

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA MATIAZZI DA SILVA

AVALIAÇÃO DA TOXIDADE E TRANSFERÊNCIA DE FICOTOXINAS
ADSORVIDAS EM MICROPARTÍCULAS PLÁSTICAS AO MICROCRUSTÁCEO
Artemia sp.

PONTAL DO PARANÁ

2023

MARIANA MATIAZZI DA SILVA

AVALIAÇÃO DA TOXIDADE E TRANSFERÊNCIA DE FICOTOXINAS
ADSORVIDAS EM MICROPARTÍCULAS PLÁSTICAS AO MICROCRUSTÁCEO
Artemia sp.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito à conclusão da disciplina de Oficina de Pesquisa IV, no Curso de Graduação em Oceanografia, Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Laureno Mafra Junior

PONTAL DO PARANÁ

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DO CURSO DE OCEANOGRAFIA
Avenida Deputado Aníbal Khury, 2033, - Bairro Balneário Pontal do Sul, Pontal do Paraná/PR, CEP 83255-976
Telefone: (41) 3511-8626 - <http://www.ufpr.br/>

ATA DE REUNIÃO

TERMO DE APROVAÇÃO

Mariana Matiazzi da Silva

“AVALIAÇÃO DA TOXIDADE E TRANSFERÊNCIA DE FICOTOXINAS ADSORVIDAS EM MICROPARTÍCULAS PLÁSTICAS AO MICROCRUSTÁCEO *Artemia sp.*”

Monografia aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharelado em Oceanografia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos membros:

Prof. Dr. Luiz Laureno Mafra Júnior
Prof. Orientador - Centro de Estudos do Mar (CPP-CEM) - UFPR

Dra. Sílvia Pedrosa Melegari
Centro de Estudos do Mar (CPP-CEM) - UFPR

Dra. Isabel do Prado Leite
Pesquisadora independente

Pontal do Paraná, 29 de novembro de 2023



Documento assinado eletronicamente por **LUIZ LAURENO MAFRA JUNIOR, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 11/12/2023, às 13:31, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **SILVIA PEDROSO MELEGARI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 11/12/2023, às 13:59, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ISABEL DO PRADO LEITE, Usuário Externo**, em 11/12/2023, às 14:57, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **6193325** e o código CRC **322508FD**.

RESUMO

Resíduos plásticos, ao se tornarem colonizados por microalgas bênticas nocivas, como o dinoflagelado *Ostreopsis* cf. *ovata*, ou cobertos por seus compostos tóxicos, podem se transformar em vetores eficazes para a transferência de ficotoxinas ao longo da cadeia alimentar marinha. O estudo focou na toxicidade resultante da interação entre microplásticos e toxinas produzidas por *O. cf. ovata*, compostos análogos à palitoxina, uma potente neurotoxina de natureza anfipática. Indivíduos adultos do microcrustáceo *Artemia* sp. foram expostos por 24 horas a quantidades crescentes de microesferas plásticas de 50 µm de diâmetro (12,5 a 150 partículas mL⁻¹) previamente cobertas pelos compostos celulares de *O. cf. ovata* dissolvidos em água do mar, em uma concentração equivalente a 9000 células mL⁻¹. Os microcrustáceos ingeriram as micropartículas juntamente com o alimento não tóxico – células de *Tetraselmis* sp. – fornecido durante o bioensaio, conforme observação do trato digestório por microscopia ótica. A análise Probit revelou uma relação direta entre a mortalidade dos organismos expostos e abundância de microplásticos com os compostos adsorvidos de *O. cf. ovata*. Os microplásticos com toxinas adsorvidas resultaram em uma concentração letal média (CL₅₀) de 22,7 partículas mL⁻¹ para *Artemia* sp. após 12 horas de exposição. Os indivíduos expostos não acumularam quantidades detectáveis de toxinas. Em contraste, indivíduos expostos somente a *Tetraselmis* sp. e às partículas plásticas (sem toxinas) em quantidades equivalentes tiveram 100% de sobrevivência. Comparando com estudos anteriores, as toxinas adsorvidas nas partículas de microplástico demonstraram ser mais letais do que a própria célula de *Ostreopsis* cf. *ovata*, indicando o potencial impacto dessas substâncias na cadeia alimentar marinha. A pesquisa indica que a presença de resíduos plásticos no ambiente pode potencializar os efeitos negativos de florações de microalgas tóxicas, da mesma forma que evidencia os múltiplos prejuízos ambientais derivados da poluição por plásticos. Desta forma, destaca-se a importância de desenvolver estratégias de gestão e mitigação eficazes, incluindo medidas de controle de poluição e políticas ambientais robustas. A conscientização pública sobre os impactos negativos dos microplásticos e das toxinas associadas é, assim, crucial para promover um ambiente mais saudável e sustentável para as futuras gerações.

Palavras-chave: Microplásticos, *Ostreopsis* cf. *ovata*, Toxinas de microalgas, Palitoxinas, Teste de toxicidade aguda, Ecotoxicologia

ABSTRACT

Plastic waste, when colonized by harmful benthic microalgae such as the dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*, or covered with its toxic compounds, can become effective vectors for the transfer of phycotoxins throughout the marine food chain. The study focused on the toxicity resulting from the interaction between microplastics and toxins produced by *O. cf. ovata*, compounds analogous to palytoxin, a potent amphipathic neurotoxin. Adult individuals of the microcrustacean *Artemia* sp. were exposed for 24 hours to increasing amounts of 50 μm diameter plastic microspheres (12.5 to 150 particles mL^{-1}) previously coated with the cellular compounds of *O. cf. ovata* dissolved in seawater, at a concentration equivalent to 9000 cells mL^{-1} . The microcrustaceans ingested the microparticles along with non-toxic food - *Tetraselmis* sp. cells - provided during the bioassay, as observed in the digestive tract through optical microscopy. Probit analysis revealed a direct relationship between the mortality of exposed organisms and the abundance of microplastics with adsorbed compounds from *O. cf. ovata*. Microplastics with adsorbed toxins resulted in a median lethal concentration (LC50) of 22.7 particles mL^{-1} for *Artemia* sp. after 12 hours of exposure. Exposed individuals did not accumulate detectable amounts of toxins. In contrast, individuals exposed only to *Tetraselmis* sp. and plastic particles (without toxins) in equivalent amounts had 100% survival. Compared to previous studies, toxins adsorbed on microplastic particles proved to be more lethal than the *O. cf. ovata* cell itself, indicating the potential impact of these substances on the marine food chain. The research suggests that the presence of plastic waste in the environment can exacerbate the negative effects of toxic microalgae blooms, highlighting the multiple environmental damages derived from plastic pollution. Thus, it underscores the importance of developing effective management and mitigation strategies, including pollution control measures and robust environmental policies. Public awareness of the negative impacts of microplastics and associated toxins is crucial for promoting a healthier and more sustainable environment for future generations.

Keywords: Microplastics, *Ostreopsis* cf. *ovata*, Microalgae toxins, Palytoxins, Acute toxicity test, Ecotoxicology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	3
2	JUSTIFICATIVA	6
3	OBJETIVOS	8
4	REFERENCIAL TEÓRICO	9
5	METODOLOGIA	13
6	RESULTADOS	17
7	DISCUSSÃO	21
8	CONCLUSÃO	25
	REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

A produção em massa de plásticos começou na década de 1950 (Barnes et al. 2009), e a partir de então o seu uso vem aumentando devido a versatilidade desse material. O descarte incorreto dos resíduos plásticos cria um problema de poluição, principalmente no ambiente marinho, muitas vezes seu destino final. Ao passar por um processo natural de intemperismo e degradação no mar, o plástico se fragmenta e gera um novo problema, os microplásticos (MPs; 1µm – 5 mm) ou nanoplásticos (NPs; 1 nm – 1 µm) (Baztan et al. 2017). Essas partículas, não visíveis a olho nu, hoje se encontram presentes no ar, solo, água doce, água do mar, gelo marinho, e até onde não há presença humana, como no oceano profundo (Oberbeckmann et al. 2014). Pensando na onipresença desse material em ambientes, vários estudos hoje focam esforços em descobrir o impacto que essas partículas podem gerar para os organismos.

