, que apresenta grande importância econômica como recurso pesqueiro (Buranelli et al., 2019). Logo, efeitos adversos, nesta espécie, poderiam vir a comprometer, consequentemente, a sobrevivência de quem depende direta ou indiretamente deste recurso.

Ademais, estudos têm demonstrado que esta espécie tem se mostrado como um bom organismo-teste sendo observadas alterações no DNA, como aumento na frequência de células micronucleadas, por meio de amostras de hemolinfa e alterações histológicas, sendo relevante a utilização das brânquias, que apresentaram patologias como necroses e

deformações, quando expostos à ambientes contaminados (Pinheiro et al., 2013; Duarte et al., 2016; Carvalho Neta et al., 2019). Desta maneira a utilização desta espécie e de seus respectivos tecidos podem fornecer importantes informações sobre os efeitos da contaminação por microplásticos e FPCPs.

1.5 Biomarcadores

Dentre as técnicas aplicadas para se avaliar alterações relacionadas à microplásticos e FPCPs na hemolinfa e brânquias de caranguejos, a utilização de biomarcadores, que são respostas geradas a partir da exposição de organismos a xenobióticos e tem sido amplamente empregadas.

Biomarcadores fornecem um diagnóstico precoce, ou seja, avaliam danos antes que possam ser sentidos efeitos em níveis maiores de organização biológica, como por exemplo, efeitos em níveis de populações e ecossistemas (Pereira et al., 2014; Colin et al., 2016), empregando pequenas quantidades de amostras de fluídos corporais e/ou tecidos.

Os biomarcadores podem ser classificados de acordo com fatores individuais que influenciam na resposta de organismos à exposição de determinados contaminantes, o grau em que refletem exposições de organismos a contaminantes ambientais e efeitos adversos oriundos desta exposição, podendo, portanto, ocorrer respostas em níveis bioquímicos, celulares, fisiológicos, morfológicos e comportamentais (Amorim, 2003; Pereira et al., 2014).

Dentre os biomarcadores de efeito biológico a nível subcelular e que podem refletir danos primários oriundos da perturbação ocasionada por exposição à contaminantes, estão a peroxidação lipídica, que permite avaliar o estresse oxidativo (Parolini & Binelli, 2014), assim como os ensaios de precipitação alcalina (DNA *strand-breaks*) (Gusso-Choueri et al., 2016; Nobre et al., 2020), que permite avaliar a genotoxicidade.

A quantificação da atividade da acetilcolinesterase fornece informações sobre morte celular (Zhang e Greenberg, 2012), ou seja, danos em nível celular e efeitos em níveis fisiológicos, pois sua resposta também reflete a ocorrência de neurotoxicidade (Barboza et al., 2018) que pode culminar em alterações comportamentais, como hiperatividade, asfixia e morte (Roex et al, 2003).

Da mesma maneira, alterações na estabilidade da membrana lisossômica de células também podem culminar em eventos de morte celular, com a liberação de enzimas digestivas, levando a alterações à nível de população (Lowe et al. 1992; Cortez et al., 2012).

Danos em nível tecidual, possivelmente oriundos de perturbações celulares, podem ser quantificados através de análises morfométricas e histopatológicas realizadas em órgãos alvo (Choi et al., 2018; Oliveira et al., 2019).

A combinação de biomarcadores pode fornecer um panorama mais confiável sobre os prováveis efeitos aos organismos oriundos da interação de microplásticos com FPCPs, visto que redundâncias nas medidas reduziriam a probabilidade de um falso positivo devido ao resultado de um único biomarcador, permitindo também a análise de efeitos em vários níveis de organização biológica e diferentes tecidos (Hook et al., 2014).

Tendo em vista a relevância deste assunto, principalmente com a tendência internacional da implementação de políticas de proibição de microplásticos e FPCPs em cosméticos, que entretanto ainda possui pouca atenção no Brasil, o presente estudo representa uma ferramenta que pode fornecer um maior embasamento para a criação de regulamentações que visem a gestão adequada de contaminantes de preocupação emergentes em ecossistemas marinhos e que contenham espécies ameaçadas.

1.6 Hipótese

Este estudo partiu da hipótese de que “*A presença dos microplásticos virgens e contaminados podem provocar toxicidade e consequentemente alterações nas respostas biológicas em caranguejos da espécie Ucides cordatus e estas alterações podem ser observadas em fluidos corporais desses organismos e seus respectivos órgãos respiratórios*”.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos biológicos oriundos da interação de microplástico primário associado ao hormônio sintético anticoncepcional 17 α Etnilestradiol e ao bactericida Triclosan, por meio da exposição de crustáceos Decapoda *Ucides cordatus* empregando biomarcadores bioquímicos, celulares e morfológicos.

2.2 Objetivos específicos

O objetivo geral foi perseguido através de objetivos específicos que são apresentados no formato de artigos científicos:

- Capítulo I – Resguardando o fato de que *U. cordatus* se trata de uma espécie protegida, o objetivo deste artigo foi avaliar a viabilidade da hemolinfa como uma técnica não destrutiva para se estudar efeitos oriundos da interação de microplásticos e FPCPs, sob indivíduos da espécie *U. cordatus*, através da resposta de biomarcadores celulares e subcelulares amplamente utilizados e consolidados.
- Capítulo II – Considerando as brânquias como primeiro órgão de contato com contaminantes na coluna d’água, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos nas brânquias de *U. cordatus* quando expostos à ambientes contendo microplásticos virgens e contaminados com FPCPs através de análises histopatológicas e histomorfométricas, ou seja, análises a nível tecidual.

Capítulo I. Microplásticos associados à fármacos e produtos de cuidados pessoais: O que biomarcadores não destrutivos podem informar sobre efeitos dessa associação?

Submetido e aceito para publicação na revista - *Marine Pollution Bulletin*

Letícia Fernanda da Silva^a; Caio Rodrigues Nobre^b; Beatriz Barbosa Moreno^a; Camilo Dias Seabra Pereira^{a,c}; Denis Moledo de Souza Abessa^b; Rodrigo Brasil Choueri^a; Paloma Kachel Gusso-Choueri^{b,c}; Augusto Cesar^a.

^a Departamento de Ciências do Mar, Universidade Federal de São Paulo, Campus Santos (Unifesp – Santos), Rua Carvalho de Mendonça, 144, 11070-102, Santos, São Paulo, Brasil.

^b Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Praça Infante Dom Henrique, s/n, Parque Bitaru, São Vicente, São Paulo, Brasil.

^c Departamento de Ecotoxicologia, Universidade Santa Cecília (Unisanta), Rua Oswaldo Cruz, 266, 11045-907, Santos, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Métodos para avaliar os efeitos de contaminantes em organismos marinhos, normalmente envolvem eutanásia para obtenção de amostras, entretanto técnicas não destrutivas podem ser mais apropriadas para se trabalhar com espécies ameaçadas. Neste estudo, foram avaliadas respostas biológicas de microplásticos e contaminantes emergentes. Efeitos bioquímicos e celulares (peroxidação lipídica, danos em DNA, atividade da colinesterase e estabilidade da membrana lisossomal) na hemolinfa foram analisados em um estudo cinético, em 3 e 7 dias, em *U. cordatus* expostos a microplásticos fortificados com Triclosan (TCS) e 17 α etinilestradiol (EE2). Resultados mostraram que os contaminantes produziram efeitos tóxicos em caranguejos expostos tanto aos microplásticos sozinhos (estresse oxidativo, genotoxicidade e neurotoxicidade), ou a microplásticos com TCS e EE2 adsorvidos (neurotóxicos e citotóxicos). Os resultados também demonstraram a capacidade de resposta desta abordagem, que contribui para a compreensão dos efeitos de exposição à microplásticos e poluição química sob a biota através de análises não destrutivas.

Palavras-chave: Partículas plásticas; triclosan; 17 α etinilestradiol; carreamento; *Ucides cordatus*; ecotoxicologia.

ABSTRACT

Methods to assess the effects of contaminants on marine organisms typically involve euthanasia to obtain samples, but non-destructive techniques may be more appropriate for working with threatened species. In this study, were assessed the biological responses of microplastics and contaminants of emerging concern. Biochemical and cellular effects (lipid peroxidation, DNA damage, cholinesterase activity, and lysosomal membrane stability) in hemolymph were analyzed in a kinetic study, at 3 and 7 days, in *U. cordatus* exposed to microplastics spiked with Triclosan (TCS) or 17 α -ethinylestradiol (EE2). Results showed that the contaminants were found to produce toxic effects in the crabs exposed either to the microplastics alone (oxidative stress, genotoxicity and neurotoxicity), or to microplastics with TCS or EE2 adsorbed (neurotoxic and cytotoxic). The results also demonstrate the responsiveness of this approach, which contributes to the understanding of the effects of exposure to microplastics and chemical pollution on biota through non-destructive analyses.

Keywords: Microplastics; triclosan; 17 α -ethinylestradiol; transport; *Ucides cordatus*; ecotoxicology.

1 INTRODUÇÃO

Micropartículas plásticas têm sido empregadas como esfoliantes e abrasivos em produtos cosméticos e de cuidados pessoais. Em sua maioria (93%) são fabricados a partir do polietileno (Napper et al., 2015). São facilmente carreados pela água, sendo transportados e descartados via esgoto. Ainda que parte destas microesferas possa se associar a óleos e graxas, assim como ao lodo durante o processo de decantação em estações de tratamento de efluentes, sendo posteriormente removida, outra parte pode ainda permanecer em suspensão na fração aquosa dos efluentes (Murphy et al., 2016). De acordo com o estudo de Carr et al., (2016), estimou-se que em uma estação de tratamento de águas residuais com tratamento secundário, pode realizar o lançamento diário de cerca de $0,00087 \text{ MPs.L}^{-1}$ de efluente secundário, totalizando 930 mil microplásticos em seu efluente final. Estas micropartículas, após serem descartadas via efluente, podem então percorrer longas distâncias e ter como destino matrizes ambientais. Este cenário se torna ainda mais crítico em muitas localidades, que ainda não possuem tratamento adequado ou não são totalmente eficientes (Xanthos & Walker, 2017), como é o caso do Brasil, onde cerca de 39,7% dos municípios não recebem qualquer tipo de tratamento de esgoto (IBGE, 2017).

A preocupação decorrente da presença destas microesferas no ambiente advém do fato destes materiais serem quase “onipresentes” e ao mesmo tempo potencialmente tóxicos para a biota por possuírem em sua composição aditivos químicos como retardantes de chamas, plastificantes, assim como emolientes que também podem ser liberados para o ambiente em que estiverem presentes (Von Moos et al., 2012). Além das microesferas, é sabido que efluentes sanitários podem conter outros contaminantes diversos, dentre os quais os fármacos e produtos de cuidados pessoais (FPCPs) que também não são eficientemente removidos nas estações de tratamento de efluentes, em locais em que há algum tipo de tratamento (Pereira et al., 2016), sendo em muitos casos descartados diretamente no ambiente nos esgotos brutos.

Dentre os FPCPs estão incluídas substâncias como o 17 α Etinilestradiol e o Triclosan. O 17 α Etinilestradiol (EE2) é um hormônio sintético amplamente utilizado em pílulas anticoncepcionais, e chega aos corpos hídricos tanto pela excreção, após seu uso, como também pelo descarte incorreto destas substâncias (Heberer, 2002; Cunha et al., 2016). Já o Triclosan (TCS, 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxy)-fenol) é um agente antimicrobiano amplamente utilizado em shampoos, desodorantes, entre outros produtos

de cuidados pessoais (Cortez et al, 2012). Ambas as substâncias são lipofílicas, com alto coeficiente de partição octanol-água (EE2 - Kow>3 e TCS - Kow>4) (Wu et al., 2016). Estudos vêm demonstrando a presença destas substâncias em efluentes de estações de tratamento de esgotos em diferentes países (Pessoa et al., 2014; Mohan & Balakrishnan, 2019), assim como sua ocorrência ambiental (Barreiros et al., 2016; Pusceddu et al, 2019; Pintado-Herrera et al, 2014, Montagner et al., 2014). Além disso, têm sido considerados tóxicos para organismos aquáticos (Maranho et al, 2014; Pusceddu et al., 2018; Da Silva & Abessa, 2019; Almeida et al., 2020; Xu et al., 2020). Em condição de co-ocorrência no ambiente, microplásticos podem adsorver FPCPs (Puckowski et al., 2021) e, ao longo de sua trajetória até os ambientes marinhos, podem atuar como possíveis carreadores destas substâncias potencialmente tóxicas (Wu et al. 2016), inclusive transportando-as para locais onde não há fontes de contaminação. Neste contexto, a introdução de microplásticos via emissários submarinos em zonas costeiras pode ser particularmente preocupante em termos de risco à biota.

Atualmente, os estudos que avaliam os possíveis efeitos à biota aquática relacionados tanto a micropartículas plásticas, quanto FPCPs, ou até mesmo a associação entre eles, geralmente fazem uso de técnicas letais, ou seja, existe a eutanásia dos organismos para retirada de amostras de tecidos e órgãos internos destinados às análises dos efeitos tóxicos (Aguirre-Martinez et al. 2013; Gonzalez Rey et al., 2014; Watts et al, 2016; Pedà et al., 2016; Ribeiro et al., 2017; Freitas et al., 2019; Nobre et al., 2020; Webb et al., 2020). Entretanto, levando em consideração trabalhos com espécies ameaçadas, que já apresentam uma população reduzida, o uso de ferramentas não destrutivas se mostra vantajoso (Fossi & Leonzio, 1997).

Embora possa haver algumas limitações relacionadas ao uso de ferramentas não destrutivas, como a restrição a um tipo de tecido ou a existência de uma boa correlação entre efeitos nesse tecido e em outros e os mecanismos de ação envolvidos, existem muitas vantagens como a possibilidade de amostragem de uma maior quantidade de organismos além de amostragens repetidas ao longo do tempo utilizando um mesmo indivíduo (Fossi et al., 1994). Além destas vantagens, existe ainda a questão bioética, envolvendo o bem-estar animal conforme já abrangido por legislações internacionais de países como Brasil (Brasil, 2008), Suíça, Noruega e Nova Zelândia (Passantino et al., 2021).

Ucides cordatus é típico de manguezais do continente americano, se distribuindo desde a Flórida ao Sul do Brasil (Chace & Hobbs, 1969; Buranelli et al., 2019). No Brasil

é um importante recurso pesqueiro (Carvalho Neta et al., 2019) e possui status de espécie protegida em seu período reprodutivo. Esta espécie vem sendo utilizada como um bom modelo biológico em estudos sobre poluição ambiental por ser capaz de responder à presença de contaminantes em seu ambiente (Nudi et al., 2007; Pinheiro et al., 2012, 2013; Duarte et al., 2016).

A hemolinfa, tecido que pode ser estudado através de técnicas não destrutivas, tem a função de realizar o transporte de oxigênio, nutrientes e hormônios (Vazquez et al., 2009; Fredrick et al., 2012), sendo que dentre os seus constituintes, os hemócitos possuem papel fundamental na proteção contra patógenos e xenobióticos, por meio de coagulação, encapsulação e processos de fagocitose (Liu et al., 2020). Logo o comprometimento deste tecido pode também refletir implicações em outros tecidos (Fredrick et al., 2012), e sua análise pode fornecer informações de saúde geral dos organismos (Van der Oost et al., 2003).

Estudos ecotoxicológicos utilizando hemolinfa de *U. cordatus* vêm sendo realizados para avaliação de contaminação por metais (Pinheiro et al., 2013) e status de conservação em áreas de manguezal (Duarte et al., 2016), embora ainda sejam escassos estudos sobre efeitos de FPCPs associados à microplásticos. O presente estudo objetivou avaliar a efetividade de biomarcadores na hemolinfa de *U. cordatus* como ferramentas não destrutivas aplicadas ao estudo de microplásticos e substâncias carreadas por eles.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Indivíduos da espécie *Ucides cordatus* foram expostos a quatro tratamentos: (i) água do mar e DMSO (C), (ii) água do mar + microplásticos virgens (MP), (iii) água do mar + microplásticos virgens fortificados com 17 α Etinilestradiol (MPE), e (iv) água do mar + microplásticos virgens fortificados com Triclosan (MPT). Amostras de hemolinfa foram coletadas após 3 dias e 7 dias de exposição para análise de biomarcadores (Figura 1).

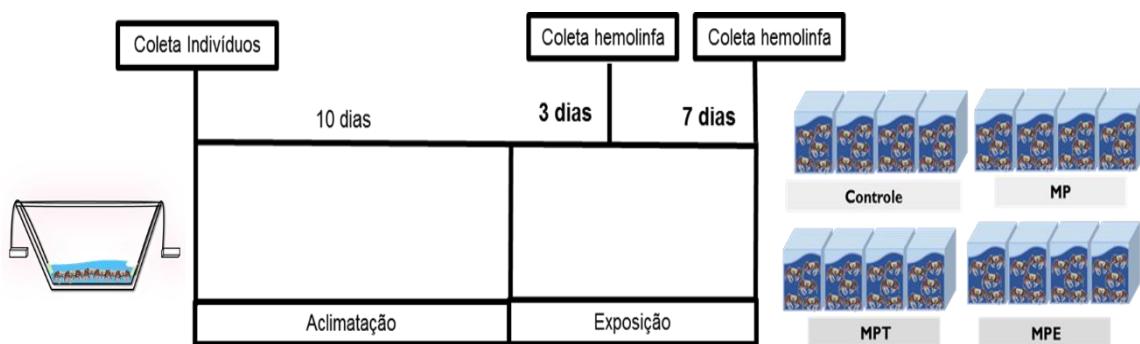


Figura 1. Desenho experimental do ensaio com *U. cordatus*. Fonte: Autores.

2.1 Fortificação dos microplásticos

Com a finalidade de promover a interação entre as partículas plásticas com FPCPs, as microesferas de polietileno (100 - 250 μm) (Braskem) foram submetidas ao procedimento de fortificação com os compostos 17 α Etinilestradiol (EE2) e Triclosan (TCS) (Sigma-Aldrich) seguindo o método de equilíbrio em lote (Wu et al, 2016) com adaptações de Nobre et al. (2020).

Primeiramente, foram preparadas soluções estoques de 1 mg/L com as substâncias EE2 e TCS. Para tanto 1 mg de cada substância, na forma de seus respectivos padrões analíticos, foi pesado em balança analítica (Mettler-Toledo), e em seguida diluídos em 0,5ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, foram avolumados em balão volumétrico com água deionizada para o volume final de 1L.

Em uma segunda etapa, pesou-se, em balança analítica, 22,5 g de microesferas plásticas, para cada substância, que foram acondicionadas juntamente com as respectivas soluções estoque em erlenmeyer de 1L devidamente cobertos para que não houvesse degradação das substâncias devido à incidência de luz.

Após o preparo, as soluções foram colocadas em agitador orbital por um período de 48 horas, a 250 rpm, a fim de atingirem o equilíbrio sortivo entre as partículas. Em seguida as microesferas foram retiradas da solução com auxílio de sistema de filtração a vácuo por membrana, utilizando filtro (Whatman GF/C) de microfibra de vidro (GE) de 1,2 µm e armazenadas em frasco âmbar em câmara fria até o início dos experimentos.

2.2 Quantificação de TCS e EE2 em microplástico e água

Análises químicas foram realizadas a partir da extração das substâncias das partículas plásticas antes e após o período de exposição (7 dias), assim como de amostras de água dos aquários também após a exposição. Para tanto foi realizada a extração seguindo-se o protocolo de extração de fase sólida (SFE) adaptado do método 1694 da *Environmental Protection Agency*, EUA (EPA, 2007).

As determinações analíticas foram realizadas por HPLC (Agilent 1260 series, *Agile Technologies*) acoplado ao espectrômetro de massa (QTRAP 3200, AB Sciex), em gradiente de acetonitrila/água 95-5% por 8 minutos, na presença dos aditivos ácido fórmico ou acetato de amônio. Foi utilizada coluna Agilent Eclipse XDB-C18 4,6X50 mm, 1,8 µm, e a análise utilizou ionização por electrospray no modo negativo (ESI-). Os espectros MS/MS resultantes foram processados e a identificação e quantificação dos analitos foram realizadas a partir da detecção das transições MRM's (*Multiple Reaction Monitoring*) da biblioteca de espectros de fragmentação (MS/MS) (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros analíticos empregados nas análises de EE2 e TCS.

Parâmetros analíticos		
Dados	EE2	TCS
Faixa de concentração da curva analítica ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	4.687 a 300	4.687 a 150
Transição MRM de quantificação	279 > 133	287 > 287
LOD ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	1,2	0,5
LOQ ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	4,0	1,7
MLOD ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	0,12	0,05
MLOQ ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	0,40	0,17

MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas; LOD – Limite de detecção; LOQ – Limite de quantificação; MLOD – Limite de detecção do método; MLOQ – Limite de quantificação do método.

2.3 Organismo-teste

Indivíduos da espécie *U. cordatus* foram coletados por meio de captura manual na Barra do Una, município de Peruíbe, São Paulo (localizado dentro Mosaico Ecológico Juréia-Itatins), uma área considerada referência em estudos de avaliação ambiental (Pinheiro et al., 2013; Duarte et al., 2016; Marinsek et al., 2018; Gonçalves et al., 2020), e em seguida foram transportados para o laboratório. No laboratório, os organismos foram aclimatados em tanques de 500L, empregando a proporção mínima de 20 litros de água do mar (previamente filtrada) e salinidade 30, para 40 organismos, expostos por submersão.

Os indivíduos foram mantidos sob forte aeração, temperatura controlada (22° C), sendo alimentados com folhas de *Rizophora mangle* em dias alternados ao longo de 10 dias. Todos os procedimentos experimentais seguiram as recomendações de ética e bem-estar animal (CEUA n. 8111041217) bem como o projeto foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unifesp (CEP n. 9816101019) e SISBIO (Processo n. 60314-1).

2.4 Bioensaio de toxicidade

O experimento foi realizado logo após o período de aclimatação, sendo realizados ao todo 4 tratamentos: I) controle com água do mar e DMSO (0,5ml/L) (C); II) água do mar com microplásticos virgens (250 mg/L) (MP); III) água do mar com microplásticos fortificados com EE2 (MPE); IV) água do mar com microplásticos fortificados com TCS (MPT). Os tratamentos foram realizados em quatro réplicas cada. Cada réplica do experimento era composta por 5 indivíduos que estavam dispostos, em aquários com capacidade para 50 litros preenchidos com 10L de água do mar (salinidade 30) a fim de que as câmaras branquiais se mantivessem úmidas, visto que se trata de organismos semiterrestres. A submersão foi escolhida devido à exposição ser realizada em aquários. A escolha da salinidade se deu ao fato de se aproximar do valor medido em campo.

Durante a realização dos experimentos, os organismos foram alimentados em dias alternados com 8g de folhas verdes de *Rizophora mangle* por aquário. O período total do experimento foi de 7 dias, sendo coletadas amostras de hemolinfa de organismos expostos em dois instantes distintos: após 3 dias de exposição (T3) e após 7 dias de exposição (T7).

Para análise de biomarcadores bioquímicos, 10 μ l de hemolinfa foram coletados na primeira articulação do primeiro quelípode de cada caranguejo com uma seringa hipodérmica de 1 ml equipada com agulha padrão de 21G – 1 $\frac{1}{4}$ (0,8 mm x 30 mm). As amostras foram armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até as análises de biomarcadores de peroxidação lipídica, danos em DNA (*strand breaks*) e atividade da colinesterase.

Para análise da estabilidade da membrana lisossômica amostras também contendo 10 μ l de hemolinfa foram coletados da primeira articulação do quelípodo de cada caranguejo com seringa e agulha hipodérmicas 21G – 1 $\frac{1}{4}$ (0,8 mm x 30 mm), entretanto as seringas continham 200 μ L de solução fisiológica para evitar respostas de estresse celular, e 300 μ L de solução anticoagulante (2,05g de glicose, 0,8g de citrato de sódio e 0,42g de cloreto de sódio diluídos em 100 ml de água destilada), visto que o fator de coagulação da hemolinfa desta espécie é muito alto o que inviabilizaria a leitura das lâminas, já que os hemócitos não absorveriam o corante (Duarte et. al, 2016). O processo de análise foi iniciado logo em seguida à coleta.

