

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
TALITA VANDERLEIA VIEIRA BATISTA

INTERAÇÕES ENTRE POLUIÇÃO PLÁSTICA, MICROALGAS E SUAS TOXINAS:  
ESTRESSORES PARA JUVENIS DE TARTARUGAS-VERDE (*Chelonia mydas*)?

PONTAL DO PARANÁ  
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
TALITA VANDERLEIA VIEIRA BATISTA

INTERAÇÕES ENTRE POLUIÇÃO PLÁSTICA, MICROALGAS E SUAS TOXINAS:  
ESTRESSORES PARA JUVENIS DE TARTARUGAS-VERDE (*Chelonia mydas*)?

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de mestre, no Programa de Pós-graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos, no Centro de Estudos do Mar - UFPR.

Orientador: Dr. Luiz L. Mafra Jr.

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Camila Domit

PONTAL DO PARANÁ  
2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DO CENTRO DE ESTUDOS DO MAR

Batista, Talita Vanderleia Vieira

Interações entre poluição plástica, microalgas e suas toxinas: estressores para juvenis de tartarugas-verde (*Chelonia mydas*)? / Talita Vanderleia Vieira Batista. – Pontal do Paraná, 2023.

1 arquivo [76 f.] : PDF.

Orientador: Doutor Luiz Laureno Mafra Júnior.

Coorientadora: Doutora Camila Domit.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Campus Pontal do Paraná, Centro de Estudos do Mar, Programa de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos.

1. Lixo plástico. 2. Biofilme microbiano. 3. Poluição marinha. 4. Microalgas bênticas. 5. Dinoflagelados tóxicos. I. Mafra Júnior, Luiz Laureno. II. Domit, Camila. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

**ATA Nº022**

## **ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM SISTEMAS COSTEIROS E OCEÂNICOS**

No dia vinte de outubro de dois mil e vinte e três às 09:00 horas, na sala Anfiteatro, Centro de Estudos do Mar, Campus Pontal do Paraná, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **TALITA VANDERLEIA VIEIRA BATISTA**, intitulada: **INTERAÇÕES ENTRE POLUIÇÃO PLÁSTICA, MICROALGAS E SUAS TOXINAS: ESTRESSORES PARA JUVENIS DE TARTARUGAS VERDES (*Chelonia mydas*)?**, sob orientação do Prof. Dr. LUIZ LAURENO MAFRA JÚNIOR. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação SISTEMAS COSTEIROS E OCEÂNICOS da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: LUIZ LAURENO MAFRA JÚNIOR (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), LUCIANA ROLINSKI GAMA Pós-Doc (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), ALLAN PAUL KRELLING (INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PARANÁ IFPR), CARLOS EDUARDO JUNQUEIRA DE AZEVEDO TIBIRIÇÁ (null). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, LUIZ LAURENO MAFRA JÚNIOR, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

Pontal do Paraná, 20 de Outubro de 2023.

Assinatura Eletrônica

20/11/2023 10:45:39.0

LUIZ LAURENO MAFRA JÚNIOR

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

20/11/2023 17:34:39.0

LUCIANA ROLINSKI GAMA

Avaliador Interno Pós-Doc (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

21/11/2023 10:34:57.0

ALLAN PAUL KRELLING

Avaliador Interno (INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DO PARANÁ IFPR)

Assinatura Eletrônica

20/11/2023 14:45:21.0

CARLOS EDUARDO JUNQUEIRA DE AZEVEDO TIBIRIÇÁ

Avaliador Externo (null)



## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação SISTEMAS COSTEIROS E OCEÂNICOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **TALITA VANDERLEIA VIEIRA BATISTA** intitulada: **INTERAÇÕES ENTRE POLUIÇÃO PLÁSTICA, MICROALGAS E SUAS TOXINAS: ESTRESSORES PARA JUVENIS DE TARTARUGAS VERDES (*Chelonia mydas*)?**, sob orientação do Prof. Dr. LUIZ LAURENO MAFRA JÚNIOR, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Pontal do Paraná, 20 de Outubro de 2023.

Assinatura Eletrônica

20/11/2023 10:45:39.0

LUIZ LAURENO MAFRA JÚNIOR  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

20/11/2023 17:34:39.0

LUCIANA ROLINSKI GAMA

Avaliador Interno Pós-Doc (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

21/11/2023 10:34:57.0

ALLAN PAUL KRELLING

Avaliador Interno (INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DO PARANÁ IFPR)

Assinatura Eletrônica

20/11/2023 14:45:21.0

CARLOS EDUARDO JUNQUEIRA DE AZEVEDO TIBIRIÇÁ

Avaliador Externo (null)

*Dedico este trabalho à minha família. Em especial ao meu **pai José Vanderley**, que com amor, coragem e resiliência construiu os alicerces para que eu pudesse chegar até aqui.*

*E às mulheres que vieram antes de mim — especialmente minha **mãe Marilete**, minha irmã Karoline, minha avó materna dona Rosa, minha avó paterna Maria Pureza, minha prima Cleri e minha ancestral Eufrásia — que, mesmo sem saber, plantaram em mim a semente do saber, da força e da persistência.*

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que tornaram possível a conclusão bem-sucedida do meu mestrado. Sem o apoio e contribuições generosas de cada um de vocês, este trabalho não teria sido realizado com sucesso. As palavras não são suficientes para expressar minha gratidão, mas vou tentar:

Ao meu Orientador Mafra, por sua orientação, paciência e sabedoria ao longo deste percurso acadêmico, sou profundamente grata e honrada pela oportunidade de aprender tanto contigo.

Aos Professores Pancho (Francisco Lagrese) e Maikon Di Domenico, cuja orientação e assistência foram inestimáveis no desenvolvimento do meu experimento e análise estatística, muito obrigado.

Ao meu amigo cubano, Angel, que compartilhou seu conhecimento e expertise na identificação das microalgas, sua ajuda foi fundamental.

As alunas Maria e Ana Julia, do LaMic (Laboratório de Microalgas), que não apenas auxiliaram na contagem de microalgas, mas também dedicaram seu tempo e esforço ao experimento, vocês foram imprescindíveis.

À Camila Domit e a equipe da dieta do PMP-BS e ao LEC (Laboratório de Ecologia e Conservação), por auxiliar na coleta de amostras das tartarugas, sua contribuição e coleguismo foi essencial.

À Luciana, uma grande amiga que o mestrado me proporcionou, que gentilmente aceitou ser minha banca, seu apoio e parceria nessa caminhada foi essencial para mim. Sentirei saudades dos açaís nas tardes no LaMic.

As amigas Taw e Do, e ao Alan, por estarem ao meu lado nos momentos difíceis, vocês foram um porto seguro.

Aos meus pais, cujo amor e apoio constante são o alicerce do meu sucesso, agradeço profundamente.

À turma do mestrado, vocês são pessoas especiais e compartilhar este caminho com vocês foi uma experiência incrível.

As técnicas do LaMic, Vanessa e Fran, amei ter vocês por perto, cada conversa e trocas de experiências foi muito especial. E a toda a equipe do LaMic, minha gratidão eterna. Vocês fazem deste laboratório único no mundo, com uma energia incrível. Sentirei saudades de todos e desta fase em que aprendi tanto com cada um que passou por aqui.

À Capes, por financiar minha bolsa de mestrado, sou grata por tornar possível a realização deste projeto e sonho.

A todos, muito obrigado por fazerem parte desta jornada e por contribuírem para o meu crescimento acadêmico e pessoal. Seu apoio foi inestimável.

## RESUMO

Os resíduos plásticos poluem os oceanos, exercendo impactos diretos sobre a saúde de vários organismos, incluindo as tartarugas-verde (*Chelonia mydas*), via ingestão ou contato físico. Além de causarem emaranhamento, sufocamento e danos ao sistema digestório, os resíduos plásticos podem carregar compostos tóxicos em sua superfície, tornando-se fontes potenciais de poluentes e toxinas para a vida marinha. As microalgas, algumas das quais produtoras de ficotoxinas, colonizam a superfície de detritos plásticos, podendo agravar os riscos da ingestão destes resíduos para a saúde animal. O presente estudo teve como objetivos (i) avaliar a colonização de diferentes tipos de plásticos por microalgas bênticas tóxicas – o dinoflagelado *Prorocentrum lima* – e diatomáceas não-tóxicas durante uma semana em sistema experimental em laboratório, e (ii) investigar a relação da presença de detritos plásticos e microalgas nocivas no trato gastrointestinal com as concentrações de ficotoxinas detectadas em tecidos de tartarugas-verde encalhadas mortas no litoral do Paraná (sul do Brasil) ao longo de quatro meses em 2022. No experimento em laboratório, diferentes tipos de plásticos (polipropileno-PP, poliestireno de alta densidade-PEAD, poliestireno de baixa densidade-PEBD, polipropileno biorientado-BOPP) foram submersos em tanques contendo as microalgas suspensas em água do mar, e a formação de biofilme algal na superfície dos plásticos foi quantificada ao longo do tempo. O biofilme foi perceptível a partir de 24 horas de exposição, com aumento exponencial na densidade de células a partir daí, atingindo abundâncias ligeiramente maiores de ambas as espécies nos fragmentos de PP e HDPE. Células tóxicas de *P. lima* predominaram no biofilme ao longo dos sete dias, mostrando-se colonizadores mais eficientes da superfície de todos os tipos de polímeros. Paralelamente, as tartarugas analisadas possuíam uma grande diversidade de microalgas no conteúdo de seu trato, com maior abundância de células nos intestinos do que nos estômagos. As microalgas mais frequentes e abundantes foram as de ocorrência tipicamente estuarina/costeira, embora algumas espécies mais oceânicas também tenham sido registradas, podendo indicar o uso de áreas de alimentação variadas pelos animais encontrados na costa paranaense. Foram registrados quatro táxons de dinoflagelados produtores de toxinas, que foram relativamente mais abundantes nos intestinos de tartarugas-verde que continham resíduos plásticos do que naquelas em que macro-resíduos eram imperceptíveis. Por fim, as concentrações de ficotoxinas lipofílicas foram determinadas por cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massa em amostras de tecidos de estômago, intestino e fígado. Quase metade dos indivíduos analisados apresentavam concentrações baixas a moderadas da toxina diarreica ácido ocadaico (OA) em seus tecidos, especialmente nos intestinos. Embora os níveis provavelmente não sejam suficientes para causarem intoxicação aguda nos animais, não se pode descartar possíveis impactos crônicos à saúde de juvenis de tartarugas-verde que usam as áreas costeiras comumente afetadas por florações de microalgas produtoras de OA e outras toxinas. O presente estudo não permite inferir se houve, de fato, uma relação entre a ingestão de plásticos e a contaminação por OA nas tartarugas analisadas, mas sugere, em conjunto, que estes resíduos têm um grande potencial de atuarem como vetores de ficotoxinas, caracterizando um cenário de estressores múltiplos para a vida marinha na região.

**Palavras-chave:** Lixo plástico; Biofilme microbiano; Poluição marinha; Microalgas bênticas; Dinoflagelados tóxicos.

## ABSTRACT

Plastic waste pollutes the ocean, exerting direct impacts on the health of various organisms, including green turtles (*Chelonia mydas*), via ingestion and physical interaction. In addition to causing entanglement, suffocation and damages to the digestive system, plastic waste can carry toxic compounds on its surface, becoming potential sources of pollutants and toxins for marine life. Microalgae, some of which produce phycotoxins, colonize plastic debris, potentially exacerbating the risks of ingestion for animal health. The present study aimed to (i) assess the colonization of different types of plastics by toxic benthic microalgae – the dinoflagellate *Prorocentrum lima* – and non-toxic diatoms during a one-week laboratory experiment, as well as (ii) investigate the relationship between the presence of plastic debris and harmful microalgae in the gastrointestinal tract (GIT) and the concentrations of phycotoxins in tissues of green turtles dead-stranded on the coast of Paraná (southern Brazil) over four months in 2022. In the laboratory experiment, different types of plastics (polypropylene-PP, high-density polystyrene-HDPE, low-density polystyrene-LDPE, bi-axially oriented polypropylene-BOPP) were submerged in tanks containing microalgae suspended in seawater, and the formation of algal biofilm on the surface of the plastics was quantified over time. Biofilm formation was already noticeable after 24 hours of the experiment, and cell density increased exponentially from then on, reaching slightly higher abundances of both species in HDPE and PP fragments. Toxic cells of *P. lima* predominated in the biofilm over the seven days, proving to be more efficient colonizers of plastics of all types of polymers. In parallel, the microscopic fractions in the GIT content of turtles that contained or did not contain plastic were analyzed, identifying and quantifying the presence of toxic and non-toxic microalgae. Tissue samples from the stomach, intestine, and liver were collected, and the concentrations of lipophilic phycotoxins were determined by HPLC-MS/MS. The turtles analyzed had a great diversity of microalgae in the contents of their GIT, with a greater abundance of cells in the intestines than in the stomachs. The most frequent and abundant microalgae were typically estuarine/coastal in occurrence, although some more oceanic species were also recorded, which may indicate the use of varied feeding areas in animals found on the coast of Paraná. Four taxa of toxin-producing dinoflagellates were recorded, which were relatively more abundant in the intestines of green turtles that contained plastic waste. Almost half of the individuals analyzed had low to moderate concentrations of the diarrheal toxin okadaic acid (OA) in their tissues, especially in the intestines. Although the levels are probably not sufficient to cause acute poisoning in animals, possible chronic health impacts on juvenile green turtles that use coastal areas commonly affected by microalgae blooms that produce OA and other toxins cannot be ruled out. The present study does not allow us to infer the real relationship between OA contamination and the ingestion of plastics in the turtles analyzed, but it suggests, together, that these residues have a great potential to act as vectors of phycotoxins, characterizing themselves as multiple stressors for marine life.

**Keywords:** Plastic waste; Microbial biofilm; Marine pollution, Benthic microalgae, Toxic dinoflagellates.

## Lista de Figuras

Figura 1 - Etapas de formação de um biofilme.....	22
Figura 2 - Células da diatomácea bêntica não tóxica <i>Psamodycton panduriforme</i> (à esquerda) e do dinoflagelado toxigênico <i>Prorocentrum lima</i> (à direita). Escalas: 100 $\mu\text{m}$ e 10 $\mu\text{m}$ , respectivamente. ....	33
Figura 3 - A) Sistema composto de cinco aquários de 50 L com bombas <i>air-lift</i> e aeradores, conectados por meio de mangueiras e bombas peristálticas a um cone <i>Imhoff</i> de 1L contendo os cultivos de microalgas que eram acrescentadas periodicamente; B) Detalhe do cone <i>Imhoff</i> com aeração na parte inferior e as bombas peristálticas na parte superior; C) Barra aeradora posicionada junto ao fundo, no centro do aquário (lado esquerdo da imagem), <i>longlines</i> suspendendo os fragmentos de diferentes polímeros plásticos, e sistema de bombas airlift (à direita); D) Detalhe do sistema de bombas <i>air-lift</i> (tubos verticais) para circulação da água dentro de um dos aquários experimentais. ....	34
Figura 4 - Fotomontagem evidenciando a formação crescente de biofilme nos plásticos de diferentes polímeros (PEBD, BOPP, PP e PEAD) que ficaram submersos durante o experimento por 1, 2, 3, 4 e 7 dias, da esquerda para a direita. ....	37
Figura 5 - Procedimento de obtenção de amostras do trato gastrointestinal (TGI) de tartarugas-verde na área de necropsias do LEC (Laboratório de Ecologia e Conservação): A,B) Abertura das seções do trato para retirada de seu conteúdo; C) Macroalgas pertencentes à Divisão Rhodophyta e gênero <i>Ulva</i> , presentes no estômago de um indivíduo. D) Resíduos antrópicos coletados no conteúdo intestinal de outro indivíduo; e E) Conteúdo líquido retirado para contagem das células de microalgas na fração microscópica de uma seção do TGI. ....	49
Figura 6 - Microalgas encontradas em amostra de conteúdo estomacal de tartaruga-verde, <i>Chelonia mydas</i> . A,B) Silicoflagelados - A) <i>Dictyocha octonaria</i> , B) <i>Dictyocha fibula</i> .; C) <i>Ebria tripartita</i> ; D,E,F) Diatomáceas - D) <i>Biddulphia pulchella</i> , E) <i>Climacosphenia moniligera</i> , F) <i>Planktoniella sol</i> ; G,H,I) Dinoflagelados - G) <i>P. micans</i> , H) <i>P. scutellum</i> , I) <i>Pyrophacus steinii</i> . Escalas = 10 $\mu\text{m}$ ; exceto E) = 20 $\mu\text{m}$ .....	53
Figura 7 - Dinoflagelados tóxicos encontrada em amostra de conteúdo estomacal de tartaruga-verde. A) <i>Dinophysis acuminata</i> ; B) <i>Dinophysis tripos</i> ; C) <i>Ostreopsis cf. ovata</i> ; D) <i>Prorocentrum lima</i> . Escalas = 10 $\mu\text{m}$ .....	54

## Lista de Gráficos

Gráfico 2 - Abundância (células mL <sup>-1</sup> ; média ± desvio padrão) de <i>Prorocentrum lima</i> (painel esquerdo) e diatomáceas (painel direito) na coluna d'água em diferentes aquários ao longo do tempo do experimento. ....	36
Gráfico 3 - Abundância (células cm <sup>-2</sup> ) de <i>Prorocentrum lima</i> (painel esquerdo) e diatomáceas (painel direito) sobre diferentes fragmentos plásticos – PEAD (polietileno de alta densidade), PEBD (polietileno de baixa densidade), BOPP (polipropileno biorientado) e PP (polipropileno) – ao longo do tempo de exposição em sistema experimental. Letras maiúsculas diferentes acima das barras indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos de exposição. ....	38
Gráfico 4 - Bloxplot das medidas de comprimento curvilíneo da carapaça (CCC, em cm) dos indivíduos que continham (“sim”) ou não continham (“não”) macroplásticos em abundância no conteúdo do TGI. Os círculos indicam <i>outliers</i> . ....	52
Gráfico 5 - Abundância celular média de microalgas presentes no conteúdo digestivo de tartarugas-verde encontradas encalhadas mortas ao longo da costa paranaense, sul do Brasil, durante os meses de abril até agosto de 2022. A abundância de todas as espécies de microalgas somadas está representada no painel da esquerda, e das espécies produtoras de toxinas na direita. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre as duas frações do trato digestivo (estômago e intestino). Um asterisco acima das barras indica diferenças estatisticamente significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre as frações com plástico (barras em cinza escuro) e sem plástico (cinza claro). ....	55
Gráfico 6 - Concentração de ácido ocaídoico (OA, em ng g <sup>-1</sup> ) em tecidos de estômago e intestino de diferentes indivíduos de tartarugas-verde ( <i>Chelonia mydas</i> ) com presença e ausência de macroplásticos no trato gastrointestinal. Os indivíduos foram coletados a partir de encalhes no litoral do Paraná, sul do Brasil, ao longo de um período de aproximadamente quatro meses em 2022. Níveis-traço de OA (entre os limites de detecção e quantificação: 0,6-2,0 ng g <sup>-1</sup> ) foram posicionados na base do eixo Y. ....	57

## **Lista de Mapas**

Mapa 2 - Mapa da área de amostragem de indivíduos de tartarugas-verde juvenis encalhadas mortas ao longo do litoral do Estado do Paraná, sul do Brasil, onde o Laboratório de Ecologia e Conservação (LEC/UFPR) realiza, por meio do PMP-BS<sup>1</sup> o monitoramento regular diário e a coleta de espécimes.....48

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1 – Tabela com o código de identificação da plataforma SIMBA-Petrobras das tartarugas que tiveram níveis de toxinas em seus tratogastrointestinal (TGI). .....	56
Tabela 2 - Lista com as Tartarugas-verde analisadas no presente estudo, incluindo o código obtidos a partir da plataforma de dados públicos denominado “Sistema de Informação de Monitoramento da Biota Aquática” (SIMBA-Petrobras), que possui os dados biológicos de cada indivíduo necropsiado. Seu estágio de decomposição (escala numérica crescente: Nível 2 – Carcaça Fresca: O animal ainda mantém a maior parte de sua aparência original. Não há sinais evidentes de decomposição avançada; Nível 3 - Início de Decomposição: A decomposição começou a se instalar, com sinais claros de mudanças físicas; Nível 4 – Decomposição avançada: A decomposição avançou significativamente, com forte deterioração dos tecidos. Nível 5 – Esqueletização ou Restos Secos: A maior parte dos tecidos moles foi consumida, restando apenas ossos e alguns restos secos). A incidência de fibropapilomatose (FP), seu comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) e informações sobre a presença de plástico no estômago e/ou no intestino. ND: não determinado; n/a: dado não disponível. ....	73
Tabela 3 - Lista das microalgas encontradas no trato digestivo de tartarugas-verde. ....	75