Os MPs têm uma elevada relação superfície-volume quando comparados com fragmentos plásticos relativamente maiores e, portanto, são mais propensos a acumular substâncias lipofílicas em sua superfície (Engler 2012, Mato et al. 2001). Servem também como substrato para a colonização por diversas comunidades microbianas em habitats aquáticos (De Tender et al. 2015, Dussud et al. 2018, Hoellein et al. 2017, McCormick et al. 2014, Oberbeckmann et al. 2014, Zettler et al. 2013). Os MPs podem ser facilmente transportados para vários habitats, e os organismos marinhos em todos os níveis tróficos podem ingeri-los ativa ou passivamente (Seltenrich, 2015). Eles também podem ser ingeridos indiretamente como resultado da transferência trófica, em que presas contaminadas são consumidas por predadores (Farrell e Nelson, 2013).

Os próprios MPs são problemáticos para os organismos marinhos, mas sua ocorrência no ambiente pode representar um problema adicional quando associada à presença de toxinas como as produzidas por microalgas, as ficotoxinas. Partículas de MPs adsorvem, concentram e transportam contaminantes hidrofóbicos da água do mar para o tecido de organismos marinhos (Bhattacharya et al., 2010). Ao se adsorver à partículas flutuantes, os compostos tóxicos tornam-se disponíveis na coluna d'água, potencialmente

facilitando sua entrada em cadeias tróficas marinhas (Gallo et al., 2018). Embora diversas toxinas possuam afinidade aos polímeros plásticos, há poucos relatos que descrevem o comportamento da interação entre as toxinas de microalgas e MPs (Ou et al., 2015). Por exemplo, a microalga bêntica *Ostreopsis* cf. *ovata* produz substâncias análogas à palitoxina, incluindo as ovatoxinas (OVTXs) e a palitoxina isobárica (p-PLTX), que podem intoxicar organismos marinhos e se acumular em pescados, possivelmente levando à intoxicação alimentar humana (Brissard et al., 2014). Durante florações de *O. cf. ovata* no ambiente marinho, resíduos plásticos podem ser rapidamente colonizados por grandes quantidades de células tóxicas desta espécie (Tibiriçá et al., 2019). Entretanto, ainda não se conhece o potencial dos MPs em adsorverem as toxinas de *O. cf. ovata* a partir da água do mar, nem sua capacidade de servir de vetores destas toxinas para a cadeia trófica.

A palitoxina (PLTX) é uma das moléculas mais tóxicas encontradas na natureza, tendo o potencial de causar intoxicações graves e, em alguns casos, até fatais em seres humanos (Faimali et al., 2012). PLTX e seus análogos têm a capacidade de se acumular na cadeia alimentar, tendo sido encontradas em peixes, caranguejos e moluscos em concentrações significativas durante florações mais intensas de *O. cf. ovata* (Aligizaki et al., 2011). A ingestão de frutos do mar contaminados por essa toxina pode resultar em sintomas como cólicas abdominais, náuseas, diarreia, espasmos musculares e dificuldade respiratória (Alcana et al. 1988; Onuma et al., 1999). Em caso mais graves, seu consumo esteve associado a incidentes de intoxicação neurológica e mortes humanas (Tubaro et al., 2011). Além disso, casos de hemorragia nasal, tosse, febre e problemas respiratórios foram relatados após a inalação de aerossóis marinhos e o contato com água do mar contaminada com as toxinas, como ocorre com certa frequência no Mar Mediterrâneo (Ciminiello et al., 2010). Os efeitos tóxicos podem ser causados tanto diretamente pelos organismos produtores da toxina, como é o caso do *Ostreopsis* spp., quanto indiretamente, através de vetores e organismos suscetíveis à toxina.

A distribuição das toxinas, os organismos produtores e as rotas de exposição das PLTX e seus análogos são aspectos interligados, causando grande preocupação tanto para a saúde dos ecossistemas marinhos quanto para a saúde humana. Além de afetar indivíduos, as intoxicações também

podem ser observadas em níveis populacionais, levando a mortalidades em massa de invertebrados marinhos e macroalgas na Itália (Vale e Ares, 2007), além de ouriços-do-mar no Brasil (Ferreira, 2006). Impactos visíveis também foram registrados em organismos marinhos fixos, como cirrípedes, mexilhões e lapas, bem como em organismos móveis, incluindo equinodermos, cefalópodes e peixes, após florações de *O. cf. ovata*, comuns no verão (Ciminiello et al., 2006; Totti et al., 2010).

Em condições propícias, particularmente nos meses de verão, a espécie *O. cf. ovata* tem a capacidade de se proliferar, dando origem a espessos biofilmes mucilaginosos cobrindo o fundo marinho, ou ainda como agregados de células flutuantes. Esses aglomerados ficam suspensos próximos à superfície da água, e durante esse processo, suas toxinas são liberadas devido à lise celular, podendo ser transportadas em aerossóis que se dispersam na maresia, e/ou dissolvidas na água do mar (Tichadou et al., 2010). Além da temperatura, outros parâmetros influenciam na produção e liberação das PLTX na coluna d'água, como a fase de crescimento populacional e a salinidade (Pistocchi et al., 2011).

Esses eventos destacam a necessidade de uma compreensão abrangente das implicações das PLTX e seus análogos na saúde humana e na ecologia marinha, visando a mitigação e prevenção dos impactos negativos associados a essas substâncias tóxicas. Pensando nisso, esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos negativos da interação entre resíduos plásticos e ficotoxinas que causam impactos à fauna marinha. Para tanto, foram realizados bioensaios de toxicidade aguda para medir o efeito letal da exposição de curto prazo do microcrustáceo *Artemia* sp. a micropartículas plásticas cobertas com os compostos dissolvidos provenientes da lise de células de *O. cf. ovata*.

2 JUSTIFICATIVA

Este estudo buscou fornecer uma contribuição significativa para a compreensão do papel dos microplásticos na adsorção e transferência de toxinas ao longo da cadeia alimentar. A adsorção de toxinas em microplásticos é um fenômeno preocupante e pouco compreendido, e sua subsequente ingestão por organismos na cadeia trófica pode ter consequências prejudiciais para a saúde e o equilíbrio dos ecossistemas.

Ao abordar essa questão, espera-se preencher uma lacuna de conhecimento existente na literatura científica. Compreender como os microplásticos interagem com toxinas disponíveis no meio ambiente é fundamental para avaliar os riscos e impactos associados à poluição por plásticos. Além disso, investigar a transferência dessas toxinas ao longo da cadeia alimentar é crucial para identificar potenciais ameaças à saúde humana, bem como aos organismos e ecossistemas em geral.

Os organismos que foram utilizados para o teste de toxicidade são *O. cf. ovata* que produz neurotoxinas potentes e formam florações massivas na costa brasileira, incluindo o litoral do Paraná no verão, e *Artemia* sp., espécie de microcrustáceo que é o organismo modelo ideal para testes de ecotoxicidade, apresentando relevância ecológica (consumidores primários), desenvolvimento larval relativamente rápido, facilidade de cultivo (seu ciclo de vida pode ser facilmente reproduzido em laboratório), além de alta adaptabilidade a condições ambientais adversas, altas taxas de fecundidade, estratégia de reprodução bissexual/partenogenética (com produção de náuplios ou cistos), pequeno tamanho corporal, adaptabilidade a recursos alimentares variáveis, e são filtradores não seletivos sensíveis a substâncias tóxicas (Faimali et al, 2012).