2.5 Análises dos Biomarcadores

Para a análise dos biomarcadores, a hemolinfa dos organismos foi primeiramente homogeneizada à 5 % p/v em tampão Tris-HCl (Tris 50 mM; EDTA 1 mM; DTT 1 mM; sucrose 50 mM; KCl 150 mM; PMSF 1 mM, pH 7.6).

O homogenato foi então separado para a análise de danos em DNA (25 µL) e peroxidação lipídica (150 µL). Sendo posteriormente a hemolinfa centrifugada á 4 °C e 12.000 g por 20 min e após a centrifugação sendo obtidas alíquotas do sobrenadante para avaliação da atividade da colinesterase (50 µl). O teor de proteínas totais foi mensurado para ambas as frações de acordo com método de Bradford (1976) para uso na padronização dos dados de biomarcadores.

2.5.1 Peroxidação lipídica

A análise de peroxidação lipídica foi realizada seguindo o método do ácido tiobarbitúrico (Wills, 1987). Esta determinação foi realizada através da fluorescência empregando 516 nm (excitação) e 600 nm (emissão). Os brancos e os padrões de tetrametoxipropano foram preparados em solução de homogeneização. Os resultados foram expressos em µM TBARs/mg proteínas.

2.5.2 Ensaio de Precipitação Alcalina (*DNA strand breaks*)

Os danos em DNA foram avaliados pelo método de precipitação alcalina proposto por Olive et al. (1998) utilizando curva padrão de DNA esperma de salmão para normalização dos danos e solução de Hoechst para dar luminescência à amostra. O dano foi quantificado por fluorescência, aplicando os comprimentos de onda de 360nm de excitação e 450 nm de emissão. Os resultados foram expressos em µg DNA mg⁻¹ proteína total.

2.5.3 Atividade da colinesterase

A atividade de ChE foi determinada por meio do método descrito por Ellman (1961) e adaptado por Guilhermino et al. (1996). Para a avaliação da ChE são adicionadas 20 µL da amostra, 130 µL da solução de DTNB e 50 µL da solução de iodeto de acetilcolina.

A leitura foi realizada por absorbância de 405nm por 5 minutos. Os resultados foram expressos em nmol DTNB.min⁻¹.mg proteína total⁻¹.

2.5.4 Estabilidade da membrana lisossômica

O método de análise do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro em lisossomos de hemócitos foi reproduzido conforme protocolo descrito por Martínez-Gómez et al. (2015) com adaptações de Duarte et al. (2016) para a espécie *U. cordatus*. Após a coleta, 40 µL da amostra foram colocados em lâminas de microscopia previamente tratadas com solução de Poly-L-lisina para melhor aderência das células à lâmina. As lâminas foram colocadas em uma câmara úmida e escura e deixadas incubar por 15 minutos, e após este período foi retirado o excesso e adicionados 40 µL de solução de trabalho de vermelho neutro. Após 15 minutos de incubação, foi retirado o excesso de corante e as lâminas foram cobertas com lamínulas. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico no aumento de 400x. O “endpoint” foi determinado quando 50% ou mais das células exibiam anomalias estruturais ou vazamento do corante para o citosol.

2.6 Análise de dados

A significância das diferenças entre os tratamentos foi avaliada por meio da Análise Permutacional de Variância (PERMANOVA “main test”) univariada e multivariada (Anderson, 2008), considerando dois fatores fixos: tratamento (4 níveis: C, MP, MPE e MPT) e tempo de exposição (2 níveis: 3 e 7 dias). A variáveis da matriz multivariada foram normalizadas para que tivessem igual importância na análise. Quando o teste principal apresentou resultado significativo ($p < 0,05$), foi aplicado teste a posteriori (“pairwise multiple comparisons test”) para identificar quais níveis diferiram entre si. A homogeneidade das variâncias foi analisada utilizando PERMDISP. Uma vez que o resultado da PERMANOVA é sensível à heterocedasticidade dos dados, em casos em que foi identificada, foi observado se as séries de dados, apesar da sua heterocedasticidade, possuíam locação suficientemente distintas para corroborar uma eventual diferença significativa apontada pela PERMANOVA. Todos os testes foram realizados baseados em matrizes de semelhança de distâncias Euclidianas para os dados univariados e multivariados.

Os resíduos foram permutados usando permutação irrestrita de dados brutos. Os valores de p Monte Carlo foram usados quando o número de permutações foi menor que 50 (Anderson et al., 2008). Para estas análises foi utilizado o software *PRIMER 6.0*.

Os resultados dos biomarcadores foram integrados por meio do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) proposto por Liu et al. (2013). Para isso foram criados índices, a partir da normalização de cada valor de resposta de biomarcador individual, sendo realizado por subtração do valor médio geral e dividido por seu desvio padrão. Cada valor normalizado foi então adicionado ao valor mínimo obtido para cada biomarcador (escore Z). Os índices foram calculados, cada pontuação média do biomarcador Z foi então multiplicada por uma ponderação (LPO = 2, DNA = 2, ChE = 2, TRCVN =3), designado de acordo com a importância sistêmica de cada biomarcador. Os escores de resposta do biomarcador foram plotados como gráficos de radar. Para obter o índice integrado de resposta de biomarcador (IBR), a soma de todas as pontuações de resposta de biomarcador para cada tratamento foi dividida pela soma de todas as ponderações, fornecendo o grau final de efeito para cada tratamento.

3 RESULTADOS

3.1 Quantificação de EE2 e TCS em microplástico e água

A partir das análises de quantificação de EE2 e TCS nas micropartículas, obteve-se que os microplásticos fortificados com triclosan, apresentaram uma concentração real de $10,59 \mu\text{g.g}^{-1}$ com recuperação do valor nominal de 23,83%, já aqueles fortificados com 17α etinilestradiol apresentaram o valor real de $35,40 \mu\text{g.g}^{-1}$, com recuperação da concentração nominal de 79,65%. Enquanto isso resultados da concentração nos microplásticos após a exposição apresentaram valores de $1,28 \mu\text{g.g}^{-1}$ de EE2 e $0,22 \mu\text{g.g}^{-1}$ de TCS. Também foi detectada a presença das substâncias na água dos aquários, onde foram obtidos os valores de $1,93 \mu\text{g.L}^{-1}$ de EE2 no tratamento MPE e $0,42 \mu\text{g.L}^{-1}$ de TCS no tratamento MPT.

3.2 Biomarcadores

Os resultados das análises estatísticas da PERMANOVA *main test* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. PERMANOVA calculada a partir dos dados dos biomarcadores LPO, danos em DNA, ChE e TRCVN, assim como Análise Multivariada.

Main test	df	MS	Pseudo-F	P (perm)
LPO				
Tempo	1	1,72	9,2251e ⁻²	0,759
Tratamento	3	78,914	4,2324	0,014
Tempo x Tratamento	3	24,217	1,2988	0,291
Danos em DNA				
Tempo	1	30,029	11,838	0,001
Tratamento	3	16,209	6,3897	0,001
Tempo x Tratamento	3	6,112	2,4093	0,015
ChE				
Tempo	1	3,0385	12,092	0,001
Tratamento	3	0,55858	2,2229	0,105
Tempo x Tratamento	3	0,94447	3,7586	0,026
TRCVN				
Tempo	1	26036	214,68	0,001
Tratamento	3	11091	91,452	0,001
Tempo x Tratamento	3	1898,1	15,651	0,001
Análise Multivariada				
Tempo	1	30,029	11,838	0,001
Tratamento	3	16,209	6,3897	0,001
Tempo x Tratamento.	3	6,112	2,4093	0,015

LPO – Peroxidação lipídica; ChE – atividade da enzima colinesterase; TRCVN – tempo de retenção do corante vermelho neutro.

O resultado das análises PERMDISP mostraram que as dispersões dos dados de LPO, ChE e multivariados são homogêneas (Figuras, 2, 3 e 6), portanto não influenciam nos resultados da PERMANOVA.

Já os resultados das análises realizadas para Danos em DNA e TRCVN mostraram heterogeneidade das dispersões das variâncias entre os grupos, muito embora as diferenças apontadas pela PERMANOVA provavelmente revelem mais uma diferença entre as séries de dados, devido à distância entre as médias, do que uma heterogeneidade das variâncias (Figuras 4 e 5).

A PERMANOVA identificou tanto para os dados de LPO como para danos em DNA um efeito significativo apenas do fator tratamento. Os testes pareados mostraram diferença significativa entre o tratamento MP e todos os outros tratamentos (C, MPE e MPT) para LPO, e diferença apenas entre MP e C para danos em DNA (Figuras 2 e 3).

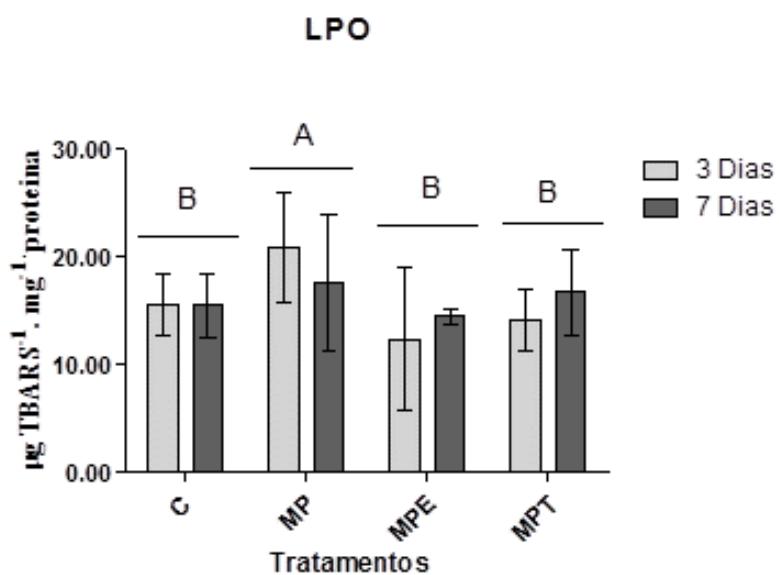


Figura 2. Média e desvio padrão dos níveis de LPO nos diferentes tratamentos, após 3 (barras cinzas claras) e 7 dias (barras cinzas escuras) de exposição. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre tratamentos independentes do tempo ($p<0,05$).

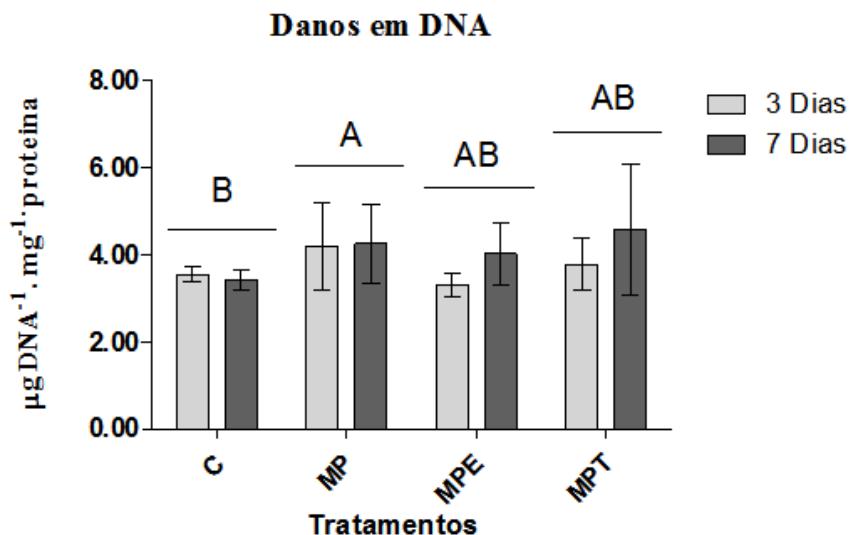


Figura 3. Média e desvio padrão dos níveis de danos em DNA nos diferentes tratamentos, após 3 (barras cinzas claras) e 7 dias (barras cinzas escuras) de exposição. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre tratamentos independentes do tempo ($p<0,05$).

Já as respostas de AChE e TRCVN sofreram efeito interativo do tratamento e do tempo de exposição, ou seja, para estas respostas os tratamentos apresentam diferenças significativas, porém dependentes do tempo de exposição, e/ou os tempos de exposição apresentam diferenças, porém apenas em alguns tratamentos. Para a ChE (Figura 4), após 3 dias de exposição, a exposição ao microplástico mais o hormônio (MPE) induziu a atividade da enzima em relação à exposição apenas ao microplástico (MP). Já após 7 dias, a ChE teve sua atividade inibida em todos os tratamentos em relação ao controle. A comparação entre tempos de exposição mostra uma inibição significativa da ChE no maior tempo de exposição, porém apenas nos tratamentos de microplástico mais EE2 ou TCS.

Quanto à estabilidade das membranas lisossômicas (TRCVN) (Figura 5), tanto aos 3 como após 7 dias de exposição, não foi observado efeito do MP sozinho, mas sim uma significativa redução do tempo de retenção do corante nos tratamentos de MP com a adição tanto de EE2 e TCS. Já o tempo de exposição influenciou no TRCVN em todos os tratamentos, inclusive no controle, pela redução dos tempos.

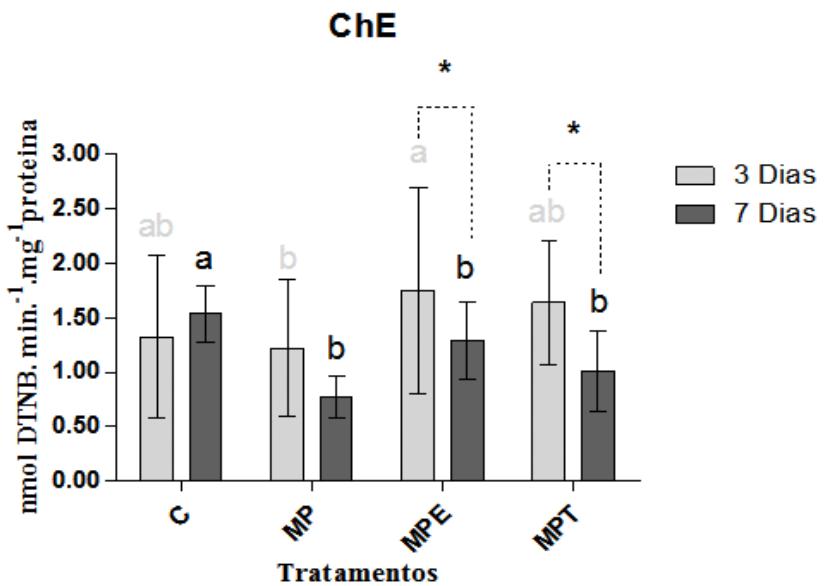


Figura 4. Média e desvio padrão da atividade da ChE nos diferentes tratamentos, após 3 (barras cinzas claras) e 7 dias (barras cinzas escuras) de exposição. Letras cinzas claras mostram comparações entre as barras cinza clara e as letras cinzas escuras mostram comparações entre barras cinzas escuras. Letras diferentes representam diferenças significativas entre tratamentos ($p<0,05$). Asteriscos representam diferenças significativas entre barras cinzas claras e escuras em um mesmo tratamento ($p<0,05$).

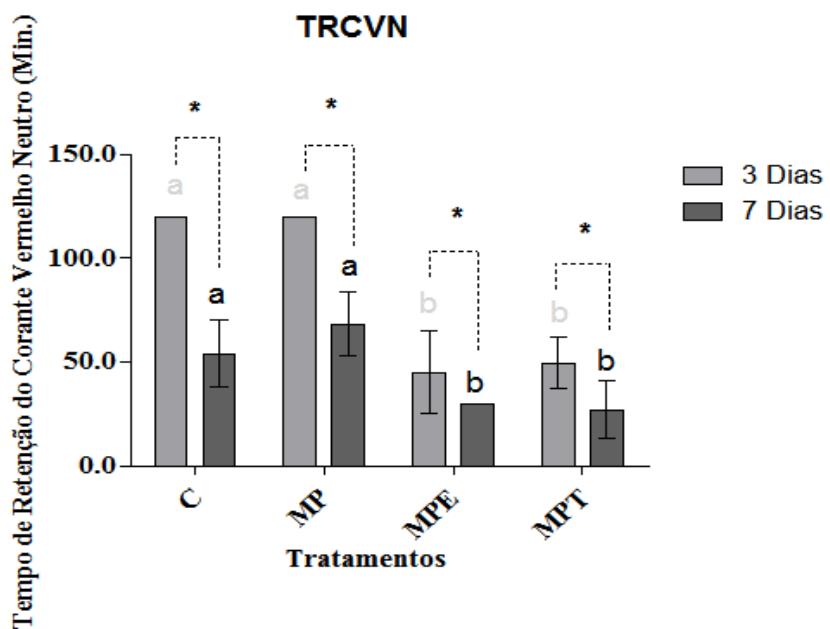


Figura 5. Média e desvio padrão do Tempo de Retenção do Vermelho Neutro nos diferentes tratamentos, após 3 (barras cinzas claras) e 7 dias (barras cinzas escuras) de exposição. Letras cinzas claras mostram comparações entre as barras cinza clara e as letras cinzas escuras mostram comparações entre barras cinzas escuras. Letras diferentes representam diferenças significativas entre tratamentos ($p<0,05$). Asteriscos representam diferenças significativas entre barras cinzas claras e escuras em um mesmo tratamento ($p<0,05$).

3.3 Abordagem integrada

3.3.1 PERMANOVA multivariada

Considerando a estrutura multivariada das respostas observadas, os resultados da PERMANOVA multifatorial demonstraram efeitos do tempo, tratamento, assim como da interação entre estes fatores, sendo então realizados testes pareados a posteriori para este último termo. O teste pareado mostrou, aos 3 dias de exposição, uma ausência de diferença significativa do conjunto de biomarcadores entre C e MP, e entre MPE e MPT, porém com diferenças significativas entre estes 2 grupos de tratamentos. Já aos 7 dias, apenas o tratamento controle difere dos demais tratamentos. O tempo produz efeitos na estrutura multivariada dos dados em todos os tratamentos, exceto para MP junto com TCS.

3.4 Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR)

Os resultados do IBR corroboram os achados da PERMANOVA e demonstraram que as respostas mudaram ao longo do tempo de exposição (Figura 6). Aos 3 dias de exposição (Figura 6a) observam-se altos valores de LPO e DNA apenas para o tratamento MP, os tratamentos contendo microplásticos fortificados com FPCPs (MPE e MPT) demonstraram a mesma tendência, ou seja, indução da atividade da enzima ChE e diminuição da estabilidade da membrana lisossômica, e isso se evidencia a partir dos valores de alteração obtidos (Tabela 3), onde os tratamentos com a presença de MPs fortificados apresentam maiores índices em relação controle.

Quando analisados os resultados do IBR para os indivíduos expostos após 7 dias (Figura 6 b), existem algumas alterações em relação ao IBR de 3 dias de exposição. A atividade da enzima ChE passa a ser inibida em todos os tratamentos com MP (MP, MPE e MPT) e estes mesmo tratamentos também tendem a apresentar valores maiores de dano em DNA. A estabilidade da membrana lisossômica apresenta o mesmo padrão anterior e é afetada significativamente em MPE e MPT, o que tende nos scores obtidos (Tabela 3) onde os MPs associados a EE2 e TCS apresentam valores maiores em comparação ao grupo controle e microplástico.

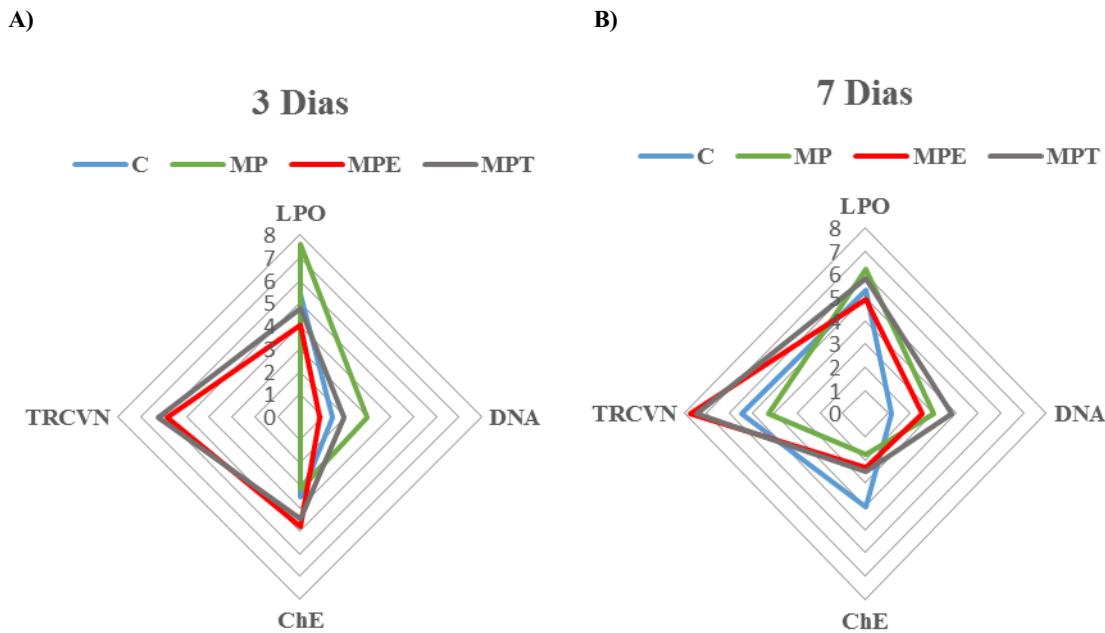


Figura 6. Respostas integradas dos biomarcadores em amostras de hemolinfa demonstrando o comportamento dos biomarcadores por tratamento com o passar do tempo.

Tabela 3. Índice integrado de respostas de biomarcadores (IBR) proposto por Liu et al. (2013) em hemolinfa de *U. cordatus*, os valores apresentados foram obtidos por meio do cálculo do índice para cada tratamento nos diferentes tempos.

	IBR	
	3 Dias	7 Dias
C	1,1443	1,7726
MP	1,5202	1,7010
MPE	1,7261	1,9405
MPT	1,9350	2,1820

IBR – Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores; C – Controle; MP – água + micropplásticos virgens; MPE – água + micropplásticos virgens fortificados com 17 α -etinilestradiol; MPT – água + micropplásticos virgens fortificados com Triclosan.

4 DISCUSSÃO

A exposição a microplásticos virgens ou fortificados com contaminantes, como FPCPs, pode gerar respostas em organismos aquáticos, induzindo alterações metabólicas e fisiológicas. Quando analisados os resultados de forma univariada bifatorial, danos oxidativos nos organismos da espécie *Ucides Cordatus* puderam ser observados nos indivíduos expostos apenas aos microplásticos sem fortificação com FPCPs, não havendo influência do tempo de exposição. Sabe-se, de acordo com a literatura, que caranguejos podem translocar microplásticos oriundos de outros órgãos para a hemolinfa, assim como metabólitos destes xenobióticos (Farrel & Nelson 2013). Logo, conforme estudo de Donovan et al., 2018, injúrias mecânicas no tecido poderiam ser causadas por essas partículas. Além disso, aditivos que possam estar presentes na composição destas micropartículas (estabilizadores, retardantes de chama, cargas e pigmentos) (Rochman, 2015) poderiam ser liberados (Nobre et. al., 2015), ocasionando possivelmente danos químicos nos organismos (Wu et al., 2011).

Na hemolinfa, aditivos liberados assim como as próprias micropartículas e seus metabólitos passariam então por processos de endocitose, visto que, apesar de não possuir funções específicas de acúmulo e estocagem, este tecido têm importante função no sistema imune destes organismos, possuindo como células principais para esta função os hemócitos, responsáveis por processos de endocitose que se mostram particularmente importantes quando se trata de estresse oxidativo (Browne et al., 2008; Canesi & Procházková, 2014).

Após a assimilação dos contaminantes, se iniciaria o processo de digestão nos lisossomos, havendo a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Van der Oost, et al., 2003). EROS são produzidas naturalmente por organismos como resultados de processos metabólicos como a respiração na qual ocorre a redução parcial do oxigênio (Sardina et al., 2012), entretanto a elevada produção de EROS pode levar a danos como a degradação oxidativa de lipídios presentes nas membranas celulares, havendo o comprometimento de suas funções.