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS E HIPÓTESES</b> .....	<b>21</b>
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA: Colonização de fragmentos plásticos no mar – formação de biofilme microbiano e sucessão de espécies</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1 Biofilme sobre o plástico: conceito e fatores influenciadores</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2 Formação e sucessão do biofilme microbiano em plásticos marinhos</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2.1 Biofilme de bactérias</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2.2 Biofilme de microalgas</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2.3 Biofilme de invertebrados</b> .....	<b>25</b>
<b>3.3 Diversidade no biofilme</b> .....	<b>26</b>
<b>4. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>5. CAPÍTULOS DA DISSERTAÇÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>5.1. CAPÍTULO 1</b> .....	<b>29</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>29</b>
<b>5.1.1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>5.1.2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
<b>5.1.2.1. Desenho experimental</b> .....	<b>32</b>
<b>5.1.2.2. Processamento e análise das amostras</b> .....	<b>34</b>
<b>5.1.2.3. Análise estatística</b> .....	<b>35</b>
<b>5.1.3. RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
<b>5.1.4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>5.1.5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>5.2. CAPÍTULO 2</b> .....	<b>43</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>43</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>44</b>
<b>5.2.1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>5.2.2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>48</b>
<b>5.2.2.1. Coleta e processamento das amostras</b> .....	<b>48</b>
<b>5.2.2.2. Contagem microscópica das células de microalgas</b> .....	<b>50</b>
<b>5.2.2.3. Análise de toxinas</b> .....	<b>50</b>
<b>5.2.2.4. Análise estatística</b> .....	<b>51</b>

<b>5.2.3. RESULTADOS</b> .....	<b>52</b>
<b>5.2.3.1. Composição e abundância de microalgas no conteúdo do trato digestivo</b> 52	
<b>5.2.3.2. Toxinas em amostras de tecido digestivo</b> .....	<b>55</b>
<b>5.2.4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>5.2.4.1. Caracterização geral da comunidade de microalgas no conteúdo digestivo das tartarugas</b> .....	<b>57</b>
<b>5.2.4.2. O lixo plástico marinho e seu papel como possível vetor de microalgas tóxicas para tartarugas</b> .....	<b>58</b>
<b>5.2.4.3. Ácido ocadaico e microalgas produtoras no sistema digestivo das tartarugas</b> .....	<b>59</b>
<b>5.2.5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>62</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>64</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>73</b>
<b>8.1. Anexo I</b> .....	<b>73</b>
<b>8.2. Anexo II</b> .....	<b>75</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Entre 1950 e 2021, a produção global de plásticos aumentou de 1,5 para 390 milhões de toneladas por ano, e a expectativa é de que continue aumentando durante os próximos anos (PLASTICS EUROPE, 2022). Nas últimas décadas, desde que a produção se intensificou, os restos plásticos se acumularam em ambientes terrestres, no oceano aberto, nas margens das ilhas mais remotas e no mar profundo, tornando-se rapidamente uma grande ameaça à saúde do ecossistema marinho. Uma vez no oceano, o plástico permanece no ambiente devido a sua natureza hidrofóbica, sendo de especial preocupação a longevidade de seus detritos e sua grande capacidade de dispersão (BARNES et al., 2009).

Itens de plástico e seus detritos, que variam em tamanho de <5 mm (microplásticos; MPs) a vários centímetros (macroplásticos), são persistentes nos oceanos e têm um tempo de degradação estimado em >400 anos (revisado em WARD et al., 2020). Os resíduos plásticos encontrados no oceano possuem composições químicas diversas, sendo principalmente compostos de polipropileno (PP), polietilenos de alta densidade (PEAD), polietileno de baixa densidade (PEBD), policloreto de vinila (PVC) e poli tereftalato de etileno (PET), (BHASKAR et al., 2004). Dentre os exemplos dos resíduos sólidos descartados no ambiente marinho estão sacolas plásticas (compostas de PEAD), potes e plásticos rígidos em geral (PP), embalagens (*packs*) de bebidas (PEBD), garrafas (PET) e embalagens de alimentos processados, como biscoitos e picolés (polipropileno biorientado-BOPP, do termo em inglês *bi-axially oriented polypropylene*). No Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP), litoral do Paraná, por exemplo, foi reportada em todos os setores do estuário a presença de sacolas de compras (29% de ocorrência nas amostras), pacotes de alimentos (19%), embalagens de doces (12%) e copos (10%) (POSSATTO et al., 2014).

A permanência de detritos plásticos por um longo período no ambiente marinho estimula a formação do biofilme bacteriano, que conduz à sucessão de outros micro e macro organismos sobre sua superfície (REISSER et al., 2014), envolvendo a colonização por bactérias seguida pelo crescimento de microalgas e invertebrados (ANDRADY, 2011; ZARDUS et al., 2008). A formação do biofilme sobre materiais plásticos mostra ser temporalmente e espacialmente variável, ligada principalmente a mudanças na temperatura e na produtividade da água do mar circundante (nutrientes), além de estar relacionada à natureza química do polímero (ARTHAM et al., 2009; OBERBECKMANN et al., 2014; EICH et al., 2015; ZHANG et al., 2021). Ao longo do tempo de submersão, as comunidades aderidas ao plástico marinho alteram sua composição, tanto em escala de dias quanto de meses e estações do ano (CHEN et al., 2019; DOBRETsov et al., 2013). Não há evidências de que alguma espécie degrade os polímeros, mas a formação de biofilme causa uma diminuição significativa na hidrofobicidade do plástico e uma diminuição de sua flutuabilidade (LOBELLE et al., 2011, CHEN et al., 2019). Os organismos podem proteger o plástico da radiação ultravioleta e fotocatalise, diretamente ou por meio de flutuabilidade reduzida, aumentando assim a longevidade do plástico (ANDRADY, 2011; CARSON et al.,

2013). O transporte dos organismos ligados aos plásticos causa grande preocupação, uma vez que esses itens podem percorrer longas distâncias carregando comunidades que podem conter espécies que se tornarão invasoras, vetores de doenças e/ou de compostos tóxicos (VIRSEK et al., 2017; LEITE et al., 2022).

Para algumas espécies da fauna marinha, como as tartarugas marinhas, os plásticos podem representar uma grande ameaça direta, através da ingestão e do emaranhamento, além de efeitos negativos indiretos por meio da degradação dos principais habitats e de efeitos negativos mais amplos ao ecossistema (BARNES et al., 2009). A ingestão de plásticos pelos animais, por exemplo, causa sérios danos ao trato digestório, como lesões, obstrução e uma falsa sensação de saciedade com consequente desnutrição (GUEBERT-BARTHOLO et al., 2011). Essa ingestão acidental provoca impactos diretos e indiretos à saúde animal, que vão desde alterações na fluatuabilidade, formação de fecalomas nos intestinos, até a morte por inanição em casos mais graves (BUTTERWORTH et al., 2012). No litoral do Paraná, foi observada a ingestão de plásticos na dieta de 92% das tartarugas-verde (*Chelonia mydas*) encontradas encalhadas nas praias após a morte recente (NUNES et al., 2018), uma frequência relativamente maior de ingestão de detritos marinhos por tartarugas-verde do que a observada durante estudos anteriores no sudoeste do Oceano Atlântico (GAMA et al., 2016; GUEBERT-BARTHOLO et al., 2011; SANTOS et al., 2016; VÉLEZ-RUBIO et al., 2015). Indivíduos juvenis de tartarugas-verde, com ~25 a 60 cm de comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), são os mais vulneráveis a ingestão de detritos marinhos devido ao seu habitat e ingestão de itens alimentares costeiros (ANDRADE et al., 2016; LYNCH, 2018; NELMS et al., 2015). Os plásticos ingeridos são principalmente polímeros flutuantes de baixa densidade, sendo representados, em escala global, em 51% por polietileno de baixa densidade (PEBD), 26% por polipropileno (PP), 10% por polietileno desconhecido (PE) e 5%, coletivamente, por PE de alta densidade, poliamida (PA), poliestireno (PS), acetato de vinila polivinílico (EVA), poliuretano (PUR) e poliacrilonitrila butadieno estireno (ABS) (JUNG et al., 2018; RIZZI et al., 2019).

Os plásticos podem ser, ainda, fontes de compostos tóxicos aos organismos que os ingerem/incorporam, pois, parte de seus constituintes – os aditivos – agem como desreguladores endócrinos (EDCs), tais como o bisfenol-A e os ftalatos. Adicionalmente, os plásticos podem servir como fontes de poluentes orgânicos persistentes (POPs), que se adsorvem a sua superfície. Ao serem ingeridos, os POPs podem se tornar biodisponíveis para os organismos (ENDO et al., 2005; TEUTEN et al., 2009; GALLO et al., 2018).

Em animais que possuem uma seletividade alimentar, seja visual e/ou química, a ingestão acidental de resíduos plásticos tende a ser agravada pela agregação de fauna e flora sobre a sua superfície, uma vez que conferem ao plástico odor, cor e paladar semelhantes aos de seus alimentos naturais (GREGORY, 2009; SCHUYLER et al., 2014; NELMS et al., 2015). Microalgas se destacam como componentes abundantes do biofilme cobrindo a superfície de detritos plásticos marinhos (BATISTA, 2019). Dentre as microalgas dominantes que colonizam detritos plásticos, algumas espécies potencialmente tóxicas podem alcançar abundâncias relativamente

elevadas (CASABIANCA et al., 2019; TIBIRIÇÁ et al., 2019). Desta forma, os plásticos flutuantes no meio marinho podem ser potenciais vetores de espécies de microalgas produtoras de compostos neurotóxicos, podendo atuar como fontes adicionais destas substâncias na cadeia trófica, inclusive no ambiente pelágico (CASABIANCA et al., 2019; LEITE et al., 2022).

Espécies de microalgas bênticas, que vivem em associação a substratos rígidos, são especialmente preocupantes. Observações microscópicas de detritos plásticos recolhidos na costa catalã do Mar Mediterrâneo, por exemplo, identificaram a ocorrência de comunidades diversificadas e complexas de diatomáceas bentônicas e pequenos flagelados (<20 µm), sendo que alguns fragmentos plásticos estavam fortemente colonizados por dinoflagelados com potencial neurotóxico, como *Ostreopsis* sp. e *Coolia* sp. (MASÓ et al., 2003). Entre 35% e 45% das águas costeiras estão atualmente sob risco moderado de colonização plástica por dinoflagelados bênticos toxigênicos, especialmente em regiões subtropicais e temperadas, para onde a dispersão de microalgas bênticas tóxicas pode ser particularmente facilitada pelos resíduos flutuantes de plásticos (LEITE et al., 2022).

Além das neurotoxinas, as toxinas diarreicas ácido ocadaico (OA) e dinofisistoxinas (DTXs), produzidas por espécies bênticas do dinoflagelado *Prorocentrum* e planctônicas de *Dinophysis*, também podem ser encontradas sobre detritos plásticos (MASÓ et al., 2016; LARSSON et al., 2018), representando assim fontes adicionais de ficotoxinas para organismos marinhos como as tartarugas-verde. Em conjunto com os plásticos, micro-organismos contendo compostos tóxicos podem ser, desta forma, acidentalmente ingeridos e potencialmente agravar os efeitos deletérios destes poluentes à saúde animal. O OA, por exemplo, tem sido apontado como um cofator ambiental da doença fibropapilomatose em tartarugas-verde (LANDSBERG et al., 1999; ARTHUR et al., 2008). Tanto o OA como as células dos dinoflagelados produtores já foram encontrados no trato gastrointestinal desta espécie de tartaruga no litoral do Paraná (MOREIRA-GONZÁLEZ et al., 2023), mas o papel dos detritos plásticos como vetores significativos de toxinas para a fauna marinha ainda precisa ser melhor avaliado.

O lixo marinho é um desafio global, causado por comportamento irresponsável e práticas inadequadas de gestão de resíduos. À medida que cresce a preocupação com a questão da poluição marinha por resíduos plásticos, torna-se essencial avaliar os riscos enfrentados pelas principais espécies e as implicações associadas à biodiversidade (VEGTER et al., 2014). Tal avaliação, no entanto, torna-se complicada pela variedade de efeitos negativos potencialmente ligados à ingestão de plásticos pelos animais marinhos, pelas grandes escalas espaciais e temporais envolvidas e pela dificuldade em se estabelecer uma relação de causalidade clara (NELMS et al., 2015). Assim, uma melhor compreensão da suscetibilidade destes organismos à ingestão de resíduos plásticos no meio marinho, que envolve a caracterização de suas propriedades biofísicoquímicas, torna-se imprescindível para se estabelecer prioridades de pesquisa, aconselhar decisões de gestão e desenvolver medidas de mitigação adequadas (SCHUYLER et al., 2014).

Neste contexto, considerando a grande quantidade de resíduos plásticos no oceano, a colonização destes resíduos por microalgas, e o risco associado para a fauna marinha, torna-se de grande relevância o conhecimento sobre a capacidade de diferentes tipos de plásticos abrigarem microalgas toxigênicas e seus compostos tóxicos, bem como o seu possível papel como vetor de ficotoxinas para espécies ameaçadas de extinção, tartarugas-verde. Sendo assim, a presente investigação examinou as interações entre diferentes tipos de detritos plásticos, microalgas marinhas e biotoxinas, a fim de avaliar seus potenciais efeitos aditivos negativos para a saúde de indivíduos juvenis desta espécie de tartaruga marinha.

## **2. OBJETIVOS E HIPÓTESES**

Combinando pesquisas de campo e experimentos de laboratório, o presente estudo tem como objetivo principal avaliar o potencial de detritos macroscópicos de plásticos em servirem como vetores para a transferência de toxinas algais nas redes alimentares marinhas, com especial atenção às tartarugas-verde, espécie ameaçada de extinção. Para isso, o estudo buscou: (i) determinar a capacidade de colonização de diferentes tipos de plásticos por microalgas tóxicas e não-tóxicas, e (ii) investigar as possíveis associações entre a ingestão de detritos plásticos e a presença de microalgas e toxinas nos tratos digestivos de indivíduos juvenis de tartaruga-verde.

Especificamente, serão testadas as seguintes hipóteses:

- a. Se características físico-químicas do tipo de polímero são importantes para a formação de biofilmes, então fragmentos plásticos de diferentes composições exibirão capacidades variáveis de abrigar células de microalgas mediante exposição experimental;
- b. Se dinoflagelados bênticos produtores de toxinas são colonizadores eficientes de substratos diversos no ambiente marinho, então suas células se tornarão mais abundantes do que as de espécies competidoras no biofilme sobre a superfície de plásticos expostos em um sistema experimental;
- c. Se detritos plásticos são vetores eficientes de células de microalgas tóxicas e de seus compostos nocivos, então espera-se encontrar quantidades detectáveis de biotoxinas e das células produtoras em indivíduos de tartarugas-verde que tenham ingerido quantidades significativas destes detritos.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA: Colonização de fragmentos plásticos no mar – formação de biofilme microbiano e sucessão de espécies

#### 3.1 Biofilme sobre o plástico: conceito e fatores influenciadores

Biofilmes são compostos por uma comunidade complexa e estruturada de microrganismos, envoltos por uma matriz extracelular de polissacarídeos, aderidos entre si a uma superfície ou interface (Figura 1) (COSTERTON et al., 1995). Um biofilme se forma naturalmente sobre qualquer superfície sólida em contato com água não esterilizada (XAVIER et al., 2005). O acúmulo de biofilme em superfícies é um fenômeno natural que acontece em meios aquosos e resulta de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem simultaneamente (MACHADO, 2005). Para uma célula bacteriana, as vantagens em se encontrar contida num biofilme são numerosas, como: proteção contra predadores tais como protozoários e contra agentes agressivos; resistências a desinfetantes e antibióticos; resistência à radiação UV, e à desidratação, já que a matriz de exopolissacarídeos (EPS) é altamente hidratada (ELASRI e MILLER, 1999). Em alguns casos, a matriz de EPS é capaz de sequestrar cátions, metais e toxinas, conferindo, além da proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação (BOARI, 2009).

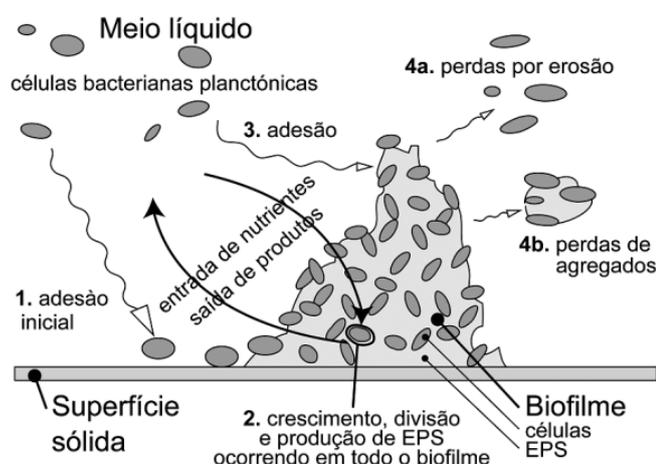


Figura 1 - Etapas de formação de um biofilme.  
Fonte: adaptado de XAVIER et al., 2005.

Na área costeira de Yantai, China, foi observado que os biofilmes ligados aos MPs têm uma biomassa maior e uma taxa de crescimento mais rápida no verão do que no outono e inverno devido às condições mais favoráveis de oxigênio dissolvido (OD), temperatura e concentrações de nutrientes naquela estação do ano (ZHANG et al., 2021). A influência da temperatura está relacionada à taxa de reação das enzimas e ao metabolismo celular, que afeta o desenvolvimento celular. Dentro de uma determinada faixa de variação, temperaturas mais altas resultarão em um crescimento mais rápido de microrganismos (GARRETT et al., 2008; CAO et al., 2017; CHEN et al., 2019). Ao mesmo tempo, os nutrientes ( $P-PO_4^-$ ,  $N-NO_3^-$ ,  $N-NO_2^-$ ,  $N-NH_3^+$  e  $Si-SiO_3^{2-}$ ) são essenciais para o crescimento de microrganismos, e níveis mais elevados de nutrientes são propícios ao desenvolvimento de biofilmes (CHEN et al., 2019). As concentrações de nutrientes e OD no inverno são significativamente maiores do que

no verão, ainda assim a biomassa do biofilme costuma ser menor. Portanto, a temperatura parece ser o principal fator que influencia o crescimento dos biofilmes (ZHANG et al., 2021; DE TENDER et al., 2017; JIN et al., 2020).

### 3.2 Formação e sucessão do biofilme microbiano em plásticos marinhos

No oceano, um biofilme microbiano se desenvolve assim que o plástico entra em contato com o meio marinho, envolvendo a colonização bacteriana seguida pelo crescimento de microalgas, macroalgas e invertebrados (ANDRADY, 2011; LOBELLE et al., 2011). Sabe-se que as camadas microbianas – os biofilmes – estimulam a ligação de algas e invertebrados a esses materiais plásticos no meio marinho. Desta forma, as variedades de microrganismos que se aderem aos plásticos aumentam a força de adesão, criam condições favoráveis e os tornam bons substratos para que espécies de outras colônias se estabeleçam (XAVIER et al., 2005; ZARDUS et al., 2008).

A formação do biofilme sobre materiais plásticos mostra ser temporalmente e espacialmente variável, ligada principalmente às mudanças na temperatura e na produtividade da água do mar circundante (nutrientes), além de estar relacionada à natureza química do polímero (ARTHAM et al., 2009; OBERBECKMANN et al., 2014; EICH et al., 2015; ZHANG et al., 2021). Ao longo do tempo de submersão, as comunidades aderidas ao plástico marinho alteram sua composição, tanto em escala de dias quanto de meses e estações do ano (CHEN et al., 2019; DOBRETISOV et al., 2013). Não há evidências de que alguma dessas espécies degradem os polímeros, mas a formação de biofilme coincide com uma diminuição significativa na hidrofobicidade do plástico e com a diminuição de sua flutuabilidade (LOBELLE et al., 2011, CHEN et al., 2019). Assim, os organismos podem proteger o plástico da radiação ultravioleta e fotocatalise diretamente, ou por meio de flutuabilidade reduzida, aumentando assim a longevidade do plástico (ANDRADY, 2011; CARSON et al., 2013).