Este estudo pode fornecer *insights* valiosos para o desenvolvimento de estratégias de gestão e mitigação eficazes. Isso inclui a implementação de medidas de controle de poluição, a formulação de políticas ambientais mais robustas e a conscientização do público em geral sobre os impactos negativos dos microplásticos e das toxinas associadas.

Portanto, espera-se que este trabalho proporcione uma base sólida para futuras pesquisas e ações, contribuindo para a proteção e conservação

dos ecossistemas marinhos e terrestres, bem como para a promoção de um ambiente mais saudável e sustentável para as gerações futuras.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo analisar a interação entre microplásticos e toxinas produzidas por microalgas bênticas, avaliando os possíveis efeitos negativos e o acúmulo de compostos tóxicos em consumidores primários que venham ingerir partículas cobertas por estas substâncias.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar se o microcrustáceo *Artemia* sp. se alimenta das esferas de microplástico;
- Testar se o microplástico adsorve as toxinas provenientes da microalga *Ostreopsis* cf. *ovata*;
- Avaliar os efeitos letais/agudos da ingestão de MPs contendo ou não a toxina adsorvida de *Ostreopsis* cf. *ovata* pelos indivíduos adultos do microcrustáceo *Artemia* sp.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

***Ostreopsis* spp.**

Espécies do gênero *Ostreopsis* são dinoflagelados bentônicos que vivem em contato próximo com uma variedade de substratos bióticos ou abióticos, como microalgas, invertebrados bentônicos, areia e rochas (Faust, 1995). *Ostreopsis* spp. podem se multiplicar massivamente sobre macroalgas e corais em áreas rasas, e formar aglomerados flutuantes junto à superfície, provocando problemas respiratórios em frequentadores de praias afetadas ou irritação nos banhistas, por inalação do spray marinho ou contato cutâneo, respectivamente. Além disso, a ocorrência de *Ostreopsis* spp. pode resultar na contaminação de organismos marinhos, entrando na cadeia alimentar e se acumulando em vários grupos de organismos, incluindo crustáceos, moluscos, peixes e equinodermos. Em última instância, isso pode levar à intoxicação alimentar de consumidores humanos por pescados contaminados (Durando, 2007).

As florações de *Ostreopsis* spp estão associadas principalmente a águas calmas, elevação da temperatura e alta disponibilidade de nutrientes. Foram relatadas florações massivas recorrentes de *Ostreopsis* cf. *ovata* no Mar Mediterrâneo, onde foram associados a impactos sobre invertebrados marinhos (Faimali et al., 2012), bem como na saúde humana por inalação (Ciminiello et al. 2006; 2010) e irritações graves da pele (Deeds et al., 2010). No Brasil, florações de *O. cf. ovata* são frequentes no Rio de Janeiro (Nascimento et al., 2012) e também foram relatadas em ilhas no estado de São Paulo (Nascimento et al., 2012) e no Arquipélago de Currais, no estado do Paraná (Tibiriçá et al., 2019), local de origem das cepas que foram utilizadas nesse estudo. A distribuição geográfica de *Ostreopsis* spp. aumentou nos últimos tempos por muitos motivos, mas também devido a essa alga se fixar em material flutuante, podendo ser transportada inclusive no lixo plástico flutuante (Casabianca et al., 2019), que é disponível hoje em diversas formas e tamanhos e em diversos ambientes (Leite et al., 2022).

O crescimento dela passa por uma fase exponencial até chegar na fase estacionária. O perfil de crescimento foi avaliado utilizando cepas de duas

coletas de águas italianas ao longo das costas do Adriático e do Tirreno da Itália (Guerrini et al., 2010). As duas cepas demonstraram padrão de crescimento semelhante, passando 10 dias na fase exponencial e de 28-30 dias na fase estacionária. Quanto à produção de toxina, a quantidade foi menor durante a fase de crescimento exponencial, aumentando durante a fase estacionária, levando a um teor de toxina extracelular por litro três a nove vezes maior do que aquela medida durante a fase exponencial (Guerrini et al., 2010). Esta quantidade deveu-se presumivelmente à acumulação de toxinas durante o crescimento, bem como a um número crescente de células quebradas; portanto, à medida que a floração natural envelhece, o teor de toxinas na água pode aumentar.

Vários estudos científicos indicam que a temperatura da água desempenha um papel fundamental na determinação das variações sazonais e na abundância de dinoflagelados bentônicos tóxicos, como relatado em publicações anteriores (Ballantine et al., 1988; Hallegraeff et al., 1995). Atualmente, observa-se que as florações da espécie *O. cf. ovata* ocorrem anualmente na costa italiana, compreendendo o período de junho até o final de outubro, sob diferentes condições ambientais. Estas condições incluem uma ampla faixa de temperaturas da água do mar, variando de 18 a 30°C (Pistocchi et al., 2011). Observou-se que temperaturas mais elevadas, na faixa de 24 a 29°C, estão associadas ao aumento na concentração de células de *Ostreopsis* na água do mar. Uma análise abrangente da produção e liberação de toxinas em relação às diferentes temperaturas foi conduzida exclusivamente na cepa Adriática de Ancona, o estudo demonstrou que a maior quantidade total de toxinas por célula (medida em picogramas por célula) foi registrada em culturas mantidas a uma temperatura de 25°C, enquanto a maior concentração total de toxinas por litro foi observada a uma temperatura de 20°C. Isso indica que as condições de cultivo a 20°C promoveram o maior rendimento de crescimento da espécie. A liberação extracelular aumentou com o aumento da temperatura, sendo o valor máximo de 27% observado a 30 °C, a condição de crescimento mais desfavorável no experimento de temperatura. Isso sugere que altas temperaturas favorecem a lise celular, levando à liberação de toxinas no meio de crescimento, conforme documentado por Pezzolesi et al. (2012).

Entre os vários parâmetros químicos e físicos, a salinidade é provavelmente o menos variável numa base sazonal, no entanto, as zonas costeiras influenciadas pela entrada de água doce de grandes rios podem sofrer importantes flutuações de salinidade. No que diz respeito aos estudos laboratoriais sobre o efeito da salinidade no crescimento e na produção de toxinas, em algumas espécies de dinoflagelados planctônicos o tratamento de diminuição da salinidade resultou em efeitos significativos mas não uniformes entre os clones (Gedaria et al., 2007; Lim e Ogata, 2005; Maier Brown et al., 2006) levando à conclusão de que este fator ambiental parece desempenhar um papel secundário na influência do conteúdo e crescimento de toxinas (Pistocchi et al., 2011).

Interação entre plásticos, algas nocivas e toxinas

A utilização excessiva de plástico em diversas áreas e seu descarte inadequado frequentemente resulta em seu despejo nos oceanos. Além disso, práticas relacionadas a ambientes marinhos, como aquicultura, pesca e transporte marítimo, contribuem significativamente para a introdução de plásticos nesse ambiente (Hinojosa e Thiel, 2009; Jambeck et al., 2015;). Plásticos flutuantes podem atuar como vetores globais para o transporte de células algais e transferência de toxinas produzidas por microalgas bentônicas ao longo de cadeias alimentares marinhas (Leite et al., 2022).