Além disso, os microplásticos podem ser assimilados pelos hemócitos através da via endocítica mediada por proteínas transmembranas, formando vesículas que são direcionadas para o retículo endoplasmático (GESAMP, 2016). Nesse processo, substâncias orgânicas presentes nos microplásticos podem ativar as enzimas responsáveis pela biotransformação de xenobióticos, servindo como um fator adicional na geração

EROs e contribuindo para desequilibrar o sistema de defesa antioxidantante (Van der Oost et al., 2003; Nobre et al., 2020). Embora hemócitos contenham enzimas antioxidantantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx) (Winston et al., 1996), quando EROs estão em grandes quantidades a ação do sistema antioxidantante pode não ser suficiente para evitar o estresse oxidativo, havendo oxidação das estruturas e moléculas celulares, os que pode ser medido pelos altos níveis de LPO em hemócitos de organismos expostos a microplásticos virgens.

Os organismos dos tratamentos contendo apenas microplásticos apresentaram não apenas maiores níveis de lipoperoxidação, mas também maiores danos em DNA, reforçando a sugestão de que as respostas antioxidantantes podem não estar sendo suficientes para lidar com o estresse oxidativo gerado pelos MP. As EROs, ao interagir com macromoléculas celulares por meio da oxidação, modificação e ligação com bases nitrogenadas, também podem provocar alterações no DNA (Gonzalez-Hunt et al., 2018). Além disso, produtos finais da peroxidação lipídica também possuem capacidade de interação com o material genético, induzindo quebras nas fitas de DNA (Eckl & Bresgen et al, 2017).

Nobre et al. (2020) reportaram que microplásticos virgens, mesmo sem a presença de contaminantes associados, provocaram efeitos nas enzimas do metabolismo de orgânicos, como a modulação de glutationa-S-transferase (GST), e efeitos citotóxicos, como aumento da atividade da enzima colinesterase e redução no tempo de retenção do corante vermelho neutro, em ostras-do-mangue. Além disso, a toxicidade de microplásticos virgens também foi relatada em outros estudos, com efeitos variando desde níveis subcelulares, como alterações em enzimas do sistema antioxidantante, até teciduais, como a presença de patologias em tecidos como intestino e tubos digestivos (Avio et al., 2015; Nobre et al., 2015; Paul-Pont et al., 2016; Pittura et al., 2018).

No presente estudo, também foram observados efeitos sobre a atividade das colinesterases (ChE), enzimas ligadas à membranas citoplasmáticas e terminações nervosas. Os resultados obtidos para essa enzima indicam um efeito neurotóxico (inibição da ChE) após 7 dias de exposição, associado à exposição aos microplásticos, tanto virgens como FPCPs adsorvidos. A inibição da ChE já foi reportada anteriormente frente a exposição à partículas de poliestireno, como na hemolinfa da espécie de molusco *Mytilus galloprovincialis* (Brandts et al., 2018). Tais efeitos poderiam estar relacionados à presença aditivos químicos, que também apresentariam a capacidade de reduzir a atividade desta enzima, como já observado em caranguejos e peixes expostos à

plastificantes e retardantes de chamas, havendo a possível competição por sítios de ligação com a acetilcolina (Minier et al., 2008; Fu et al., 2018).

Os efeitos relacionados aos FPCPs utilizados no presente estudo podem também estar relacionados ao fato destes compostos também terem a habilidade de realizar esta competição, conforme fora observado para TCS (Pullaguri et al., 2020). Além disso, para EE2 aumentos na concentração deste hormônio, podem reduzir a atividade desta enzima em invertebrados marinhos como poliquetas, podendo apresentar um aumento da atividade em menores concentrações (Maranho et al., 2014). Portanto, assim como evidenciado no presente estudo e corroborado por estudos pretéritos, os microplásticos e FPCPs podem causar efeitos neurotóxicos sobre a biota marinha.

Efeitos citotóxicos foram observados no presente estudo através dos resultados do TRCVN, que avalia a integridade da membrana lisossomal. Nos tratamentos de exposição a microplásticos fortificados com FPCPs (MPT e MPE), os hemócitos de *U. cordatus* apresentaram maior comprometimento da integridade das membranas lisossômicas em relação ao controle e ao MP. Estudos pretéritos já reportaram distúrbios nas membranas lisossomais frente a exposição de microplásticos contaminados com FPCPs e também diante da exposição apenas ao TCS e ao EE2 (Canesi et al., 2007; Cortez et al., 2012; Nobre et al., 2020).

No caso do TCS, estes efeitos ocorrem provavelmente porque além de inibir a síntese de ácidos graxos e prejudicar a função mitocondrial (Newton et al., 2005), seu efeito antibacteriano resulta em uma desestabilização estrutural das membranas celulares, o que acaba por afetar sua integridade funcional (Villalaín et al., 2001). Já o EE2 pode causar a perda da estabilidade pois estrogênios, como 17β Etnilestradiol (E_2) do qual o EE2 é derivado, teriam como alvo, na hemolinfa de invertebrados como mexilhões, o aparato lisossomal dos hemócitos, podendo levar à alterações em vias de sinalização como as mediadas por quinases (MAPK), assim como levar à um aumento de cálcio na hemolinfa, o que ativaría enzimas que degradam membranas lipídicas e são cálcio-dependentes, como a fosfolipase A2 (Burlando et al., 2002; Canesi et al., 2004).

Tais resultados são preocupantes, pois este biomarcador é considerado um indicador de “bem-estar” da célula, portanto refletindo em um resultado precoce de efeitos adversos mais graves (Binelli et al., 2009, Moore et al., 2007). A integridade ou estabilidade da membrana lisossomal já foi associada a efeitos em diferentes níveis de organização biológica, partindo de efeitos subcelulares (Dailianis et al., 2003; Pereira et al., 2011; Moore et al., 2006a; Pereira et al., 2007, 2012) a efeitos ao nível da população e

comunidade. Estes últimos se devem à relação direta entre alteração da integridade lisossomal e a perda de viabilidade de gametas (Ringwood et al., 2004) e atrofia do tecido reprodutivo, culminando na redução do potencial reprodutivo (Moore e Viarengo, 1987; Allen e Moore, 2004).

A PERMANOVA mostrou que, em conjunto, as respostas de biomarcadores de *U. cordatus* expostos apenas a MP, em curto prazo (aos 3 dias de exposição), não se diferenciam do conjunto de biomarcadores observados nos organismos do tratamento controle. No entanto, já em 3 dias, os organismos expostos a MP contaminados com FPCPs, embora sem diferença entre os efeitos produzidos pelos MP contaminados com EE2 e TCS. Porém, ambos apresentam respostas significativamente diferentes dos tratamentos controle e MP.

Já em 7 dias, todos os tratamentos contendo MP, contaminados ou não, apresentam uma resposta multivariada diferente do controle. Isso sugere que os FPCPs provocam um conjunto de respostas suficientemente diferente do controle já em uma exposição de curto prazo. Isso evidencia que microplásticos podem agir como vetores de FPCPs, conforme também demonstrado pelos resultados da quantificação das substâncias nas micropartículas, assim como sua liberação na água dos aquários, sendo que poderiam também causar exposição via efeito Cavalo de Tróia (Trevisan et al., 2020).

Vários parâmetros podem influenciar nos processos de sorção de FPCPs em microplásticos, como pH, salinidade, Kow, tipo de polímero e sua cristalinidade, além do potencial iônico (Puckowski et al., 2021) além disso por se encontrarem ligados à superfície das micropartículas, alterações de parâmetros, como o pH, poderiam promover, em primeira instância, a dessorção destas substâncias também dentro do organismo. É possível então que microplásticos possam transferir poluentes ambientais para organelas alvo (Trevisan et al., 2020), conforme observado, para o TCS e EE2, que mostraram efeitos significativos relacionados à desestabilização de membranas celulares, apresentando, portanto, efeitos mais severos, oriundos de uma ação combinada à ação dos microplásticos virgens.

A análise multivariada mostrou ainda que os MPs isoladamente, apesar de não produzir um conjunto de efeitos suficientemente diferente do controle em exposição curta, ele sim produz efeitos, porém em prazo mais longo. Além disso, em 7 dias o efeito provocado pelo MP sozinho e MP contaminado com FPCPs se assemelham, logo as micropartículas virgens passam a influenciar na resposta dos biomarcadores e não somente os FPCPs como pôde ser observado em 3 dias. Estes padrões apresentados pela

análise estatística multivariada podem ser observados visualmente a partir da integração dos dados de biomarcadores por IBR, que demonstra que em exposições de curta duração, mesmo que a exposição a microplásticos virgens leve a alterações em níveis subcelulares, de forma integrada sua resposta é mais próxima do controle do que a resposta provocada pelos MPs contaminados com FPCPs. Já estes demonstram efeitos muito parecidos entre si, tanto aos 3 quanto aos 7 dias de exposição, destacando-se especialmente efeitos em níveis maiores de organização biológica (citotóxicos e neurotóxicos).

Os resultados relacionados à biomarcadores no presente estudo demonstram que tanto microplásticos virgens, quanto fortificados com FPCPs induziram alterações na hemolinfa de *Ucides cordatus*, após 3 ou 7 dias de exposição, ressaltando, portanto, a confiabilidade e importância da realização de estudos contemplando diferentes tempos de exposição, pois esta variação temporal permite demonstrar que as respostas a MPs sozinhos ou associados a FPCPs apresentam diferenças ao longo do tempo.

Análises empregando técnicas letais têm sido realizada para análise de efeito de contaminantes ambientais em *U. cordatus* (Carvalho-Neta et al., 2019; Oliveira et al., 2019; Jesus et al., 2020), muito embora resultados preliminares considerando alterações na hemolinfa no presente estudo, demonstram que estes organismos podem sim ser significativamente afetados pela contaminação por microplásticos e FPCPs. A hemolinfa, circula por todos os órgãos nesta espécie, logo danos neste fluido podem vir a alterar a oxigenação e transporte de nutrientes para outros órgãos, o que pode levar até mesmo ao surgimento de patologias, além de afetar a imunidade inata nestes organismos, que possui a hemolinfa como detentora das principais células de defesa, os tornando mais suscetíveis à contaminantes ambientais e patógenos.

O estudo da hemolinfa como órgão alvo do efeito de microplásticos e FPCPs, fornecem resultados preliminares e que poderiam sustentar a utilização da hemolinfa como uma ferramenta não destrutiva e responsável. Também se mostra importante por colaborar para manutenção de populações desta espécie ameaçada, como uma técnica não-destrutiva, servindo de subsídio para avaliar o risco ecológico com base em espécies protegidas como *U. cordatus*.

5 CONCLUSÕES

- A partir da metodologia empregada e dos resultados obtidos pode-se concluir que houveram alterações metabólicas em organismos da espécie *U. cordatus* expostos à microplásticos e FPCPs.
- A análise de biomarcadores empregando amostras de hemolinfa permitem a identificação e estimativa de efeitos celulares e subcelulares, assim como a influência do tempo, que provocam as alterações no metabolismo dos organismos.
- A utilização desta técnica não destrutiva, resguarda questões éticas e de bem-estar animal.

REFERÊNCIAS

- Aguirre-Martinez, G.V., DelValls, T.A., Martín-Díaz, L.M., 2013. *Identification of biomarkers responsive to chronic exposure to pharmaceuticals in target tissues of Carcinus maenas*. Mar. Env. Res. 87-88, 1-11..
- Allen, J.I., Moore, M.N., 2004. *Environmental prognostics: is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation*. Mar. Environ. Res. 58, 227-232..
- Almeida A., Silva, M.G., Soares, A.M.V.M., Freitas, R., 2020. *Concentrations levels and effects of 17alpha-Ethinylestradiol in freshwater and marine waters and bivalves: A review*. Env. Res. 185, 109316. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109316>.
- Anderson, M. J., Gorley, R. N., Clarke, K. R., 2008. *Permanova for Primer: Guide to software and statistical methods*. Plymouth, UK: Primer-e.
- Avio, C.G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., Regoli, F., 2015. *Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels*. Environ. Pollut. 198, 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.021>.
- Barreiros, L., Queiroz, J.F., Magalhães, L. M., Silva, A.M.T., Segundo, M.A., 2016. *Analysis of 17-β-estradiol and 17-α-ethinylestradiol in biological and environmental matrices - A review*. Microchem. J. 126, 243-262. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.12.003>.
- Binelli, A., Cogni, D., Parolini, M., Riva, C., Provini, A., 2009. *In vivo experiments for the evaluation of genotoxic and citotoxic effects of Triclosan in Zebra mussel hemocytes*. Aquat. Toxicol. 91, 238-244. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.11.008>.
- Bradford, M.M., 1976. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brandts, I., Teles, M., Gonçalves, A.P., Barreto, A., Franco-Martinez, L., Tvarijonaviciute, A., Martins, M.A., Soares, A.M.V.M., Tort, L., Oliveira, M., 2018. *Effects of nanoplastics on Mytilus galloprovincialis after individual and combined exposure with carbamazepine*. Sci. Tot. Environ. 643, 775–784. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.257>.
- Brasil., 2008. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União [Internet]. Brasília. Seção 1. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm; (acessado: 21.07.2021).

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.
<https://doi.org/10.1021/es800249a>.

Buranelli, R.C., Felder, D.L., Mantelatto, F.L., 2019. *Genetic diversity among populations of the Western Atlantic mangrove crab Ucides cordatus (Linnaeus, 1763) (Decapoda: Brachyura: Ocypodidae): evidence for panmixia and useful data for future management and conservation. J. Crustacean Biol.* 39, 386-395.
<https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruz036>.

Burlando, B., Marchi, B., Panfoli, I., Viarengo, A., 2002. *Essential role of Ca^{2+} -dependent phospholipase A₂ in estradiol-induced lysosome activation. Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, C1461- C1468. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00429.2001>.

Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Lorusso, L.C., Marchi, B., Burattini, S., Falcieri, E., Gallo, G., 2004. *Rapid effects of 17 β -estradiol on cell signaling and function of Mytilus hemocytes. Gen. Comp. Endocrinol.* 136, 58-71.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2003.12.003>.

Canesi, L., Lorusso, L.C., Ciacci, C., Betti, M., Rocchi, M., Pojana, G., Marcomini, A., 2007. *Immunomodulation of Mytilus hemocytes by individual estrogenic chemicals and environmentally relevant mixtures of estrogens: in vitro and in vivo studies. Aquat. Toxicol.* 81, 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.10.010>.

Canesi, L., Procházková, P., 2014. Chapter 7 - *The Invertebrate Immune System as a Model for Investigating the Environmental Impact of Nanoparticles. In: Boraschi, D., Duschl, A. (eds) Nanoparticles and the Immune System. Academic Press.* 91-112.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408085-0.00007-8>.

Carr, S.A., Liu, J., Tesoro, A.G., 2016. *Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. Water Res.* 91, 174–182.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.01.002>.

Carvalho Neta, R.N.F., Mota Andrade, T.S.O., de Oliveira, S.R.S., Torres Junior, A.R., da Silva Cardoso, W., Santos, D.M.S., Dos Santos Batista, W., de Sousa Serra, I.M.R., Brito, N.M., 2019. *Biochemical and morphological responses in Ucides cordatus (Crustacea, Decapoda) as indicators of contamination status in mangroves and port areas from northern Brazil. Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 26, 15884-15893.
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-04849-0>.

Chace, F.A. Hobbs, H.H. 1969. *The freshwater and terrestrial decapod crustaceans of the West Indies with special reference to Dominica. Bull. U.S. Natl. Mus.* 292, 1–258.
<https://doi.org/10.5479/si.03629236.292.1>.

Cortez, F.S., Pereira, C.D.S., Santos, A.R., Cesar, A., Choueri, R.B., Martini, G.A., Bohrer-Morel, M.B., 2012. *Biological effects of environmentally relevant concentrations of the pharmaceutical Triclosan in the marine mussel Perna perna (Linnaeus, 1758)*. Environ. Pollut. 168, 145–150.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.04.024>.

Cunha, D. L., Silva, S.M.C., Bila, D.M., Oliveira, J. L.M., Sarcinelli, P. N., Larentis, A. L., 2016. *Regulation of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol in water bodies in Europe, the United States, and Brazil*. Cadernos de Saúde Pública. 32, e00056715.
<https://doi.org/10.1590/0102-311X00056715>.

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*. Mar. Environ. Res. 56, 443-470.
[https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(03\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(03)00005-9).

Da Silva, A.Q., de Souza Abessa, D.M., 2019. *Toxicity of three emerging contaminants to non-target marine organisms*. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 26, 18354–18364.
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-05151-9>.

Donovan, S., Mestre, N.C., Abel, S., Fonseca, T.G., Carteny, C.C., Cormier, B., Keiter, S.H., Bebianno, M.J., 2018. *Ecotoxicological effects of chemical contaminants adsorbed to microplastics in the Clam Scrobicularia plana*. Front. Mar. Sci. 5, 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00143>.

Duarte, L.F.A., Souza, C.A., Nobre, C.R., Pereira, C.D.S., Pinheiro, M.A.A., 2016. *Multi-level biological responses in Ucides cordatus (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ucididae) as indicators of conservation status in mangrove areas from the western atlantic*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 133, 176-187.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.07.018>.

Eckl, P.M., Bresgen, N., 2017. *Genotoxicity of lipid oxidation compounds*. Free Radic. Biol. Med. 111, 244-25. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.002>.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres-Jr, V., Featherstone, R.M., 1961. *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochem. Pharmacol. 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).

EPA, 2007b. Method 1694: *Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/ MS* EPA821-R-08-002. < https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-10/documents/method_1694_2007.pdf (accessado: 20.07.2021).

Farrel, P., Nelson, K., 2013. *Trophic level transfer of microplastic: Mytilus edulis (L.) to Carcinus maenas (L.)*. Environ. Pollut. 177, 1-3.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.01.046>.

- Fossi, M.C., 1994. *Nondestructive biomarkers in ecotoxicology*. Environ. Health Perspect. 102, Suppl 12, 49-54. <https://doi.org/10.1289/ehp.94102s1249>.
- Fossi, M.C., Savelli, C., Marsili, L., Casini, S., Jimenez, B., Junin, M., Castello, H., Lorenzani, J.A., 1997. *Skin biopsy as a nondestructive tool for the toxicological assessment of endangered populations of pinnipeds: preliminary results on mixed function oxidase in Otaria flavescens*. Chemosphere, 35, 1623-1635. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00244-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00244-0).
- Fredrick, W.S., Ravichandran, S., 2012. *Hemolymph proteins in marine crustaceans*. Asian. Pac. J. Trop. Biomed. 2, 496-502. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60084-7](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60084-7).
- Freitas, R., Coppola, F., Costa, S., Manzini, C., Intorre, L., Meucci, C., Soares, A.M.V.M., Pretti, C., Solé, M., 2019. *Does salinity modulates the response of Mytilus galloprovincialis exposed to triclosan and diclofenac?* Environ. Pollut. 251, 756–765. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.115>.
- Fu, H., Xia, Y., Chen, Y., Xu, T., Xu, L., Guo, Z., Xu, H., Xie, H.Q., Zhao, B., 2018. *Acetylcholinesterase Is a Potential Biomarker for a Broad Spectrum of Organic Environmental Pollutants*. Environ. Sci. Technol. 52, 8065-8074. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04004>.
- GESAMP, 2016. *Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: part two of a global assessment*. In: Kershaw PJ, Rochman CM (eds) IMO/FAO/UNESCO IOC/UNIDO/WMO/ IAEA/UN/UNEP/UNDP joint group of experts on the scientific aspects of marine environmental protection. Reports and studies series. GESAMP No. 93, International Maritime Organization, London, p 220.
- Guilhermino, L., Lopes, M. C., Carvalho, A. P., Soared, A. M. 1996. *Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile Daphnia magna*. Chemosphere. 32, 727-738. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(95\)00360-6](https://doi.org/10.1016/0045-6535(95)00360-6).
- Gonçalves, A.R.N., Marinsek, G.P., Abessa, D.M.S., Mari, R.B., 2020. *Adaptative responses of myenteric neurons of Sphoeroides testudineus to environmental pollution*. Neurotoxicology. 76, 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.10.008>.
- Gonzalez-Hunt, C.P., Wadhwa, M., Sanders, L.H., 2018. *DNA damage by oxidative stress: Measurement strategies for two genomes*. Curr. Opin. Toxicol. 7, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.11.001>.
- Gonzalez-Rey, M., Mattos, J.J., Piazza, C.E., Bainy, A.C.D., Bebianno, M.J., 2014. *Effects of active pharmaceutical ingredients mixtures in mussel Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol. 153, 12-26. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.02.006>.

Heberer, T., 2002. *Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data.* *Toxicol. Lett.* 131, 5–17. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00041-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00041-3).

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, Diretoria de Pesquisas, 2017. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico - Abastecimento de água e Esgotamento sanitário. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/30/84366>. (acessado: 23.07.2021).

Jesus, W.B., Oliveira, S.R.S., Andrade, T.S.O. M., Sousa, J. B. M., Pinheiro-Sousa, D. B., Santos, D. M. S., Cardoso, W.S., Carvalho-Neta, R.N.F., 2020. *Biological responses in gills and hepatopancreas of Ucides cordatus (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) as indicative of environmental contamination in mangrove areas in Maranhão State, Brazil.* *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 48, 226-236. <https://dx.doi.org/10.3856/vol48-issue2-fulltext-2374>.

Liu, C., Chang V.W., Gin, K.Y.H., 2013. *Environmental toxicity of PFCs: an enhanced integrated biomarker assessment and structure–activity analysis.* *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 2226–2233. <https://doi.org/10.1002/etc.2306>.

Liu, S., Zheng, S.C., Li, Y.L., Li, J., Liu, H.P., 2020. Hemocyte-Mediated Phagocytosis in Crustaceans. *Front Immunol.* 11, 268. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00268>

Maranho, L.A., Baena-Nogueras, R.M., Lara-Martín, P.A., 2014. *Bioavailability, oxidative stress, neurotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals bound to marine sediments. The use of the polychaete Hediste diversicolor as bioindicator species.* *Environ. Res.* 134, 353–365. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.08.014>.

Marinsek, G.P., Abessa, D.M.S., Gusso-Choueri, P.K., Choueri, R.B., Gonçalves, A.R.N., Barroso, B.V.D., Santos, G.S., Cestari, M.M., Campos, B.G., Mari, R.B., 2018. *Enteric nervous system analyses: New biomarkers for environmental quality assessment.* *Mar. Pollut. Bull.* 137, 711-722. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.11.015>.

Martínez-Gómez, C., Bignell, J., Lowe, D., 2015. *Lysosomal membrane stability in mussels.* In: *ICES techniques in marine environmental sciences*, no. 56.

Minier, C., Forget-Leray, J., Bjørnstad, A., Camus, L., 2008. *Multixenobiotic resistance, acetyl-choline esterase activity and total oxyradical scavenging capacity of the Arctic spider crab, Hyas araneus, following exposure to bisphenol A, tetra bromo diphenyl ether and diallyl phthalate.* *Mar. Pollut. Bull.* 56, 1410-1415, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.05.005>.

Mohan, S., Balakrishnan, P., 2019. *Triclosan in Treated Wastewater from a City Wastewater Treatment Plant and its Environmental Risk Assessment.* *Water Air Soil Pollut.* 230, 69. <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4098-9>.

Montagner, C.C., Jardim, W.F., Von Der Ohe, P. C., Umbuzeiro, G.A., 2014. *Occurrence and potential risk of triclosan in freshwaters of Sao Paulo, Brazil-the need for regulatory actions.* Environ Sci Pollut Res Int. 21, 1850–1858. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2063-5>.

Moore, M.N., Viarengo, A., 1987. *Lysosomal membrane fragility and catabolism of cytosolic proteins: evidence for a direct relationship.* Experientia. 43, 320-323. <https://doi.org/10.1007/BF01945568>.

Moore, M.N., Allen, J.I., McVeigh, A., Shaw, J., 2006. *Lysosomal and autophagic reactions as predictive indicators of environmental impact in aquatic animals.* Autophagy. 2, 217–220. <https://doi.org/10.4161/auto.2663>.

Moore, M. N., Viarengo, A., Donkin, P., Hawkins, A. J., 2007. *Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels.* Aquat. Toxicol. 84, 80-91. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.06.007>.

Murphy, F., Ewins, C., Carbonnier, F., Quinn, B., 2016. *Wastewater Treatment Works (WwTW) as a Source of Microplastics in the Aquatic Environment.* Environ. Sci. Technol. 50, 5800–5808. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05416>.

Napper, I.E., Bakir, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2015. *Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics.* Mar. Pollut. Bull. 99, 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.07.029>.