#### 3.2.1 Biofilme de bactérias

Nas superfícies plásticas, os biofilmes são compostos por uma grande diversidade de bactérias. Um estudo sobre MPs em águas costeiras da China (ZHANG et al., 2021), reportou uma cobertura dominante de espécies não identificadas de *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Cyanobacteria*, com a última dominando no inverno. Os itens estavam entre 0,5 e 3 m de profundidade. Além disso, foi reportada a co-ocorrência de microrganismos pertencentes aos seguintes táxons: a ordem Planctomycetales, as famílias Hyphomonadaceae, Saprospiraceae e Rhodobacteraceae, as famílias Saprospiraceae, Cyclobacteriaceae, Desulfobacteraceae e Oleiphilaceae, Rhodobacterales, Rhizobiales e Cellvibrionales, Pseudomonadaceae, Vibrionaceae, Shewanellaceae e Enterobacteriaceae. As espécies bacterianas nas superfícies dos MPs eram compostas principalmente por cianobactérias (verão, outono e inverno), *Litoreaibacter* (verão) e *Pseudahrensia*

(outono). Além dos principais gêneros das comunidades bacterianas que colonizam os MPs, os gêneros especiais em cada tipo de MPs foram determinados: *Hellea* (outono) e *Oleiphilus* (inverno) em PE, *Cyanobacteria* (verão) e *Bosea* (inverno) no PP, e *Ilumatobacter*, *Woeseia*, *Ahrensia* (verão), Holosporaceae não-identificadas (outono) e *Bacteroides* (ZHANG et al., 2021).

Chen et al., (2019) observaram o desenvolvimento de biofilme em detritos plásticos flutuantes em um lago de água doce, em East Lake, que é um lago urbano mesotrófico a eutrófico localizado em Wuhan, China. Encontraram células de Cynophyta, Bacillariophyta, Chlorophyta, Cryptophyta, Pyrrophyta, Euglenophyta.

Bryant et al. (2016) coletaram micro e macrolásticos no grande giro do Pacífico e detectaram a presença de diatomáceas, dinoflagelados e cianobactérias entre uma infinidade de organismos heterotróficos. Bryozoa, Cyanobacteria, Alphaproteobacteria e Bacteroidetes dominaram todas as partículas de plástico, independentemente do tamanho da partícula.

### 3.2.2 Biofilme de microalgas

As microalgas também são amplamente encontradas em biofilmes. Masó et al. (2003) foram os primeiros a registrarem a ocorrência de microalgas potencialmente tóxicas em plásticos, em material coletado entre 1995 e 2000 no Mediterrâneo (costa noroeste, Catalunha). Houve o registro de *Ostreopsis* sp., *Coolia* sp. e *Alexandrium taylori* (este último durante uma floração). Mais tarde, Masó et al. (2016) analisaram a microbiota de itens coletados no sedimento e na superfície no norte do Mediterrâneo (Itália, Grécia e Espanha), entre 40 e 90 m de profundidade. Diatomáceas foram dominantes, dinoflagelados ocorreram em 50% dos itens pelágicos e foram raros nos itens plásticos que se encontravam junto ao fundo. Dentre as espécies potencialmente nocivas, encontraram *Prorocentrum lima*, *Prorocentrum cordatum* (syn. *P. minimum*), *Ceratium* spp., *Pentaparsodinium* spp., *Heterocapsa* sp., *Coolia* sp. e *Dinophysys* sp., sendo a maioria raramente encontrada na coluna d'água. Nos fragmentos do giro do Pacífico Norte foi encontrado principalmente bactérias e diatomáceas, e dinoflagelados em baixa densidade (MASÓ et al., 2003).

Casabianca et al. (2019) contabilizaram 259 células cm<sup>-2</sup> de *Ostreopsis* cf. *ovata* em plásticos por qPCR, mas registraram até 2500 células cm<sup>-2</sup> no experimento de adesão em laboratório (através de microscopia). Além disso, também contabilizaram máximas abundâncias de 30 células cm<sup>-2</sup> de *Alexandrium pacificum* e 73 células cm<sup>-2</sup> de *Alexandrium minutum*. Tiribicá et al. (2019), no litoral do Paraná, Brasil, durante “bloom” de *O. cf. ovata*, registraram uma média de 1300 a 8400 células cm<sup>-2</sup> em plásticos. Essas microalgas bênticas são produtoras de compostos neurotóxicos potentes, podendo representar um risco adicional à fauna marinha que ingere materiais plásticos contaminados. Assim, o plástico passa a atuar como vetor adicional da toxina na cadeia trófica.

Kettner et al. (2019) analisaram a microbiota de fragmentos plásticos incubados por 15 dias em águas salobras na Alemanha (Mar Báltico). Além de uma ampla diversidade de micro-organismos, registraram um enriquecimento do dinoflagelado

potencialmente tóxico *Pfiesteria* sp. (espécie majoritariamente planctônica e heterotrófica). Esta avaliação das comunidades eucarióticas totais em MP em ambientes salobres destaca a complexidade dos biofilmes associados aos MPs, potencialmente levando a atividades microbianas alteradas e, portanto, a mudanças nas funções do ecossistema.

Dinoflagelados potencialmente tóxicos foram encontrados em plásticos também por Amaral-Zettler et al. (2021). Eles registraram a presença de dinoflagelados que estavam tanto na água quanto no plástico, no norte do Mediterrâneo (França e Itália). Incluía os gêneros *Prorocentrum*, *Karenia*, *Polykrikos*, *Dinophysis*, *Alexandrium*, *Amphidoma*, *Heterocapsa*, *Karlodinium* e *Margalefidinium*. Alguns outros táxons de dinoflagelados potencialmente tóxicos foram registrados apenas nos plásticos, incluindo *Amphidinium* spp. - possivelmente *A. massartii* (100% identificado), *A. carterae* (99.5%), *A. klebsii* (99.5%), e *Amphidinium* sp. (97.4–100%); *Gonyaulax spinifera* (99.7%); *Azadinium* spp. - possivelmente *Azadinium poporum* (99%) e *Azadinium caudatum* (96%); e *Ostreopsis* sp.

Os estudos sobre os efeitos toxicológicos associados à ingestão de plásticos contendo microalgas tóxicas por organismos marinhos são limitados (GALL e THOMPSON, 2015). Os detritos plásticos são potenciais vetores para a transferência de toxinas algais nas redes alimentares. Investigar quais são os efeitos potenciais do biofilme de microalgas tóxicas na ingestão de plásticos pela fauna marinha é essencial para formar políticas públicas para preservar a espécie, uma vez que estes microrganismos podem ser tóxicos e causar danos à saúde humana e impactar a fauna.

### 3.2.3 Biofilme de invertebrados

Numerosos estudos demonstraram que os resíduos antropogênicos são um substrato adequado para a colonização e crescimento de vários organismos marinhos, como briozoários, poliquetas, cracas e hidrozoários (THIEL e GUTOW, 2005; THIEL e HAYE, 2006; DA GAMA et al., 2008; ZETTLER et al., 2013; FAZEY e RYAN, 2016). Devido a sua capacidade de crescer em todas as categorias de substratos antropogênicos, os briozoários são os colonizadores incrustantes mais abundantes em lixo marinho (STEVENS et al., 1996; FARRAPEIRA 2011; GOLDSTEIN et al., 2014).

Hidrozoários e briozoários são comumente encontrados vivendo em detritos marinhos, que podem ser transportados por longas distâncias por meio dos oceanos pela ação das correntes e do vento (ALIANI e MOLCARD, 2003). As larvas de briozoários *Bugula flabellata* e *Bugula neritina* optaram ativamente por se estabelecer em plásticos em vez de substratos de madeira ou concreto (PINOCHET et al., 2020).

Na Itália, em um estudo desenvolvido por Mancini et al. (2021), um total de 656 itens de lixo marinho foram analisados. A fauna associada consistia em 1536 organismos bentônicos pertencentes a 62 espécies. Em termos de abundância de espécies, Bryozoa foi o táxon dominante, seguido por Polychaeta, Bivalvia, Ascidiacea e Anthozoa. Seis espécies exóticas foram encontradas nesses substratos

antropogênicos e, entre elas, foram registradas duas espécies de briozoários até então não declaradas em águas italianas, o Electridae *Conopeum reticulum* (Linnaeus, 1767) e o Alcyonidiidae *Alcyonidium gelatinosum*.

### 3.3 Diversidade no biofilme

Reisser et al. (2014) analisaram fragmentos plásticos flutuantes ao redor da Austrália e encontraram maior diversidade de diatomáceas (14 gêneros), seguidas por cocolitoforídeos (7), somente um dinoflagelado: *Ceratium* cf. *macroceros*, briozoários, cracas (*Lepas* spp.), um isópode (*Asellota*), um verme marinho, ovos de insetos marinhos (*Halobates* sp.), bem como células supostamente identificadas como bactérias, cianobactérias e fungos.

Zettler et al. (2013) coletaram detritos marinhos de plástico em vários locais no Atlântico Norte, que foram analisados com microscopia eletrônica de varredura e sequenciamento de última geração para caracterizar as comunidades microbianas aderidas. Diatomáceas, cianobactérias e algas verdes foram relatadas como micro-organismos pioneiros que colonizam detritos plásticos marinhos. Foi relatado uma comunidade microbiana diversa de heterótrofos, autótrofos, predadores e simbiontes, a qual foi denominada de “Plastisfério”. A lista taxonômica com as espécies encontradas é enorme.

Oberbeckmann et al. (2014) analisaram amostras de plástico (PET) coletadas no Mar do Norte e realizaram experimentos de incubação com água natural, reportando a presença (por sequenciamento genético) da diatomácea *Asterionella*, as cianobactérias, *Stanieria* e *Pseudomorphium*, além das macroalgas pardas *Saccharina* e *Fucus*.

Um estudo no norte da Europa demonstrou que a composição e abundância das comunidades de diatomáceas colonizando diferentes tipos de substratos plásticos varia ao longo do tempo. Diferentes espécies de microrganismos podem apresentar preferências distintas ao se agregar a superfícies plásticas (OBERBECKMANN et al., 2014). Fatores como cor, textura, orientação e as comunidades microbianas iniciais podem impactar significativamente o desenvolvimento a curto prazo das comunidades incrustantes (BERS & WAHL, 2004; HOIPKEMEIER-WILSON et al., 2004). O tipo de polímero tem pouca influência na comunidade microbiana colonizada em MPs (ZHANG et al., 2021). No entanto, em macroplásticos, a comunidade colonizadora mostra ter preferências no momento de se fixar ao polímero, por exemplo *O. cf. ovata* aderiu mais abundantemente a materiais plásticos mais flexíveis (sacolas plásticas) (TIBIRIÇÁ et al., 2019). Devido à seletividade e à disponibilidade de lixos plásticos, muitos animais marinhos têm se alimentam por alguns tipos de plásticos por se assemelharem ao seu alimento natural. Investigar a preferência dos micro-organismos ao colonizar detritos plásticos e a seletividade que alguns organismos marinhos exercem é essencial para entendermos se existem alguns tipos de plásticos que são extremamente atrativos para algumas dessas espécies.

Um estudo revelou que placas plásticas (acrílico) pintadas em coloração preta foram colonizadas por maiores densidades de organismos bênticos, incluindo micro-

e macroalgas, do que aquelas pintadas em branco, sobretudo em curto e médio prazo (até 30 dias). As razões para a colonização preferencial podem envolver a fototaxia negativa das fases larvais no momento do assentamento, além de diferenças na temperatura e absorção/reflexão de radiação solar nos diferentes substratos (DOBRETSOV et al., 2013). Entretanto, em outro estudo, não foi observado um efeito da cor do plástico sobre o estabelecimento dos invertebrados (HODSON et al., 2000). Desta forma, a questão da colonização dos substratos de cores variadas deve ser levada em consideração e melhor investigada em estudos futuros.

#### 4. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A dissertação está dividida em dois capítulos no formato de artigos científicos. O capítulo 1, intitulada “colonização de microalgas marinhas tóxicas e não-tóxicas sobre diferentes tipos de plásticos: uma abordagem experimental”, que é focado no experimento de exposição de diferentes tipos de plásticos em água do mar contendo microalgas produtoras de toxinas diarreicas, o dinoflagelado *Prorocentrum lima*, e diatomáceas bênticas não tóxicas. Buscou-se avaliar o potencial competitivo de colonização das microalgas tóxicas sobre os detritos macroscópicos de plásticos compostos de diferentes polímeros, que serviriam, desta forma, como vetores para a transferência de toxinas algais nas redes alimentares marinhas. Planeja-se submeter este artigo para publicação na revista Harmful Algae (Qualis A1 na área de Biodiversidade da CAPES), reconhecida por sua contribuição para a compreensão e mitigação dos efeitos prejudiciais dessas algas em ambientes aquáticos. A revista é fonte importante de pesquisa para cientistas, acadêmicos e profissionais que trabalham com algas nocivas, bem como para aqueles que buscam entender os impactos desses micro-organismos sobre a saúde pública, pesca, aquicultura e para a vida marinha em geral.

O capítulo 2, intitulado “Interações entre poluição plástica, microalgas e suas toxinas: estressores para juvenis de tartarugas-verde (*Chelonia mydas*)?”, versa sobre a ingestão de microalgas potencialmente tóxicas e de resíduos macroscópicos de plásticos por tartarugas-verde. O estudo investigou as possíveis associações entre o acúmulo de toxinas algais e a presença de microalgas tóxicas e plásticos nos conteúdos alimentares ingeridos por juvenis de tartarugas-verde, avaliando os potenciais efeitos negativos interativos para a sua saúde. Pretende-se submeter este artigo à Marine Pollution Bulletin, reconhecida por seu compromisso em divulgar pesquisas, estudos de caso e revisões que contribuem para a compreensão dos impactos da poluição marinha e para o desenvolvimento de estratégias de mitigação e políticas de gestão ambiental. Ela é uma importante fonte de informação para cientistas, ambientalistas, legisladores e profissionais que trabalham na área da conservação marinha e na proteção dos ecossistemas aquáticos.

A dissertação é concluída com uma seção de Considerações Finais, que inclui uma síntese dos principais resultados dos dois artigos científicos, além de conexões entre ambos que permitem estabelecer conclusões mais amplas e fazer recomendações para estudos futuros. São destacados os principais “insights” obtidos a partir da pesquisa e suas implicações na área de estudo, onde são discutidas suas contribuições, limitações e possíveis direções futuras de estudo.

## 5. CAPÍTULOS DA DISSERTAÇÃO

### 5.1. CAPÍTULO 1

#### COLONIZAÇÃO DE MICROALGAS MARINHAS TÓXICAS E NÃO-TÓXICAS SOBRE DIFERENTES TIPOS DE PLÁSTICOS: UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL

#### RESUMO

A formação de biofilmes microbianos em materiais plásticos no ambiente marinho é um fator que envolve a colonização inicial por bactérias, seguida pelo crescimento de microalgas e invertebrados. Essa colonização pode ser influenciada por vários fatores, incluindo a composição química do plástico, a produtividade da água circundante e as relações de competição e predação entre as espécies. Este estudo avalia a formação de biofilmes de microalgas, especificamente o dinoflagelado toxigênico *Prorocentrum lima* e diatomáceas bentônicas não-tóxicas, em diferentes tipos de plásticos ao longo de sete dias, sob condições controladas em laboratório. Fragmentos de plástico compostos por diferentes polímeros (polipropileno - PP, poliestireno de alta densidade - PEAD, poliestireno de baixa densidade - PEBD, e polipropileno biorientado - BOPP) foram submersos em um sistema de tanques contendo água do mar filtrada, células de *P. lima* e diatomáceas. Durante a exposição, a abundância de ambas as espécies sobre os plásticos foi periodicamente mensurada por meio de contagem em microscópio óptico. Os biofilmes de algas se desenvolveram rapidamente, sendo perceptíveis após apenas 24 horas e aumentando gradativamente em densidade celular até o fim do experimento. Ambas as espécies foram capazes de colonizar todos os tipos de plásticos, no entanto, as abundâncias foram ligeiramente maiores nos fragmentos de PEAD e PP. Embora as diatomáceas sejam tradicionalmente consideradas colonizadoras dominantes, o dinoflagelado tóxico *P. lima* predominou durante todo o experimento, alcançando abundâncias aproximadamente dez vezes maiores ao longo do período. Este estudo contribui para uma melhor compreensão acerca da dinâmica de formação de biofilmes microbianos sobre plásticos marinhos, fornecendo informações valiosas sobre como diferentes tipos de plásticos podem se tornar substratos favoráveis para microalgas produtoras de toxinas. Quando densamente colonizados por microalgas contendo compostos tóxicos, como esperado em situações de Florações de Algas Nocivas, os resíduos plásticos podem representar um risco adicional para a vida marinha. A compreensão sobre tal interação e o potencial multiestressor dos plásticos é essencial para mitigar os impactos da poluição plástica nos ecossistemas marinhos.

**Palavras-chaves:** Biofilme microbiano; Lixo plástico; Dinoflagelados nocivos; Substratos artificiais; Microalgas bêmicas; Toxinas diarreicas.

## ABSTRACT

The formation of microbial biofilms on plastic materials in the marine environment is a phenomenon that involves initial colonization by bacteria, followed by the growth of microalgae and invertebrates. Such colonization can be influenced by several factors, including the chemical composition of the plastic, the productivity of the surrounding water, and competition and predation relationships between species. This study evaluates microalgae biofilm formation, specifically the toxigenic dinoflagellate *Prorocentrum lima* and non-toxic benthic diatoms, on different types of plastics over seven days under controlled laboratory conditions. Plastic fragments composed of different polymers (polypropylene- PP, high-density polystyrene- HDPE, low-density polystyrene- LDPE, bioriented polypropylene- BOPP) were submerged in a system of tanks containing filtered seawater and *P. lima* and diatoms in suspension. For seven days, the abundance of both species was periodically measured on the plastics by counting under an optical microscope. The algal biofilms developed quickly, being noticeable after just 24 hours and gradually increasing in cellular density over the seven days of exposure of the plastics to the microalgae suspension. Both species were able to colonize all types of plastic; however, abundances were slightly higher in HDPE and PP fragments. Although diatoms are traditionally considered dominant colonizers, the toxic dinoflagellate *P. lima* predominated throughout the experiment, reaching abundances approximately ten times higher throughout the period. This study contributes to a deeper understanding of the dynamics of microbial biofilm formation on marine plastics, providing valuable information on how different types of plastics can become favorable substrates for toxin-producing microalgae. When densely colonized by microalgae containing toxic compounds, as expected in Harmful Algal Bloom situations, plastic waste can pose an additional risk to marine life. Understanding this interaction and the multi-stressor potential of plastics is essential to mitigate the impacts of plastic pollution on marine ecosystems.

**Keywords:** Microbial biofilm; Plastic waste; Harmful dinoflagellates; Artificial substrates; Benthic microalgae; Diarrhetic toxins.

### 5.1.1. INTRODUÇÃO

Itens de plástico, que variam de <5 mm (microplásticos; MPs) a vários centímetros (macroplásticos) de tamanho, são persistentes nos oceanos, e têm um tempo de degradação estimado em >400 anos (WARD et al., 2020). Estes materiais sofrem uma série de transformações que levam a uma redução gradativa em seu tamanho, além de mudanças em suas propriedades físico-químicas (LIU et al., 2020; SUN et al., 2020). Devido à grande persistência dos plásticos e às grandes quantidades de lixo nos oceanos do mundo, sua dispersão no ambiente marinho facilita potencialmente a propagação de espécies invasoras (KIESSLING et al., 2015).