Os detritos plásticos marinhos fornecem uma área superficial significativa para a colonização potencial por microalgas planctônicas e bentônicas nocivas e para a adsorção de suas toxinas (Casabianca et al., 2019). Muitos estudos já realizados comprovam que há uma colonização de microalgas, em especial o dinoflagelado benthico *Ostreopsis cf. ovata* Tibiriçá et al. 2019; Masó et al., 2016; Zettler et al., 2021), alvo desse estudo, principalmente em áreas costeiras. Mas ainda há escassez na literatura estudos e artigos científicos que investiguem e analisem como as toxinas liberadas por algas tóxicas podem ser adsorvidas por essas partículas. É bastante provável que as toxinas sejam adsorvidas quando liberadas em

grande quantidade e essas partículas já estejam envelhecidas por processos de degradação no ambiente, aumentando assim a superfície de contato.

5 METODOLOGIA

5.1 CULTIVO DE MICROALGAS

As cepas de *Ostreopsis* cf. *ovata* utilizadas foram isoladas a partir de material coletado em abril de 2023 no Parque Nacional Marinho das Ilhas de Currais, localizado no município de Pontal do Paraná. Os cultivos monoclonais foram repicados em frascos Erlenmeyer de vidro (125 mL) contendo água do mar filtrada, autoclavada, enriquecida com meios de cultura f/2 (Guillard, 2004) diluído 2x (“f/4”) sem silicato, mantidos em uma incubadora D.B.O. sob condições ideais de temperatura (26 ± 1 °C), irradiância (~ 100 μmol fótons m^{-2} s^{-1}), salinidade (34 ± 2) e fotoperíodo (12: 12 h; claro: escuro). Previamente ao experimento, o volume do cultivo foi aumentado a partir da inoculação de novo meio de cultivo com células em fase exponencial de crescimento.

Além de *O. cf. ovata*, um cultivo monoclonal da microalga não-tóxica *Tetraselmis* sp. foi mantido em meio F/2, em garrafas de vidro com volume de 2L, sob aeração constante. Esta microalga serviu de alimento para os organismos antes e durante os testes.

5.2 CULTIVO DE *Artemia* sp.

A manutenção dos microcrustáceos *Artemia* sp. seguiu o protocolo estabelecido no Laboratório de Microalgas (LaMic) do Centro de Estudos do Mar da UFPR. Brevemente, cistos foram expostos à aeração intensa e iluminação (12 : 12 h) até a eclosão, durante aproximadamente dois dias. Após a eclosão, as larvas, pós-larvas e os indivíduos juvenis foram alimentados com quantidades crescentes da microalga não-tóxica *Tetraselmis* sp. por até 30 dias, quando chegaram na fase adulta e estavam prontas para serem utilizadas nos experimentos de exposição.

5.3 EXTRAÇÃO DA TOXINA E ADSORÇÃO NO MICROPLÁSTICO

As microesferas plásticas de poliestireno (PS) em vermelho, com diâmetro de 50 μm , foram adquiridas da empresa Lab 261 (Palo Alto, CA, EUA). Para maior eficiência de adsorção das toxinas, as partículas foram desgastadas por fricção em um cone de papel abrasivo (lixa de ferro grão 80) durante 40 minutos utilizando vortex.

Depois de lavadas, as partículas desgastadas foram expostas aos compostos dissolvidos que foram extraídos de células cultivadas da microalga bêntica *Ostreopsis* cf. *ovata* em água do mar, a uma concentração correspondente a 9000 células mL^{-1} .

Para a extração da toxina, as células foram rompidas em ultrassom por 6 minutos para liberação dos compostos intra-celulares. A solução foi centrifugada e filtrada para remoção de partículas. As micropartículas foram então expostas ao líquido filtrado por cinco dias, sob agitação constante em uma mesa rotatória.

Após 5 dias de exposição, as partículas ficaram cobertas de mucilagem (figura 1), então foram lavadas com água do mar em peneira com malha de 20 μm de abertura, removendo toda a solução líquida e mucilagem que continha as toxinas. As partículas lavadas, contendo as toxinas adsorvidas, foram dispostas em água do mar filtrada (0,22 μm) para o teste de exposição.

FIGURA 1 - MICROPLÁSTICO COM MUCILAGEM



5.4 TESTES DE EXPOSIÇÃO

As esferas de microplástico, previamente expostas às toxinas dissolvidas, foram colocadas em contato com as artêmias em frascos Erlenmeyer de 100mL, contendo 8 indivíduos no controle e na menor concentração e 7 nos demais frascos. Foram realizados testes com seis concentrações diferentes de microplásticos contendo as toxinas, sendo elas 12,5; 25; 50; 75; 115; e 150 partículas mL⁻¹ (T1, T2, T3, T4, T5, T6), com três réplicas cada (a, b, c), totalizando 18 unidades experimentais, mais 3 controles (Ca, Cb, Cc), que não receberam micropartículas plásticas. Além do plástico com as toxinas adsorvidas, foram fornecidas células vivas de *Tetraselmis* sp. em quantidade suficiente para alimentação de artêmias. O experimento foi repetido com microesferas que não foram expostas às toxinas dissolvidas, para avaliar possíveis efeitos letais provenientes da ingestão isolada de microplásticos por *Artemia* sp.

Em ambas as baterias experimentais, a sobrevivência dos indivíduos foi aferida ao longo do tempo, após 12 e 24 horas de exposição. Os indivíduos foram considerados mortos por não haver movimentação, e foram imediatamente coletados para análise da ingestão de esferas por meio da observação do trato digestório em microscópio ótico invertido (Zeiss), sendo em seguida congelados em microtubos Eppendorf para posterior análise de toxinas.

5.5 ANÁLISE DE TOXINAS

Antes da análise da toxina, os indivíduos de artemia foram transferidos para um tubo falcon 15 ml, com o volume total de 1,5 ml. As amostras foram sonicadas, em ultrassom, por 6 minutos. A mistura foi centrifugada a 2500×5 minutos. Foi transferido 1 ml do sobrenadante para um eppendorf e filtrado com filtros de seringa (PVDE, 0,22 µm, Analítica, São Paulo, Brasil). Os extratos evaporados em nitrogênio até completa secagem e ressuspensão em um volume pequeno de metanol MeOH 90%, resultando em um fator de concentração 20 vezes, sendo filtradas em filtro de seringa 0,22 µm antes da análise.

Todas as amostras foram analisadas em sistema LC-MS/MS empregando o método para palitoxinas intactas e seus análogos, monitorando as transições e íons precursores com carga tripla, ou seja, a razão m/z onde z é igual a 3, com mínimo de 3 e no máximo 5 transições para cada analito, exceto homopalitotoxina e 42-hidroxi-palitotoxina, que tiveram apenas uma transição m/z . As amostras foram injetadas em uma coluna C18 com volume de injeção de 5 μL , mantendo a temperatura da coluna de 40 ° C e modo de ionização por eletrospray positivo. A fase móvel utilizada no modo gradiente consistiu de água ultrapura e acetonitrila, ambas suplementadas com 100 nM de acetato de cálcio. Nenhum aditivo ácido foi empregado em nenhuma fase móvel.

5.6 ANÁLISE DE DADOS

A maior parte dos organismos morreu nas primeiras 12 horas de exposição, sendo este o tempo de duração adotado para o cálculo dos efeitos tóxicos. Foi realizada a técnica de PROBIT para a determinação do valor de concentração letal mediana (CL_{50}), que mede a concentração da substância tóxica (no caso a densidade de micropartículas por mL) que causa a letalidade de 50% dos organismos expostos. Essa análise é particularmente relevante em ecossistemas aquáticos, onde a exposição a poluentes pode afetar a vida dos organismos. Além disso, foram determinadas a concentração de efeito não observado (CENO) e a concentração de efeito observado (CEO). Para isso, foram realizados testes-t de Student comparando a diferença estatística entre o efeito médio medido no controle com aqueles observados nas menores concentrações testadas, considerando um nível de significância (α) de 0,05.