Newton, A.P.N., Cadena, S.M.S.C., Rocha, M.E.M., Carnieri, E. G.S., Oliveira, M.B.M., 2005. *Effect of triclosan (TRN) on energy-linked functions of rat liver mitochondria.* Toxicol. Lett. 160, 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.06.004>.

Nobre. C.R., Santana, M.F.M., Maluf, A., Cortez, F.S., Cesar, A., Pereira, C.D.S., Turra, A., 2015. *Assessment of microplastic toxicity to embryonic development of the sea urchin Lytechinus variegatus (Echinodermata: Echinoidea).* Mar. Pollut. Bull. 92, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.050>.

Nobre, C.R., Moreno, B.B., Alves, A.V., de Lima Rosa J., da Rosa Franco, H., Abessa, D.M.S., Maranho, L.A., Choueri, R.B., Gusso-Choueri, P.K., Pereira C.D.S., 2020. *Effects of microplastics associated with triclosan on the oyster Crassostrea brasiliiana: An integrated biomarker approach.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 79, 101-110. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00729-8>.

Nudi, A.H., Wagener, A.L.R., Francioni, E., Scofield, A.L., Sette, C.B., Veiga, A., 2007. *Validation of Ucides cordatus as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records.* Environ. Int. 33, 315–327. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.11.001>.

Olive, P.L., 1988. *DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells*. Environ. Mol. Mutagen. 11, 487–495.
<https://doi.org/10.1002/em.2850110409>.

Oliveira, S.R.S., Batista, W.S., Sousa, J.B.M., Noleto, K.S., Lima, I.M.A., Andrade, T.S.O.M., Cardoso, W.S., Carvalho-Neta, R.N.F., 2019. *Enzymatic and Histological Biomarkers in Ucides cordatus (Crustacea, Decapoda) in an Industrial Port on the North Coast of Brazil*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 102, 802–810.
<https://doi.org/10.1007/s00128-019-02594-1>.

Passantino, A., Elwood, R.W., Coluccio P., 2021. *Why protect decapod crustaceans used as models in biomedical research and in ecotoxicology? Ethical and legislative Considerations*. Animals. 11, 73. <https://doi.org/10.3390/ani11010073>.

Paul-Pont, I., Lacroix, C., Fernández, C.G., Hégaret, H., Lambert, C., Le Goic, N., Frère, L., Cassone, A.L., Sussarelo, R., Fabioux, C., Guyomarch, J., Albentosa, M., Huvet, A., Soudant, P., 2016. *Exposure of marine mussels *Mytilus* spp. to polystyrene microplastics: Toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation*. Environ. Pollut. 216, 724-737. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.039>.

Pedà, C., Caccamo, L., Fossi, M.C., Gai, F., Andaloro, F., Genovese, L., Perdichizzi, A., Romeo, T., Maricchiolo, G., 2016. *Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: Preliminary results*. Environ. Pollut. 212, 251-256. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.083>.

Pereira, C.D.S., Abessa, D.M.S., Bainy, A.C.D., Zaroni, L.P., Gasparro, M.R., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Furley, T.H., Sousa, E.C.P.M., 2007. *Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil*. Environ. Toxicol. Chem. 26, 462-469. <https://doi.org/10.1897/06-266R.1>.

Pereira, C.D.S., Martín-Díaz, M.L., Zanette, J., Cesar, A., Choueri, R.B., Abessa, D.M.S., Catharino, M.G.M., Vasconcellos, M.B.A., Bainy, A.C.D., Sousa, E.C.P.M., DelValls, T.A., 2011. *Integrated biomarker responses as environmental status descriptors of a coastal zone (São Paulo, Brazil)*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 1257-1264. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.02.019>.

Pereira, C.D.S., Martín-Díaz, M.L., Catharino, M.G.M., Cesar, A., Choueri, R.B., Taniguchi, S., Abessa, D.M.S., Bicego, M.C., Vasconcellos, M.B.A., Bainy, A.C.D., Sousa, E.C.P.M., DelValls, T.A., 2012. *Chronic contamination assessment integrating biomarkers' responses in transplanted mussels e a seasonal monitoring*. Environ. Toxicol. 27, 257-267. <https://doi.org/10.1002/tox.20638>.

Pereira, C.D.S., Marinho, L.A., Cortez, F.S., Pusceddu, F.H., Santos, A.R., Ribeiro, D.A., Cesar, A., Guimarães, L.L., 2016. *Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone*. Sci. Total Environ. 548-549, 148–154.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.051>.

Pessoa, G.P., Souza, N.C., Vidal, C.B., Alves, J.A.C., Firmini, P.I.M., Nascimento, R.F., Santos, A.B., 2014. *Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants*. *Sci. Total Environ.* 490, 288-295.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.008>.

Pinheiro, M.A.A., Silva, P.P.G., Duarte, L.F.A., Almeida, A.A., Zanotto, F.P., 2012. *Accumulation of six metals in the mangrove crab Ucides cordatus (Crustacea: Ucididae) and its food source, the red mangrove Rhizophora mangle (Angiosperma: Rhizophoraceae)*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 81, 114-121.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.05.004>.

Pinheiro, M.A.A., Duarte, L.F.A., Toledo, T.R., Adam, M.L., Torres, R.A., 2013. *Habitat monitoring and genotoxicity in Ucides cordatus (Crustace: Ucididae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil*. *Environ. Monit. Assess.* 185, 8273-8285. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3172-9>.

Pintado-Herrera, M.G., González-Mazo, E., Lara-Martín, P.A., 2014. *Determining the distribution of triclosan and methyl triclosan in estuarine settings*. *Chemosphere*. 95, 478-485. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.101>.

Pittura, L., Avio, C.G., Giuliani, M.E., d'Errico, G., Keiter, S.H., Cormier, B., Gorbi, S., Regoli, F., 2018. *Microplastics as vehicles of environmental PAHs to marine organisms: combined chemical and physical hazards to the Mediterranean mussels, Mytilus galloprovincialis*. *Front. Mar. Sci.* 5, 103.
<https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00103>.

Puckowski, A., Cwięk, W., Mioduszewska, K., Stepnowski, P., Białk-Bielńska, A., 2021. *Sorption of pharmaceuticals on the surface of microplastics*. *Chemosphere*. 263, 127976. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127976>.

Pullaguri, N., Nema, S., Bhargava, Y., Bhargava, A., 2020. *Triclosan alters adult zebrafish behavior and targets acetylcholinesterase activity and expression*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 75, 103311. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103311>.

Pusceddu, F.H., Choueri, R.B., Pereira, C.D.S., Cortez, F.S., Santos, D.R.A., Moreno, B.B., Santos, A.R., Rogero, J.R., Cesar, A., 2018. *Environmental risk assessment of triclosan and ibuprofen in marine sediments using individual and sub-individual endpoints*. *Environ. Pollut.* 232, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.046>.

Pusceddu, F.H., Sugauara, L.E., Marchi, M.R., Choueri, R.B., Castro, I.B., 2019. *Estrogen levels in surface sediments from a multi-impacted Brazilian estuarine system*. *Mar. Pollut. Bull.* 142, 576-580. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.052>.

Ribeiro, F., Garcia, A.R., Pereira, B.P., Fonseca, M., Mestre, N.C., Fonseca, T.G., Ilharco, L.M., Bebianno, M.J., 2017. *Microplastics effects in Scrobicularia plana*. *Mar. Pollut. Bull.* 122, 379-391. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.078>.

Ringwood, A.H., Hoguet, J., Keppler, C., Gielazyn, M., 2004. *Linkages between cellular biomarker responses and reproductive success in oysters Crassostrea virginica*. Mar. Environ. Res. 58, 151-155. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.010>.

Rochman, C.M., Hoh, E., Kurobe, T., Teh, S. J., 2013. *Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress*. Sci. Rep. 3, 3263. <https://doi.org/10.1038/srep03263>.

Sardina, J.L., López-Ruano, G., Sánchez-Sánchez, B.; Llanillo, M., Hernández-Hernández, A., 2012. *Reactive oxygen species: Are they important for hematopoiesis?* Crit. Rev. Oncol. Hemat. 81, 257-274. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2011.03.005>.

Trevisan, R., Uzochukwu, D., Di Giulio, R.T. 2020. *PAH Sorption to nanoplastics and the trojan horse effect as drivers of mitochondrial toxicity and PAH localization in zebrafish*. Front. Environ. Sci. 8, 78. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00078>.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. *Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6).

Vazquez, L., Alpuche, J., Maldonado, G., 2009. *Immunity mechanisms in crustaceans*. Innate Immun. 15, 179–188. <https://doi.org/10.1177/1753425909102876>

Villalaín, J., Mateo, C.R., Aranda, F.J., Shapiro, S., Micol, V., 2001. *Membranotropic effects of the antibacterial agent Triclosan*. Arch. Biochem. Biophys. 390, 128-136. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2356>.

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. <https://doi.org/10.1021/es302332w>.

Watts, A.J., Urbina, M.A., Goodhead, R., Moger, J., Lewis, C., Galloway, T.S., 2016. *Effect of microplastic on the gills of the shore crab Carcinus maenas*. Environ. Sci. Technol. 50, 5364-5369. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01187>.

Webb, S., Gaw, S., Marsden, I.D., McRae, N.K., 2020. *Biomarker responses in New Zealand green-lipped mussels Perna canaliculus exposed to microplastics and triclosan*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 201, 110871. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110871>.

Winston, G.W., Moore, M.N., Kirchin, M.A., Soverchia, C., 1996. *Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, Mytilus edulis: lysosomal localization and effect of xenobiotics*. Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 113, 221-229. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(95\)02091-8](https://doi.org/10.1016/0742-8413(95)02091-8).

Wills, E.D., 1987. *Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes*. In: Snell K, Mullock B (eds) *Biochemical toxicology: a practical approach*. IRL Press, Washington, 127–150.

Wu, M., Xu, H., Shen, Y., Qiu, W., Yang, M., 2011. *Oxidative stress in zebrafish embryos induced by short-term exposure to bisphenol A, nonylphenol, and their mixture*. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2335-2341. <https://doi.org/10.1002/etc.634>.

Wu, C., Zhang, K., Huang, X., Liu, J., 2016. *Sorption of pharmaceuticals and personal care products to polyethylene debris*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 8819–8826. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6121-7>.

Xanthos, D., Walker, T.R., 2017. *International policies to reduce plastic marine pollution from single-use plastics (plastic bags and microbeads): A review*. *Mar. Pollut. Bull.* 118, 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.02.048>.

Xu, X., Zhang, D., Zhang, W., 2020. *Ecological Toxicity of Triclosan (TCS): A Review*. *IOP Conf. Series: Mater. Sci. Eng.* 735, 012062. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/735/1/012062>.

Capítulo II. Exposição à microplásticos contaminados com fármacos e produtos de cuidados pessoais: efeitos histológicos em *Ucides cordatus*

Letícia Fernanda da Silva^a; Caio Rodrigues Nobre^b; Beatriz Barbosa Moreno^a; Camilo Dias Seabra Pereira^{a,c}; Alexandre Rodrigo Nascimento Gonçalves^b; Nathalia Sales Soares do Nascimento^b; Gabriela Pustiglione Marinsek^b; Renata de Britto Mari^b; Rodrigo Brasil Choueri^a; Paloma Kachel Gusso-Choueri^{b,c}; Augusto Cesar^a.

^a Departamento de Ciências do Mar, Universidade Federal de São Paulo, Campus Santos (Unifesp), Rua Carvalho de Mendonça, 144, 11070-102, Santos, São Paulo, Brasil;

^b Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Praça Infante Dom Henrique, s/n, Parque Bitaru, São Vicente, São Paulo, Brasil;

^c Departamento de Ecotoxicologia, Universidade Santa Cecília (Unisanta), Rua Oswaldo Cruz, 266, 11045-907, Santos, São Paulo, Brasil.

Resumo

Microplásticos têm sido detectados em brânquias de invertebrados, além disso estudos tem relatado a possibilidade de microplásticos atuarem como vetores de outros contaminantes como fármacos e produtos de cuidados pessoais (FPCPs) ocasionando efeitos em diferentes níveis biológicos, como celulares e subcelulares. O presente estudo avaliou alterações a nível tecidual, empregando análises histopatológicas e histomorfométricas nas brânquias de *U. cordatus* em cenários de exposição à microplásticos isoladamente ou adsorvidos à FPCPs. Para isso espécimes foram expostas à quatro tratamentos: I) controle (C), II) microplástico virgens (MP), III) microplásticos fortificados com 17 α Etnilestradiol (MPE), e IV) microplásticos fortificados com triclosan (MPT), ao longo de 3 ou 7 dias. Após a exposição foram coletadas amostras de brânquias para análises histológicas. Resultados das análises histológicas, mostraram que tanto microplásticos virgens e principalmente aqueles fortificados com FPCPs podem agravar consideravelmente patologias nas brânquias de *U. cordatus*, sendo este agravamento influenciado pelo tempo de exposição, o que pode ser ainda mais evidenciado através da integração da extensão, ocorrência e grau das patologias.

Palavras-chave: Poluição por plásticos; bactericida; hormônio anticoncepcional; histopatologia; morfometria; caranguejos.

Abstract

Microplastics have been detected in invertebrate gills, furthermore studies have reported the possibility of microplastics acting as vectors of other contaminants such as pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) causing effects at different biological levels as cellular and subcellular. The present study evaluated alterations at tissue level, using histopathological and histomorphometric analyzes in the gills of *U. cordatus* in exposure to microplastics alone or adsorbed to PPCPs. Specimens were exposed to four treatments: I) control (C), II) virgin microplastic (MP), III) microplastics fortified with 17 α Ethinylestradiol (MPE), and IV) microplastics fortified with triclosan (MPT), over 3 or 7 days. After exposure period, gill samples were collected for histological analysis. Results of the histological analysis showed that both virgin microplastics and especially those fortified with PPCPs can considerably aggravate pathologies in the gills of *U. cordatus*, this aggravation being influenced by the time of exposure, which could be further evidenced through the integration of the extension, occurrence, and degree of pathologies.

Keywords: Plastic pollution; bactericide; contraceptive hormone; histopathology; morphometry; gills; crabs.

1 INTRODUÇÃO

Os oceanos têm sido constantemente afetados por produtos químicos antropogênicos de ampla ocorrência, nomeados como de “preocupação emergente”. Alguns destes compostos historicamente não eram considerados “contaminantes” já outros são relativamente novos, pois estão sendo introduzidos na sociedade apenas recentemente (Sauvé et al., 2014). Dentro desta classe de contaminantes podemos elencar os fármacos e seus metabólitos (Valdez-Carrillo et al., 2020), alguns bactericidas como o Triclosan (Rasheed et al., 2019) e ingredientes utilizados na formulação de produtos de cuidados pessoais como as micropartículas plásticas (Mak et al., 2019).

Estes contaminantes cada vez mais mensurados em efluentes urbanos (Carr et al., 2016; Lehutso et al., 2017; Tang et al., 2021) e já têm sido amplamente detectados em compartimentos ambientais (Eriksen et al., 2014; Lebreton et al., 2018), como em águas oceânicas e estuarinas. Além disso de acordo com Wu et al., (2016) microplásticos presentes em efluentes podem vir a atuar como carreadores de fármacos e produtos de cuidados pessoais (FPCPs), sendo esta interação favorecida por um conjunto de fatores físico-químicos, como a hidrofobicidade dos FPCPs, o tipo de polímero e área superficial das micropartículas (Avio et al., 2015). Logo, microplásticos também possuiriam a capacidade de transferir FPCPs tanto para compartimentos ambientais quanto para a biota.

Características como a flutuabilidade dos microplásticos também poderiam favorecer diferentes vias de assimilação, assim como as espécies mais suscetíveis a determinado tipo de microplástico (Wang et al., 2019), que possa também possuir FPCPs adsorvidos. O polietileno de baixa densidade (LDPE) (Wu et al., 2016) que apresenta valores de densidade entre 0,90 - 0,94 g/cm³ (Lambert & Wagner, 2018), logo sendo uma importante via de assimilação e acumulação que seria favorecida por este tipo de microplástico seria a respiratória (Wang et al., 2021; Von Moos et al., 2012).

As brânquias são os principais órgãos respiratórios e também responsáveis por processos de osmorregulação em espécies de organismos aquáticos, como crustáceos, estando também envolvidas no processo de excreção de produtos nitrogenados (amônia), assim como transporte e homeostase de cálcio (Evans et al., 2005; Freire et al., 2008; Henry et al., 2012).

Análises a nível de tecido (histológicas) utilizando as brânquias, vêm sendo aplicadas tanto para identificar a presença das micropartículas, quanto como

biomarcadores nos estudos de avaliação dos efeitos de microplásticos e FPCPs, individualmente, em organismos aquáticos. Dentre estas análises está a identificação de histopatologias, frequência de ocorrência das mesmas, além de análises histomorfométricas, permitindo avaliar os efeitos em um nível intermediário de organização biológica (Carvalho Neta et al., 2019; Oliveira et al., 2019; Jesus et al., 2020).

Microplásticos já têm sido identificados em organismos como caranguejos semiterrestres. Brenneck et al., 2015 observaram que até mesmo microplásticos com tamanhos superiores à 100 µm podem ficar retidos em brânquias de caranguejos da espécie *Uca rapax*. A presença destes microplásticos em invertebrados poderiam ainda causar abrasão, induzindo estresse oxidativo e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, indicando também uma resposta inflamatória (Kurchaba et al., 2020; Vasanthi et al., 2021).

Patologias em brânquias, relacionadas à presença de microplásticos, também têm sido observadas em espécies de crustáceos. Hsieh et al., 2021 observaram que camarões *Litopenaeus vannamei* expostos à micropartículas de polietileno apresentaram encolhimento e deformação das lamelas secundárias de suas brânquias. Ademais a presença e liberação de aditivos que podem estar presentes nestas micropartículas, poderiam ocasionar levantamento epitelial em brânquias de organismos marinhos como observado em espécie de peixe (Barja-Fernandez et al., 2013).

Alterações na arquitetura e estrutura, assim como a influência da extensão das patologias, tanto regressivas como progressivas, na área superficial das lamelas e consequentemente no processo respiratório de indivíduos expostos à microplásticos têm sido corroborada por análises morfométricas, muito embora este tipo de análise tenha tido como foco animais vertebrados. No estudo de Karbalalei et al., 2021 foi observada uma redução na altura das lamelas secundárias nas brânquias de peixes expostos à microplásticos virgens.

A abrasão ocasionada por microplásticos poderia ainda aumentar a absorção de outros contaminantes (Karami et al., 2016; Karbalalei et al. 2021). E, uma vez absorvidos, contaminantes como TCS e EE2, estes também poderiam ocasionar infiltração hemocítica em brânquias de invertebrados, conforme observado em *Mytilus galloprovincialis* expostos à EE2 (Lopes et al., 2021). Ademais, peixes expostos à TCS apresentaram a presença de levantamento epitelial, necroses, hipertrófia, fusão lamelar e hiperplasia (Hemalatha et al., 2019).

Considerando que já foram detectados microplásticos em áreas de manguezal em no Brasil (Zamprogno et al., 2021), e que possam estar carreando FPCPs, diversas espécies podem estar suscetíveis a tais processos, como crustáceos Decapoda que já têm se mostrado vulneráveis a cenários de contaminação ambiental, como a espécie *Ucides cordatus*.

Esta espécie é endêmica de manguezal apresentando grande relevância ambiental, assim como econômica (Pinheiro et al., 2013), podendo ser encontrada desde o sul dos Estados Unidos até o sul do Brasil (Chace & Hobbs, 1969; Buranelli et al., 2019).

Efeitos adversos nestes organismos têm sido observados através de análises histológicas (Carvalho Neta et al., 2019; Oliveira et al., 2019), muito embora estudos sobre efeitos histológicos relacionados à exposição desta espécie à microplásticos e FPCPs ainda não tenham sido desenvolvidos.

Trabalhos empregando estes tipo de análises em brânquias se mostrariam importantes, visto que alterações à nível tecidual nas brânquias destes organismos poderiam afetar a sobrevivência destes organismos devido ao comprometimento do sistema respiratório, assim como a capacidade destes organismos colonizar ambientes eurialinos, pelo comprometimento da função osmorregulatória (Ortega et al., 2017) afetando consequentemente comunidades que dependem de sua comercialização para subsistência.

Ademais, para além da aplicação de índices histopatológicos convencionais, com abordagem semi-quantitativa, e integração de frequência de ocorrência das patologias, estudos que abordem a integração das patologias unindo sua ocorrência, severidade e extensão em um valor unificado poderiam refletir o real estado de saúde geral das brânquias, uma vez que o significado biológico possa ser melhor interpretado e representado.

A partir deste contexto o presente estudo possuiu como objetivo avaliar alterações morfológicas nas brânquias do crustáceo Decapoda *Ucides cordatus* expostos à microplásticos virgens e também a microplásticos fortificados 17 α etinilestradiol e triclosan empregando análises histopatológicas e histomorfométricas. Também foi testada a efetividade da integração estatística das patologias considerando não apenas sua ocorrência, mas também sua extensão e severidade em um único valor (por lesão) de forma a melhor compreender as respostas biológicas das brânquias destes organismos em cada tratamento contendo microplásticos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para se atingir tal objetivo, espécimes de *Ucides cordatus* foram expostos a quatro diferentes tratamentos: (i) água do mar e DMSO (C), (ii) água do mar + microplásticos virgens (MP), (iii) água do mar + microplásticos virgens fortificados com 17 α Etinilestradiol (MPE), e (iv) água do mar + microplásticos virgens fortificados com Triclosan (MPT). Amostras de brânquia foram coletadas após 3 dias e 7 dias de exposição para análises histopatológicas e histomorfométricas.

2.1 Fortificação dos microplásticos

Com a finalidade de promover a interação entre as partículas plásticas com FPCPs, as microesferas de polietileno (100 - 250 μm) (Braskem) foram submetidas ao procedimento de fortificação com os compostos 17 α Etinilestradiol (EE2) e Triclosan (TCS) (Sigma-Aldrich) seguindo o método de equilíbrio em lote (Wu et al, 2016) com adaptações de Nobre et al. (2020).

Primeiramente, foram preparadas soluções estoque de 1 mg/L com as substâncias EE2 e TCS. Para tanto 1 mg de cada substância, na forma de seus respectivos padrões analíticos, foi pesado em balança analítica (Mettler-Toledo), e em seguida diluídos em 0,5ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, foram avolumados em balão volumétrico com água deionizada para o volume final de 1L.

Em uma segunda etapa, pesou-se, em balança analítica, 22,5 g de microesferas plásticas, para cada substância, que foram acondicionadas juntamente com as respectivas soluções estoque em erlenmeyer de 1L devidamente cobertos para que não houvesse degradação das substâncias devido à incidência de luz. Após o preparo, as soluções foram colocadas em agitador orbital por um período de 48 horas, a 250 rpm, a fim de atingirem o equilíbrio sortivo entre as partículas. Em seguida as microesferas foram retiradas da solução com auxílio de sistema de filtração a vácuo por membrana, utilizando filtro (Whatman GF/C) de microfibra de vidro (GE) de 1,2 μm e armazenadas em frasco âmbar em câmara fria até o início dos experimentos.

2.2 Identificação e quantificação de TCS e EE2 em microplástico e água

Análises químicas foram realizadas a partir da extração das substâncias das partículas plásticas antes e após o período de exposição (7 dias), assim como de amostras de água dos aquários também após a exposição. Para tanto foi realizada a extração seguindo-se o protocolo de extração de fase sólida (SFE) adaptado do método 1694 da *Environmental Protection Agency*, EUA (EPA, 2007).

As determinações analíticas foram realizadas por HPLC (Agilent 1260 series, Agile Technologies) acoplado ao espectrômetro de massa (QTRAP 3200, AB Sciex), em gradiente de acetonitrila/água 95-5% por 8 minutos, na presença dos aditivos ácido fórmico ou acetato de amônio. Foi utilizada coluna Agilent Eclipse XDB-C18 4,6X50 mm, 1,8 µm, e a análise utilizou ionização por electrospray no modo negativo (ESI-). Os espectros MS/MS resultantes foram processados e a identificação e quantificação dos analitos foram realizadas a partir da detecção das transições MRM's (*Multiple Reaction Monitoring*) da biblioteca de espectros de fragmentação (MS/MS) (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros analíticos referentes à análise dos compostos de interesse.