Os resíduos plásticos encontrados no oceano possuem composição química diversas, sendo principalmente compostos de polipropileno (PP), polietilenos de alta densidade (PEAD), polietileno de baixa densidade (PEBD), policloreto de vinilo (PVC) e poli tereftalato de etileno (PET) (BHASKAR et al., 2004). A permanência de detritos plásticos por um longo período no ambiente marinho estimula a formação do biofilme bacteriano, que conduz à sucessão de outros micro e macro organismos sobre sua superfície (REISSER et al., 2014), envolvendo a colonização por bactérias seguida pelo crescimento de microalgas e invertebrados (ANDRADY, 2011). Sabe-se que as camadas microbianas – biofilmes – estimulam a ligação de algas e invertebrados a esses plásticos no meio marinho (ZARDUS et al., 2008). A formação do biofilme sobre materiais plásticos aparenta ser temporal e espacialmente variável, relacionada principalmente a mudanças na temperatura e na produtividade da água do mar circundante (nutrientes), além da natureza química do polímero (ARTHAM et al., 2009; OBERBECKMANN et al., 2014; EICH et al., 2015; ZHANG et al., 2021).

Ao longo do tempo de submersão, as comunidades aderidas ao plástico marinho alteram sua composição, tanto em escala de dias quanto de meses e estações do ano (CHEN et al., 2019; DOBRETSOV et al., 2013). Não há evidências de que alguma dessas espécies degrade os polímeros, mas a formação de biofilme leva a uma diminuição significativa na hidrofobicidade e na flutuabilidade do plástico (LOBELLE et al., 2011, CHEN et al., 2019). Desta forma, os organismos podem proteger o plástico da radiação ultravioleta e fotocatalise, diretamente, ou por meio de flutuabilidade reduzida, aumentando a longevidade destes resíduos no ambiente marinho (ANDRADY, 2011; CARSON et al., 2013). O transporte de organismos associados aos plásticos gera grande preocupação, uma vez que esses itens podem percorrer longas distâncias carregando comunidades que contêm espécies com potencial de atuarem como invasoras ou vetores de doenças e/ou de compostos tóxicos (VIRSEK et al., 2017; LEITE et al., 2022).

Dentre microalgas dominantes que colonizam detritos plásticos, algumas espécies potencialmente tóxicas podem alcançar abundâncias relativamente elevadas (CASABIANCA et al. 2019; TIBIRIÇÁ et al. 2019). Desta forma, os plásticos flutuantes no meio marinho podem ser potenciais vetores de espécies de microalgas produtoras de compostos neurotóxicos, podendo atuar como fontes adicionais destas substâncias na cadeia trófica, inclusive no ambiente pelágico (CASABIANCA et al., 2019; LEITE et al., 2022; KIESSLING et al., 2015).

Espécies de microalgas bênticas, que vivem em associação a substratos rígidos, são especialmente preocupantes. Observações microscópicas de detritos plásticos recolhidos na costa catalã do Mar Mediterrâneo, por exemplo, identificaram a ocorrência de comunidades diversificadas e complexas de diatomáceas bentônicas e pequenos flagelados (<20 µm), sendo que alguns fragmentos plásticos estavam fortemente colonizados por dinoflagelados com potencial neurotóxico, como *Ostreopsis* sp. e *Coolia* sp. (MASÓ et al., 2003). Atualmente, entre 35% e 45% das águas costeiras estão sob risco moderado de colonização plástica por dinoflagelados bênticos toxigênicos, especialmente em regiões subtropicais e temperadas, para onde a dispersão de microalgas bênticas tóxicas pode ser particularmente facilitada pelos resíduos flutuantes de plásticos (LEITE et al., 2022).

Além de neurotoxinas, as toxinas diarreicas ácido ocadaico (OA) e dinofisistoxinas (DTXs), produzidas por espécies bênticas do dinoflagelado *Prorocentrum* e planctônicas de *Dinophysis*, também podem ser encontradas sobre detritos plásticos (MASÓ et al., 2016; LARSSON et al., 2018), representando assim fontes adicionais de ficotoxinas para organismos marinhos. Em conjunto com os plásticos, microorganismos contendo compostos tóxicos podem ser, desta forma, acidentalmente ingeridos e agravar potencialmente os efeitos deletérios destes poluentes à saúde animal.

Neste contexto, considerando a grande quantidade de resíduos plásticos nos oceanos e a colonização destes por microalgas, torna-se de grande relevância o conhecimento sobre a capacidade de diferentes tipos de plásticos abrigarem microalgas toxigênicas e o seu possível papel como vetor de toxinas para espécies marinhas. Sendo assim, a presente investigação irá avaliar o potencial de detritos macroscópicos de plásticos em servirem como substrato, buscando determinar a capacidade de colonização, competição e sucessão pela microalga tóxica *P. lima* e diatomáceas bentônicas em diferentes tipos de plásticos.

## 5.1.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1.2.1. Desenho experimental

No Laboratório de Microalgas (LaMic) do Centro de Estudos do Mar - UFPR, fragmentos de plástico de polímeros selecionados foram confeccionados a partir de itens plásticos, incluindo: (i) bandejas comuns de plástico rígido (compostas de PP), (ii) sacolas plásticas de compras (PEAD) e (iii) embalagem transparente de alimento de 350 µm de espessura (PEBD), com área superficial total de 72 cm<sup>2</sup>, somando-se ambos os lados, além de (iv) embalagens de picolé (BOPP), com área superficial total de 50 cm<sup>2</sup>, somando-se ambos os lados. Todos os fragmentos experimentais foram manufacturados a partir de embalagens novas (plástico virgem).

Dados abióticos foram monitorados, sendo a temperatura do laboratório com termômetro digital, a temperatura da água nos tanques com termômetro de mercúrio, a salinidade com um salinômetro manual (refratômetro) e o Ph da água com um Phmetro. Em cada tanque foram adicionadas células de *Prorocentrum lima* e de

diatomáceas penadas bênticas não identificadas (Figura 2), até se atingir uma densidade de 70 células de *P. lima* e 80 células de diatomáceas por mililitro.

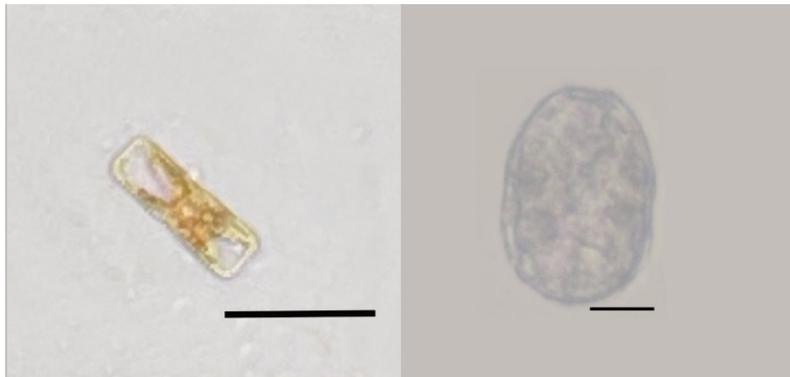


Figura 2 - Células da diatomácea bêntica não tóxica *Psamodycton panduriforme* (à esquerda) e do dinoflagelado toxigênico *Prorocentrum lima* (à direita). Escalas: 100  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

Para compensar as perdas por sedimentação e pela própria formação de biofilme ao longo do tempo, mais células foram acrescentadas periodicamente a partir de suspensões compostas por diluições dos cultivos algais em água do mar filtrada, dispostas em cones *Imhoff* de 1 L com aeração, usando bombas peristálticas (Figura 3). As bombas eram acionadas por 5 minutos a cada 3 horas, a um fluxo de 6,25 mL  $\text{min}^{-1}$ , buscando-se manter a densidade celular aproximadamente constante dentro dos aquários. Em cada aquário, foram montados cinco *longlines* horizontais metálicos (arame de aço inoxidável de 6 mm de diâmetro), os quais sustentavam individualmente um fragmento de cada tipo de plástico ( $n = 4$ ), suspensos a 12 cm do fundo e dispostos em ordem aleatória. Cada aquário constituía uma réplica experimental ( $n = 4$ ), e um quinto aquário, que não continha os fragmentos plásticos, foi usado como controle para medir a taxa de sedimentação de células. Depois de 1, 2, 3, 4 e 7 dias de imersão, os itens plásticos foram coletados para se analisar a formação de biofilme ao longo do tempo, removendo-se um *longline* de cada aquário por tempo amostral. No total, 80 amostras foram obtidas (4 tipos de polímero  $\times$  5 tempos amostrais  $\times$  4 réplicas).

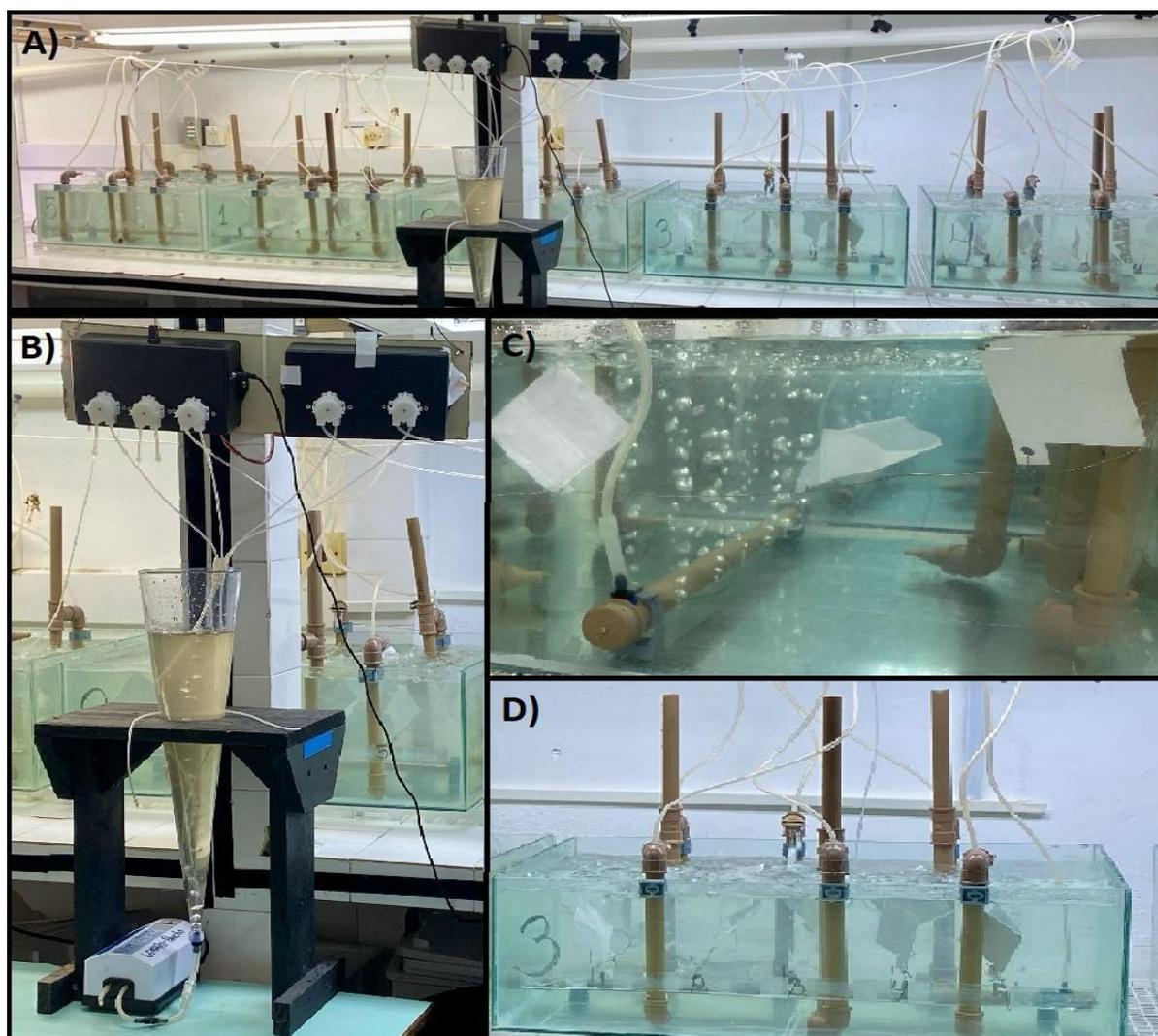


Figura 3 - A) Sistema composto de cinco aquários de 50 L com bombas *air-lift* e aeradores, conectados por meio de mangueiras e bombas peristálticas a um cone *Imhoff* de 1L contendo os cultivos de microalgas que eram acrescentadas periodicamente; B) Detalhe do cone *Imhoff* com aeração na parte inferior e as bombas peristálticas na parte superior; C) Barra aeradora posicionada junto ao fundo, no centro do aquário (lado esquerdo da imagem), *longlines* suspendendo os fragmentos de diferentes polímeros plásticos, e sistema de bombas *airlift* (à direita); D) Detalhe do sistema de bombas *air-lift* (tubos verticais) para circulação da água dentro de um dos aquários experimentais.

### 5.1.2.2. **Processamento e análise das amostras**

Seguindo a ordem previamente sorteada, cada plástico foi coletado lentamente em seu respectivo tempo de imersão, para tentar desprender o mínimo possível de células do biofilme durante a amostragem. Após a coleta, os plásticos rígidos e os plásticos flexíveis foram colocados em potes de boca larga com capacidade para 500 mL e de 250 mL, respectivamente. Foram adicionados aproximadamente 100 mL de água do mar filtrada em cada, agitando-se manualmente por 3 minutos para desprender as células de microalgas. O conteúdo recuperado foi preservado com solução de Lugol em uma concentração de 1% do volume total da amostra e armazenado em frascos de vidro âmbar para posterior quantificação das células de ambas as espécies de microalgas. A contagem foi feita sob microscópio óptico invertido Axio Zeiss, com ampliação de 200x, fração microscópica do microfítoplâncton ( $>20 \mu\text{m}$ ), usando uma

câmara de Sedgewick-Rafter, e a densidade celular na solução (células mL<sup>-1</sup>) foi finalmente calculada e extrapolada para a superfície plástica (células cm<sup>-2</sup>).

Após o desprendimento das células, os fragmentos plásticos foram retornados aos potes, onde foi adicionada água do mar filtrada com solução de formaldeído a 4%, e mantidos sem agitação adicional. Posteriormente, foram preparadas lâminas com sub-amostras (3 cm<sup>2</sup>) dos plásticos, que foram observadas em microscópio para se certificar de que não restavam células aderidas. Caso restassem, as células eram contadas, a densidade celular era calculada (em células cm<sup>-2</sup>) e somada ao valor obtido na amostra contendo as células desprendidas.

### 5.1.2.3. Análise estatística

A abundância das microalgas componentes do biofilme no plástico foi calculada em células por centímetro quadrado (células cm<sup>-2</sup>), com base na fórmula:

$$\left(\frac{\text{células}}{\text{cm}^2}\right) = \left(\frac{\text{células}}{\mu\text{L}}\right) * \left(\frac{1000\mu\text{L}}{1\text{ mL}}\right) * \left(\frac{\text{Vol. Total da amostra (mL)}}{\text{Área total da amostra (cm}^2\text{)}}\right) * \left(\frac{\text{Vol. Sedimentado (mL)} - \text{Vol. Sobrenadante descartado (mL)}}{\text{Vol. Total sedimentado (mL)}}\right)$$

A resposta da abundância das microalgas a diferentes substratos e períodos de amostragem foi avaliada usando modelos lineares generalizados (GLM) com a escolha do modelo baseado no Critério de Informação de Akaike corrigido (AICc). A correlação de Pearson foi utilizada para avaliar a relação entre as espécies de microalgas utilizadas no experimento. Dado que as abundâncias das espécies de microalgas eram variáveis discretas e apresentavam superdispersão, o modelo de Binomial Negativo foi selecionado como o melhor ajuste. Além disso, após a seleção dos modelos, conduzimos testes de Tukey (Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts) para buscar as diferenças entre os grupos de plástico em relação à colonização das microalgas. Valores de  $p < 0,05$  foram adotados como o critério para significância estatística. Todas as análises estatísticas e as representações gráficas dos resultados foram feitas no ambiente estatístico R (R Development Core Team, 2023).

### 5.1.3. RESULTADOS

As densidades celulares de *P. lima* e das diatomáceas se mantiveram aproximadamente constantes na coluna d'água ao longo dos sete dias de experimento ( $p = 0,2$ ) e foram similares entre os diferentes aquários ( $p = 0,4$ ). Apesar de *P. lima* ter alcançado valores ligeiramente mais altos do que as diatomáceas nesses aquários, as diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p = 0,3$ ). Ao longo dos dias, conforme ocorria a colonização nos plásticos, as abundâncias celulares nos aquários oscilaram, começando o primeiro dia com uma média de  $\pm 20$  células/mL de *P. lima* e  $\pm 50$  células/mL de diatomáceas, terminando o sexto dia com  $\pm 28$  células/mL e  $\pm 10$  células/mL, respectivamente (Gráfico 1). A temperatura média da água durante o experimento foi de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , a salinidade  $\pm 31$ , e o pH  $\pm 8,0$ .

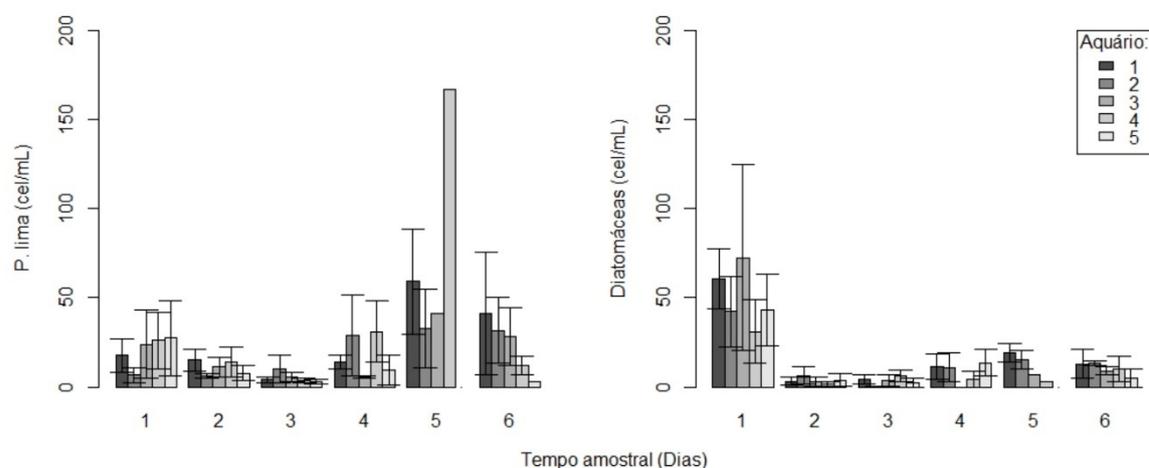


Gráfico 1 - Abundância (células mL<sup>-1</sup>; média ± desvio padrão) de *Prorocentrum lima* (painel esquerdo) e diatomáceas (painel direito) na coluna d'água em diferentes aquários ao longo do tempo do experimento.

A colonização sobre os diferentes tipos de fragmentos plásticos aumentou gradativamente ao longo do tempo. A formação do biofilme de algas já foi visualmente perceptível a partir de 24 horas de exposição. A coloração do plástico foi sendo alterada de forma gradativa conforme as células se acumularam em sua superfície durante o processo de colonização (Figura 4).



Figura 4 - Fotomontagem evidenciando a formação crescente de biofilme nos plásticos de diferentes polímeros (PEBD, BOPP, PP e PEAD) que ficaram submersos durante o experimento por 1, 2, 3, 4 e 7 dias, da esquerda para a direita.

As abundâncias celulares de ambas as espécies de microalgas utilizadas neste experimento sobre as superfícies plásticas foram correlacionadas entre si (Correlação de Pearson  $R^2 = 0,85$ ;  $p = 2 \times 10^{-16}$ ), aumentando de forma exponencial ao longo do tempo (Gráfico 2). Notavelmente, *P. lima* atingiu densidades celulares cerca de dez vezes maiores do que as diatomáceas sobre os diferentes tipos de plástico, com abundâncias máximas de 2.322 células  $\text{cm}^{-2}$  (média  $\pm$  DP:  $452 \pm 575$ ), e 278 células  $\text{cm}^{-2}$  ( $58 \pm 71$ ), respectivamente. A quantidade de células de ambas as espécies variou sobre os diferentes tipos de plástico, sendo a diferença estatisticamente significativa para *P. lima* ( $P = 0,04$ ), mas apenas marginalmente significativa para as diatomáceas ( $p = 0,06$ ). As densidades celulares das duas microalgas foram ligeiramente maiores nos fragmentos de PEAD e PP (Gráfico 2), conforme detalhado mais adiante.