6 RESULTADOS

Os indivíduos de *Artemia* sp. ingeriram as microesferas junto com seu alimento não-tóxico (*Tetraselmis* sp), demonstrados nas figuras 2a e 2b.

FIGURA 2A – ARTEMIA COM MICROPLÁSTICO NO TRATO DIGESTIVO



FIGURA 2B - ARTEMIA COM MICROPLÁSTICO NO TRATO DIGESTIVO



Em relação às análises de toxinas, diversas observações foram feitas. Em relação ao padrão palitoxina, as transições mais intensas ocorreram em ordem decrescente: PLTx1, seguido de PLTx3, depois PLTx5, PLTx2 e PLTx4. No entanto, no pellet de cultura de *Ostreopsis cf. ovata*, todas as cinco transições apareceram no mesmo tempo de retenção, embora a intensidade dos fragmentos monitorados tenha mudado. No caso de *Ostreopsis cf. ovata* extraída pelo protocolo OASIS, a transição 4 exibiu o sinal mais intenso, seguida pela transição 5 e depois pelas transições 1, 2 e 3. Embora nenhum padrão de 42-hidroxipalitotoxina estivesse disponível, várias amostras produziram valores muito baixos para esta variante da palitotoxina. Sinais intensos também foram observados em várias amostras para transições de homopalitotoxina. Para a ovatoxina A, a transição 2 foi a mais intensa, seguida pela transição 1. O mesmo padrão foi observado para a ovatoxina B. No caso da ovatoxina C, a transição 2 foi a mais intensa e a transição 1 foi a segunda mais intensa. No entanto, a análise da forma do pico e do ápice revelou que a transição 4 da ovatoxina C corresponde a outra substância, uma vez que o seu tempo de retenção e o ápice do pico são deslocados em comparação com outras transições demonstradas. Os níveis de acumulados de toxina pelas artêmias foram menores do que o limite de detecção (LOD) da técnica analítica, que foi de 0,55ng/ml.

Não houve mortes nos indivíduos expostos apenas as micropartículas de plástico, que não possuíam toxina adsorvida, mesmo após 24 horas de exposição a concentração mais elevada de partículas (150 partículas mL⁻¹)

Os resultados dos testes de toxicidade com micropartículas de plástico contendo os compostos adsorvidos de *Ostreopsis cf. ovata* estão descritos na Tabela 1 e no Gráfico 1 havendo mortes em todas as concentrações, sendo a T2, com 25 partículas mL⁻¹ a concentração de efeito observado (CEO), e a T1, com 12,5 partículas mL⁻¹ a concentração de efeito não observado (CENO). De modo geral, após 12 horas de exposição, o número (e o percentual) de artêmias mortas aumentou conforme aumentou a densidade de micropartículas em suspensão. Por meio da análise probabilística Probit, o valor de CL₅₀ calculado para este bioensaio foi de 22,7 partículas mL⁻¹.

TABELA 1 - CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PARTÍCULAS, NÚMERO E PORCENTAGEM DE MORTOS POR CONCENTRAÇÃO APÓS 12 HORAS DE EXPOSIÇÃO

Concentração total de partículas	Nº de mortos	% mortos
1250	3	37,5
1250	4	50
1250	1	12,5
2500	5	70
2500	6	85
2500	6	85
5000	3	43
5000	4	57
5000	3	43
7500	6	85
7500	6	85
7500	6	85
11500	6	85
11500	7	100
11500	7	100
15000	7	100
15000	7	100
15000	7	100

GRÁFICO 1 - PORCENTAGEM DE MORTALIDADE POR PARTÍCULAS DE MICROPLÁSTICO COM TOXINA ADSORVIDA

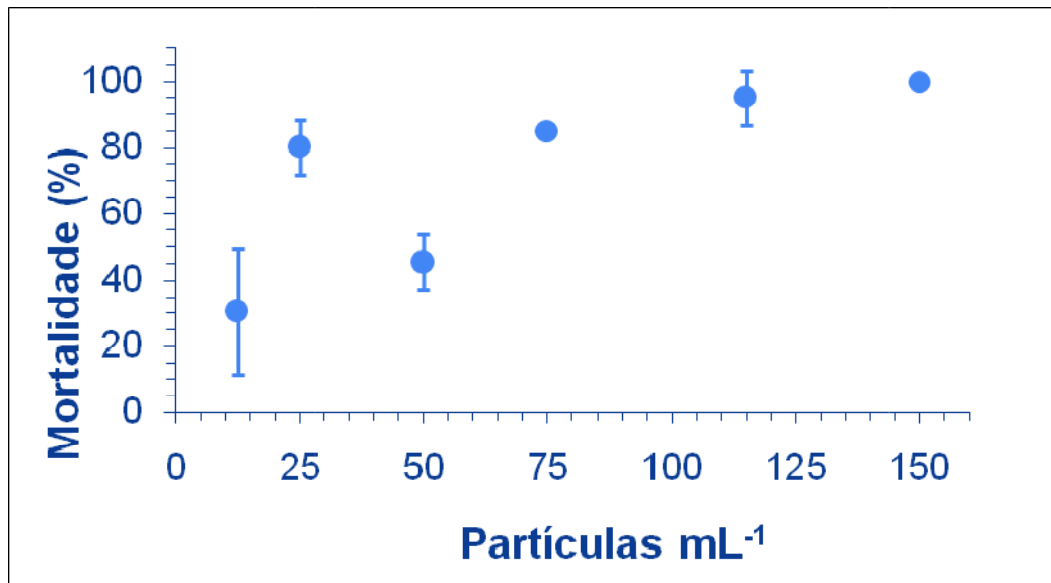
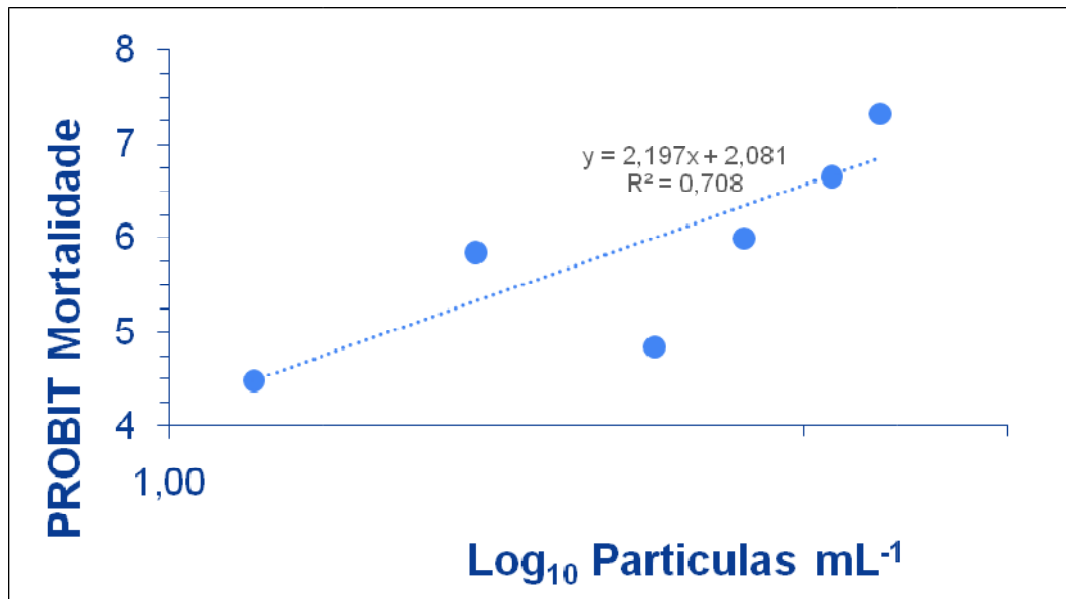