FPCP	Parâmetros analíticos					
	Faixa de concentração da curva analítica ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	Transição MRM de quantificação	LOD ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	MLOD ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	MLOQ ($\mu\text{g. L}^{-1}$)
EE2	4.687 a 300	279 > 133	1,2	4,0	0.12	0.40
TCS	4.687 a 150	287 > 287	0,5	1,7	0,05	0,17

MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas; LOD – Limite de detecção; LOQ – Limite de quantificação; MLOD – Limite de detecção do método; MLOQ – Limite de quantificação do método.

2.3 Desenho experimental

Para a realização do experimento, primeiramente foram obtidos indivíduos da espécie de interesse. Logo estes foram adquiridos na Barra do Una, localizada dentro Mosaico Ecológico Juréia-Itatins (Peruíbe-SP), através de coleta manual, sendo posteriormente transportados à laboratório, onde foram aclimatados em tanques de 500L, empregando a proporção mínima de 20 litros de água do mar para 40 organismos por 10

dias, sendo alimentados em dias alternados com folhas de *Rizophora mangle* e sendo mantidos sob forte aeração, temperatura controlada (22º C).

Após o período de aclimatação, foi realizado experimento, contemplando 4 tratamentos: I) controle com água do mar e DMSO (0,5ml/L) (C); II) água do mar com microplásticos virgens (250 mg/L) (MP); III) água do mar com microplásticos fortificados com EE2 (MPE); IV) água do mar com microplásticos fortificados com TCS (MPT). Cada tratamento foi realizado em quatros réplicas, sendo compostas por 5 indivíduos, dispostos em aquários com capacidade para 50 litros preenchidos com 10L de água do mar (salinidade 30).

Durante a realização dos experimentos, os organismos foram alimentados em dias alternados com 8g de folhas verdes de *Rizophora mangle* por aquário. O período total do experimento foi de 7 dias, sendo coletadas amostras de brânquias de organismos expostos em dois instantes distintos: após 3 dias de exposição (T3) e após 7 dias de exposição (T7).

Após os organismos serem crioeutanasiados, (deixando-os em freezer por 1 hora) estes foram dissecados para extração das brânquias que foram logo em seguida fixadas em solução ALFAC (álcool, formaldeído e ácido acético glacial) por 16 horas, após este período estes tecidos foram armazenados em álcool 70% e mantidos a 4ºC para posterior processamento histológico.

Todos os procedimentos experimentais seguiram as recomendações de ética e bem-estar animal (CEUA n. 8111041217) bem como o projeto foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unifesp (CEP n. 9816101019) e SISBIO (Processo n. 60314-1).

2.4 Biomarcadores morfológicos

O processamento histológico se deu de acordo com procedimentos histológicos padrões seguindo três passos: desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Após inclusão em parafina, foram obtidos 3 cortes semiseriados (5µm de espessura e 200 µm de espaçamento entre os cortes) que foram novamente diafanizados, hidratados e por fim corados em Hematoxilina e Eosina (H &E), permitindo a observação das estruturas.

2.4.1 Análises Histomorfométricas

Para análises histomorfométricas foi utilizado método adaptado de Nero et al. (2006) e aplicado por Marinsek (2018). Primeiramente foi delimitada como objeto de estudo a área central das brânquias, que tendem a apresentar uma menor variação em seu tamanho, visto que as extremidades das brânquias desta espécie apresentam-se mais curtas em uma extremidade e mais compridas em outra. Nesta área selecionada, foram então capturadas duas fotomicrografias de cada lado da brânquia (aumento 40x), totalizando 4 fotomicrografias por corte histológico ou 12 fotomicrografias por indivíduo. A partir das fotomicrografias capturadas, foram realizadas mensurações de maneira aleatória, sendo que as imagens primeiramente eram sobrepostas à um sistema teste adaptado dos princípios da estereologia (Mandarim-de-Lacerda, 2003) (Figura 1) medindo-se apenas as lamelas secundárias que tocavam o centro da cruz. Em cada uma destas lamelas foram obtidas as medidas dos seguintes parâmetros: comprimento das lamelas secundárias (CLS), largura das lamelas secundárias (LLS) e distância inter-lamelar (DIL), sendo que para os parâmetros LLS e DIL foram realizadas três medidas representando as porções basal, medial e apical, obtendo-se uma média dos resultados.

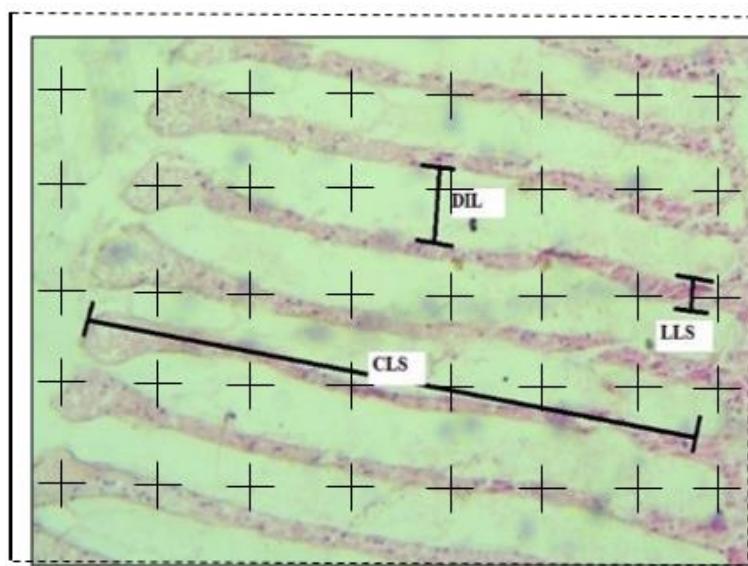


Figura 1. Sistema-teste com 40 pontos ao qual as fotomicrografias eram sobrepostas, para seleção das lamelas das brânquias de *U. cordatus* e medida dos parâmetros de interesse. (CLS) – comprimento da lamela secundária, (LLS) – largura da lamela secundária, (DIL) – distância inter-lamelar. Fonte: Fotomicrografia dos autores.

2.4.2 Análises Histopatológicas

A fim de avaliar o grau dos danos nas brânquias, análises histopatológicas foram realizadas a partir da metodologia adaptada de Bennett et al., (1999), também com base nos conceitos de (Poleksic & Mitrovic-Tutundzik, 1994). As patologias identificadas, de acordo com fator de importância (w) abrangendo valores de 1 a 3, relacionados à reversibilidade do dano (1 revertem com facilidade; 2 potencialmente reversíveis ao final da exposição e 3 direcionam à perda parcial ou total da função do órgão) (Tabela 2). Também foi observada a ocorrência das lesões, classificada como um segundo valor numérico (a) relacionado à extensão e grau da lesão variando entre 0 e 6 (0: ausente, 1: pontual e pequena, 2: pouco extensa, 4: extensão média; e 6:abundante/extensa). O Índice de Bernet foi calculado seguindo-se a seguinte equação:

$$I_{org} = \Sigma rp \Sigma alt (a * w)$$

Onde rp: padrão de reação; alt: alteração; a: score; w: fator de importância.

Além disso, frequências de ocorrência para cada patologia foram calculadas e o score (a) das patologias foi utilizado para realização da integração dos dados a partir da análise de componentes principais PCA.

Tabela 2. Fatores de importância das patologias presentes nas brânquias de *U. cordatus* (adaptado de Bernet et al., 1999).

Patologias Brânquias	Fator de Importância
Extravasamento de hemolinfa	1
Congestão/aumento de volume de hemolinfa	1
Aneurisma	1
Edema	1
Alterações na arquitetura e estrutura	1
<i>Fusão de lamelas</i>	
<i>Descolamento da cutícula</i>	
<i>Descolamento do epitélio</i>	
<i>Elevação do epitélio</i>	
<i>Descamação do epitélio</i>	
<i>Alteração canal marginal</i>	
<i>Ruptura do epitélio</i>	
<i>Ruptura da cutícula</i>	
<i>Inchaço lamelar</i>	
<i>Ruptura das células pilares</i>	
Atrofia das lamelas secundárias	2
Inclusão fibrilar	2
Fibrose	2
Alterações nucleares	2
<i>Células necróticas</i>	
Necrose	3
Hiperplasia	2
Esxudato	1
Granuloma	1
Infiltração	2
Tumor Benigno	2
Parasitas	1

2.5 Análise dos dados

Os resultados dos Índices Histopatológicos e das análises histomorfométricas foram analisados através da Análise Permutacional de Variância (PERMANOVA “*main test*”) univariada bifatorial, (Anderson, 2008), considerando os fatores: tratamento (4 níveis: C, MP, MPE e MPT) e tempo de exposição (2 níveis: 3 e 7 dias). Quando o teste principal apresentou resultado significativo ($p < 0,05$), foi aplicado teste a posteriori (“*pairwise multiple comparisons test*”) para identificar quais níveis diferiram entre si. A homogeneidade das variâncias foi analisada utilizando PERMDISP. Uma vez que o resultado da PERMANOVA é sensível à heterocedasticidade dos dados, em casos em que foi identificada, foi observado se as séries de dados, apesar da sua heterocedasticidade, possuíam locação suficientemente distintas para corroborar uma eventual diferença significativa apontada pela PERMANOVA. Por fim a contribuição de cada parâmetro (LLS, CLS e DIL) para a dissimilaridade entre fatores foi observado através da análise SIMPER.

Todos os testes foram realizados baseados em matrizes de semelhança de distâncias Euclidianas. Os resíduos foram permutados usando permutação irrestrita de dados brutos. Os valores de p Monte Carlo foram usados quando o número de permutações foram menores que 50 (Anderson et al., 2008). Para estas análises foi utilizado o software PRIMER 6.0.

A Análise Fatorial com extração por Análise de Componentes Principais (FA/PCA *Principal Components Analysis*), foi realizada com a finalidade de se destacar as associações entre o score (a) que representa a extensão das patologias, em relação aos tratamentos e tempo de exposição. Desta maneira, as variáveis foram padronizadas a fim de que fossem igualmente tratadas. As variáveis selecionadas para serem interpretadas foram aquelas com scores $\geq 0,7$ (Tabachnick & Fidell, 1996). A relevância das associações observadas para cada tratamento foi estimada calculando o fator score do centroide de todos os casos para os dados originais. As análises foram realizadas utilizando o software Statistica® 12.

3 RESULTADOS

3.1 Identificação e quantificação de EE2 e TCS em microplástico e água

Os resultados das análises químicas demonstraram que houve uma redução da concentração de FPCPs nos microplásticos ao final do experimento (7 dias), de 35,40 µg.g⁻¹ para 1,28 µg.g⁻¹ de EE2 no tratamento MPE e 10,59 µg.g⁻¹ para 0,22 µg.g⁻¹ de TCS no tratamento MPT. Também foi detectada a presença das substâncias na água dos aquários (EE2: 1,93 µg.L⁻¹ no tratamento MPE e TCS: 0,42 µg.L⁻¹ no tratamento MPT).

A recuperação nominal nos microplásticos fortificados com triclosan foi de 23,83%, enquanto para os fortificados com 17 α etinilestradiol foi de 79,65%.

3.2 Análises histológicas

Foram observadas, em geral, 24 patologias presentes nos organismos (Tabela 3). Em 3 dias de exposição o tratamento MPE apresentou maior frequência de ocorrências, sendo registrado exclusivamente neste tratamento a ocorrência de tumor benigno caracterizados por pronunciada inclusão fibrilar (Figura 2C). Também em 3 dias, necrose foi uma das alterações mais frequentes em todos os tratamentos (100%), ou seja, ocorreram em todos os organismos de todos os tratamentos, sendo que nos tratamentos contendo FPCPs estas lesões foram mais evidentes do que no tratamento controle.

Também foram observados em todos os tratamentos uma alta frequência de ocorrência de alterações na estrutura e arquitetura (ruptura de células pilares, ruptura da cutícula e epitélio, assim como descolamento da cutícula) (100%), apresentando influência principalmente na estrutura das brânquias dos indivíduos expostos aos tratamentos MP e MPT, afetando inclusive a estrutura geral deste órgão (Figura 2 B e D). Infiltração hemocítica também apresentou alta frequência de ocorrência, principalmente nos tratamentos contendo microplásticos tanto virgens quanto fortificados com FPCPs (100%) (Tabela 4).

Considerando todos os tratamentos em 3 dias, teve-se que de maneira geral e em ordem decrescente, a frequência de ocorrência das seguintes alterações foram observadas: necrose = ruptura de cutícula = ruptura epitelial = ruptura das células pilares = descolamento da cutícula > infiltração > alteração do canal marginal > exsudato > descolamento do epitélio > extravasamento de hemolinfa > descamação do epitélio >

elevação do epitélio > inchaço lamelar > edema > parasitas > congestão/aumento do volume de hemolinfa > atrofia das lamelas secundárias > células necróticas > granuloma > fibrose > hiperplasia > fusão de lamelas > tumor benigno = inclusão fibrilar (Tabela 3).

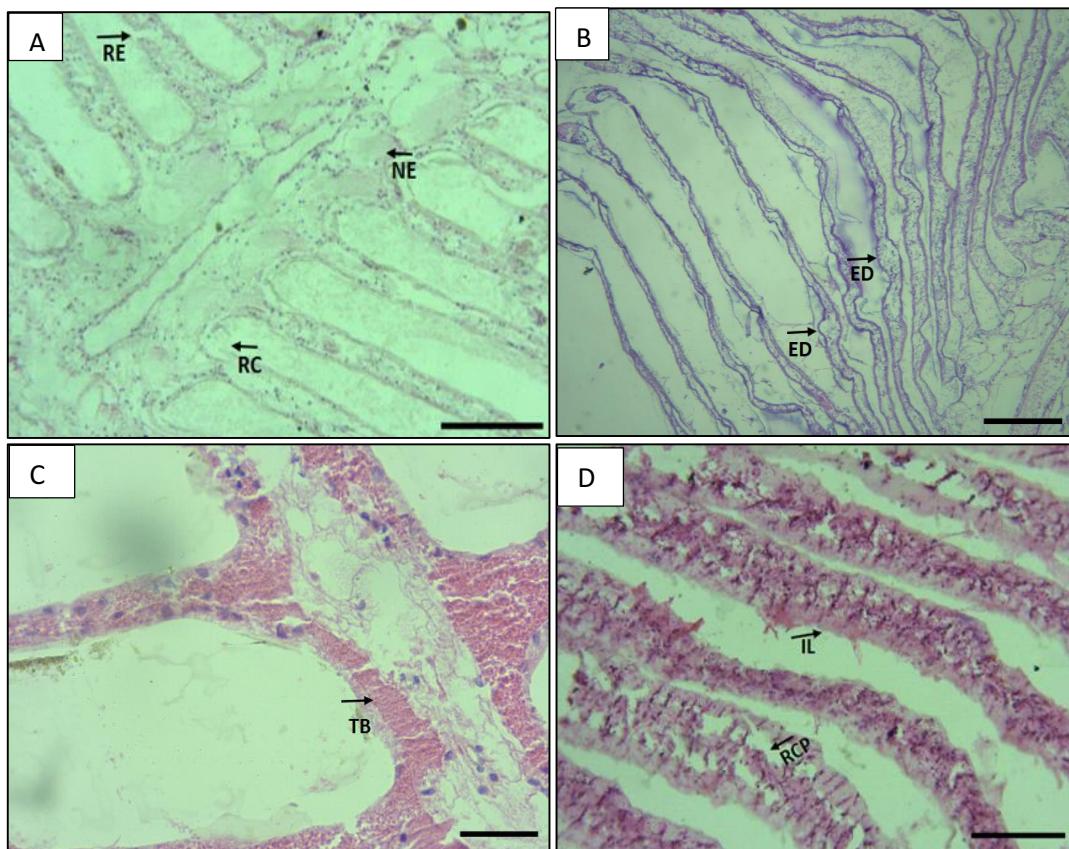


Figura 2. Indivíduos expostos aos tratamentos no tempo de 3 dias. A) Organismos do tratamento controle com necroses claras (NE), ruptura da cutícula (RC) e do epitélio (RE) (100x). B) Tratamento MP apresentando alteração em sua arquitetura, com ampla presença de edemas (ED) (40x). C) Tratamento MPE com tumor benigno (TB) (400x). D) Indivíduos do tratamento MPT com lamelas desestruturadas, apresentando inchaço (IL) ocasionando ruptura das células pilares (RCP) (100x).

Aos 7 dias de exposição, o tratamento MPT apresentou maior frequência de ocorrência de alterações sendo também registrado exclusivamente neste tratamento a ocorrência de tumor benigno e maiores perturbações circulatórias (extravasamento/congestão/aumento do volume de hemolinfa – 100%) (Figura 3E). As necroses ainda se apresentaram como uma das patologias mais frequentes (100%) em todos os tratamentos (Tabela 3), entretanto se mostrando mais evidentes e difusas neste período (Figura 3C e F). Ruptura e descolamento da cutícula, assim como ruptura do epitélio ainda

permaneceram, com uma alta frequência de ocorrência em todos os tratamentos assim como controle (100%). Infiltração também apresentou alta frequência de ocorrência em geral (100%) (Figura 3A).

As frequências de ocorrência das patologias, também em ordem decrescente e considerando todos os tratamentos neste período, foram: necrose = infiltração = ruptura da cutícula = ruptura epitelial = descolamento de cutícula > descolamento epitelial = alteração do canal marginal = ruptura das células pilares > extravasamento de hemolinfa > congestão/aumento do volume de hemolinfa = elevação do epitélio = descamação do epitélio > exsudato > atrofia > parasitas > granuloma > células necróticas > edema > inchaço lamelar > hiperplasia > inclusão fibrilar > fibrose > aneurisma = tumor benigno (Tabela 3).

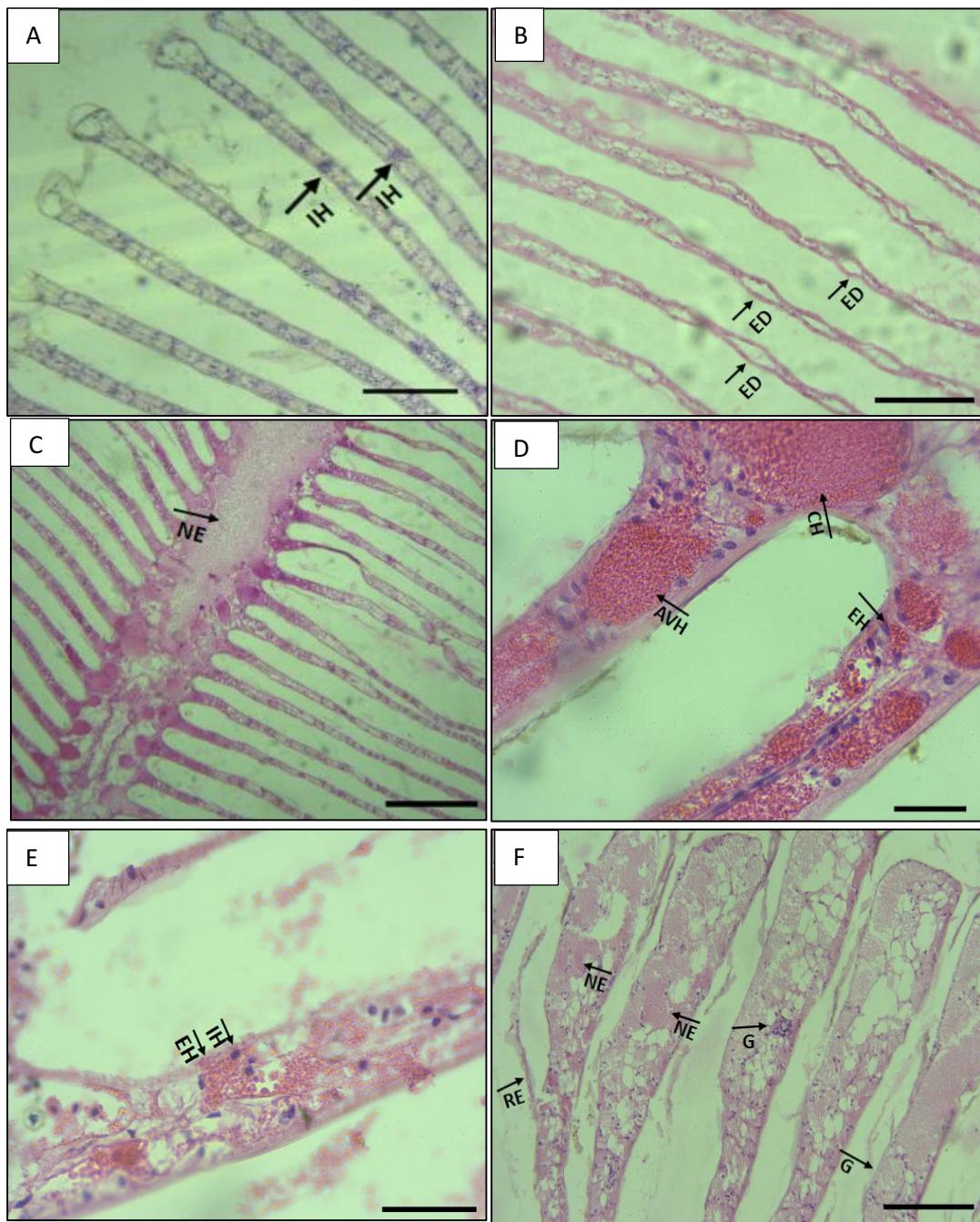


Figura 3. Indivíduos expostos aos tratamentos no tempo de 7 dias. A) Controle apresentando infiltrações hemocíticas (IH) (40x); B) Tratamento MP apresentando lamelas com edemas (100x); C) e D) Extravasamento (EH), Aumento do volume (AVH) e congestão de hemolinfa (CH) (400x), necroses evidentes (NE) tratamento MPE (40x); E) e F) Tratamento MPT extravasamento de hemolinfa (EH), infiltração hemocítica (IH) (400x), necroses (NE), Ruptura do epitélio (RE) e granulomas (G) (100x).

Tabela 3. Frequência de ocorrência das principais alterações (%) observadas nas brânquias de *U. cordatus*.

Histopatologias	T3				T7			
	C	MP	MPE	MPT	C	MP	MPE	MPT
Extravasamento de hemolinfa	83,3	80,0	85,7	83,3	83,3	100,0	83,3	100,0
Congestão/aumento de volume de hemolinfa	100,0	0,0	57,1	0,0	66,7	66,7	83,3	100,0
Aneurisma	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	16,7	0,0
Edema	33,3	60,0	42,9	100,0	50,0	66,7	16,7	33,3
Fusão de lamelas	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Descolamento cutícula	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Descolamento epitelial	66,7	100,0	85,7	83,3	100,0	83,3	100,0	100,0
Elevação do epitélio	83,3	60,0	85,7	66,7	100,0	100,0	33,3	83,3
Descamação do epitélio	100,0	60,0	71,4	83,3	100,0	66,7	66,7	83,3
Alteração canal marginal	100,0	80,0	100,0	100,0	100,0	100,0	83,3	100,0
Ruptura epitelial	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Ruptura da cutícula	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Inchaço lamelar	50,0	20,0	71,4	100,0	50,0	66,7	16,7	16,7
Inclusão fibrilar	0,0	0,0	14,3	0,0	33,3	50,0	0,0	16,7
Fibrose	16,7	0,0	0,0	33,3	0,0	0,0	33,3	50,0
Ruptura das células pilares	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	83,3	100,0	100,0
Atrofia	33,3	0,0	57,1	33,3	66,7	83,3	66,7	50,0
Células necróticas	66,7	0,0	42,9	0,0	33,3	16,7	83,3	33,3
Necrose	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Hiperplasia	33,3	0,0	0,0	0,0	0,0	33,3	16,7	66,7
Esxudato	83,3	80,0	85,7	100,0	66,7	83,3	66,7	83,3
Granuloma	16,7	20,0	28,6	16,7	50,0	33,3	16,7	66,7
Infiltração	83,3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Tumor Benigno	0,0	0,0	14,3	0,0	0,0	0,0	0,0	16,7
Parasita	50,0	20,0	100,0	0,0	66,7	33,3	50,0	33,3

A partir da identificação das patologias, foram gerados os índices histopatológicos, sendo os resultados das análises estatísticas da PERMANOVA *main test* dos índices histopatológicos apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. PERMANOVA calculada a partir dos dados dos Índices Histopatológicos.