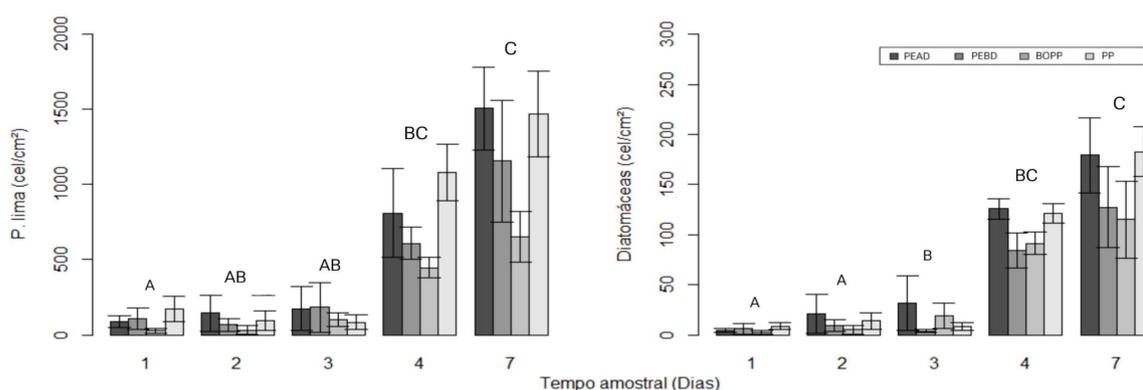


Gráfico 2 - Abundância (células cm<sup>-2</sup>) de *Prorocentrum lima* (painel esquerdo) e diatomáceas (painel direito) sobre diferentes fragmentos plásticos – PEAD (polietileno de alta densidade), PEBD (polietileno de baixa densidade), BOPP (polipropileno biorientado) e PP (polipropileno) – ao longo do tempo de exposição em sistema experimental. Letras maiúsculas diferentes acima das barras indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos de exposição.

A colonização ao longo dos dias de experimento variou significativamente para ambas as espécies. Para *P. lima*, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dias 1 e 4 ( $p = 0,029$ ) 7 e 3 ( $p = 0,022$ ), 7 e 2 ( $p = 0,009$ ), e entre os dias 1 e 7 ( $p < 0,001$ ). Para as diatomáceas, houve diferenças estatisticamente significativas entre os dias 1 e 4 ( $p < 0,001$ ), 1 e 7 ( $p < 0,001$ ), 2 e 7 ( $p = 0,003$ ), 4 e 2 ( $p = 0,037$ ), 3 e 1 ( $p = 0,022$ ), e 7 e 3 ( $p = 0,028$ ). Não foram encontradas variações significativas entre as demais comparações pareadas entre tempos amostrais.

O biofilme microalgal sobre os fragmentos de BOPP (embalagem de picolé) não era perceptível a olho nu nos primeiros três dias de experimento, tornando-se visível após o quarto dia, e assumindo aparência semelhante aos demais no sétimo dia (Figura 4). De fato, as células de ambas as espécies tiveram uma colonização mais lenta no início da exposição, especialmente sobre este tipo de polímero. Somente a partir do quarto dia, a densidade celular de *P. lima* aumentou mais rapidamente, de  $99 \pm 92$  (média  $\pm$  DP) células cm<sup>-2</sup> no terceiro dia para  $447 \pm 132$  células cm<sup>-2</sup> no quarto dia, e para  $651 \pm 334$  células cm<sup>-2</sup> no sétimo dia de experimento. As diatomáceas iniciaram o primeiro dia com  $2 \pm 4$  células cm<sup>-2</sup>, e terminaram o sétimo dia com  $115 \pm 76$  células cm<sup>-2</sup> neste tipo de plástico (Gráfico 2). Os plásticos rígidos (PP) tiveram uma colonização semelhante ao fragmento de BOPP, com baixo assentamento nos primeiros três dias, quando as abundâncias médias foram no primeiro dia de  $8 \pm 6$  células cm<sup>-2</sup> para as diatomáceas e  $173 \pm 167$  células cm<sup>-2</sup> para *P. lima*, atingindo valores bastante elevados a partir do quarto dia até alcançar  $182 \pm 49$  células cm<sup>-2</sup> para diatomáceas e  $1.470 \pm 569$  para *P. lima* no sétimo dia (Gráfico 2). Ao comparar o plástico BOPP com o PP, que foi o que alcançou a maior abundância média de ambas as microalgas, as diferenças encontradas não foram estatisticamente significativas ( $p = 0,08$ ).

Os fragmentos de PEAD (sacolas plásticas) foram os que resultaram no maior valor de abundância média de *P. lima* durante todo o experimento, atingindo  $1.506 \pm 511$  células cm<sup>-2</sup> após 7 dias de exposição. A abundância de diatomáceas também aumentou ao longo do tempo, atingindo  $179 \pm 84$  células cm<sup>-2</sup> neste tipo de plástico. Nos fragmentos de plástico PEBD (embalagens transparentes), as diatomáceas

iniciaram a colonização com  $6 \pm 10$  células  $\text{cm}^{-2}$  no primeiro dia, diminuindo para apenas  $4 \pm 2$  células  $\text{cm}^{-2}$  no terceiro dia, até atingir  $127 \pm 69$  células  $\text{cm}^{-2}$  após 7 dias de imersão. A abundância do dinoflagelado *P. lima* também variou ao longo do tempo, oscilando entre  $107 \pm 144$  células  $\text{cm}^{-2}$  no primeiro dia até atingir sua média máxima de  $1156 \pm 699$  células  $\text{cm}^{-2}$  no sétimo dia (Gráfico 2).

#### 5.1.4. DISCUSSÃO

Um biofilme microbiano se desenvolve assim que o plástico entra em contato com o meio marinho, a partir da colonização inicial por bactérias seguida pelo crescimento de microalgas e invertebrados (ANDRADY, 2011; EICH et al., 2015). Assume-se que os microrganismos que se aderem aos fragmentos plásticos criam condições favoráveis para o assentamento de outras espécies, aumentando assim a biomassa e diversidade desse biofilme. No entanto, a formação de biofilme sobre materiais plásticos mostra ser temporalmente e espacialmente variável, influenciado pela produtividade da água ao redor e pelas características químicas do polímero (ARTHAM et al., 2009; OBERBECKMANN et al., 2014; EICH et al., 2015, DOBRETSOV et al., 2013, PATIL et al., 2005). Também foi demonstrado que os biofilmes nos plásticos marinhos flutuantes abrigam diferentes assembleias de microalgas, as quais são compostas principalmente por diatomáceas, cianobactérias e coccolitoforídeos (BRIAND et al., 2012; OBERBECKMANN et al., 2014; REISSER et al., 2014).

No presente estudo, a formação de biofilme pelo dinoflagelado toxigênico *P. lima* e por diatomáceas não-tóxicas foi constatada após 24 horas de submersão dos diferentes tipos de materiais plásticos em um sistema contendo estas células em suspensão na água do mar, num ambiente laboratorial controlado. À medida que o experimento avançou, a quantidade de microalgas no biofilme aumentou exponencialmente, apresentando um aumento significativo ao longo dos sete dias de submersão, atingindo os maiores valores de abundância no sétimo dia. Esse aumento reflete uma maior disponibilidade de ficotoxinas nesse substrato.

As abundâncias celulares, tanto de diatomáceas como de *P. lima*, foram superiores nos fragmentos de PEAD e PP em relação àqueles constituídos de PEBD e BOPP, apesar das diferenças terem sido apenas marginalmente significativas nas análises estatísticas. Em um experimento realizado *in situ* no Arquipélago de Currais, Paraná, Brasil, materiais como tela de microfibras de vidro, sacolas plásticas (PEAD) e sacos de alimento transparentes (PEBD) revelaram uma abundância significativamente superior do dinoflagelado tóxico *Ostreopsis cf. ovata* em comparação aos plásticos rígidos (PP) expostos por 24 horas (TIBIRIÇÁ et al., 2019). Entretanto, quando o experimento *in situ* foi conduzido por um período mais longo (cerca de um mês) em um ambiente próximo, a Ilha da Galheta (Paraná, Brasil), itens plásticos de composições distintas (PEAD, PP e BOPP) resultaram em abundâncias celulares comparáveis de microalgas (BATISTA et al., 2019). Em conjunto com o presente estudo, isso sugere que o tipo de polímero é importante somente nos estágios iniciais da colonização microalgal. Com o passar do tempo, as características

físico-químicas das superfícies dos diferentes plásticos vão se tornando mais homogêneas pela presença do biofilme microbiano, e os diferentes materiais provavelmente representem áreas igualmente colonizáveis pelas microalgas.

A película de polipropileno biorientada (BOPP) é um tipo de filme plástico amplamente empregado no ramo alimentício, sendo usado em produtos como rótulos de bebidas, embalagens de salgadinhos e de picolé, entre outras aplicações (ECYCLE, 2023). Embora, à primeira vista, o processo de formação do biofilme não tenha sido perceptível neste material, a contagem de células mostrou que elas estavam presentes. O biofilme estava se formando em partes que continham fissuras, saliências ou qualquer tipo de feição que favorecesse a adesão das células a este polímero, que se destaca por sua superfície lisa e brilhante. Destaca-se que os plásticos utilizados no presente estudo, para fins de padronização e comparação, eram virgens, ou seja, sem nenhum contato com o ambiente aquático prévio ao experimento. Após a entrada dos polímeros no ambiente marinho, entretanto, os plásticos sofrem um processo irreversível de envelhecimento. Como consequência, em MPs, a biomassa microbiana do biofilme aumenta em plásticos envelhecidos, em relação aos virgens (SHAN et al., 2022). Isso sugere que, no meio natural, a formação de biofilme deva ser intensificada em itens plásticos que já sofreram algum processo de desgaste/envelhecimento.

Ao longo do tempo, as variedades de microrganismos que colonizam a superfície dos plásticos vão mudando em função de mudanças físico-químicas e biológicas, tanto na água quanto no substrato (PATIL et al., 2005). O assentamento gradativo dos micro-organismos aumenta a força de adesão sobre os plásticos, tornando-os bons substratos para outros indivíduos se estabelecerem, incluindo macroalgas e macroinvertebrados em estágios mais avançados de colonização/bioincrustação (ZARDUS et al., 2008; BATISTA et al., 2019). Neste momento, processos de competição e herbivoria passam a ser importantes no controle da abundância, diversidade e dominância dos organismos vivendo sobre estes substratos, incluindo microalgas. Durante florações de microalgas nocivas, as densidades celulares sobre os substratos artificiais são proporcionais à abundância destas no ambiente (TESTER et al., 2014). Dinoflagelados podem colonizar substratos artificiais dentro de um período de 24 a 48 horas (TESTER et al., 2014; TIBIRIÇÁ et al., 2019; presente estudo). A partir daí, estudos *in situ* indicam que as diatomáceas passam a ser dominantes (TESTER et al., 2014), o que não foi observado em laboratório com as duas espécies testadas no presente estudo, sob condições ambientais controladas e ausência de herbivoria.

No presente estudo, células do dinoflagelado *P. lima* foram invariavelmente mais abundantes (densidades celulares ~10× superiores) do que as diatomáceas bênticas co-ocorrentes em todos os tipos de plásticos avaliados, ao longo dos sete dias de exposição. Os fatores envolvidos nas relações de competição entre as espécies por substratos artificiais ainda precisam ser melhor compreendidos, mas provavelmente envolvem um conjunto de particularidades físicas e químicas da superfície do plástico, como sua textura, porosidade e/ou a liberação de compostos, que afetam a adesão e

o desenvolvimento de micro-organismos específicos. Outros fatores determinantes incluem a densidade de células no ambiente, as condições de correntes e turbulência, e outros fatores ambientais que promovem ou inibam o contato e a adesão das células ao plástico. Caso essa dominância de *P. lima* sobre as diatomáceas também ocorra no ambiente marinho, pode haver um impacto significativo nas dinâmicas ecológicas locais. Assim, é crucial que os processos de sucessão e competição pela colonização de substratos plásticos sejam melhor investigados no ambiente natural, como uma ferramenta para mitigar os potenciais impactos desses estressores múltiplos para a vida marinha e a saúde humana.

### 5.1.5. CONCLUSÃO

Neste estudo, observou-se que, após somente 24 horas em contato com a suspensão contendo células de microalgas em água do mar, o biofilme se desenvolveu no plástico de forma visível a olho nu. Embora a diatomácea seja dita de maior poder de colonização, a microalga tóxica *P. lima* foi predominante ao longo dos sete dias de experimento. Isso demonstrou que o plástico pode ser mais prejudicial à saúde dos animais marinhos quando estiver densamente colonizado por microalgas produtoras de toxinas, como em situações de floração.

A colonização das microalgas em diferentes tipos de plásticos mostrou ser um processo complexo, que depende do tipo do polímero, do tempo de exposição, da espécie de microalga em questão e da densidade de células no ambiente. A formação de biofilme parece ser parcialmente influenciada pelo tipo de polímero que compõe o material plástico, embora à medida em que o biofilme atinge estágios mais avançados de formação, a superfície plástica vai sendo modificada e outros fatores biofísicoquímicos devem assumir maior influência sobre a abundância e a composição das microalgas formadoras do biofilme. No presente experimento de curta duração (7 dias), dinoflagelados se mostraram colonizadores mais eficientes de diferentes itens plásticos, incluindo bandejas rígidas comuns (polipropileno, PP), sacolas plásticas de compras (polietileno de alta densidade, PEAD), embalagem/*pack* de bebidas transparente (polietileno de baixa densidade, PEBD) e até mesmo de um polímero muito usado como embalagens e rótulos na indústria alimentícia (polipropileno biorientado, BOPP).

Este estudo contribui significativamente para a compreensão da dinâmica de formação de biofilmes microbianos sobre plásticos marinhos, fornecendo *insights* valiosos sobre como diferentes tipos de plásticos podem se tornar substratos favoráveis para microalgas produtoras de toxinas. Quando densamente colonizados por microalgas contendo compostos tóxicos, como em situações de florações de Algas Nocivas, os resíduos plásticos podem representar um risco adicional para a vida marinha. Embora as diatomáceas sejam tradicionalmente consideradas colonizadoras dominantes, o dinoflagelado tóxico *P. lima* predominou durante todo o experimento. Portanto, os processos de sucessão e competição pela colonização de substratos plásticos devem ser investigados no ambiente natural, pois esse conhecimento é fundamental para mitigar os riscos relacionados à formação de biofilmes de

microalgas tóxicas sobre esses materiais e, assim, proteger tanto os ecossistemas marinhos quanto a saúde humana.

## 5.2. CAPÍTULO 2

### INTERAÇÕES ENTRE POLUIÇÃO PLÁSTICA, MICROALGAS E SUAS TOXINAS: POTENCIAIS ESTRESSORES PARA TARTARUGAS-VERDE JUVENIS (*Chelonia mydas*)?

#### RESUMO

As tartarugas marinhas são classificadas globalmente como espécies ameaçadas de extinção. Interações com lixo plástico têm sido registradas em todas as sete espécies que ocorrem no mundo, sendo a tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) a que apresenta ocorrências mais frequentes. Comumente, as tartarugas ingerem itens plásticos das mais variadas formas e tamanhos, e a cobertura por biofilmes microbianos contribui para tornar estes detritos mais semelhantes aos alimentos naturais. Para agravar a situação, algumas microalgas que colonizam os plásticos produzem potentes toxinas, de modo que os plásticos flutuantes podem se transformar em vetores alternativos de compostos tóxicos para estes animais. Neste estudo foram analisadas amostras de conteúdo do trato gastrointestinal de indivíduos juvenis de tartarugas-verde (n = 46) encalhados mortos no litoral do Paraná ao longo de quatro meses em 2022. As amostras foram submetidas a análises microscópicas para identificar e quantificar a presença de microalgas tóxicas e não-tóxicas no trato de tartarugas que continham ou não plásticos em seu interior. As tartarugas-verde analisadas possuíam uma grande diversidade de microalgas em seus sistemas digestivos, sobretudo de espécies típicas de ambientes estuarinos e costeiros. Por outro lado, a presença de microalgas oceânicas sugere que algumas tartarugas podem utilizar áreas de alimentação mais afastadas da costa. A abundância total de microalgas foi maior nos indivíduos que não apresentavam detritos plásticos macroscópicos no trato. Quatro táxons potencialmente tóxicos de dinoflagelados foram encontrados nas amostras, incluindo táxons produtores de toxinas diarreicas, como *Dinophysis acuminata* (densidade máxima: 21 células g<sup>-1</sup>), *Dinophysis tripos* (1 célula g<sup>-1</sup>) e *Prorocentrum lima* (até 89 células g<sup>-1</sup>); e *Ostreopsis* cf. *ovata* (até 39 células g<sup>-1</sup>), que produz neurotoxinas análogas à palitoxina. Todos os táxons toxigênicos ocorreram em maior frequência e abundância no intestino em relação ao estômago e esôfago, tanto nas tartarugas que continham plásticos em abundância como naquelas em que os resíduos eram imperceptíveis. Amostras de tecidos de estômagos, intestinos e fígados foram coletadas e as concentrações de ficotoxinas lipofílicas foram determinadas por HPLC-MS/MS. O ácido ocadaico (OA), uma toxina diarreica, foi detectado em diferentes amostras de tecidos de quase metade (21/46) das tartarugas-verde amostradas durante o estudo. Sua presença foi mais frequente nos tecidos intestinais (máximo: 13 ng g<sup>-1</sup>; n=13) e em animais que tinham registro de interação com resíduos sólidos antrópicos (n=11). O OA foi detectado também no estômago (máximo: 30 ng g<sup>-1</sup>; n=2) e no fígado (10 ng g<sup>-1</sup>; n=1) das tartarugas. Assim como a ingestão de resíduos plásticos, a frequente presença de níveis baixos a moderados de OA em tartarugas-verde nesta região pode representar uma ameaça adicional à saúde destes animais. Compreender a interação entre microalgas tóxicas

e plásticos no ambiente e na dieta das tartarugas é fundamental para a conservação dessa espécie ameaçada.

**Palavras-chave:** Lixo plástico; Dinoflagelados tóxicos; Tartaruga marinha; Ingestão de plástico; Toxinas diarreicas; Saúde única.

## ABSTRACT

Sea turtles are globally classified as endangered species. Interactions with plastic waste have been documented in all seven species worldwide, with the green turtle (*Chelonia mydas*) displaying the highest prevalence. Turtles frequently ingest plastic items of various shapes and sizes, and the presence of microbial biofilms on these plastics enhances them to resemble natural food even more. To exacerbate the situation, some microalgae that colonize plastics produce potent toxins, turning floating plastics into alternative vectors for toxic compounds in the marine food chain. In this study, we examined samples of gastrointestinal tract (GIT) contents from juvenile green turtle individuals (n=46) dead-stranded on the coast of Paraná. The samples underwent microscopic analysis to identify and quantify the presence of toxic and non-toxic microalgae in the turtles' GITs, distinguishing between turtles with and without plastic debris inside. The analyzed green turtles contained a wide variety of microalgae in their digestive systems, particularly species that are representative of estuarine and coastal environments. Conversely, the presence of typically oceanic microalgae suggests that some turtles may utilize feeding areas farther off the coast. Total microalgal abundance was higher in individuals lacking macroscopic plastic debris in their GITs. Four potentially toxic dinoflagellate taxa were identified in the samples, including those producing diarrhetic shellfish toxins such as *Dinophysis acuminata* (maximum density: 21 células g<sup>-1</sup>), *Dinophysis tripos* (1 cell g<sup>-1</sup>), and *Prorocentrum lima* (up to 89 células g<sup>-1</sup>), as well as *Ostreopsis cf. ovata* (39 células g<sup>-1</sup>), which produces neurotoxins similar to palytoxin. All toxigenic taxa occurred more frequently and abundantly in the intestines compared to the stomach, regardless of the presence of plastic waste. Tissue samples from stomachs, intestines, and livers were collected, and concentrations of lipophilic phycotoxins were determined using HPLC-MS/MS. Okadaic acid (OA), a diarrhetic toxin, was detected in various tissue samples from nearly half (21/46) of the sampled green turtles during the study. Its presence was more common in intestinal tissues (maximum: 13 ng g<sup>-1</sup>; n=13) and in animals with a history of interaction with anthropogenic solid waste. OA was also found in the stomach (max: 30 ng g<sup>-1</sup>; n=2) and liver (10 ng g<sup>-1</sup>; n=1) of turtles. In addition to the ingestion of plastic waste, the frequent presence of low to moderate levels of OA in green turtles may pose an additional threat to the health of these animals in this region. Understanding the interaction between toxic microalgae and plastics in the environment and in the turtles' diet is crucial for the conservation of this endangered species.