GRÁFICO 2 – ANÁLISE PROBIT DE MORTALIDADE POR LOG10 PARTÍCULAS POR ML



6 DISCUSSÃO

A palitoxina (PLTX) é uma das substâncias tóxicas presentes na natureza, com potencial para provocar intoxicações graves e, em alguns casos, fatais em seres humanos. Essa toxina e seus análogos têm a capacidade de se acumular na cadeia alimentar, sendo detectados em peixes, caranguejos e moluscos durante períodos de floração intensa de *O. cf. Ovata*. A ingestão de frutos do mar contaminados por palitoxina pode resultar em sintomas como cólicas abdominais, náuseas, diarreia, espasmos musculares e dificuldade respiratória (Deeds e Schwartz, 2010). Em situações mais severas, o consumo dessa toxina tem sido associado a casos de intoxicação neurológica e até mesmo a óbitos. Além disso, a inalação de aerossóis marinhos e o contato com água do mar contaminada também podem causar efeitos adversos, como hemorragia nasal, tosse, febre e problemas respiratórios (Thakur e Jha, 2017). Os efeitos tóxicos podem ser desencadeados tanto diretamente pelos organismos produtores da toxina, como é o caso do *Ostreopsis* spp., quanto indiretamente, por meio de vetores e organismos suscetíveis à toxina. As palitoxinas são conhecidas por afetar os canais de sódio nas células, levando à despolarização das membranas celulares. Esse efeito na atividade elétrica celular pode interferir na função normal dos tecidos, causando danos aos sistemas neuromusculares e, em última instância, levando à morte celular (Ramos et al., 2010). As artêmias são organismos invertebrados bastante utilizados para avaliar o potencial impacto ecotoxicológico de palitoxinas em nível marinho. Em um estudo investigando o estresse oxidativo sofrido a exposição de palitoxinas derivadas de *Ostreopsis* spp., observou-se que a mesma induz aumento significativo de espécies reativas de oxigênio em indivíduos adultos de *Artemia franciscana* (Cavion et al., 2022).

Os valores de CL₅₀ resultantes da exposição de artêmias a células ou compostos de *Ostreopsis* spp. variam em função da toxicidade da espécie e da cepa de microalga testada, além do estágio de desenvolvimento do microcrustáceo exposto e tempo de exposição (Pavaux et al., 2020). Em um estudo realizado com artêmias adultas (Neves et al., 2017), mesmo estágio utilizado no presente estudo, a concentração letal mediana foi calculada em 200 células mL⁻¹ de *O. cf. ovata* após 3 horas de experimento. Comparando

com o experimento realizado nesse estudo, a concentração que causou a mortalidade de 50% dos indivíduos foi de 22,7 partículas por mL após 12 horas de exposição. Outras cepas, entretanto, podem alcançar maiores valores de toxicidade (menores valores de CL_{50}) após 24-48 horas de exposição (Tabela 2). De qualquer forma, pode-se considerar que partículas de microplástico contendo toxinas adsorvidas em sua superfície podem ser tão ou mais letais que as próprias células de *Ostreopsis* spp., constituindo assim vetores eficientes de suas toxinas para os organismos marinhos que as ingerirem.

. TABELA 2 – CL_{50} DE DIFERENTES TESTES DE OSTREOPSIS EM ARTEMIAS

Espécie	Organismo	Estágio	Efeitos	Fonte
<i>Ostreopsis ovata</i> isolated by A. Penna	<i>Artemia salina</i> (Linnaeus, 1758)	Náuplios	CL_{50} -48h <4 cells. mL^{-1}	Faimali et al., 2012
<i>Ostreopsis cf. ovate</i>	<i>Artemia salina</i> (Linnaeus, 1758)	Náuplios	CL_{50} -24h=15 cells. mL^{-1}	Giussani et al., 2016
<i>Ostreopsis cf. ovata</i> UNR-05	<i>Artemia salina</i> (Linnaeus, 1758)	Adultos	DL_{50} (200 cells. mL^{-1}) = 3h	Neves et al., 2017
<i>Ostreopsis cf. ovata</i>	<i>Artemia salina</i> (Linnaeus, 1758)	Náuplios (24h após eclodirem)	CL_{50} -24h = 0.03 mg. mL^{-1}	Pagliara and Caroppo, 2012
<i>Ostreopsis cf. ovata</i>	<i>Artemia franciscana</i> (Kellogg, 1906)	Estagio II - III	LC_{50} -48h= 1.63 cell. mL^{-1}	Prato et al., 2011
<i>Ostreopsis siamensis</i>	<i>Artemia salina</i> (Linnaeus, 1758)		LT_{50} (250 cells. mL^{-1}) = 24h	Rhodes et al., 2000
<i>Ostreopsis cf. ovata</i>	<i>Artemia</i>	Adultos	=4,7 cell. mL^{-1}	Magro, 2021
<i>Ostreopsis cf. ovata</i>	<i>Artemia</i>	Adultos	=22,7 partículas mL^{-1}	Esse estudo

FONTE: Pavaux, A. S., Berdalet, E., & Lemée, R. (2020). Chemical ecology of the benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis*: review of progress and future directions. *Frontiers in Marine Science*, 7, 498.

Quando comparamos valor de CL_{50} com outras substâncias tóxicas conhecidas, como metais pesados zinco e níquel, temos valores bem diferentes do de toxinas de algas bênticas. Valores como 0,38 g/L e 0,71 g/L, em uma salinidade 35, em 48h (Damasceno, 2013), e concentração de *Ostreopsis* sendo de 8 cells. $mL^{-1} \pm 5 = 115 \text{ pg. mL}^{-1}$. Isso mostra como as toxinas da *Ostreopsis* spp. são significativamente mais letais que essas substâncias tóxicas, apresentando resultados de concentração. Além desses metais, temos exemplo também com cobre, tendo CL_{50} 0,16mg/L, em 72 horas de experimento (Badaró-Pedroso, 2013). Mesmo o cobre, uma substância extremamente tóxica, não teve efeito tão rápido como o microplástico com a toxina adsorvida.

A dispersão do plástico por correntes de água é um fenômeno preocupante que tem sido amplamente observado em todo o mundo. O plástico, devido à sua durabilidade, acaba sendo transportado por rios e oceanos, afetando ecossistemas aquáticos e causando um impacto significativo na vida marinha. Além disso, a possibilidade de intoxicação na cadeia alimentar é uma consequência direta desse problema. É importante destacar que o plástico, em sua forma original, pode não ser letal para os organismos marinhos de imediato, mas causar efeitos subletais, como o estresse oxidativo, por exemplo, (Yoshida, et al., 2012). Portanto, é de extrema importância realizar estudos que investiguem como as toxinas adsorvidas nos plásticos afetam os organismos marinhos. A adsorção de toxinas no plástico é um processo pelo qual substâncias tóxicas presentes na água se ligam à superfície do plástico. Mesmo quando as amostras foram lavadas e enxaguadas antes de entrar em contato com os organismos, ainda há a possibilidade de que resíduos de toxinas permaneçam no plástico devido à adsorção.

Esses estudos são cruciais para entender a extensão do problema da poluição por plásticos e seus impactos na saúde dos ecossistemas marinhos e na saúde humana, uma vez que os seres humanos também fazem parte da cadeia alimentar e podem ser expostos a toxinas presentes em organismos que ingerem plástico. Portanto, a pesquisa nessa área desempenha um papel

fundamental na conscientização sobre a necessidade de reduzir o uso de plásticos descartáveis e adotar práticas mais sustentáveis.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo destaca a capacidade do plástico de atuar como um veículo de adsorção de toxinas, desencadeando potenciais riscos significativos para a vida marinha e a saúde humana. Adsorção de toxinas por parte do plástico é um processo de extrema preocupação, uma vez que os resultados indicam que essas toxinas, quando ingeridas, têm o potencial de levar à morte de indivíduos, e os microplásticos têm sido reportados no interior de diferentes organismos marinhos e do homem (Brocardo, 2022, Santo de Moura et al., 2012, Machado et al., 2021, Yan et al., 2021).