Teste Principal	df	MS	Pseudo-F	P (perm)
Tempo	1	911,85	8,8369	0,011
Tratamento	3	841	8,1503	0,001
Tempo x Tratamento.	3	363,26	3,5204	0,029

A PERMANOVA demonstrou, a partir do teste principal, que os resultados dos índices histopatológicos apresentaram interação entre os fatores tempo de exposição e tratamento (Tabela 4). Considerando o fator tratamento em cada nível (tempo) temos que em 3 dias de exposição, os indivíduos expostos aos tratamentos MPE e MPT apresentaram maiores índices histopatológicos quando comparados àqueles expostos ao tratamento contendo apenas microplásticos virgens, sendo que os expostos à MPT também se diferenciaram significativamente dos expostos ao controle, enquanto que os expostos ao MPE quase se diferenciam significativamente do tratamento controle, o que pode ser observado pelo fato de apresentar valor do índice bem próximo ao do tratamento MPT (Figura 4). Após 7 dias de exposição observou-se que os indivíduos expostos ao tratamento MPT apresentaram maiores índices histopatológicos, se diferenciando dos demais tratamentos contendo microplásticos, entretanto não se diferenciando do controle (Figura 4).

Considerando as diferenças entre os níveis do fator tempo de exposição (3 dias x 7 dias) em cada tratamento, observou-se um aumento significativo nos índices histopatológicos nos tratamentos MP e controle.

O PERMDISP apresentou heterogeneidade das dispersões das *within-group variances*, entretanto as diferenças apontadas pela PERMANOVA provavelmente estejam mais relacionadas à diferença entre as séries de dados, devido à distância entre as médias, do que uma heterogeneidade das variâncias (Figura 4).

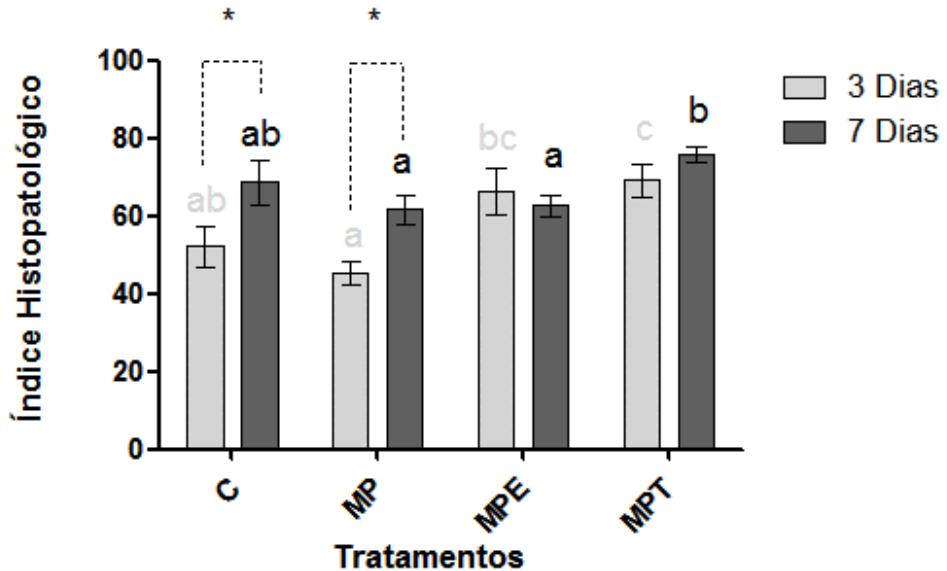


Figura 4. Média e desvio padrão dos Índices Histopatológicos nos diferentes tratamentos, após 3 (barras cinzas claras) e 7 dias (barras cinzas escuras) de exposição. Letras cinzas claras mostram comparações entre as barras cinza clara e as letras cinzas escuras mostram comparações entre barras cinzas escuras. Letras diferentes representam diferenças significativas entre tratamentos ($p<0,05$). Asteriscos representam diferenças significativas entre barras cinzas claras e escuras em um mesmo tratamento ($p<0,05$).

A análise FA/PCA realizada a partir dos resultados das extensões médias das patologias (scores (a) médios) por tratamento e tempo de exposição extraiu três fatores dos dados originais que explicaram 70,55 % das variâncias (Tabela 5).

Os resultados demonstraram que o Fator 1 explicou 35,01% das variâncias dos dados originais, e demonstrou que no tempo de 7 dias existem relações entre a extensão de extravasamento de hemolinfa, congestão/aumento de volume da hemolinfa, aneurisma, necrose, células necróticas e fibrose, sendo que os maiores scores foram observados nos tratamentos MPE (Figura 3C e D) e MPT (Figura 3 E e F) (Tabela 6). Outro grupo de variáveis que também se relacionaram à F1 (com sinal oposto) foram edemas, alteração do canal marginal, ruptura epitelial e ruptura da cutícula e inchaço lamelar apresentando relevância nos tratamentos MP e MPT em 3 dias e em MP em 7 dias (Figura 3B).

Já o Fator 2, que explica 20,24 % das variâncias dos dados originais, refletiu as associações de elevação do epitélio, granuloma, infiltração e tumor benigno. Os maiores scores foram observados em 3 dias no tratamento MPE e em 7 dias nos tratamentos controle (Figura 3A) e MPT (Figura 3F).

Por fim o Fator 3, que explicou cerca de 15,29% das variâncias dos dados originais, relacionou a este fator a descamação do epitélio e ruptura das células pilares se

mostrando especialmente relevantes em todos os tratamentos contendo microplásticos em 3 dias e no tratamento MPT em 7 dias.

Tabela 5. *Loadings* (após rotação Varimax) da FA/PCA aplicada nos dados originais (*loadings* > 0,7 são apresentados em negrito). As variâncias dos fatores principais são dados em porcentagem da variância total nos dados originais das matrizes.

Alterações	Fator 1 35,01%	Fator 2 20,24%	Fator 3 15,29%
Extravasamento de hemolinfa	0,783051	-	-
Congestão/aumento de volume de hemolinfa	0,951164	-	-
Aneurisma	0,775320	-	-
Edema	-0,865120	-	-
Fusão de lamelas	-	-0,764178	-
Elevação do epitélio	-	0,716470	-
Descamação do epitélio	-	-	-0,723672
Alteração canal marginal	-0,750173	-	-
Ruptura epitelial	-0,830649	-	-
Ruptura da cutícula	-0,924512	-	-
Inchaço lamelar	-0,907279	-	-
Inclusão fibrilar	-	-	-
Fibrose	0,897711	-	-
Ruptura das células pilares	-	-	-0,747541
Atrofia das lamelas secundárias	-	-	-
Células necróticas	0,732616	-	-
Necrose	0,735479	-	-
Hiperplasia	-	-	-
Esxudato	-	-	0,761372
Granuloma	-	0,864137	-
Infiltração	-	0,831013	-
Tumor Benigno	-	0,747780	-

Cortes considerados como componentes dos fatores >0,70.

Tabela 6. Scores dos fatores estimados para cada tratamento em cada tempo de exposição.

Tratamentos	Fator 1	Fator 2	Fator 3
3 Dias			
C	0,16344	-0,79401	0,362914
MP	-0,76673	-1,25139	-0,814635
MPE	-0,17607	0,31036	-0,681137
MPT	-1,38480	-0,18916	-0,450487
7 Dias			
C	-0,26189	1,64422	0,090040
MP	-0,27440	-0,07608	2,264641
MPE	1,91882	-0,79636	-0,158083
MPT	0,78165	1,15241	-0,613255

As análises dos dados histomorfométricos a partir da PERMANOVA multifatorial, demonstraram que os fatores tempo e tratamento apresentaram interação entre si (Tabela 7). Considerando as diferenças entre os níveis do fator tempo de exposição (3 dias x 7 dias) em cada tratamento, em 3 dias de exposição o tratamento MPT se diferenciou de todos os tratamentos, enquanto o tratamento MPE apresentou diferença significativa em relação apenas ao controle. Já em 7 dias de exposição o tratamento MP se diferenciou significativamente do controle.

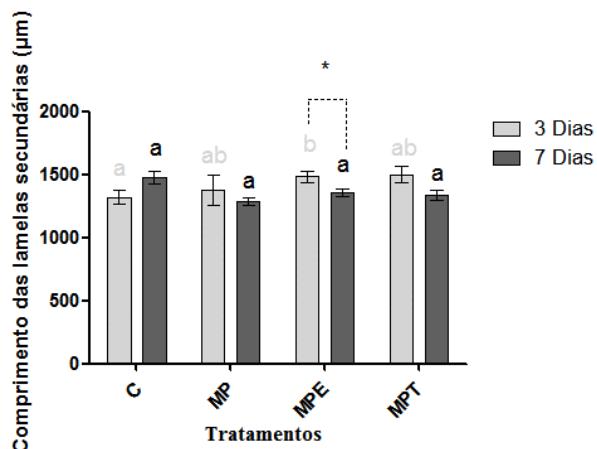
Ao se analisar quais variáveis mais contribuíram para as diferenças em cada tempo de exposição, observou-se pelo SIMPER que em 3 dias o fator largura das lamelas apresentou maior contribuição para as diferenças em relação ao tratamento MPT (Figura 5 B), com os indivíduos expostos à esse tratamento apresentando lamelas mais largas. Para o tratamento MPE a variável que mais contribuiu para sua diferença significativa com o controle foram os comprimentos das lamelas secundárias (Figura 5 A), com os indivíduos expostos ao tratamento MPE apresentando lamelas mais compridas. Já em 7 dias de exposição, a distância inter-lamelar evidenciou diferenças entre o controle e o tratamento MP, este último apresentando uma menor distância entre as lamelas (Figura 5 C).

Ao se analisar interação no fator tempo de exposição pôde-se observar que os tratamentos contendo FPCPs apresentaram influência do tempo de exposição, havendo uma redução significativa da largura das lamelas de MPT e do comprimento das lamelas secundárias de indivíduos expostos à MPE em 7 dias.

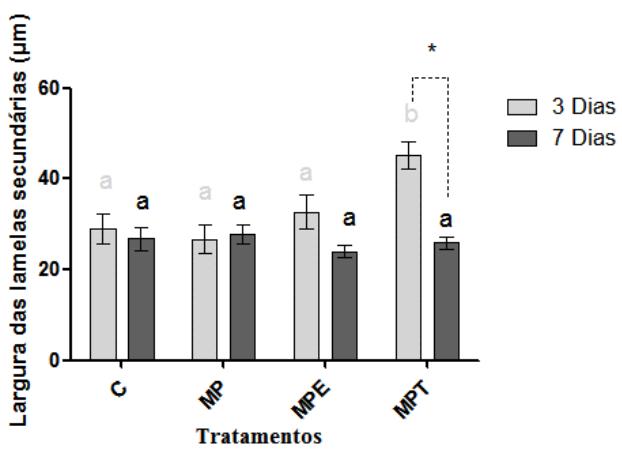
Tabela 7. PERMANOVA calculada a partir dos dados dos parâmetros histomorfométricos.

Teste principal	df	MS	Pseudo-F	P (perm)
Tempo	1	11,974	5,1368	0,003
Tratamento	3	4,431	1,9008	0,058
Tempo x Tratamento	3	9,2663	3,9751	0,001

A)



B)



C)

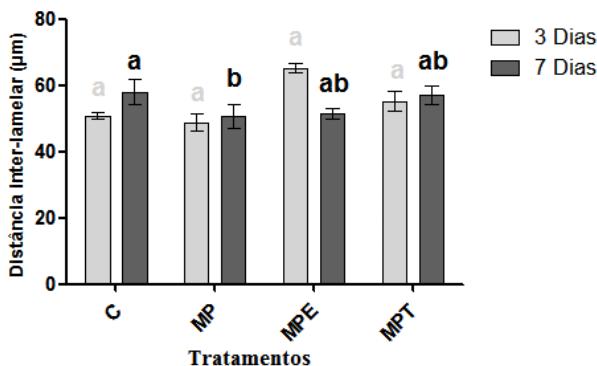


Figura 5. Média e desvio padrão dos dados histomorfométricos das lamelas secundárias das brânquias de *Ucides cordatus* após 3 (barras cinzas claras) e 7 dias (barras cinzas escuras) de exposição.. A) Comprimento das lamelas secundárias; B) Largura das lamelas secundárias; C) Distância inter-lamelar. Letras cinzas claras mostram comparações entre as barras cinza clara e as letras cinzas escuras mostram comparações entre barras cinzas escuras. Letras diferentes representam diferenças significativas entre tratamentos ($p<0,05$). Asteriscos representam diferenças significativas entre barras cinzas claras e escuras em um mesmo tratamento ($p<0,05$).

4 DISCUSSÃO

A partir dos resultados do índice histopatológico, foi possível observar que a influência do tempo de exposição aos tratamentos foi significativa, sendo que em curto prazo (3 dias), organismos expostos aos tratamentos contendo MPs fortificados com FPCPs se encontraram em piores condições de saúde.

Tal fato pode estar relacionado à dessorção destes contaminantes a partir das micropartículas plásticas e transferência para as águas dos aquários conforme apresentado através das análises químicas sendo detectada a presença e concentração das substâncias. Também pode ter ocorrido a assimilação de MPs ainda contendo FPCPs adsorvidos, que também foram detectados e quantificados nos microplásticos pelas análises químicas.

Considerando os FPCPs serem lipofílicos, associado ao fato de brânquias serem o primeiro órgão de contato com contaminantes via água, estudos têm apontado este órgão como um dos alvos de TCS e EE2 (Escarrone et al., 2016; Ricciardi et al., 2016). Ainda de acordo com Webb et al., (2020) as micropartículas de polietileno poderiam propiciar um maior acúmulo de triclosan em invertebrados, como mexilhões, o que possivelmente pode ter desencadeado as lesões observadas, no presente estudo, neste tecido.

Em contraposição à uma exposição mais curta, em 7 dias de exposição, somente indivíduos expostos à tratamentos fortificados com Triclosan apresentaram em piores condições de saúde, apresentando maior índice histopatológico. Isto pode estar relacionado à inefetividade de mecanismos de defesa, como a presença de barreiras físicas e bioquímicas, contra o bactericida.

Conforme relatado, alterações significativas no metabolismo das brânquias de invertebrados foram observadas quando expostos à microplásticos fortificados com Triclosan, como a ativação e inibição de enzimas responsáveis pela biotransformação de xenobióticos e instabilidade da membrana lisossomal (Nobre et al., 2020).

O fato de o tratamento MPE não diferir do controle e MP neste tempo de exposição, ainda que se espere que a concentração do contaminante aumente com o tempo de exposição, pode estar relacionado ao fato de que conforme os fármacos (como EE2) adentram as brânquias via difusão, e vão sendo assimilados pelo organismo, haveria uma transferência para o plasma, e posterior distribuição do fármaco para os outros tecidos via hemolinfa (Ricciardi et al., 2016).

Neste estudo, foi observado que a resposta do índice histopatológico do grupo controle foi temporal com os animais piorando sua condição de saúde com o tempo e não diferiu do tratamento MPT aos 7 dias de exposição. Isto pode estar relacionado a presença de parasitas. Devido ao período de exposição mais prolongado a presença dos parasitas podem ter culminado em alterações nos mecanismos de defesa destes organismos prejudicando a resposta imune nos caranguejos deste tratamento, levando ao grande valor do índice histopatológico no tratamento controle.

Trabalhos pretéritos já relataram fungos e dinoflagelados como possíveis causadores de infiltração hemocítica, necroses, destruição de lacunas hemais, assim como dilatação, compressão e ruptura das lamelas e células pilares nesta espécie de caranguejo (Boeger et al., 2007). Ademais, apesar de o local de coleta ser uma área de proteção ambiental, estudos têm abordado a questão de que em áreas protegidas a maior quantidade de indivíduos, poderia facilitar a transmissão de parasitas (McCallum et al., 2005; Wood et al., 2013).

Patologias leves à severas nas brânquias de *U. cordatus* foram observadas com maior frequência de ocorrência nos tratamentos contendo FPCPs em ambos os tempos de exposição. É consenso que a presença de alterações como necrose, ruptura epitelial, descolamento de cutícula, assim como alteração do canal marginal e ruptura das células pilares podem ocorrer em organismos expostos a baixos níveis de contaminação ou até mesmo em áreas consideradas pristinas (Carvalho Neta et al., 2019; Oliveira et al., 2019; Jesus et al., 2020), se mostrando como mecanismos de defesa contra até mesmo variações ambientais. Entretanto, estes trabalhos também ressaltam que essas lesões podem apresentar maiores frequências em organismos expostos à ambientes com relevante contaminação ambiental, fragilizando organismos, podendo levar à mortalidade até mesmo redução populacional.

Apesar dos índices histopatológicos fornecerem um valor numérico, as informações apresentam poucos detalhes sobre a influência das patologias de maneira mais específica, pois são ponderadas as patologias e somadas gerando um valor médio final único, enquanto que frequências de ocorrência demonstram informações um pouco mais detalhadas, como a distribuição de cada patologia dentro dos grupos amostrais deste estudo.

Complementarmente, adaptações no contexto da integração de valores de severidade e extensão no resultado de cada patologia também se mostrariam importantes ao demonstrar as relações entre alterações à curto e longo prazo dependendo também do

tratamento de exposição. Ainda mais considerando que mesmo alterações consideradas moderadas e leves de acordo com a metodologia de Bernet et al., (1999), como hemorragias, poderiam desencadear outras alterações mais severas, como necroses, se tornando ainda mais difíceis de serem revertidas (Nascimento et al., 2012).

A análise multivariada realizada a partir da extensão média e severidade de ocorrência das patologias, demonstrou relações entre as respostas dentro de cada tratamento em que os indivíduos foram expostos.

Maiores associações foram encontradas entre os tratamentos MPE e MPT em 7 dias de exposição e processos inflamatórios (alterações circulatórias relacionadas a processos necróticos). Células necróticas e necroses podem ser reflexo da inibição enzimática, de danos na integridade da membrana celular e de distúrbios na síntese de proteínas e metabolismo de carboidratos (Manahan, 1991).

No caso dos microplásticos associados ao triclosan, este contaminante poderia levar à uma redução significativa da estabilidade das membranas lisossomais (Cortez et al., 2012; Pusceddu et al., 2018) em brânquias de invertebrados, principalmente em exposições mais prolongadas, acarretando em processos de morte celular e consequentemente o aumento de danos como o agravamento de necroses (Nobre et al., 2020), indicando a redução na função celular (Bernet et al., 1999).

As necroses nas brânquias poderiam também evoluir para processos de cicatrização (Poleksic & Mitrovic-Tutundzic et al., 1994) com o surgimento de fibroses. Fibroses também já foram observadas em órgãos de organismos expostos à TCS e EE2 (Xu et al., 2014; Hemalatha et al., 2019; Zang et al., 2019; Jimoh et al., 2021). Grandes áreas contendo fibroses, poderiam levar à perda funcional do tecido (Jun et al., 2018), uma vez que suas células constituintes, apesar de tornarem o tecido menos vulnerável (Poléksic et al., 2010), não apresentam a mesma função que uma célula epitelial, afetando a troca gasosa e iônica.

Processos hemorrágicos e de congestão podem também ser associados a processos necróticos, visto que áreas de congestão, aneurisma e extravasamento de hemolinfa poderiam impedir a oxigenação de áreas do tecido (Nascimento et al., 2012), levando à morte celular. O aumento do volume de hemolinfa também, pode estar relacionada à eventos recentes de alterações nas trocas gasosas (Kotisc et al., 2017). Tais alterações poderiam ainda comprometer a função de troca gasosa, levando à perda de capacidade suporte pela ruptura das células pilares, assim como uma desarranjo nas lamelas secundárias (Nascimento et al., 2012).

Estudos prévios com *Danio rerio* expostos à condições contendo FPCPs, como o EE2 e Triclosan (Chen et al., 2015; Arman et al., 2021) também observaram a presença de alterações circulatórias, como a dilatação de vasos sanguíneos, e ressaltaram que tais perturbações poderiam portanto prejudicar a fisiologia dos organismos (Nascimento et al., 2012), principalmente em cenários em que há uma constante exposição à contaminantes.

Fortes associações também foram observadas entre as extensões de edemas, alteração do canal marginal, ruptura epitelial e ruptura da cutícula e inchaço lamelar nos tratamentos contendo microplásticos virgens em ambos os tempos de exposição e MPT em 3 dias de exposição. Song et al., (2021) e Elshaer et al., (2013) de fato, já observaram a presença de edemas em peixes expostos à triclosan e aditivos que podem estar presentes em microplásticos. A ruptura epitelial e da cutícula também pode ser associada à presença destes edemas (Garcia et al., 2007).

A cutícula apresenta importante papel nas trocas gasosas e iônicas em caranguejos, possuindo permeabilidade seletiva, o que permite que reduza a perda de sal, logo o comprometimento de sua integridade, poderia também afetar o processo de osmorregulação (Freire et al., 2008). O inchaço das lamelas nestes organismos poderia ainda levar à perda funcional das brânquias caso não haja uma redução na concentração de exposição, levando à eventos de anóxia (Tamse et al., 1995; Negro, 2015).

Ademais a cutícula que recobre o canal marginal nesta espécie é mais rígida, prevenindo o colapso durante a exposição ao ar, sem afetar a troca gasosa (Martinez Gomes et al., 1999). Logo a ruptura da cutícula nesta região também poderia prejudicar de certa maneira a ocupação do ambiente terrestre por esta espécie. Alterações no canal marginal, como dilatação, pode ser resultado da ruptura de células pilares, podendo levar à formação de aneurismas (Hassaninezhad et al., 2014). As alterações no canal marginal também podem afetar a integridade do espaço interlamelar (Martinez Gomez et al., 1999). Edemas, muito embora representem alterações leves, conforme apontado por Bernet et al., 1999, em quadros avançados o epitélio respiratório se separa inteiramente das lamelas primárias e secundárias, ocorrendo necroses, podendo até mesmo levar à morte (Strzyzewska et al., 2016).

A extensão de tais patologias podem ter levado à alterações morfológicas significativas nas lamelas branquiais, conforme corroborado pelas análises histomorfométricas. Estas análises indicaram um aumento na largura das lamelas dos animais de MPT durante os 3 dias de exposição e também em MP aos 7 dias de exposição,

fato que pode ser resultado da redução significativa na distância entre as lamelas, possivelmente pela presença ainda expressiva de edemas.

Tal resultado corrobora com o observado por Barja- Fernández et al., (2013) que também relataram relevante diminuição do espaço inter-lamellar nas brânquias de peixes expostos à BDE-47, um aditivo que pode ser utilizado durante a fabricação de microplásticos. Alterações na morfometria das brânquias podem interferir nos processos de oxigenação (Nero et al., 2006), visto que há um aumento da barreira que impede que a água permeie, afetando a saúde do organismo.

Nos tratamentos MPE em 3 dias de exposição, assim como controle e MPT em 7 dias, ainda foi observada a associação entre elevação do epitélio, granuloma, infiltração e tumor benigno. Hemalatha et al., (2019) e Schwaiger et al., (2004) observaram levantamento epitelial relacionado à exposição de peixes à triclosan e fármacos.

Esta alteração, juntamente com o aumento significativo do comprimento das lamelas em MPE, pode ser explicada como uma das barreiras físicas ativadas em organismos aquáticos com a finalidade de aumentar a distância entre as células, buscando impedir que o agente agressor adentre o sistema circulatório e possa causar efeitos nos organismos (Arman et al., 2021), muito embora, apesar de representarem um mecanismo de defesa, também poderia afetar a troca gasosa devido ao aumento da distância entre as células (Elshaer et al., 2013).

Infiltrações hemocíticas e granulomas também são caracterizados como linhas de defesa em crustáceos, visto que hemócitos, constituintes e responsáveis por esses processos apresentam papel na fagocitose e também no encapsulamento de contaminantes e patógenos (Boeger et al., 2007; Mahajaran et al., 2015). Muito embora infiltrações hemocíticas sejam consideradas benéficas como mecanismo de defesa, extensas áreas com alta densidade de hemócitos poderiam comprimir regiões adjacentes e até mesmo espaço no qual a água circula em brânquias de invertebrados, interferindo em funções intrínsecas ao tecido (Lee et al., 2001). O acúmulo de células de defesa poderiam também alterar o fluxo de hemolinfa, dificultando a oxigenação e ocasionando necroses nestas regiões (Elgendi et al., 2015).

Inclusive a presença de triclosan poderia agravar processos inflamatórios já existentes, até mesmo tumores (Alfhili & Lee et al., 2019), e a presença de estrógenos como 17β estradiol, em determinadas espécies de organismos aquáticos, poderiam alterar a imunidade inata (Maciuszek et al., 2020), a principal resposta imune em caranguejos, levando a possível declínio na saúde dos organismos.