**Keywords:** Plastic waste; Toxic dinoflagellates; Sea turtles; Plastic ingestion; Diarrhetic shellfish toxins; One health.

### 5.2.1. INTRODUÇÃO

As tartarugas marinhas são classificadas globalmente como espécies ameaçadas de extinção (IUCN, 2023). As principais causas de impactos às suas populações são a interação com atividades pesqueiras e a degradação de seus habitats, seja pela ocupação da orla, alterações de ambientes costeiros, poluição ou inserção de patógenos no ecossistema marinho (FLINT, 2013). Há registros de interação com plásticos para todas as sete espécies que ocorrem no mundo, sendo a tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) a que apresenta as maiores frequências de ocorrência (GALL e THOMPSON, 2015; LYNCH, 2018). A interação com resíduos plásticos, sobretudo a ingestão ou enroscamento, destaca-se como uma das principais ameaças a esta espécie, tanto nas avaliações globais (WILDERMANN et al., 2018) quanto no Plano de Ação Nacional para a conservação das tartarugas marinhas no Brasil (ICMBIO/MMA, 2017).

A ingestão de plásticos causa sérios danos ao trato digestório, incluindo lesões, obstrução e uma falsa sensação de saciedade com consequente desnutrição (GUEBERT-BARTHOLO et al., 2011). A ingestão acidental pode provocar impactos diretos e indiretos, que vão desde alterações na flutuabilidade, formação de fecalomas nos intestinos, até a morte por inanição em casos mais graves (BUTTERWORTH et al., 2012). Os plásticos podem, ainda, representar fontes de compostos tóxicos aos organismos que os ingerem/incorporam, pois, parte de seus constituintes age como desreguladores endócrinos (EDCs), tais como o bisfenol-A e os ftalatos. Adicionalmente, os plásticos podem servir como fontes de poluentes orgânicos persistentes (POPs), os quais se adsorvem à sua superfície no ambiente aquático. Ao serem ingeridos, os POPs adsorvidos aos plásticos podem se tornar biodisponíveis para os organismos (ENDO et al., 2005; TEUTEN et al., 2009; GALLO et al., 2018).

A ingestão de detritos marinhos por tartarugas marinhas vem sendo documentada no litoral do Paraná desde 2003. Nesta região, foi observada a ingestão de plásticos por mais de 70% dos indivíduos juvenis de tartarugas-verde (GUEBERT-BARTHOLO et al., 2011; VÉLEZ-RUBIO et al., 2015; GAMA et al., 2016; SANTOS et al., 2016; NUNES et al., 2019). Tartarugas-verde juvenis entre ~25 a 60 cm de comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) são as mais vulneráveis à ingestão de detritos marinhos devido ao seu habitat alimentar costeiro (NELMS et al., 2015; ANDRADE et al., 2016; GAMA et al., 2016; LYNCH, 2018). Os plásticos ingeridos por estes animais são principalmente constituídos de polímeros flutuantes de baixa densidade, sendo majoritariamente compostos de polietileno de baixa densidade (PEBD; 51%), polipropileno (PP; 26%), polietileno (PE) de composição desconhecida (10%); e PE de alta densidade (5%) (JUNG et al., 2018).

Em animais que possuem uma seletividade alimentar sensorial, seja visual e/ou química, a ingestão acidental de resíduos plásticos tende a ser agravada pela agregação de fauna e flora sobre a sua superfície, uma vez que conferem ao plástico odor, cor e paladar semelhantes aos de seus alimentos naturais (GREGORY, 2009; SCHUYLER et al., 2014; NELMS et al., 2015; PFALLER et al., 2023). Dentre as principais microalgas que colonizam os detritos plásticos, algumas espécies

potencialmente tóxicas, principalmente as de hábito bêntico, podem alcançar abundâncias relativamente elevadas em ocasiões excepcionais (CASABIANCA et al., 2019; TIBIRIÇÁ et al., 2019). Desta forma, os plásticos flutuantes no meio marinho são capazes de carregar espécies de microalgas produtoras de compostos neurotóxicos, podendo atuar como vetores adicionais destas substâncias na cadeia trófica, inclusive no ambiente pelágico, onde as toxinas de microalgas bênticas não estariam usualmente disponíveis para todos os níveis tróficos (CASABIANCA et al., 2019; LEITE et al., 2022).

Observações microscópicas de detritos plásticos recolhidos na costa catalã do Mar Mediterrâneo, por exemplo, identificaram a ocorrência de comunidades diversificadas e complexas de diatomáceas bênticas e de pequenos flagelados (<20 µm). Alguns fragmentos plásticos estavam densamente colonizados por dinoflagelados potencialmente produtores de compostos neurotóxicos, como *Ostreopsis* sp. e *Coolia* sp. (MASÓ et al., 2003). Entre 35% e 45% das águas costeiras do mundo estão atualmente sob risco moderado de colonização plástica por dinoflagelados bênticos toxigênicos, especialmente em regiões subtropicais e temperadas, para onde a dispersão de microalgas bênticas tóxicas pode ser particularmente facilitada pelos resíduos flutuantes de plásticos (LEITE et al., 2022).

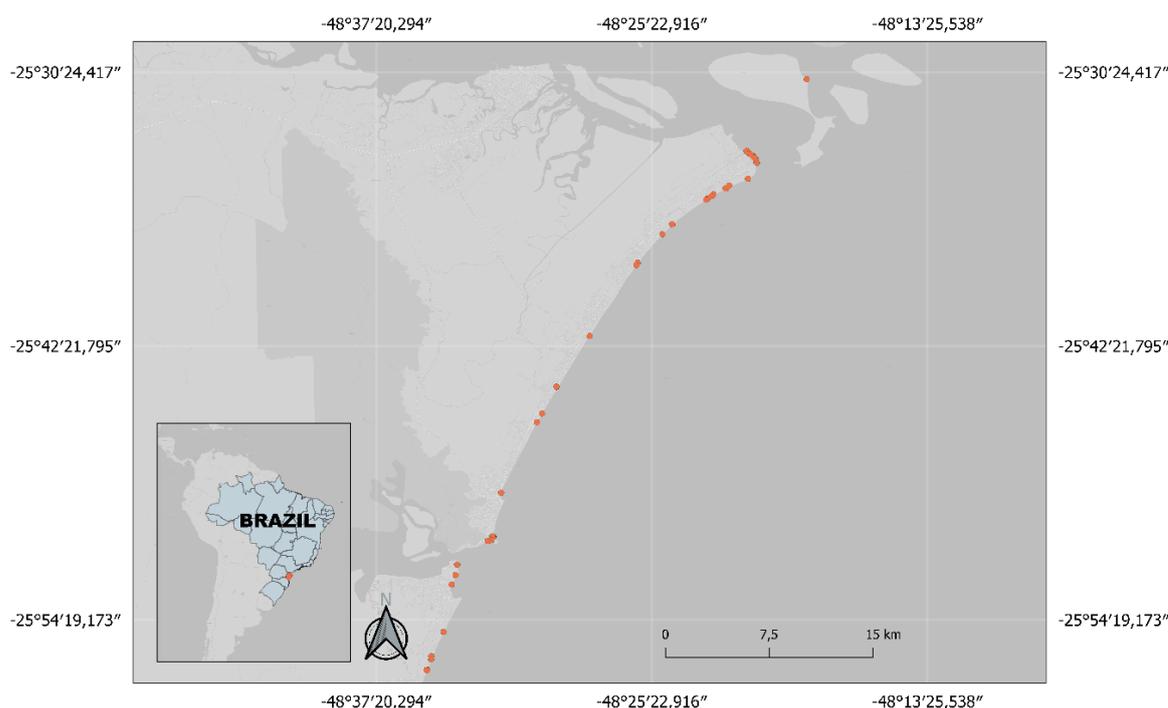
Além de neurotoxinas, as toxinas diarreicas ácido ocadaico (OA) e dinofisistoxinas (DTXs), produzidas por espécies bênticas de *Prorocentrum* e planctônicas de *Dinophysis*, também podem ser encontradas sobre detritos plásticos (MASÓ et al., 2016; LARSSON et al., 2018). Tais rejeitos representariam assim fontes adicionais de ficotoxinas para organismos marinhos como as tartarugas-verde. Em conjunto com os plásticos, micro-organismos contendo compostos tóxicos podem ser, desta forma, acidentalmente ingeridos e agravar potencialmente os efeitos deletérios destes poluentes à saúde animal. O OA, por exemplo, tem sido apontado como um cofator ambiental da doença viral fibropapilomatose em tartarugas-verde (LANDSBERG et al., 1999; ARTHUR et al., 2008). Tanto o OA como as células dos dinoflagelados que o produzem já foram encontrados no trato gastrointestinal (TGI) de indivíduos desta espécie no litoral do Paraná (MOREIRA-GONZÁLEZ et al., 2023). Entretanto, o papel dos detritos plásticos como potenciais vetores de toxinas para a fauna marinha ainda precisam ser elucidado com mais clareza.

Considerando-se a grande quantidade de resíduos plásticos já presentes no oceano, a pronta colonização destes resíduos por microalgas potencialmente tóxicas (ver capítulo anterior), a elevada frequência de ingestão de plásticos pela tartaruga-verde, e a escassez de estudos que envolvam esses fatores em conjunto, torna-se de grande relevância o conhecimento sobre o potencial dos plásticos servirem como vetores de biotoxinas para esta espécie ameaçada de extinção. Sendo assim, a presente investigação examinará as possíveis associações entre a presença de detritos plásticos, microalgas marinhas e/ou de biotoxinas nos conteúdos alimentares e tecidos digestivos de indivíduos juvenis de tartarugas-verde, a fim de avaliar os potenciais efeitos aditivos negativos para a sua saúde.

## 5.2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.2.1. *Coleta e processamento das amostras*

Juvenis de tartarugas-verde encontrados encalhados mortos nas praias do litoral do Estado do Paraná, foram coletados pela equipe do Laboratório de Ecologia e Conservação (LEC/UFPR), como parte do Projeto de Monitoramento de Praia da Bacia de Santos (PMP-BS)<sup>1</sup> (Mapa 1). Os dados biológicos de cada indivíduo necropsiado foram obtidos a partir da plataforma de dados públicos denominado “Sistema de Informação de Monitoramento da Biota Aquática” (SIMBA-Petrobras). Os animais frescos ou em estado inicial de decomposição são recolhidos e conduzidos para a necropsia, na qual o TGI dos animais é retirado para análise. O presente estudo consistiu na obtenção e análise de amostras das frações microscópicas do conteúdo dos TGIs de tartarugas-verde contendo quantidades contrastantes – i.e., quantidades abundantes ou imperceptíveis – de detritos plásticos macroscópicos em sua composição. Os TGIs com aparente ausência de plásticos eram dominados por macroalgas e gramíneas marinhas, itens alimentares comuns na dieta destas tartarugas.



Mapa 1 - Mapa da área de amostragem de indivíduos de tartarugas-verde juvenis encalhadas mortas ao longo do litoral do Estado do Paraná, sul do Brasil, onde o Laboratório de Ecologia e Conservação (LEC/UFPR) realiza, por meio do PMP-BS<sup>1</sup> o monitoramento regular diário e a coleta de espécimes.

<sup>1</sup> PMP-BS é uma condicionante ambiental do IBAMA à Petrobras vinculada à exploração de óleo na Bacia de Santos, no âmbito do Pré-sal. No Paraná é executada pela UFPR por meio de convênio tripartite entre UFPR, UNIVALI e FUNPAR.

Entre abril e agosto de 2022, 46 animais encalhados continham conteúdo estomacal e intestinal passível de amostragem. Amostras do conteúdo intestinal puderam ser obtidas a partir de 40 indivíduos distintos, sendo que 20 continham quantidades abundantes de plásticos e, nos outros 20, o conteúdo era composto por itens alimentares orgânicos, com ausência ou quantidades muito limitadas de detritos plásticos macroscópicos (Figura 5). As amostras de conteúdo estomacal também foram obtidas, mas neste caso a partir de 32 indivíduos, sendo que sete deles continham resíduos plásticos em abundância e 25 não continham quantidades perceptíveis de detritos plásticos macroscópicos.



Figura 5 - Procedimento de obtenção de amostras do trato gastrointestinal (TGI) de tartarugas-verde na área de necropsias do LEC (Laboratório de Ecologia e Conservação): A,B) Abertura das seções do trato para retirada de seu conteúdo; C) Macroalgas pertencentes à Divisão Rhodophyta e gênero *Ulva*, presentes no estômago de um indivíduo. D) Resíduos antrópicos coletados no conteúdo intestinal de outro indivíduo; e E) Conteúdo líquido retirado para contagem das células de microalgas na fração microscópica de uma seção do TGI.

Adicionalmente, amostras de ~1,5 g de tecidos do estômago, intestino e fígado foram retiradas durante a necropsia a partir de 32, 40 e 46 indivíduos distintos, respectivamente. Os tecidos do estômago e intestino foram exaustivamente lavados com água do mar filtrada em filtro 0,22  $\mu\text{m}$ , para remoção de eventuais células de microalgas produtoras de toxinas que estivessem aderidas às membranas. Todas as

frações de tecidos foram acondicionadas em microtubos de centrífuga (Eppendorf) e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior determinação da presença de biotoxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do termo em inglês *High-Performance Liquid Chromatography*).

#### **5.2.2.2. Contagem microscópica das células de microalgas**

Os detritos plásticos contidos em cada parte do TGI (Figura 5) foram cuidadosamente separados, pesados em balança semi-analítica com precisão de  $1 \times 10^{-3}$  g, e colocados em potes de 500 mL, contendo 200 mL de água do mar filtrada ( $0,22 \mu\text{m}$ ). Os potes foram agitados vigorosamente por 3 min para destacar as microalgas dos materiais plásticos. O conteúdo foi peneirado através de duas peneiras posicionadas sucessivamente, a primeira com uma malha de  $200 \mu\text{m}$ , para eliminar partículas maiores e a seguinte com malha de  $20 \mu\text{m}$  para reter as microalgas de interesse. O resíduo contido na peneira de  $20 \mu\text{m}$  foi recuperado e o volume do conteúdo ( $50\text{-}200$  mL) foi mensurado em uma proveta (Nalgon). O líquido filtrado foi preservado com solução de Lugol a 1% para identificação microscópica e enumeração das células de microalgas. Antes da contagem das células, o excesso de sedimentos mais grosseiros foi removido de todas as amostras, usando o método descrito em Brustolin et al. (2016). Brevemente, as amostras foram homogeneizadas e alíquotas de 70 mL de cada amostra foram dispensadas em um tubo de vidro cilíndrico de  $24 \times 2$  cm (altura  $\times$  diâmetro). Após 3 min para o assentamento das partículas de sedimento maiores, as amostras foram retiradas do tubo com uma pipeta Pasteur a 5 cm de profundidade. A enumeração das células de microalgas foi realizada usando uma câmara de *Sedgewick-Rafter* a partir de uma alíquota sedimentada de 1 mL, e a densidade celular, representando a abundância das microalgas, foi expressa como células  $\text{g}^{-1}$  (peso úmido) de conteúdo digestivo total (itens orgânicos e/ou plásticos).

#### **5.2.2.3. Análise de toxinas**

Para a extração das ficotoxinas lipofílicas, as amostras de tecidos de estômago, intestino, e fígado previamente lavadas foram descongeladas, sendo adicionado um volume de metanol (MeOH) grau HPLC 99,8% em uma proporção de 9:1 (mL:g) para a pesagem dos tecidos. Os tecidos foram rompidos com o auxílio de um microtritador de tecidos (Ultraturrax), a 20.000 rpm durante 3 min. Após este procedimento, a amostra foi centrifugada por 3 min a 2.800 rpm ( $1500 \times g$ ). Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi filtrada em filtro de seringa (PTFE hidrofílico,  $0,22 \mu\text{m}$  porosidade, 13 mm diâmetro) e armazenado em frasco de vidro do tipo "vial" de 2 mL.

As toxinas lipofílicas foram analisadas por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas tipo tandem (LC-MS/MS), usando um sistema de HPLC Agilent 1260 (EUA) acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo 3200AB Q-TRAP (AB Sciex; EUA), seguindo o protocolo da União Europeia (EU-RL-MB 2015). Os compostos foram detectados usando um monitoramento de reação

múltiplo (MRM) com a fonte de íons no modo negativo. As toxinas lipofílicas analisadas incluíram as toxinas diarreicas ácido ocadaico (OA) e dinofisistoxinas (DTXs), além de pectenotoxinas (PTX), azaspirácidos (AZA) e yessotoxinas (YTX). As transições MRM (pares de íons precursores e seus fragmentos característicos) foram selecionadas e monitoradas de acordo com os parâmetros descritos em EU-RL-MB (2015).

As separações cromatográficas foram realizadas a 20 °C, utilizando uma coluna C-18 (50 × 4, 6 mm ID, 1, 8 µm; Phenomenex). As fases móveis foram constituídas por (A) 100% de água e (B) 95% de acetonitrila + 5% de água, ambas contendo formiato de amônio 2 mM e ácido fórmico 50 mM. Um gradiente de eluição (a 0,3 mL min<sup>-1</sup>) foi aplicado da seguinte forma: início em 80:20% (A:B), aumentando gradativamente para 100% de B ao longo de 8 min e mantendo por 3,5 min em 100% de B, antes de retornar à condição inicial até o final da análise (13 min no total). As concentrações de OA nas amostras foram calculadas utilizando o software Analyst<sup>®</sup> a partir de curvas de calibração feitas com diluições seriadas do material de referência certificado (National Research Council, Halifax, Canadá), preparado em metanol nas seguintes concentrações: 3,37; 10,12; 20,25; 40,5; e 81,0 ng mL<sup>-1</sup>. O volume de injeção foi de 20 µL para as amostras e 5 µL para as soluções de calibração. O limite de detecção (LOD; 1,21 ng mL<sup>-1</sup>) e o limite de quantificação (LOQ; 4,04 ng mL<sup>-1</sup>) foram calculados pelas fórmulas: LOD = [(3 × DP)/b]; e LOQ = [(10 × DP)/b], onde “DP” é o desvio padrão da área do pico detectado em análises repetidas da concentração mínima mensurável de OA em uma solução padrão (n = 5) e “b” é a inclinação da regressão linear obtida a partir da curva de calibração. As concentrações calculadas de toxinas foram expressas em ng g<sup>-1</sup> de tecido (peso úmido).

#### 5.2.2.4. Análise estatística

Como a abundância de células de microalgas no TGI das tartarugas-verde não seguiu uma distribuição normal, um teste não paramétrico (Kruskal-Wallis) foi realizado para comparar a abundância de células dos principais grupos de microalgas – ou das espécies potencialmente tóxicas – entre: (i) as frações do trato digestivo (estômago ou intestino), (ii) os grupos que continham, ou não, plásticos em abundância no TGI, e (iii) os meses de amostragem. Mediante a detecção de diferenças significativas entre os grupos, foi aplicado o teste *post-hoc* de Dunn, seguindo o método de Benjamini-Hochberg, para comparações múltiplas. Adicionalmente, foi utilizada a correlação de Pearson para avaliar a relação entre as concentrações de OA nos tecidos e a abundância celular de espécies produtoras de OA no conteúdo digestivo. Valores de P < 0,05 foram utilizados como padrão para significância estatística. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico R Studio (R-4.3.1, 2023).