Em particular, o plástico revelou ser capaz de adsorver as toxinas do dinoflagelado bêntico *Ostreosis* cv. *ovata*. Quando o plástico se torna um portador dessas toxinas e entra na cadeia alimentar, ele se transforma em uma ameaça não apenas para os organismos marinhos que o ingerem diretamente, mas também para a saúde humana por meio do consumo de pescados contaminados.

REFERÊNCIAS

- Alcala, A. C., Alcala, L. C., Garth, J. S., Yasumura, D., & Yasumoto, T. (1988). Human fatality due to ingestion of the crab *Demania reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin. *Toxicon*, 26(1), 105-107.
- Aligizaki, K., Katikou, P., Milandri, A., & Diogène, J. (2011). Occurrence of palytoxin-group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art. *Toxicon*, 57(3), 390-399.
- Barnes, D. K., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences*, 364(1526), 1985-1998.
- Ballantine, D. L., Tosteson, T. R., & Bardales, A. T. (1988). Population dynamics and toxicity of natural populations of benthic dinoflagellates in southwestern Puerto Rico. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 119(3), 201-212.
- Baztan, J., Bergmann, M., Booth, A., Broglio, E., Carrasco, A., Chouinard, O., ... & Wallace, N. (2017). Breaking down the plastic age. In *MICRO 2016* (pp. 177-181). Elsevier.
- Bhattacharya, P., Lin, S., Turner, J. P., & Ke, P. C. (2010). Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis. *The journal of physical chemistry C*, 114(39), 16556-16561.
- Brissard, C., Herrenknecht, C., Séchet, V., Hervé, F., Pisapia, F., Harcouet, J., ... & Amzil, Z. (2014). Complex toxin profile of French Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* strains, seafood accumulation and ovatoxins prepurification. *Marine Drugs*, 12(5), 2851-2876.
- Brocardo, G. D. S. (2022). Avaliação da presença de microplásticos (MPs) em três espécies de bivalves cultivadas na Ilha de Santa Catarina, Brasil.
- Casabianca, S., Capellacci, S., Giacobbe, M. G., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Varriale, F., ... & Penna, A. (2019). Plastic-associated harmful microalgal assemblages in marine environment. *Environmental Pollution*, 244, 617-626.
- Cavion, F., Pelin, M., Ponti, C., Della Loggia, R., Tubaro, A., & Sosa, S. (2022). Ecotoxicological Impact of the Marine Toxin Palytoxin on the Micro-Crustacean *Artemia franciscana*. *Marine Drugs*, 20(2), 81.
- Ciminiello, Patrizia, et al. "The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method." *Analytical chemistry* 78.17 (2006): 6153-6159.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E. D., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., ... & Pistocchi, R. (2010). Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(18), 2735-2744.

Damasceno, É. P. (2013). Efeito da mistura dos metais zinco e níquel em diferentes salinidades sobre o microcrustáceo *Artemia* sp.

De Tender, C. A., Devriese, L. I., Haegeman, A., Maes, S., Ruttink, T., & Dawyndt, P. (2015). Bacterial community profiling of plastic litter in the Belgian part of the North Sea. *Environmental science & technology*, 49(16), 9629-9638.

Deeds, J. R., & Schwartz, M. D. (2010). Human risk associated with palytoxin exposure. *Toxicon*, 56(2), 150-162.

do Prado Leite, I., Menegotto, A., da Cunha Lana, P., & Júnior, L. L. M. (2022). A new look at the potential role of marine plastic debris as a global vector of toxic benthic algae. *Science of The Total Environment*, 838, 156262.

Durando, P., Ansaldi, F., Oreste, P., Moscatelli, P., Marensi, L., Grillo, C., ... & Collaborative Group for the Ligurian Syndromic Algal Surveillance. (2007). *Ostreopsis ovata* and human health: epidemiological and clinical features of respiratory syndrome outbreaks from a two-year syndromic surveillance, 2005-06, in north-west Italy. *Weekly releases (1997-2007)*, 12(23), 3212.

Dussud, C., Meistertzheim, A. L., Conan, P., Pujol-Pay, M., George, M., Fabre, P., ... & Ghiglione, J. F. (2018). Evidence of niche partitioning among bacteria living on plastics, organic particles and surrounding seawaters. *Environmental Pollution*, 236, 807-816.

Engler, R. E. (2012). The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean. *Environmental science & technology*, 46(22), 12302-12315.

Faimali, M., Giussani, V., Piazza, V., Garaventa, F., Corrà, C., Asnaghi, V., ... & Chiantore, M. (2012). Toxic effects of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on invertebrate and vertebrate marine organisms. *Marine environmental research*, 76, 97-107.

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

Faust, M. A. (1995). Observation of sand-dwelling toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from widely differing sites, including two new species. *Journal of phycology*, 31(6), 996-1003.

Ferreira, C. E. L. (2006). Sea urchins killed by toxic algae. *JMBA Glob. Mar. Environ*, 3, 22-23.

Gallo, F., Fossi, C., Weber, R., Santillo, D., Sousa, J., Ingram, I., ... & Romano, D. (2018). Marine litter plastics and microplastics and their toxic chemicals components: the need for urgent preventive measures. *Environmental Sciences Europe*, 30, 1-14.

Gedaria, A.I., Luckas, B., Reinhardt, K., Azanza, R.V., 2007. Growth response and toxin concentration of cultured *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* to varying salinity and temperature conditions. *Toxicon* 50, 518–529.

Giussani, V., Sbrana, F., Asnaghi, V., Vassalli, M., Faimali, M., Casabianca, S., et al. (2015). Active role of the mucilage in the toxicity mechanism of the harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Harmful Algae* 44, 46–53. doi: 10.1016/j.hal.2015.02.006

Guerrini, F., Pezzolesi, L., Feller, A., Riccardi, M., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., ... & Pistocchi, R. (2010). Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon*, 55(2-3), 211-220.

Guillard, R.R.L., Morton, S.L. (2004). Culture methods. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D. M., Cembella, A.D. (Eds.). *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Paris: UNESCO.

Hallegraeff, G. M., McCausland, M. A., & Brown, R. K. (1995). Early warning of toxic dinoflagellate blooms of *Gymnodinium catenatum* in southern Tasmanian waters. *Journal of plankton research*, 17(6), 1163-1176.

Hinojosa, I. A., & Thiel, M. (2009). Floating marine debris in fjords, gulfs and channels of southern Chile. *Marine pollution bulletin*, 58(3), 341-350.

Hoellein, T. J., McCormick, A. R., Hittie, J., London, M. G., Scott, J. W., & Kelly, J. J. (2017). Longitudinal patterns of microplastic concentration and bacterial assemblages in surface and benthic habitats of an urban river. *Freshwater Science*, 36(3), 491-507.

Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., ... & Law, K. L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), 768-771.

Leite, I., Menegotto, A., da Cunha Lana, P., & Júnior, L. L. M. (2022). A new look at the potential role of marine plastic debris as a global vector of toxic benthic algae. *Science of The Total Environment*, 838, 156262.

Lim, P.T., Ogata, T., 2005. Salinity effect on growth and toxin production of four tropical *Alexandrium* species (Dinophyceae). *Toxicon* 45, 699–710.

Machado, J. A., de Oliveira, S., Nazário, M. G., Fernandes, H., & Krelling, A. P. (2021). ANÁLISE DA PRESENÇA DE MICROPLÁSTICO EM BIVALVES (PERNA PERNA): UM ESTUDO DE CASO EM MATINHOS, LITORAL DO PARANÁ. *Guaju*, 7(1), 156-179.