Os animais dos tratamentos contendo microplásticos associados com FPCPs apresentaram a relação entre tumores benignos, presença de fibrose e a presença de granulomas. Acredita-se que possa ter ocorrido um processo de cicatrização, havendo a proliferação de tecido fibroso em grande parte do órgão, o que o caracterizou como tumor benigno (fibroma). Doenças neoplásicas como esta poderiam entretanto evoluir e causar mortalidade em espécies de invertebrados (Costa et al., 2013).

Outras variáveis associadas à MP em 3 dias de exposição e MPE em 7 dias foram a fusão de lamelas. Tal alteração se mostraria também como uma estratégia adaptativa à exposição dos contaminantes (Nascimento et al., 2012), entretanto poderia também diminuir a área disponível para trocas gasosas, aumentando a distância para que a água realiza a troca com a hemolinfa (Elshaer et al., 2013). Karbalalei et al., (2021) observaram a presença de fusão de lamela em peixes expostos à microplásticos.

A presença de maiores extensões de exsudato no tratamento controle em 3 dias de exposição pode estar relacionado também a presença de patógenos. Exsudatos são caracterizados como a presença de fluidos que extravasam de vasos de hemolinfa, por lesão ou inflamação (Bernet et al., 1999), sendo característico de uma inflamação aguda, ou seja, apresentam uma curta duração.

Sherwood et al., (2012) reforçam que a presença de patógenos poderiam levar à processos exudativos em organismos aquáticos. Ademais, a associação desta patologia à microplásticos virgens em 7 dias de exposição pode estar relacionada ao aumento da permeabilidade das paredes dos vasos de hemolinfa, permitindo a saída deste fluido, devido à abrasão das micropartículas. Este processo de exsudação pode levar ao excesso de acúmulo de fluidos, caracterizando edemas inflamatórios que poderia vir a influenciar e reduzir os espaços para trocas gasosas (Santos et al., 2021) sendo que esta alteração também reflete perturbações na pressão osmótica.

Por fim a relação entre ruptura de células pilares e descamação foi observada em todos os tratamentos contendo microplásticos em 3 dias de exposição. Micropartículas de polietileno virgem estiveram associados às alterações na arquitetura e estrutura nas brânquias de peixes (Karami et al., 2016), como extensa descamação. Barja- Fernandez et al., 2013 também observaram descamação do epitélio em peixes expostos à aditivo de microplásticos.

Apesar de células pilares estarem relacionadas à principalmente à sustentação do tecido das lamelas (Rebelo et al., 2000; Jesus et al., 2020), sua ruptura poderia levar ao surgimento de necroses (Martinez et al., 1999). Ademais, poderia haver uma redução da espessura nos vasos de hemolinfa, reduzindo a concentração de oxigênio e acúmulo de gás carbônico (Negro et al., 2015), podendo estar relacionado à processos de necrose (Rebelo, 2000). Em MPT, além da ruptura das células pilares, também foi observada a presença extensa de descamação, sendo que podem também ter levado à exposição de vasos e auxiliado no agravamento de necroses.

Os resultados deste estudo demonstram que o uso de análises histológicas em brânquias de caranguejos da espécie *U. cordatus* permitiram a observação de alterações morfológicas quando expostos à ambientes contendo microplástico e FPCPs, sendo que o grau das patologias demonstrou relação também com o tempo ao qual os organismos ficaram expostos, assim como o tratamento, permitindo observar que indivíduos expostos à TCS e EE2 são significativamente afetados em 3 dias de exposição e somente aqueles expostos à TCS são mais afetados em 7 dias de exposição, demonstrando que o processo de carreamento o processo de carreamento de outros contaminantes induziram danos histológicos mais relevantes.

De maneira geral, o agravamento de tais patologias poderiam comprometer significativamente a saúde geral dos organismos, sendo que ao serem prejudicadas as brânquias, haveria um comprometimento do sistema osmorregulatório, dificultando a adaptação e sobrevivência em ambientes eurialinos, podendo atingir níveis populacionais, desta espécie que já se encontra caracterizada como uma espécie protegida.

Além disso a análise multivariada FA/PCA foi efetiva, demonstrando que tratamentos contendo FPCPs apresentaram fortes associações com alterações mais severas e irreversíveis como necroses.

5 CONCLUSÕES

- Tanto microplásticos virgens e principalmente, aqueles fortificados com FPCPs podem ocasionar efeitos adversos e agravar consideravelmente as patologias nas brânquias de *U. cordatus*, sendo este agravamento influenciado pelo tempo.
- Através da análise integrada das patologias, foi demonstrando que podem ser efetivos os efeitos relacionados à contaminação por microplásticos e FPCPs.
- Este trabalho ressalta a aplicabilidade de estudos histopatológicos em brânquias, ainda mais considerado as patologias de forma discriminadas, como órgão alvo do efeito de microplásticos atuando como carreadores de FPCPs colaborando com estudos já realizados abrangendo análises em um menor nível de organização biológica.

REFERÊNCIAS

- Alfhili M.A., Lee, M.H., 2019. Triclosan: *An Update on Biochemical and Molecular Mechanisms*. *Oxid. Med. Longev.* 1607304. <https://doi.org/10.1155/2019/1607304>.
- Anderson, M. J., Gorley, R. N., Clarke, K. R., 2008. *Permanova for Primer: Guide to software and statistical methods*. Plymouth, UK: Primer-e.
- Arman, S. 2021. *Effects of acute triclosan exposure on gill and liver tissues of zebrafish (Danio rerio)*. *Ann Limnol-Int J Limnol.* 57. <https://doi.org/10.1051/limn/2021004>.
- Avio, C.G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., Regoli, F., 2015. *Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels*. *Environ. Pollut.* 198, 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.021>.
- Barja-Fernández, S., Míguez, J.M., Alvarez-Otero, R. 2013. *Histopathological effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in the gills, intestine and liver of turbot (Psetta maxima)*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 95, 60-8. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.028>.
- Bernet, D., Schmidt-Posthaus, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 2001. *Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution*. *J. Fish Dis.* 22, 25 - 34.
- Boeger, W.A., Pie, M.R., Vicente, V., Ostrensky, A., Hungria, D., Castilho, G.G., 2007. *Histopathology of the mangrove land crab Ucides cordatus (Ocypodidae) affected by lethargic crab disease*. *Dis. Aquat. Org.* 78, 73-81. <https://doi.org/10.3354/dao01847>.
- Brennecke, D., Ferreira, E.C., Costa, T.M., Appel, D., da Gama, B.A., Lenz, M., 2015. *Ingested microplastics (>100 µm) are translocated to organs of the tropical fiddler crab Uca rapax*. *Mar. Pollut. Bull.* 96, 491-5. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.05.001>.
- Buranelli, R.C., Felder, D.L., Mantelatto, F.L., 2019. *Genetic diversity among populations of the Western Atlantic mangrove crab Ucides cordatus (Linnaeus, 1763) (Decapoda: Brachyura: Ocypodidae): evidence for panmixia and useful data for future management and conservation*. *J. Crustacean Biol.* 39, 386-395. <https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruz036>.
- Carvalho Neta, R.N.F., Mota Andrade, T.S.O., de Oliveira, S.R.S., Torres Junior, A.R., da Silva Cardoso, W., Santos, D.M.S., Dos Santos Batista, W., de Sousa Serra, I.M.R., Brito, N.M., 2019. *Biochemical and morphological responses in Ucides cordatus (Crustacea, Decapoda) as indicators of contamination status in mangroves and port areas from northern Brazil*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 26, 15884-15893. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04849-0>.
- Carr, S.A., Liu, J., Tesoro, A.G., 2016. *Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants*. *Water Res.* 91, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.01.002>.

Chace, F.A., Hobbs, H.H., 1969. *The freshwater and terrestrial decapod crustaceans of the West Indies with special reference to Dominica*. Bull. U.S. Natl. Mus., 292: 1–258.

Chen, P., Li, S., Liu, L., Xu, N. 2015. *Long-term effects of binary mixtures of 17 α -ethinyl estradiol and dibutyl phthalate in a partial life-cycle test with zebrafish (*Danio rerio*)*. Environ Toxicol Chem. 3, 518-26. <https://doi.org/10.1002/etc.2803>.

Cortez, F.S., Pereira, C.D.S., Santos, A.R., Cesar, A., Choueri, R.B., Martini, G.A., Bohrer-Morel, M.B., 2012. *Biological effects of environmentally relevant concentrations of the pharmaceutical Triclosan in the marine mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758)*. Environ. Pollut. 168, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.04.024>.

Costa, P.M., Carreira, S., Costa, M.H., Caeiro, S., 2013. *Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality*. Aquat Toxicol. 126, 442-54. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.08.013>.

Elshaer, F. M., Khalaf-Allah, H. M. M., Bakry, S., 2013. *Histopathological alterations in gills of some poecilid fishes after exposure to bisphenol A*. World J Fish Marine Sci, 5, 693-700.

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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111913>.

Escarrone, A.L., Caldas, S.S., Primel, E.G., Martins, S.E., Nery, L.E., 2016. *Uptake, tissue distribution and depuration of triclosan in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to freshwater*. Sci Total Environ. 560-561, 218-24. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.039>.

EPA, 2007b. Method 1694: *Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/ MS* EPA821-R-08-002. https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-10/documents/method_1694_2007.pdf (acessado: 20.07.2021).

Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. *The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste*. Physiol Rev. 85, 97-177. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2003>

Elgendi, M. Y., Abdelsalam, M., Moustafa, M., Kenawy, A. M., Seida, A., 2015. *Caligus elongatus and Photobacterium damselaе subsp piscicida concomitant infections affecting broodstock European seabass, *Dicentrarchus labrax*, with special reference to histopathological responses*. J Aquac Res Dev, 6, 346.

Freire, C.A., Onken, H., McNamara, J.C., 2008. *A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 151, 272-304. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.05.008>

- Garcia-Santos, S., Monteiro, S. M., Carrola, J., Fontainhas-Fernandes, A., 2007. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59, 376-381.
<https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000200017>.
- Hassaninezhad, L., Safahieh, A., Salamat, N., Savari, A., Majd, N.E., 2014. Assessment of gill pathological responses in the tropical fish yellowfin seabream of Persian Gulf under mercury exposure. *Toxicol Rep.* 1, 621-628.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.07.016>
- Henry, R.P., Lucu, C., Onken, H., Weihrauch, D., 2012. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Front Physiol.* 3, 431.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00431>.
- Hemalatha, D., Nataraj, B., Rangasamy, B., Shobana, C., Ramesh, M., 2019. DNA damage and physiological responses in an Indian major carp *Labeo rohita* exposed to an antimicrobial agent triclosan. *Fish Physiol. Biochem.* 45, 1463-1484.
<https://doi.org/10.1007/s10695-019-00661-2>.
- Hsieh, S. L., Wu, Y. C., Xu, R. Q., Chen, Y. T., Chen, C. W., Singhania, R. R., Dong, C. D., 2021. Effect of polyethylene microplastics on oxidative stress and histopathology damages in *Litopenaeus vannamei*. *Environ. Pollut.* 288, 117800.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117800>
- Jesus, W.B., Oliveira, S.R.S., Andrade, T.S.O. M., Sousa, J. B. M., Pinheiro-Sousa, D. B., Santos, D. M. S., Cardoso, W.S., Carvalho-Neta, R.N.F., 2020. Biological responses in gills and hepatopancreas of *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) as indicative of environmental contamination in mangrove areas in Maranhão State, Brazil. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 48, 226-236. <https://dx.doi.org/10.3856/vol48-issue2-fulltext-2374>.
- Jimoh, R.O., Sogbanmu, T.O., 2021. Sublethal and environmentally relevant concentrations of triclosan and triclocarban induce histological, genotoxic, and embryotoxic effects in *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Environ Sci Pollut.* 28, 31071–31083. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12820-1>
- Jun, J.I., Lau, L.F., 2018. Resolution of organ fibrosis. *J. Clin. Invest.* 128, 97-107.
<https://doi.org/10.1172/JCI93563>.
- Kostić, J., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Aborgiba, M., Gačić, Z., Paunović, M., Višnjić-Jeftić, Z., Rašković, B., Poleksić, V., Lenhardt, M., Vuković-Gačić, B., 2017. The impact of multiple stressors on the biomarkers response in gills and liver of freshwater breams during different seasons. *Sci. Total Environ.* 601–602, 1670-1681
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.273>
- Karami, A., Romano, N., Galloway, T., Hamzah, H., 2016. Virgin microplastics cause toxicity and modulate the impacts of phenanthrene on biomarker responses in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Environ. Res.* 151, 58-70.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.07.024>.
- Karbalaei, S., Hanachi, P., Rafiee, G., Seifori, P., Walker, T.R. 2021 Toxicity of polystyrene microplastics on juvenile *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) after

individual and combined exposure with chlorpyrifos, *J. Hazard. Mater.* 403, 123980. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123980>.

Kurchaba, N., Cassone, B.J., Northam, C., Ardelli, B.F., LeMoine, C.M.R., 2020. *Effects of MP Polyethylene Microparticles on Microbiome and Inflammatory Response of Larval Zebrafish*. *Toxics.* 8, 55. <https://doi.org/10.3390/toxics8030055>.

Lambert, S., Wagner, M., 2018. *Microplastics Are Contaminants of Emerging Concern in Freshwater Environments: An Overview*. In: Wagner M., Lambert S. (eds) *Freshwater Microplastics. The Handbook of Environmental Chemistry*, 58. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61615-5_1.

Lebreton, L., Slat, B., Ferrari, F., Sainte-Rose, B., Aitken, J., Marthouse, R., Hajbane, S., Cunsolo, S., Schwarz, A., Levivier, A., Noble, K., Debeljak, P., Maral, H., Schoeneich-Argent, R., Brambini, R., Reisser, J., 2018. *Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic*. *Sci Rep* 8, 4666. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22939-w>.

Lehutso, R. F., Daso, A. P., Okonkwo, J. O., 2017. *Occurrence and environmental levels of triclosan and triclocarban in selected wastewater treatment plants in Gauteng Province, South Africa*. *Emerg. Contam.* 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2017.07.001>.

Lee, M. K., Cho, B. Y., Lee, S. J., Kang, J. Y., Do Jeong, H., Huh, S. H., Huh, M. D., 2001. *Histopathological lesions of Manila clam, Tapes philippinarum, from Hadong and Namhae coastal areas of Korea*. *Aquaculture*, 201, 199-209. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00648-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00648-2).

Lopes, J., Coppola, F., Soares, A. M., Meucci, V., Pretti, C., Polese, G., Freitas, R., 2021. *How temperature rise will influence the toxic impacts of 17 alpha-ethinylestradiol in Mytilus galloprovincialis?*. *Environ. Res.* 112279. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112279>

Maciuszek, M., Pijanowski, L., Pekala-Safinska, A., Kemenade B.M.L.V., Chadzinska, M., 2020. *M. 17 β -Estradiol affects the innate immune response in common carp*. *Fish Physiol. Biochem.* 46, 1775–1794. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00827-3>.

Manahan, Stanley E. 1991. *Environmental Chemistry*. Fifth edition. Lewis Publishers, Inc. Chelsa, MI.

Mak, C.W., Yeung, K.C.F., Chan, K.M., 2019, *Acute toxic effects of polyethylene microplastic on adult zebrafish*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 182, 109442. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109442>.

Mandarim-de-Lacerda, C.A., 2003. *Stereological tools in biomedical research*. *An. Acad. Bras. Cienc.* 75, 469-86. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652003000400006>.

Marinsek, G.P., 2018. Alterações Morfológicas no intestino de Sphoeroides testudineus decorrentes de diferentes níveis de contaminação em três estuários do litoral do estado de São Paulo (Dissertação de mestrado), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

McCallum, H., Gerber, L., Jani, A., 2005. *Does infectious disease influence the efficacy of marine protected areas? A theoretical framework*. *J. Appl. Ecol.*, 42, 688-698. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2005.01043.x>

- Maharajan, A., Narayanasamy, Y., Ganapiriy, V., Shanmugavel, K., 2015. *Histological alterations of a combination of Chlorpyrifos and Cypermethrin (Nurocombi) insecticide in the fresh water crab, Paratelphusa jacquemontii (Rathbun).* *J. Basic Appl. Zoo.* 72, 104-112. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.08.002>.
- Martinez, C.B.R., Alvares, E.P., Harris, R.R., Santos, M.C.F. 1999. *A morphological study on posterior gills of the mangrove crab Ucides cordatus. Tissue Cell*, 31, 380-389. <https://doi.org/10.1054/tice.1999.0046>.
- Nascimento, A.A., Araújo, F.G., Gomes, I.D., Mendes, R, M., Sales, A., 2012. *Fish gills alterations as potential biomarkers of environmental quality in a eutrophized tropical river in south-eastern Brazil. Anat. Histol. Embryol.* 41, 209-16. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2011.01125.x>.
- Negro, C.L., 2015. *Histopathological effects of endosulfan to hepatopancreas, gills and ovary of the freshwater crab Zilchiopsis collastinensis (Decapoda: Trichodactylidae).* *Ecotoxicol Environ Saf.* 113, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.025>
- Nero, V., Farwell, A., Lister, A., Van der Kraak, G., Lee, L.E., Van Meer, T., MacKinnon, M.D., Dixon, D.G., 2006. *Gill and liver histopathological changes in yellow perch (Perca flavescens) and goldfish (Carassius auratus) exposed to oil sands process-affected water. Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 365-77. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.04.014>.
- Nobre, C.R., Moreno, B.B., Alves, A.V., de Lima Rosa J., da Rosa Franco, H., Abessa, D.M.S., Maranho, L.A., Choueri, R.B., Gusso-Choueri, P.K., Pereira C.D.S., 2020. *Effects of microplastics associated with triclosan on the oyster Crassostrea brasiliiana: An integrated biomarker approach. Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 79, 101-110. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00729-8>.
- Oliveira, S.R.S., Batista, W.S., Sousa, J.B.M., Noleto, K.S., Lima, I.M.A., Andrade, T.S.O.M., Cardoso, W.S., Carvalho-Neta, R.N.F., 2019. *Enzymatic and Histological Biomarkers in Ucides cordatus (Crustacea, Decapoda) in an Industrial Port on the North Coast of Brazil. Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 102, 802–810. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02594-1>.
- Ortega, P., Vitorino, H.A., Moreira, R.G., Pinheiro, M.A., Almeida, A.A., Custódio, M.R., Zanotto, F.P., 2017. *Physiological differences in the crab Ucides cordatus from two populations inhabiting mangroves with different levels of cadmium contamination. Environ Toxicol Chem.* 36, 361-371. <https://doi.org/10.1002/etc.3537>.
- Pinheiro, M.A., Duarte, L.F., Toledo, T.R., Adam, M.L., Torres, R.A., 2013. *Habitat monitoring and genotoxicity in Ucides cordatus (Crustacea: Ucididae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. Environ. Monit. Assess.* 185, 8273-85. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3172-9>.
- Poleksic, V., Mitrovic-Tutundzic, V., 1994. *Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Fishing News Books Ltd., Farnham*, p.339-352.
- Poleksic, V., Lenhardt, M., Jaric, I., Djordjevic, D., Gacic, Z., Cvijanovic, G., Raskovic, B., 2010. *Liver, gills, and skin histopathology and heavy metal content of the Danube sterlet (Acipenser ruthenus Linnaeus, 1758). Environ Toxicol Chem.* 29, 515-21. <https://doi.org/10.1002/etc.82>.

- Pusceddu, F.H., Choueri, R.B., Pereira, C.D.S., Cortez, F.S., Santos, D.R.A., Moreno, B.B., Santos, A.R., Rogero, J.R., Cesar, A., 2018. *Environmental risk assessment of triclosan and ibuprofen in marine sediments using individual and sub-individual endpoints*. Environ. Pollut. 232, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2017.09.046>.
- Rasheed, T., Bilal, M., Nabeel, F., Adeel, M., Iqbal, H.M.N., 2019. *Environmentally related contaminants of high concern: Potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment*. Environ Int. 122, 52-66. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.038>.
- Rebelo, M.F., Rodriguez, E.M., Santos, E.A., Ansaldi, M., 2000. *Histopathological changes in gills of the estuarine crab Chasmagnathus granulata (Crustacea-Decapoda) following acute exposure to ammonia*. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 125, 157-64. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(99\)00093-6](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(99)00093-6).
- Ricciardi, K.L., Poynton, H.C., Duphily, B.J., Blalock, B.J., Robinson, W.E., 2016. *Bioconcentration and depuration of (14)C-labeled 17 α -ethinyl estradiol and 4-nonylphenol in individual organs of the marine bivalve Mytilus edulis*. Environ. Toxicol. Chem. 35, 863-73. <https://doi.org/10.1002/etc.3137>.
- Santos, R.M.B., Monteiro, S.M., Cortes, R.M.V., Pacheco, F.A.L., Fernandes, L.F.S., 2021. *Seasonal effect of land use management on gill histopathology of Barbel and Douro Nase in a Portuguese watershed*. Sci Total Environ. 764, 142869. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142869>
- Sauvé, S., Desrosiers, M., 2014. *A review of what is an emerging contaminant*. Chem. Cent. J. 8, 15. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-15>.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R.D., 2004. *Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout*. Aquat. Toxicol. 68, 141-50. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.014>.
- Sherwood, L., Klandorf, H., Yancey, P., 2012. *Animal physiology: from genes to organisms*. second ed Brooks/Cole. p. 500.
- Song, X., Wang, X., Li, X., Yan, X., Liang, Y., Huang, Y., Huang, L., Zeng, H., 2021. *Histopathology and transcriptome reveals the tissue-specific hepatotoxicity and gills injury in mosquitofish (*Gambusia affinis*) induced by sublethal concentration of triclosan*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 220, 112325. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112325>.
- Strzyzewska, E., Szarek, J., Babinska, I., 2016. *Morphologic evaluation of the gills as a tool in the diagnostics of pathological conditions in fish and pollution in the aquatic environment: a review*. Vet Med. 61, 123-132. <https://doi.org/10.17221/8763-VETMED>
- Tabachnick, B.G., Fidell, L.S., 1989. *Using multivariate statistics*. second ed New York, 916 Harper Collins College. 746 p.
- Tang, Z., Liu, Z.H., Wang, H., Dang, Z., Liu, Y., 2021. *Occurrence and removal of 17 α -ethynodiol (EE2) in municipal wastewater treatment plants: Current status and challenges*. Chemosphere. 271, 129551. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129551>.

- Tamse, C. T., Gacutan, R. Q., Tamse, A. F., 1995. *Changes induced in the gills of milkfish (*Chanos chanos* Forsskål) fingerlings after acute exposure to nifurpirinol (Furanace; P-7138).* Bull Environ Contam Toxicol. 54, 591-596.
- Valdez-Carrillo, M., Abrell, L., Ramírez-Hernández, J., Reyes-López, J.A., Carreón-Diazconti, C., 2020. *Pharmaceuticals as emerging contaminants in the aquatic environment of Latin America: a review.* Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 27, 44863-44891. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10842-9>.
- Vasantha, R. L., Arulvasu, C., Kumar, P., Srinivasan, P., 2021. *Ingestion of microplastics and its potential for causing structural alterations and oxidative stress in Indian green mussel *Perna viridis*—A multiple biomarker approach.* Chemosphere. 283, 130979. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130979>
- 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. <https://doi.org/10.1021/es302332w>.
- Wang, W., Gao, H., Jin, S., Li, R., Na, G., 2019. *The ecotoxicological effects of microplastics on aquatic food web, from primary producer to human: A review.* Ecotoxicol. Environ. Saf., 173, 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.113>
- Wang, T., Hu, M., Xu, G., Shi, H., Leung, J., Wang, Y., 2021. *Microplastic accumulation via trophic transfer: Can a predatory crab counter the adverse effects of microplastics by body defense?* Sci. Total Environ. 754, 142099. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142099>.
- Webb, S., Gaw, S., Marsden, I.D., McRae, N.K., 2020. *Biomarker responses in New Zealand green-lipped mussels *Perna canaliculus* exposed to microplastics and triclosan.* Ecotoxicol. Environ. Saf. 201, 110871. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110871>.
- Wood, C.L, Micheli, F., Fernández, M., Gelcich, S., Castilla, J.C., Carvajal, J., 2013. *Marine protected areas facilitate parasite populations among four fished host species of central Chile.* J. Anim. Ecol. 82, 1276-87. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12104>.
- Wu, C., Zhang, K., Huang, X., Liu, J., 2016. *Sorption of pharmaceuticals and personal care products to polyethylene debris.* Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 8819–8826. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6121-7>.
- Xu, N., Chen, P., Liu, L., Zeng, Y., Zhou, H., Li, S., 2014. *Effects of combined exposure to 17 α -ethynodiol and dibutyl phthalate on the growth and reproduction of adult male zebrafish (*Danio rerio*).* Ecotoxicol. Environ. Saf. 107, 61-70. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.001>.
- Zang, L., Ma, Y., Huang, W., Ling, Y., Sun, L., Wang, X., Zeng, A., Dahlgren, R.A., Wang, C., Wang, H., 2019. *Dietary *Lactobacillus plantarum* ST-III alleviates the toxic effects of triclosan on zebrafish (*Danio rerio*) via gut microbiota modulation.* Fish Shellfish Immunol. 84, 1157-1169. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.007>.