### 5.2.3. RESULTADOS

#### 5.2.3.1. **Composição e abundância de microalgas no conteúdo do trato digestivo**

Foram analisadas 46 tartarugas, que possuíam comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) entre 28,6 e 66,0 cm (média de 35,1 cm). Tartarugas-verde com valores de CCC menores do que ~45 cm continham itens plásticos com mais frequência do que indivíduos maiores (Gráfico 3), no entanto esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,20$ ). Tumores por infecção viral (fibropapilomatose) foram confirmados em somente um indivíduo, estando ausentes em 27 tartarugas, e a condição não pode ser determinada (ND) em outros 17 indivíduos por estarem em decomposição avançada. Por fim, de acordo com dados do programa SIMBA, 36 das 46 tartarugas-verde (78,3%) continham a presença de algum tipo de resíduo sólido antrópico (RSA) no seus TGIs (Anexo I).

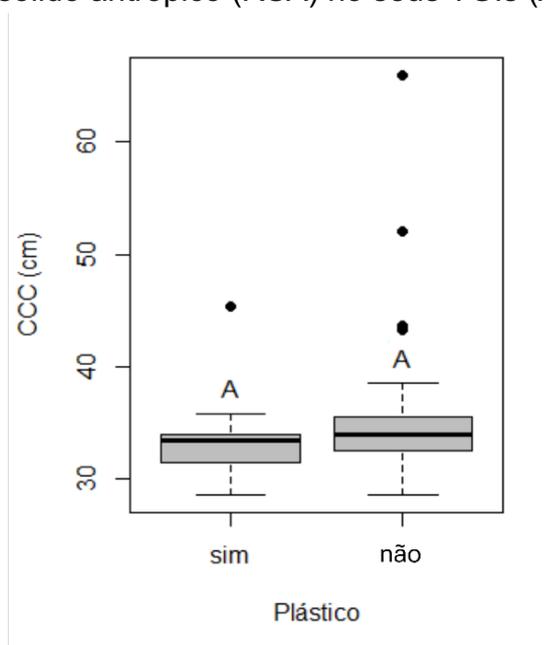


Gráfico 3 - Bloxplot das medidas de comprimento curvilíneo da carapaça (CCC, em cm) dos indivíduos que continham ("sim") ou não continham ("não") macroplásticos em abundância no conteúdo do TGI. Os círculos indicam *outliers*.

Entre as tartarugas-verde avaliadas, foi registrada uma grande riqueza de espécies de microalgas nas amostras da fração microscópica do conteúdo do TGI (Figura 6; Anexo II). As diatomáceas, em conjunto, constituíram o grupo de microalgas mais comum (87% de frequência) e mais abundante ( $P = 0,01$ ) no TGI das tartarugas, atingindo um valor máximo no intestino de 33.297 células  $g^{-1}$ . Os táxons mais frequentes nas amostras incluíram as diatomáceas não-tóxicas *Cylindrotheca* spp., *Navicula* spp., *Amphora* spp., *Diploneis* ssp., *Pleurosigma* spp., *Asterionellopsis* spp., *Coscinodiscus* spp., *Cyclotella* sp., *Licmophora* sp., *Melosira* spp., *Thalassionema* spp. e *Thalassiosira* sp. Além disso, os dinoflagelados não-tóxicos foram um grupo de microalgas relativamente frequente, estando presentes em 64% das amostras e

atingindo uma abundância máxima de 511 células  $g^{-1}$  nos estômagos. As espécies que mais ocorreram nas amostras analisadas foram *Prorocentrum micans*, *Prorocentrum scutellum*, *Phalacroma rotundatum* e *Ornithocercus* spp. O grupo taxonômico dos silicoflagelados também esteve presente em 29% das amostras, atingindo uma abundância máxima de 185 células  $g^{-1}$  nos intestinos.

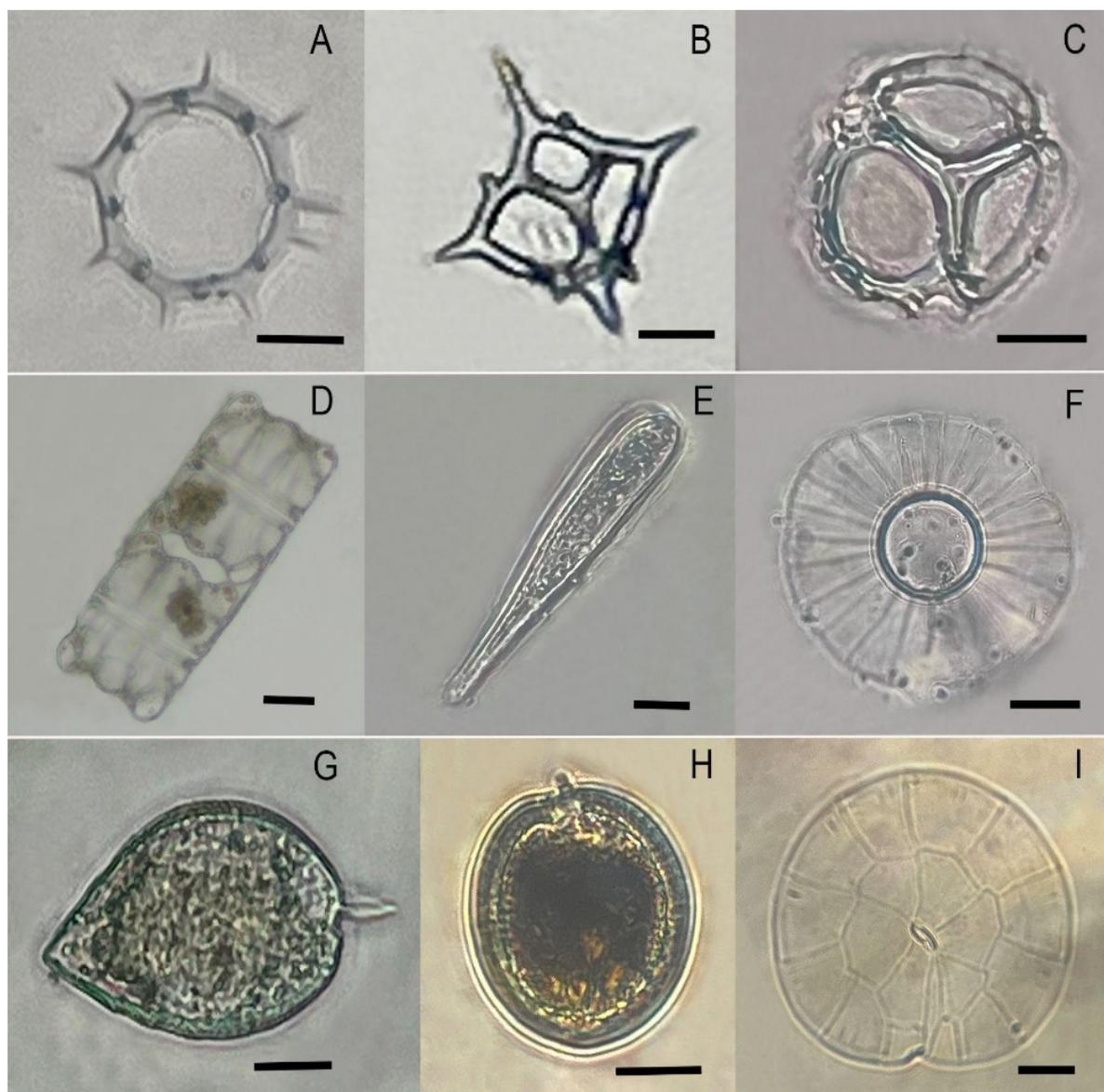


Figura 6 - Microalgas encontradas em amostra de conteúdo estomacal de tartaruga-verde, *Chelonia mydas*. A,B) Silicoflagelados - A) *Dictyocha octonaria*, B) *Dictyocha fibula*.; C) *Ebria tripartita*; D,E,F) Diatomáceas - D) *Biddulphia pulchella*, E) *Climacosphenia moniligera*, F) *Planktoniella sol*; G,H,I) Dinoflagelados - G) *P. micans*, H) *P. scutellum*, I) *Pyrophacus steinii*. Escalas = 10  $\mu m$ ; exceto E) = 20  $\mu m$ .

Quatro táxons potencialmente tóxicos de dinoflagelados foram encontrados no conteúdo do TGI das tartarugas-verde examinadas, incluindo táxons produtores de toxinas diarreicas, como o complexo *Dinophysis acuminata*, que atingiu a abundância máxima no intestino de 21 células  $g^{-1}$  e esteve presente em 2,8% das amostras, o complexo *Prorocentrum lima*, com máximo no intestino de 89 células  $g^{-1}$  e presente em 1,4 % das amostras, e *Dinophysis tripos*, com abundância máxima no intestino de 1 célula  $g^{-1}$  (1,4%). Além destes, o dinoflagelado *Ostreopsis* cf. *ovata*, que produz

neurotoxinas análogas à palitoxina, alcançou a abundância máxima no intestino de 39 células  $g^{-1}$  (2,8%), sendo registrado em duas amostras (Figura 7).

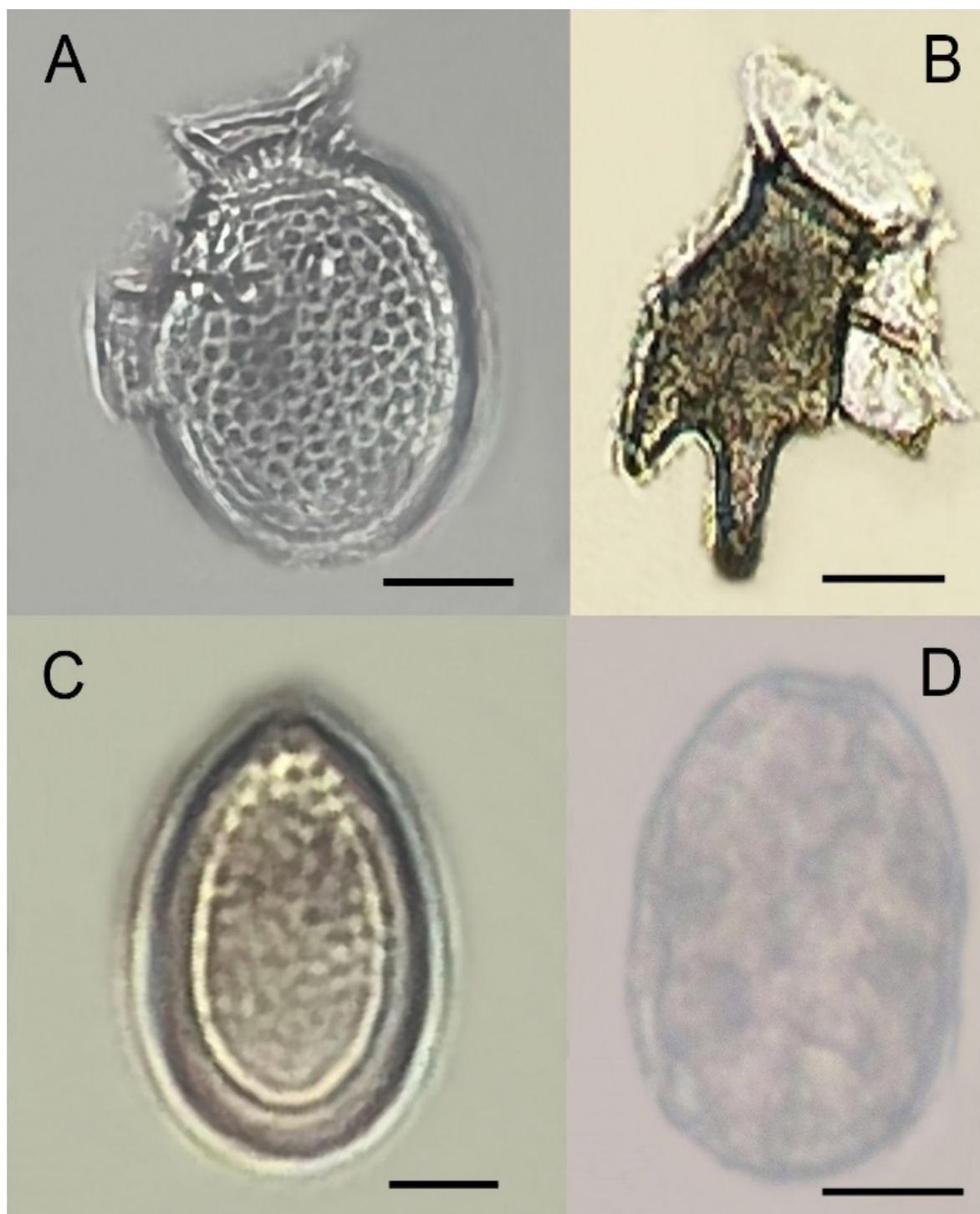


Figura 7 - Dinoflagelados tóxicos encontrada em amostra de conteúdo estomacal de tartaruga-verde. A) *Dinophysis acuminata*; B) *Dinophysis tripos*; C) *Ostreopsis cf. ovata*; D) *Prorocentrum lima*. Escalas = 10  $\mu m$ .

A abundância total de células de microalgas foi maior nos intestinos do que nos estômagos ( $p = 0,002$ ), e nas amostras que não continham plásticos com relação às que continham ( $p = 0,03$ ). Nas amostras virtualmente sem plástico, a densidade total de microalgas atingiu um valor máximo de 33.489 células  $g^{-1}$  (média  $\pm$  DP: 7.586  $\pm$

4.137) no intestino e 20.085 células g<sup>-1</sup> (5.078 ± 2.490) no estômago. Em contraste, nos indivíduos que haviam ingerido grandes quantidades de plástico, a abundância total de microalgas alcançou somente 3138 células g<sup>-1</sup> (453 ± 48) no intestino e 35 células g<sup>-1</sup> (12 ± 8) no estômago (Gráfico 4).

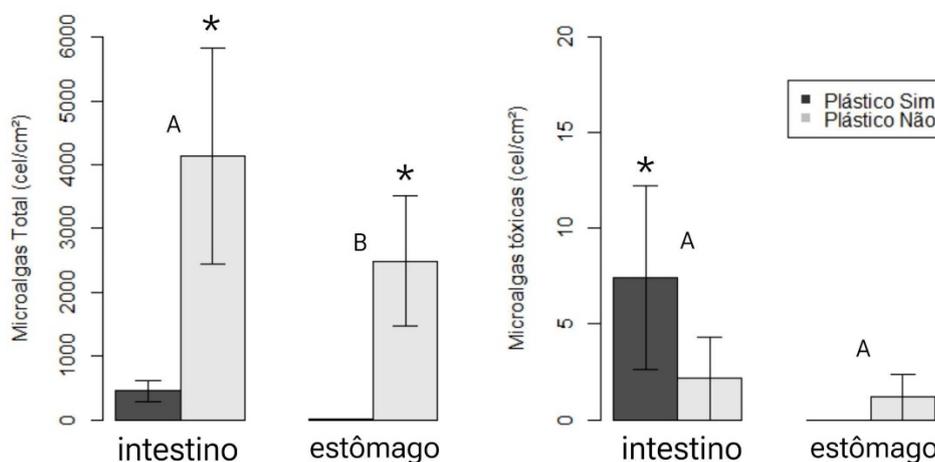


Gráfico 4 - Abundância celular média de microalgas presentes no conteúdo digestivo de tartarugas-verde encontradas encalhadas mortas ao longo da costa paranaense, sul do Brasil, durante os meses de abril até agosto de 2022. A abundância de todas as espécies de microalgas somadas está representada no painel da esquerda, e das espécies produtoras de toxinas na direita. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre as duas frações do trato digestivo (estômago e intestino). Um asterisco acima das barras indica diferenças estatisticamente significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre as frações com plástico (barras em cinza escuro) e sem plástico (cinza claro).

A abundância das células de dinoflagelados tóxicos, em conjunto, foi maior no intestino do que no estômago, entretanto os valores não foram significativamente distintos entre si ( $p = 0,10$ ). Contudo, considerando somente a fração do intestino, os valores foram significativamente maiores ( $p = 0,04$ ) nos indivíduos que continham itens plásticos (máx.: 89 células g<sup>-1</sup>; média ± desvio padrão, DP: 9 ± 2 células g<sup>-1</sup>) do que naqueles aparentemente sem plásticos (máx.: 43 células g<sup>-1</sup>; média ± DP: 21 ± 7 células g<sup>-1</sup>). Em contraste, não foram encontradas microalgas produtoras de toxinas nos estômagos que continham plástico, somente naqueles aparentemente sem plásticos (máx.: 30 células g<sup>-1</sup>, média ± DP: 6 ± 1 células g<sup>-1</sup>) (Gráfico 4).

### 5.2.3.2. **Toxinas em amostras de tecido digestivo**

O ácido ocadaico (OA) foi detectado em diferentes amostras de tecidos de 14 tartarugas-verde encalhadas no litoral do Paraná durante o período investigado. No tecido do estômago, o OA foi quantificável em somente duas tartarugas, das quais uma continha plástico no TGI (5 ng g<sup>-1</sup>; média ± DP: 2 ± 0,7 ng g<sup>-1</sup>) e a com a maior concentração de OA detectada nos tecidos do TGI (30 ng g<sup>-1</sup>; média ± DP: 6 ± 1,2 ng g<sup>-1</sup>) na única tartaruga cujo tecido do fígado continha níveis detectáveis de OA (10 ng g<sup>-1</sup>). Apesar disso, a presença de níveis quantificáveis da toxina foi mais frequente em tecidos intestinais ( $P = 0,009$ ), ocorrendo em 13 indivíduos, sendo que sete continham

resíduos plásticos (máx.: 10 ng g<sup>-1</sup>; média ± DP: 3 ± 2 ng g<sup>-1</sup>) em seus TGIs e seis não (máx.: 13 ng g<sup>-1</sup>; média ± DP: 3 ± 1,8 ng g<sup>-1</sup>) (Tabela 1).

cod. tartaruga (SIMBA)	Ano	Mês	TGI	Plástico	OA ng g <sup>-1</sup>
CEM030434	2022	abril	estomago	não	30
CEM045745	2022	julho	intestino	não	13
CEM029008	2022	julho	intestino	sim	10
CEM054099	2022	julho	intestino	sim	10
CEM030386	2022	agosto	intestino	não	8
CEM037957	2022	maio	intestino	sim	6
CEM038030	2022	julho	intestino	não	6
CEM029008	2022	julho	estomago	sim	5
CEM038085	2022	julho	intestino	sim	5
CEM028477	2022	julho	intestino	não	4
CEM012598	2022	maio	intestino	sim	3
CEM038235	2022	julho	intestino	não	3
CEM052437	2022	junho	intestino	sim	3
CEM052438	2022	junho	intestino	sim	3
CEM053995	2022	julho	intestino	não	2

Tabela 1 – Tabela com o código de identificação da plataforma SIMBA-Petrobras das tartarugas que tiveram níveis de toxinas em seus tratogastrointestinal (TGI).

Os níveis de toxina no intestino (entre os dois grupos com e sem plástico) não foram significativamente distintos ( $p = 0,20$ ). Em oito tartarugas contendo níveis quantificáveis de toxinas, foi notificado algum tipo de patologia. Apenas uma não tinha patologia alguma e em cinco delas não pode ser avaliado devido ao alto nível de decomposição da carcaça. Ademais, de todas as tartarugas analisadas, apenas uma teve presença de fibropapilomatose, mas esta não apresentava um nível detectável de OA nos tecidos analisados.

Além destes 14 indivíduos com níveis de toxina, outras sete tartarugas-verde encalhadas apresentavam níveis-traço de OA, ou seja, concentrações acima do limite de detecção do método analítico (0,61 ng g<sup>-1</sup>), mas não suficientes para uma quantificação confiável (<2,02 ng g<sup>-1</sup>). Todas estas sete amostras com níveis mais baixos de OA eram de tecido intestinal, sendo cinco (71%) de indivíduos com relato de RSA, quatro (57%) com alguma patologia, uma sem patologia e duas em que as patologias não puderam ser avaliadas.

Não houve uma correlação estatística significativa entre o tamanho das tartarugas e as concentrações de OA acumuladas em seus tecidos (correlação de Pearson:  $R^2 = 0,0003$ ;  $p = 0,90$ ). As tartarugas com níveis mensuráveis de OA mediam, em média, cerca de 35 cm de CCC. Oito dessas 14 tartarugas (57%) encalharam no mês de julho de 2022 (Gráfico 5), correspondendo a 42% de todas as tartarugas analisadas ( $n =$

19) naquele mês, que foi o mês com maior número de encalhes de tartarugas-verde na região durante o período investigado (n = 84, entre abril e agosto de 2022).