Magro, Leonardo (2021). POTENCIAL TÓXICO ENTRE DIFERENTES CEPAS DO DINOFLAGELADO *Ostreopsis cf. ovata*.

Maier Brown, A.F., Dortch, Q., Van Dolah, F.M., Leighfield, T.A., Morrison, W., Thessen, A.E., Steidinger, K.A., Richardson, W., Moncreiff, C.A., Pennock, J.R., 2006. Effect of salinity on distribution, growth, toxicity of *Karenia* spp. *Harmful Algae* 5, 199–212.

Masó, M., Fortuño Alós, J. M., De Juan, S., & Demestre, M. (2016). Microfouling communities from pelagic and benthic marine plastic debris sampled across Mediterranean coastal waters.

Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C., & Kaminuma, T. (2001). Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environmental science & technology*, 35(2), 318-324.

McCormick, A., Hoellein, T. J., Mason, S. A., Schluep, J., & Kelly, J. J. (2014). Microplastic is an abundant and distinct microbial habitat in an urban river. *Environmental science & technology*, 48(20), 11863-11871.

Nascimento, S. M., França, J. V., Gonçalves, J. E., & Ferreira, C. E. (2012). *Ostreopsis cf. ovata* (Dinophyta) bloom in an equatorial island of the Atlantic Ocean. *Marine Pollution Bulletin*, 64(5), 1074-1078.

Nascimento, S. M., Corrêa, E. V., Menezes, M., Varela, D., Paredes, J., & Morris, S. (2012). Growth and toxin profile of *Ostreopsis cf. ovata* (Dinophyta) from Rio de Janeiro, Brazil. *Harmful algae*, 13, 1-9.

Neves, R. A. F., Fernandes, T., Santos, L. N. D., and Nascimento, S. M. (2017). Toxicity of benthic dinoflagellates on grazing, behavior and survival of the brine shrimp *Artemia salina*. *PLoS One* 12:e0175168. doi: 10.1371/journal.pone.0175168

Oberbeckmann, S., Loeder, M. G., Gerdt, G., & Osborn, A. M. (2014). Spatial and seasonal variation in diversity and structure of microbial biofilms on marine plastics in Northern European waters. *FEMS microbiology ecology*, 90(2), 478-492.

Oberbeckmann, S., & Labrenz, M. (2020). Marine microbial assemblages on microplastics: diversity, adaptation, and role in degradation. *Annual review of marine science*, 12, 209-232.

Onuma, Y., Satake, M., Ukena, T., Roux, J., Chanteau, S., Rasolofonirina, N., ... & Yasumoto, T. (1999). Identification of putative palytoxin as the cause of clopeotoxism. *Toxicon*, 37(1), 55-65.

Ou, L., Huang, X., Huang, B., Qi, Y., & Lu, S. (2015). Growth and competition for different forms of organic phosphorus by the dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* with the dinoflagellate *Alexandrium catenella* and the diatom *Skeletonema costatum* sl. *Hydrobiologia*, 754, 29-41.

Pagliara, P., and Caroppo, C. (2012). Toxicity assessment of *Amphidinium carterae*, *Coolia* cfr. *monotis* and *Ostreopsis* cfr. *ovata* (Dinophyta) isolated from the northern Ionian Sea (Mediterranean Sea). *Toxicon* 60, 1203–1214. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.08.005

Pavaux, A. S., Berdalet, E., & Lemée, R. (2020). Chemical ecology of the benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis*: review of progress and future directions. *Frontiers in Marine Science*, 7, 498.

Pistocchi, R., Pezzolesi, L., Guerrini, F., Vanucci, S., Dell'Aversano, C., & Fattorusso, E. (2011). A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*. *Toxicon*, 57(3), 421-428.

Pezzolesi, L., Guerrini, F., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E. D., Fattorusso, E., ... & Pistocchi, R. (2012). Influence of temperature and salinity on *Ostreopsis* cf. *ovata* growth and evaluation of toxin content through HR LC-MS and biological assays. *Water research*, 46(1), 82-92.

Prato, E., Biandolino, F., Bisci, A. P., and Caroppo, C. (2011). Preliminary assessment of *Ostreopsis* cf. *ovata* acute toxicity by using a battery bioassay. *Chem. Ecol.* 27, 117–125. doi: 10.1080/02757540.2011.625930

Ramos, V., & Vasconcelos, V. (2010). Palytoxin and analogs: biological and ecological effects. *Marine Drugs*, 8(7), 2021-2037.

Rhodes, L., Adamson, J., Suzuki, T., Briggs, L., and Garthwaite, I. (2000). Toxic marine epiphytic dinoflagellates, *Ostreopsis siamensis* and *Coolia monotis* (Dinophyceae), in New Zealand. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 34, 371–383. doi: 10.1080/00288330.2000.9516939

Santo de Moura, P. E., de Alcântara Santos, A. C., & Sousa Filho, J. R. (2012). PRESENÇA DE LIXO MARINHO EM ESTÔMAGOS DE PEIXES NO LITORAL DE ILHÉUS E URUÇUCA/BA E SUA INFLUÊNCIA NA PESCA ARTESANAL. *Encontro Nacional dos Núcleos de Pesquisa Aplicada em Pesca e Aquicultura*.

Seltenrich, N. (2015). New link in the food chain? Marine plastic pollution and seafood safety.

Totti, C., Accoroni, S., Cerino, F., Cucchiari, E., & Romagnoli, T. (2010). *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): relationships with environmental conditions and substrata. *Harmful algae*, 9(2), 233-239.

Thakur, L. K., & Jha, K. K. (2017). Palytoxin-induced acute respiratory failure. *Respiratory medicine case reports*, 20, 4-6.

Tibiriçá, C. E. J., Leite, I. P., Batista, T. V., Fernandes, L. F., Chomérat, N., Herve, F., ... & Mafra Jr, L. L. (2019). *Ostreopsis* cf. *ovata* bloom in Currais,

Brazil: phylogeny, toxin profile and contamination of mussels and marine plastic litter. *Toxins*, 11(8), 446.

Tichadou, L., Glaizal, M., Armengaud, A., Grosseil, H., Lemée, R., Kantin, R., ... & De Haro, L. (2010). Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. *Clinical toxicology*, 48(8), 839-844.

Tubaro, A. U. R. E. L. I. A., Durando, P., Del Favero, G. I. O. R. G. I. A., Ansaldi, F., Icardi, G., Deeds, J. R., & Sosa, S. I. L. V. I. O. (2011). Case definitions for human poisonings postulated to palytoxins exposure. *Toxicon*, 57(3), 478-495.

Vale, C., & Ares, I. R. (2007). Biochemistry of palytoxins and ostreocins. *Phycotoxins: chemistry and biochemistry*, 95-118.

Yan, Z., Liu, Y., Zhang, T., Zhang, F., Ren, H., & Zhang, Y. (2021). Analysis of microplastics in human feces reveals a correlation between fecal microplastics and inflammatory bowel disease status. *Environmental science & technology*, 56(1), 414-421.

Yoshida, E. T. E. (2012). Avaliação da influência da ingestão de lixo plástico nos indicadores de estresse oxidativo no sangue de tratargas verdes (*Chelonia mydas*).

Zettler ER, Mincer TJ, Amaral-Zettler LA. 2013. Life in the "Plastisphere": microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47:7137–46

Zettler, L. A., Zettler, E. R., Mincer, T. J., Klaassen, M. A., & Gallagher, S. M. (2021). Biofouling impacts on polyethylene density and sinking in coastal waters: a macro/micro tipping point?. *Water Research*, 201, 117289.