Zampogno, G.C., Caniçali, F.B., Cozer, C.D.R., Otegui, M.B.P., Graceli, J.B., Costa, M.B.D., 2021. *Spatial distribution of microplastics in the superficial sediment of a mangrove in Southeast Brazil: A comparison between fringe and basin*. *Sci Total Environ.* 784, 146963. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146963>.

CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos neste estudo pôde-se demonstrar que tanto microplásticos virgens, como atuando como carreadores de FPCPs, podem causar efeitos adversos em diferentes níveis de organização biológica em caranguejo *U. cordatus*. As análises químicas demonstraram que microplásticos podem liberar 17 α etinilestradiol e triclosan para ambientes aquáticos, assim como ainda reter considerável quantidade adsorvida pelo prazo de uma semana.

A partir da análise de biomarcadores na hemolinfa foi possível observar que o tempo de exposição dos organismos aos tratamentos se mostrou como um importante fator relacionado aos efeitos observados, com FPCPs já apresentando efeitos em um menor período, enquanto com um maior tempo de exposição os efeitos foram acentuados com a presença de microplásticos. Sendo assim, a hemolinfa se mostrou como uma técnica que pode ser aplicada em trabalhos de monitoramento desta espécie ameaçada, resguardando questões éticas e de bem-estar animal.

Considerando as brânquias como principal órgão de contato com contaminantes em meio aquático e responsável por processo de respiração e osmorregulação destes organismos, por onde microplásticos virgens e contaminados poderiam ser assimilados e até mesmo transportados para a hemolinfa. Os resultados obtidos no presente trabalho, indicaram efeitos nas brânquias de indivíduos expostos principalmente à microplásticos contaminados com FPCPs.

O tempo de exposição é determinante quanto as alterações e gravidade das patologias, bem como há associação com TCS. Logo, análises histológicas se mostram como uma importante ferramenta para avaliação de efeitos adversos associados a presença de contaminantes e microplástico.

Por fim, o presente trabalho demonstra a importância da utilização de biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica a fim de investigar respostas mais responsivas e que melhor demonstrem possíveis mecanismos de ação em cenários de poluição por FPCPs e microplásticos.

REFERÊNCIAS

- Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., Yang, Y., 2017. *Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review*. *Environ. Int.* 99, 107-119. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010>.
- Almeida, Â., Silva, M. G., Soares, A. M., Freitas, R., 2020. *Concentrations levels and effects of 17alpha-Ethinylestradiol in freshwater and marine waters and bivalves: A review*. *Environ. Res.*, 185, 109316. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109316>.
- Amorim, L. C. A., 2003. *Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais*. *Rev. bras. Epidemiol.* 6, 158-170. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2003000200009>.
- Avio, C.G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., Regoli, F., 2015. *Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels*. *Environ. Pollut.* 198, 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.021>.
- Bakir, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2012. *Competitive sorption of persistent organic pollutants onto microplastics in the marine environment*. *Mar Pollut Bull.* 6, :2782-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.09.010>.
- Balmer, M.E., Poiger, T., Droz, C., Romanin, K., Bergqvist, P.A., Müller, M.D., Buser, H.R., 2004. *Occurrence of methyl triclosan, a transformation product of the bactericide triclosan, in fish from various lakes in Switzerland*. *Environ. Sci. Technol.* 38, 390-5. doi: <https://doi.org/10.1021/es030068>.
- Barboza, L.G.A., Vieira, L.R., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, F., Carvalho, C., Guilhermino, L., 2018. *Microplastics cause neurotoxicity, oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass, Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758)*. *Aquat. Toxicol.* 195, 49-57. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.12.008>.
- Barreiros, L., Queiroz, J. F., Magalhães, L. M., Silva, A. M., Segundo, M. A., 2016. *Analysis of 17-β-estradiol and 17-α-ethinylestradiol in biological and environmental matrices—a review*. *Microchem. J.* 126, 243-262. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109316>.
- Behera, S.K., Kim, H.W., Oh, J.E., Park, H.S., 2011. *Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea*. *Sci. Total. Environ.* 409, 4351-60. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.07.015>.
- Binelli, A., Parolini, M., Pedriali, A., Provini, A., 2011. *Antioxidant activity in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in response to triclosan exposure*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 217, 421-430. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0597-4>.
- Boucher, J., Friot, D., 2017. *Primary Microplastics in the Oceans: A Global Evaluation of Sources*. 10.2305/IUCN.CH.2017.01.en.

Bour, A., Hossain, S., Taylor, M., Sumner, M., Carney Almroth, B., 2020. *Synthetic microfiber and microbead exposure and retention time in model aquatic species under different exposure scenarios*. *Front. Environ. Sci.* 8, 83.

<https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00083>.

Brennecke, D., Ferreira, E. C., Costa, T. M., Appel, D., da Gama, B. A., Lenz, M., 2015. *Ingested microplastics (> 100 µm) are translocated to organs of the tropical fiddler crab Uca rapax*. *Mar. Pollut. Bull.*, 96, 491-495.

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.05.001>.

Buranelli, R. C., Felder, D. L., Mantelatto, F. L., 2019. *Genetic diversity among populations of the Western Atlantic mangrove crab Ucides cordatus (Linnaeus, 1763) (Decapoda: Brachyura: Ocypodidae): evidence for panmixia and useful data for future management and conservation*. *J. Crustac.*, 39, 386-395.

<https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruz036>.

Carvalho Neta, R.N.F., Mota Andrade, T.S.O., de Oliveira, S.R.S., Torres Junior, A.R., da Silva Cardoso, W., Santos, D.M.S., Dos Santos Batista, W., de Sousa Serra, I.M.R., Brito, N.M., 2019. *Biochemical and morphological responses in Ucides cordatus (Crustacea, Decapoda) as indicators of contamination status in mangroves and port areas from northern Brazil*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 26, 15884-15893.

<https://doi.org/10.1007/s11356-019-04849-0>.

Chen, X., Richard, J., Liu, Y., Dopp, E., Tuerk, J., Bester, K., 2012. *Ozonation products of triclosan in advanced wastewater treatment*. *Water Research*. 46, 2247-2256.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.01.039>.

Choi, E., Alsop, D., Wilson, J. Y., 2018. *The effects of chronic acetaminophen exposure on the kidney, gill and liver in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *Aquat. Toxicol.* 198, 20-29. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.007>.

Colin, N., Porte, C., Fernandes, D., Barata, C., Padrós, F., Carrassón, M., Monroy, M., Cano-Rocabayera, O., de Sostoa, A., Piña, B., Maceda-Veiga, 2016 A. *Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers*. *Sci Total Environ.* 540, 307-23. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.099>.

Cortez, F.S., Pereira, C.D.S., Santos, A.R., Cesar, A., Choueri, R.B., Martini, G.A., Bohrer-Morel, M.B., 2012. *Biological effects of environmentally relevant concentrations of the pharmaceutical Triclosan in the marine mussel Perna perna (Linnaeus, 1758)*. *Environ. Pollut.* 168, 145–150.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.04.024>.

Costa, L. L., Arueira, V. F., da Costa, M. F., Di Beneditto, A. P. M., Zalmon, I. R., 2019. *Can the Atlantic ghost crab be a potential biomonitor of microplastic pollution of sandy beaches sediment?* *Mar. Pollut. Bull.* 145, 5-13.

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.05.019>.

Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P., 2011. *Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature*. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 214, 442-448.
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.002>.

Deng, H., He, J., Feng, D., Zhao, Y., Sun, W., Yu, H., Ge, C., 2021. *Microplastics pollution in mangrove ecosystems: A critical review of current knowledge and future directions*. *Sci Total Environ.* 753, 142041.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142041>

Dharmadasa, W. S., Andrady, A. L., Kumara, P. T. P., Maes, T., Gangabadage, C. S., 2021. *Microplastics pollution in Marine Protected Areas of Southern Sri Lanka*. *Mar. Pollut. Bull.* 168, 112462. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112462>.

Dhillon, G. S., Kaur, S., Pulicharla, R., Brar, S. K., Cledón, M., Verma, M., Surampalli, R. Y., 2015. *Triclosan: current status, occurrence, environmental risks and bioaccumulation potential*. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 12, 5657-5684.

<https://doi.org/10.3390/ijerph120505657>.

Duarte, C. M., 2014. *Global change and the future ocean: a grand challenge for marine sciences*. *Front. Mar. Sci.* 1, 63. <https://doi.org/10.3389/fmars.2014.00063>.

Duarte, L.F.A., Souza, C.A., Nobre, C.R., Pereira, C.D.S., Pinheiro, M.A.A., 2016. *Multi-level biological responses in Ucides cordatus (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ucididae) as indicators of conservation status in mangrove areas from the western atlantic*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 133, 176-187.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.07.018>.

Eriksen, M., Lebreton, L.C., 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. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111913>.

Farrell, P., Nelson, K., 2013. *Trophic level transfer of microplastic: Mytilus edulis (L.) to Carcinus maenas (L.)*. *Environ. Pollut.* 177, 1-3.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.01.046>.

Gouin, T., Avalos, J., Brunning, I., Brzuska, K., de Graaf, J., Kaumanns, T., Koning, T., Meyberg, M., Rettinger, K., Schlatter, H., Thomas, J., van Welie, R., Wolf, T., 2015. *Use of micro-plastic beads in cosmetic products in Europe and their estimated emissions to the North Sea environment*. *Int. J. Appl. Sci. SOFW-J.* 141, 40–46.

Green, D.S., Colgan, T.J., Thompson, R.C., Carolan, J.C., 2019. *Exposure to microplastics reduces attachment strength and alters the haemolymph proteome of blue mussels (Mytilus edulis)*. *Environ Pollut.* 246:423-434.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.017>

Guerranti, C., Martellini, T., Perra, G., Scopetani, C., Cincinelli, A., 2019. *Microplastics in cosmetics: Environmental issues and needs for global bans*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 68, 75-79. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.03.007>.

Guo, X., Wang, J., 2019. *The chemical behaviors of microplastics in marine environment: A review*. *Mar. Pollut. Bull.* 142, 1-14.

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.019>.

Gusso-Choueri, P.K., Choueri, R.B., Santos, G.S., de Araújo, G.S., Cruz, A.C., Stremel, T., de Campos, S.X., Cestari, M.M., Ribeiro, C.A., Abessa, D.M., 2016. *Assessing genotoxic effects in fish from a marine protected area influenced by former mining activities and other stressors*. *Mar Pollut Bull.* 104, 229-39. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.025>.

Halden, R. U., Paull, D. H., 2005. *Co-occurrence of triclocarban and triclosan in US water resources*. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1420-1426. doi: <https://doi.org/10.1021/es049071e>.

Hook, S. E., Gallagher, E. P., Batley, G. E., 2014. *The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health*. *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 10, 327-341. doi: <https://doi.org/10.1002/ieam.1530>.

Jambeck, J.R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., Law, K.L., 2015. *Marine pollution. Plastic waste inputs from land into the ocean*. *Science*. 347, 768-71. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1260352>.

Lacerda, A.L.D.F., Rodrigues, L.D.S., van Sebille, E., Rodrigues, F.L., Ribeiro, L., Secchi, E.R., Kessler, F., Proietti, M.C., 2019. *Plastics in sea surface waters around the Antarctic Peninsula*. *Sci Rep.* 9, 3977. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40311-4>.

Lahens, L., Strady, E., Kieu-Le, T.C., Dris, R., Boukerma, K., Rinnert, E., Gasperi, J., Tassin, B., 2018. *Macroplastic and microplastic contamination assessment of a tropical river (Saigon River, Vietnam) transversed by a developing megacity*. *Environ. Pollut.* 236, 661-671. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.005>.

Lima, A.R., Barletta, M., Costa, M.F., Ramos, J.A., Dantas, D.V., Melo, P.A., Justino, A.K., Ferreira, G.V., 2016. *Changes in the composition of ichthyoplankton assemblage and plastic debris in mangrove creeks relative to moon phases*. *J Fish Biol.* 89, 619-40. doi: <https://doi.org/10.1111/jfb.12838>.

Lowe, D.M., Moore, M.N., Evans, B.M., 1992. *Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab Limanda limanda*. *Mar Ecol. Prog. Ser.*, 91, 135–140.

Mai, L., Bao, L.J., Shi, L., Wong, C.S., Zeng, E.Y., 2018. *A review of methods for measuring microplastics in aquatic environments*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25, 11319-11332. doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1692-0>.

Maranho, L.A., Baena-Nogueras, R.M., Lara-Martín, P.A., 2014. *Bioavailability, oxidative stress, neurotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals bound to marine sediments. The use of the polychaete Hediste diversicolor as bioindicator species*. *Environ. Res.* 134, 353–365. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.08.014>.

Martinez, C.B.R., Alvares, E.P., Harris, R.R., Santos, M.C.F., 1999. *A morphological study on posterior gills of the mangrove crab Ucides cordatus*. *Tissue Cell*, 31, 380-389. doi: <https://doi.org/10.1054/tice.1999.0046>.

- Mohan, S., Balakrishnan, P., 2019. *Triclosan in treated wastewater from a city wastewater treatment plant and its environmental risk assessment*. *Water Air Soil Pollut.* 230, 1-13.
- Montagner, C. C., Jardim, W. F., Von der Ohe, P. C., Umbuzeiro, G. A. 2014. *Occurrence and potential risk of triclosan in freshwaters of São Paulo, Brazil—the need for regulatory actions*. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 21, 1850-1858. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2063-5>.
- Montagner, C. C., Vidal, C., Acayaba, R. D., 2017. *Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios*. *Quim. Nova*, 40, 1094-1110. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170091>
- Murphy, F., Ewins, C., Carbonnier, F., Quinn, B., 2016. *Wastewater treatment works (WwTW) as a source of microplastics in the aquatic environment*. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5800-5808. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05416>.
- NOAA, National Oceanic and Atmospheric Administration, 2018 *Why should we care about the ocean?* National Ocean Service website. Disponível em: <https://oceanservice.noaa.gov/facts/why-care-about-ocean.html>, (acessado 18.08.2021).
- Nobre, C.R., Santana, M.F.M., Maluf, A., Cortez, F.S., Cesar, A., Pereira, C.D.S., Turra, A., 2015. *Assessment of microplastic toxicity to embryonic development of the sea urchin Lytechinus variegatus (Echinodermata: Echinoidea)*. *Mar. Pollut. Bull.* 92, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.050>.
- Nobre, C.R., Moreno, B.B., Alves, A.V., de Lima Rosa J., da Rosa Franco, H., Abessa, D.M.S., Maranho, L.A., Choueri, R.B., Gusso-Choueri, P.K., Pereira C.D.S., 2020. *Effects of microplastics associated with triclosan on the oyster Crassostrea brasiliiana: An integrated biomarker approach*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 79, 101-110. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00729-8>.
- Ogata, Y., Takada, H., Mizukawa, K., Hirai, H., Iwasa, S., Endo, S., Mato, Y., Saha, M., Okuda, K., Nakashima, A., Murakami, M., Zurcher, N., Booyatumonondo, R., Zakaria, M.P., Dung le, Q., Gordon, M., Miguez, C., Suzuki, S., Moore, C., Karapanagioti, H.K., Weerts, S., McClurg, T., Burres, E., Smith, W., Van Velkenburg, M., Lang, J.S., Lang, R.C., Laursen, D., Danner, B., Stewardson, N., Thompson, R.C., 2009. *International Pellet Watch: global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs*. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1437-46. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.06.014>.
- Ohgaki, T., Takada, H., Yoshida, R., Mizukawa, K., Yeo, B. G., Alidoust, M., Hirai, N., Yamashita, R., Tokumaru, T., Watanabe, I., Onwona-Agyeman, S., Gardiner, P., Eriksen, M., Kelly, J., Rodriguez-Sierra, C., Colasse, L., Baztan, J., Barretto, F.P., Izar, G.M. Abessa, D., Zakaria, M.P., Kwan, C., Saha, M., Ryan, P., Weerts, S., Ofosu-Anim, J., Sabi, E.B., Akita, L.G., Tait, H., Eriksson, C., Burton, H., 2021. *International pellet watch: Global monitoring of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in plastic resin pellets*. *E.M.C.R.* 1, 75-90. <https://doi.org/10.5985/emcr.20210002>.

- Oliveira, S.R.S., Batista, W.S., Sousa, J.B.M., Noleto, K.S., Lima, I.M.A., Andrade, T.S.O.M., Cardoso, W.S., Carvalho-Neta, R.N.F., 2019. *Enzymatic and Histological Biomarkers in Ucides cordatus (Crustacea, Decapoda) in an Industrial Port on the North Coast of Brazil*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 102, 802–810.
<https://doi.org/10.1007/s00128-019-02594-1>.
- Ostle, C., Thompson, R. C., Broughton, D., Gregory, L., Wootton, M., Johns, D. G., 2019. *The rise in ocean plastics evidenced from a 60-year time series*. *Nat. Commun.* 10, 1-6. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09506-1>.
- Parolini, M., Binelli, A., 2014. *Oxidative and genetic responses induced by Δ-9-tetrahydrocannabinol (Δ-9-THC) to Dreissena polymorpha*. *Sci Total Environ.* 468-469, 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.024>.
- Peng, Y., Luo, Y., Nie, X. P., Liao, W., Yang, Y. F., Ying, G. G., 2013. *Toxic effects of triclosan on the detoxification system and breeding of Daphnia magna*. *Ecotoxicology*. 22, 1384-1394. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1124-3>.
- Pereira, C.D.S., Abessa, D.M., Choueri, R.B., Almagro-Pastor, V., Cesar, A., Maranho, L.A., Martín-Díaz, M.L., Torres, R.J., Gusso-Choueri, P.K., Almeida, J.E., Cortez, F.S., Mozeto, A.A., Silbiger, H.L., Sousa, E.C., Del Valls, T.A., Bainy, A.C., 2014. *Ecological relevance of Sentinels' biomarker responses: a multi-level approach*. *Mar Environ Res.* 96,118-26. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.11.002>
- Pessoa, G. P., de Souza, N. C., Vidal, C. B., Alves, J. A., Firmino, P. I. M., Nascimento, R. F., dos Santos, A. B., 2014. *Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants*. *Sci. Total Environ.*, 490, 288-295.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.008>.
- Pinheiro, M.A.A., Duarte, L.F.A., Toledo, T.R., Adam, M.L., Torres, R.A., 2013. *Habitat monitoring and genotoxicity in Ucides cordatus (Crustace: Ucididae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil*. *Environ. Monit. Assess.* 185, 8273-8285. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3172-9>.
- Pusceddu, F.H., Choueri, R.B., Pereira, C.D.S., Cortez, F.S., Santos, D.R.A., Moreno, B.B., Santos, A.R., Rogero, J.R., Cesar, A., 2018. *Environmental risk assessment of triclosan and ibuprofen in marine sediments using individual and sub-individual endpoints*. *Environ. Pollut.* 232, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.046>.
- Pusceddu, F.H., Sugauara, L.E., Marchi, M.R., Choueri, R.B., Castro, I.B., 2019. *Estrogen levels in surface sediments from a multi-impacted Brazilian estuarine system*. *Mar. Pollut. Bull.* 142, 576-580. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.052>.
- Ricart, M., Guasch, H., Alberch, M., Barceló, D., Bonnneau, C., Geiszinger, A., Farré, M.I., Ferrer, J., Ricciardi, F., Romaní, A.M., Morin, S., Proia, L., Sala, L., Sureda, D., Sabater, S. 2010. *Triclosan persistence through wastewater treatment plants and its potential toxic effects on river biofilms*. *Aquat. Toxicol.* 100, 346-53. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.08.010>.

Roex, E. W., Keijzers, R., Van Gestel, C. A., 2003. *Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, Danio rerio, after chronic exposure to parathion*. *Aquat. Toxicol.* 64, 451-460. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00100-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00100-0).

Smolarz, K., Hallmann, A., Zabrzanska, S., Pietrasik, A., 2017. *Elevated gonadal atresia as biomarker of endocrine disruptors: field and experimental studies using Mytilus trossulus (L.) and 17-alpha ethinylestradiol (EE2)*. *Mar. Pollut. Bull.* 120, 58-67. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.007>.

Tanaka, K., Takada, H., 2016. *Microplastic fragments and microbeads in digestive tracts of planktivorous fish from urban coastal waters*. *Sci. Rep.* 6, 1-8. <https://doi.org/10.1038/srep34351>.

Uddin, S., Fowler, S. W., Behbehani, M., 2020. *An assessment of microplastic inputs into the aquatic environment from wastewater streams*. *Mar. Pollut. Bull.* 160, 111538. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111538>.

U.S. EPA. *United States Environmental Protection Agency. Chemical Contaminants - CCL 4 Final CCL 4 Chemical Contaminants*, 2015. <https://www.epa.gov/ccl/chemical-contaminants-ccl-4> (acessado 28.08.2021).

Villegas, L., Cabrera, M., Capparelli, M.V., 2021. *Assessment of Microplastic and Organophosphate Pesticides Contamination in Fiddler Crabs from a Ramsar Site in the Estuary of Guayas River, Ecuador*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 107, 20-28. <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03238-z>

Waite, H. R., Donnelly, M. J., Walters, L. J., 2018. *Quantity and types of microplastics in the organic tissues of the eastern oyster Crassostrea virginica and Atlantic mud crab Panopeus herbstii from a Florida estuary*. *Mar. Pollut. Bull.* 12, 179-185. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.02.026>.

Wang, J., Tan, Z., Peng, J., Qiu, Q., Li, M., 2016. *The behaviors of microplastics in the marine environment*. *Mar. Environ. Res.* 113, 7-17. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.10.014>.

Watts, A.J., Urbina, M.A., Goodhead, R., Moger, J., Lewis, C., Galloway, T.S., 2016. *Effect of microplastic on the gills of the shore crab Carcinus maenas*. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5364-5369. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01187>.

Webb, S., Gaw, S., Marsden, I.D., McRae, N.K., 2020. *Biomarker responses in New Zealand green-lipped mussels Perna canaliculus exposed to microplastics and triclosan*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 201, 110871. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110871>.

Wu, C., Zhang, K., Huang, X., Liu, J., 2016. *Sorption of pharmaceuticals and personal care products to polyethylene debris*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 8819–8826. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6121-7>.

Yu, P., Liu, Z., Wu, D., Chen, M., Lv, W., Zhao, Y., 2018. *Accumulation of polystyrene microplastics in juvenile Eriocheir sinensis and oxidative stress effects in the liver*. *Aquat. Toxicol.* 200, 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.04.015>.

Yueh, M. F., Tukey, R. H., 2016. *Triclosan: a widespread environmental toxicant with many biological effects*. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56, 251-272. doi: <https://10.1146/annurev-pharmtox-010715-103417>.

Zarfl C, Matthies M., 2010. *Are marine plastic particles transport vectors for organic pollutants to the Arctic?* *Mar. Pollut. Bull.* 60, 1810-4. doi: <https://10.1016/j.marpolbul.2010.05.026>.

Zhang, X.J., Greenberg, D.S., 2012. *Acetylcholinesterase involvement in apoptosis*. *Front. Mol. Neurosci.* 5, 40. doi: <https://10.3389/fnmol.2012.00040>.

Zhang, N., Peng, F., Ying, G.G., Van den Brink, P.J., 2019. *Fate and effects of triclosan in subtropical river biofilms*. *Aquat Toxicol.* 212, 11-19. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.04.015>