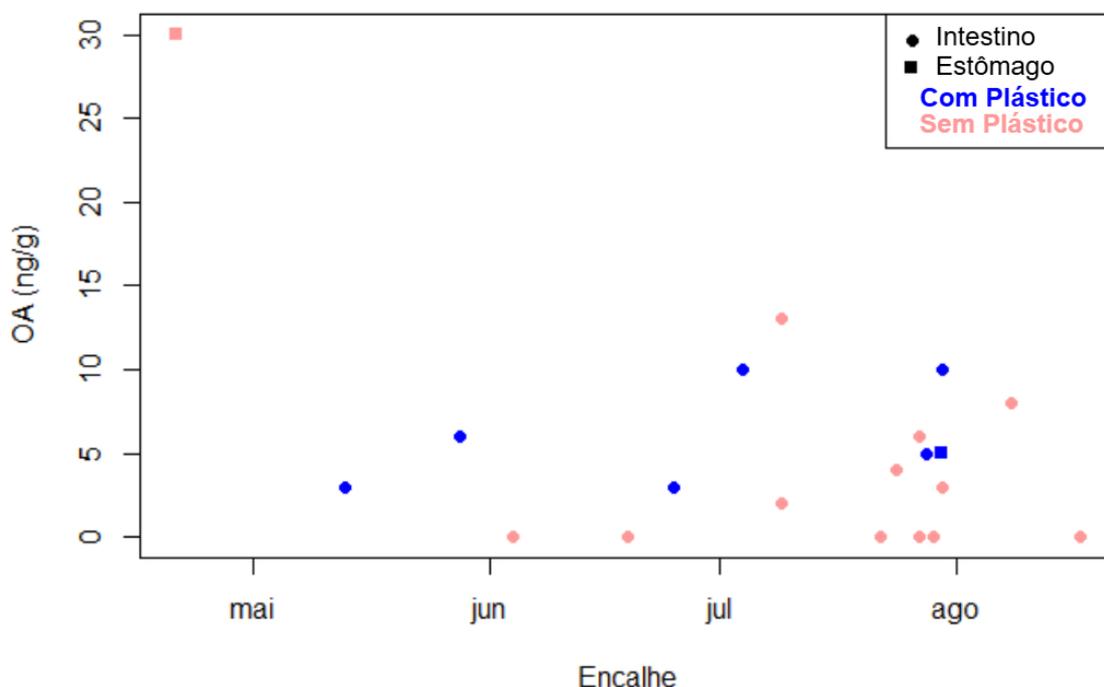


Gráfico 5 - Concentração de ácido ocadaico (OA, em  $\text{ng g}^{-1}$ ) em tecidos de estômago e intestino de diferentes indivíduos de tartarugas-verde (*Chelonia mydas*) com presença e ausência de macroplásticos no trato gastrointestinal. Os indivíduos foram coletados a partir de encalhes no litoral do Paraná, sul do Brasil, ao longo de um período de aproximadamente quatro meses em 2022. Níveis-traço de OA (entre os limites de detecção e quantificação:  $0,6\text{-}2,0 \text{ ng g}^{-1}$ ) foram posicionados na base do eixo Y.

As concentrações de OA acumuladas em tecidos digestivos das tartarugas-verde juvenis não se correlacionaram significativamente com a soma da abundância celular das espécies produtoras de toxinas diarreicas – *D. acuminata* e *Prorocentrum lima* – no conteúdo do trato digestivo (correlação de Pearson:  $R^2 = 0,0009$ ;  $p = 0,80$ ). Das 14 tartarugas contendo níveis quantificáveis da toxina, em apenas uma delas, que acumulou  $13 \text{ ng OA g}^{-1}$  no tecido intestinal, foram detectadas células de microalgas produtoras de OA (21 células de *D. acuminata g}^{-1}*). Essa amostra não continha macroplásticos aparentes nas amostras, e nem tinha sido relacionada a interações com qualquer tipo de RSA no banco de dados do SIMBA. Nenhuma outra toxina lipofílica foi detectada nos tecidos analisados.

## 5.2.4. DISCUSSÃO

### 5.2.4.1. Caracterização geral da comunidade de microalgas no conteúdo digestivo das tartarugas

As microalgas presentes nas amostras de conteúdo do TGI de tartarugas-verde analisadas no presente estudo incluíam as diatomáceas, que foram o grupo de algas mais diversas e abundantes, principalmente no intestino, seguidas pelos

dinoflagelados e silicoflagelados. Os táxons mais abundantes e frequentes são representativos das águas estuarinas e costeiras locais, indicando alimentação ativa desses animais dentro do Complexo Estuarino de Paranaguá (PROCOPIAK et al., 2006; BRUSTOLIN et al., 2014; MOREIRA-GONZÁLEZ et al., 2020; GUEBERT-BARTHOLO et al., 2011; GAMA et al., 2016, 2021). Em contraste, a presença da diatomácea *Planktoniella sol*, que é indicadora de massas d'água mais oceânicas ligadas à circulação da corrente do Brasil (RAO, 1976; HASLE et al., 1997; FALCÃO et al., 2022), bem como a presença de dinoflagelados tóxicos que não são comumente encontrados no interior do estuário, tais como *Ostreopsis* cf. *ovata*, sugerem que alguns indivíduos de tartaruga-verde encalhados ao longo da costa do Paraná podem utilizar áreas de alimentação mais expostas, como ilhas costeiras, ao longo do litoral do Paraná e/ou em estados vizinhos. A costa sul-sudeste do Brasil tem sido identificada como um corredor ecológico importante para a espécie (FUENTES et al., 2020; CANTOR et al., 2020), fornecendo pistas sobre as regiões de alimentação da população. A faixa costeira do Paraná, no sul do Brasil, é, de fato, uma das áreas de alimentação mais importantes para as tartarugas-verde recrutadas no sudoeste do Oceano Atlântico, como indicado por vários estudos (ANDRADE et al., 2016; FUENTES et al., 2020; GAMA et al., 2016; GONZÁLEZ CARMAN et al., 2012). Apesar de sua importância e do reconhecimento global de sua biodiversidade (LANA et al., 2001; UNESCO, 1999), essa região está enfrentando fortes impactos decorrentes da expansão das atividades humanas, tendo sido recentemente identificada por Fuentes et al. (2020) como uma área crítica de ameaças para os juvenis de tartarugas-verde.

#### **5.2.4.2. O lixo plástico marinho e seu papel como possível vetor de microalgas tóxicas para tartarugas**

Indivíduos juvenis de tartarugas-verde (*C. mydas*), com 25 a 60 cm de comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), são os mais vulneráveis à ingestão de resíduos sólidos antrópicos (RSAs) devido ao seu hábitat alimentar costeiro (ANDRADE et al., 2016; LYNCH, 2018; NELMS et al., 2015). De fato, dentre as tartarugas analisadas no presente estudo, as que tinham relato de interação com RSAs (78% do total), mediam entre 28 a 45 cm de CCC. Ademais, *C. mydas* vem mostrando ter uma maior frequência de ingestão e maior variedade de tipos de RSA ingeridos em relação a outras espécies de tartarugas marinhas (RIZZI et al., 2019). Outros estudos têm revelado índices equivalentes ou até superiores de interação com RSAs em tartarugas-verde encalhadas mortas nesta região (GUEBERT-BARTHOLO et al., 2011; GAMA et al., 2016; VÉLEZ-RUBIO et al., 2015; SANTOS et al., 2016; NUNES et al., 2019).

O acúmulo de grandes quantidades de resíduos plásticos macroscópicos no trato digestivo de tartarugas marinhas aumenta a probabilidade de lesões e mortalidade em curto prazo (WILCOX et al., 2018). Embora seja difícil de estabelecer as causas da mortalidade entre as tartarugas-verde amostradas no presente estudo, sabe-se que a ingestão de detritos plásticos causa uma série de impactos negativos à saúde destes animais, incluindo a redução na absorção de nutrientes, formação de fecalomas,

respostas inflamatórias e contaminação química; todos os quais deprimem o sistema imunológico e aumentam a vulnerabilidade a outras doenças e ameaças antrópicas (COLFERAI et al., 2017; GUEBERT-BARTHOLO et al., 2011).

No oceano, os detritos plásticos são prontamente cobertos por um biofilme composto por bactérias e microalgas bênticas, principalmente diatomáceas (EICH et al., 2015; OBERBECKMANN et al., 2016; MICHELS et al., 2018). Por vezes, os plásticos podem carregar espécies de microalgas bênticas produtoras de compostos tóxicos (MASÓ et al., 2003; CASABIANCA et al., 2019), o que os torna potenciais vetores adicionais de ficotoxinas para a cadeia trófica, inclusive no ambiente pelágico. Adicionalmente, as tartarugas podem ingerir microalgas tóxicas que estão normalmente aderidas aos itens naturais de sua dieta, sobretudo macroalgas e macrófitas marinhas. Para a tartaruga-verde na região investigada, a dieta inclui várias macrófitas que abrigam microalgas potencialmente nocivas (MOREIRA-GONZÁLEZ et al., 2020), com destaque para as macroalgas *Ulva* spp., *Sargassum* spp. e *Gracilaria domingensis*, além da gramínea marinha *Halodule wrightii*, e partes de plantas do mangue, especialmente *Avicennia schaueriana* (GAMA et al., 2016). Por fim, as densidades de células de dinoflagelados tóxicos em macrófitas são proporcionais às densidades no ambiente (TESTER et al., 2014), de modo que a ingestão destas células deva ser maior durante períodos de florações de algas nocivas (FANs).

No presente estudo, os dinoflagelados produtores de toxinas foram relativamente mais abundantes nos intestinos de tartarugas que continham plásticos, sugerindo uma possível associação. De fato, estudos no ambiente natural (TESTER et al., 2014; TIBIRIÇÁ et al., 2019) e em laboratório (item 5.1. CAPÍTULO 1, presente estudo) indicam que dinoflagelados bênticos toxigênicos possuem uma elevada capacidade de colonizar as superfícies plásticas e outros substratos artificiais na água do mar, principalmente durante as primeiras horas após sua submersão. Em conjunto, estes dados sugerem que os detritos plásticos podem atuar como vetores consideráveis de células tóxicas para a fauna marinha, sobretudo para espécies que ingiram grandes quantidades desses materiais com frequência, como as tartarugas-verde. Desta forma, os potenciais efeitos nocivos aditivos provocados pela ingestão de plásticos contendo células tóxicas devem ser cuidadosamente considerados e examinados nestes organismos.

#### **5.2.4.3. Ácido ocadaico e microalgas produtoras no sistema digestivo das tartarugas**

As concentrações de ácido ocadaico (OA) nos tecidos digestivos das tartarugas-verde encalhadas no litoral do Paraná durante o presente estudo não tiveram correlação com a abundância de células das espécies produtoras pertencentes aos complexos taxonômicos *Dinophysis acuminata* e *Prorocentrum lima*. O intestino, que é o maior responsável pela absorção de nutrientes em vertebrados (GUYTON e HALL, 2011), foi o tecido que mais frequentemente acumulou concentrações detectáveis de OA nas tartarugas aqui examinadas. É possível, portanto, que as toxinas lipofílicas

presentes nas microalgas possam ser absorvidas mais eficientemente nesse órgão. A detecção da toxina foi menos frequente no estômago e ainda mais no fígado, onde foi detectado em apenas uma tartaruga. Isso corrobora estudos anteriores realizados nesta região, que detectaram OA predominantemente em intestinos tartarugas-verde, mas não em seus fígados (MAFRA et al., 2019; MOREIRA-GONZÁLEZ et al., 2023), ao passo que contraria o padrão conhecido para peixes e invertebrados como moluscos bivalves, em que o fígado e a glândula digestiva são os órgãos de maior acúmulo de OA, respectivamente (e.g., MAFRA et al., 2019).

De todas as amostras com detecção de OA, ~62% (13 de 21) continham plástico em seu trato digestivo. No entanto, a maior concentração de OA detectado foi em um tecido estomacal que não apresentou nenhuma ocorrência de células microalgais, mostrando que a toxina permanece mesmo com o conteúdo alimentar já digerido. Essa tartaruga não tinha qualquer interação documentada com RSA, e estava em decomposição muito avançada, ainda assim, foi possível detectar o OA em seu fígado também, sendo uma das maiores concentrações da toxina detectadas no presente estudo.

O OA é um potente inibidor de proteínas fosfatases, considerado um composto promotor de tumores (VALDIGLESIAS et al., 2013). Em tartarugas-verde, tem sido apontado como um cofator ambiental da doença fibropapilomatose (LANDSBERG et al., 1999; ARTHUR et al., 2008). Porém, no presente estudo, apenas um indivíduo (~3%) apresentou fibropapilomatose, e este não tinha concentrações detectáveis de ao em seus tecidos. Em um estudo semelhante, de todos os animais afetados por fibropapilomatose (n = 6), apenas um continha níveis detectáveis de OA em seus tecidos digestivos (MOREIRA-GONZÁLEZ et al., 2023).

Uma tartaruga-verde teve presença de uma espécie de diatomácea que é indicadora de circulação oceânica, *Planktoniella sol* (RAO, 1976; HASLE et al., 1997; FALCÃO et al., 2022), que estava presente em uma amostra de intestino que continha plástico em abundância. Nela foi detectada uma concentração de OA de 10 ng g<sup>-1</sup>, mesmo não ocorrendo microalgas produtoras desta toxina em seu conteúdo intestinal. Não está claro se há uma relação de causalidade entre a ingestão de plástico e o acúmulo de OA nas tartarugas, mas pode-se concluir que múltiplos estressores ambientais afetam essa espécie com elevada incidência na região estudada. Das 21 tartarugas em que detectamos a presença de OA, doze apresentavam alguma forma de patologia, como infecção viral, bacteriana e parasitária (SIMBA, 2023). É possível inferir que essas tartarugas estavam debilitadas e que, de alguma maneira, a combinação de estressores adicionais, como a ingestão de plástico e a exposição ao OA, possa ter contribuído para seu óbito.

### 5.2.5. CONCLUSÃO

Espécies distintas de microalgas bênticas e planctônicas, em especial aquelas típicas do ambiente estuarino do litoral do Paraná, sul do Brasil, estavam bem representadas no conteúdo digestivo das tartarugas-verde. Contudo, também

estavam presentes espécies do ambiente praiado, de ilhas costeiras e oceânico, indicando que elas podem utilizar áreas de alimentação mais distantes.

Células de microalgas toxigênicas foram encontradas no trato digestivo de alguns indivíduos, embora estas fossem componentes menos representativos. Quase metade das tartarugas analisadas (21/46) continham quantidades baixas a moderadas da toxina diarreica ácido ocadaico (OA) em tecidos selecionados, especialmente nos intestinos, mas não houve relação entre os níveis de toxina e a quantidade de células toxigênicas no trato gastro-intestinal. Embora não se espere que os níveis de toxinas detectados provoquem efeitos de intoxicação aguda nas tartarugas marinhas, possíveis efeitos crônicos à sua saúde não podem ser desconsiderados.

A maioria dos indivíduos contaminados (13/21) apresentava um histórico de interação com resíduos sólidos antrópicos. Da mesma forma, células de microalgas produtoras de OA eram mais abundantes nos intestinos de animais que continham resíduos plásticos em seus tratos digestivos, em comparação com aqueles sem plásticos. Portanto, considerando que o lixo plástico pode abrigar grandes quantidades de células de microalgas produtoras de toxinas, principalmente durante eventos de floração, é possível que haja, de fato, um efeito negativo interativo entre poluição por plásticos e as florações de algas nocivas (FANs) para a fauna marinha. Neste contexto, animais ameaçados de extinção como as tartarugas-verde, com histórico de ingestão frequente de macroplásticos e uso de áreas costeiras que são eventualmente afetadas por FANs para a alimentação, são especialmente vulneráveis.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo abordou questões cruciais relacionadas à poluição marinha por resíduos plásticos e seus potenciais impactos à saúde das tartarugas-verde. Os oceanos enfrentam um sério problema com a crescente contaminação por plásticos, que além de afetarem diretamente a vida marinha, também carregam consigo substâncias tóxicas, elevando ainda mais os riscos para os organismos que os ingerem.

A primeira parte do presente estudo teve como principal objetivo investigar a colonização de diferentes tipos de plásticos por microalgas, incluindo o dinoflagelado *Prorocentrum lima*, e diatomáceas bêmicas não-tóxicas. Os resultados revelaram que a formação de biofilme algal ocorre rapidamente, com densidades celulares aumentando exponencialmente ao longo do tempo. Surpreendentemente, o dinoflagelado tóxico *P. lima* demonstrou ser um colonizador altamente eficiente em todos os tipos de polímeros plásticos testados. Essas descobertas destacam a capacidade das microalgas tóxicas de colonizarem os plásticos, deixando claro o potencial dos riscos associados à ingestão desses materiais pelos organismos marinhos.

Assim, na segunda parte do estudo, a presente pesquisa investigou a associação entre a presença de resíduos plásticos e a ocorrência de microalgas nocivas e toxinas lipofílicas no trato gastrointestinal (TGI) de tartarugas-verde encalhadas mortas na costa do Paraná. Os resultados revelaram uma grande diversidade de microalgas nos TGIs das tartarugas, com predominância de células não-tóxicas nos intestinos em comparação com os estômagos. Foi registrada a presença de quatro táxons de dinoflagelados produtores de toxinas, sendo relativamente mais abundantes nos intestinos das tartarugas que continham resíduos plásticos em relação àquelas em que os macrolásticos não eram aparentes. Quase metade dos indivíduos analisados apresentou concentrações baixas a moderadas da toxina diarreica ácido ocadaico (OA) em seus tecidos, principalmente nos intestinos. Embora seja improvável que esses níveis causem intoxicação aguda nas tartarugas, não pode-se descartar a possibilidade de impactos crônicos à saúde dos juvenis de tartarugas-verde. Este estudo não permite uma conclusão definitiva sobre uma relação significativa entre a contaminação por OA e a ingestão de plásticos pelas tartarugas, mas sugere que os resíduos plásticos têm o potencial de atuarem como vetores de ficotoxinas, tornando a saúde dos organismos sujeitos a essa combinação estressores ambientais mais vulnerável.

Os presentes achados mostram a necessidade emergente de lidar com a poluição plástica nos oceanos e sua complexa interação com os ecossistemas marinhos. É fundamental que medidas sejam tomadas para reduzir a entrada de plásticos nos oceanos, bem como para entender melhor os impactos desses materiais na saúde da vida marinha, particularmente em áreas propensas a florações de microalgas produtoras de toxinas. Este estudo contribui para a compreensão desses desafios, na medida em que fornece uma base valiosa para futuras pesquisas e ações de conservação, sendo um dos primeiros a identificar microalgas no trato gastrointestinal

de tartarugas-verde, e o primeiro a focar no lixo plástico como vetor dessas toxinas algais para esta espécie ameaçada.

## 7. REFERÊNCIAS

**ALIANI, S.; MOLCARD, A.** Hitch-hiking on floating marine debris: macrobenthic species in the Western Mediterranean Sea. *Hydrobiologia*, v. 503, p. 59-67, 2003.

**AMARAL-ZETTLER, L. A.; BALLERINI, T.; ZETTLER, E. R.; ASBUN, A. A.; ADAME, A.; CASOTTI, R.; DUMONTET, B.; DONNARUMMA, V.; ENGELMANN, J. C.; FRÈRE, L.; MANSUI, J.; PHILIPPON, M.; PIETRELLI, L.; SIGHICELLI, M.** Diversity and predicted inter- and intra-domain interactions in the Mediterranean Plastisphere. *Environmental Pollution*, v. 286, 2021.

**ANDRADE, M.F., DOMIT, C., BROADHURST, M.K., TOLHURST, D.J., SILVA-SOUZA, Â. T.** Appropriate morphometrics for the first assessment of juvenile green turtle (*Chelonia mydas*) age and growth in the South-Western Atlantic. *Marine Biology*, v. 163, 2016.

**ANDRADY, Anthony L.** Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, v. 62, n. 8, p. 1596-1605, 2011. ISSN 0025-326X. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X11003055>. Acesso em: 12 jan. 2025. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>.

**ANGULO, R.J.** Geologia da Planície Costeira do Estado do Paraná. Ph.D. Thesis, Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, 332 f., 1992.

**ARTHAM, T.; SUDHAKAR, M.; VENKATESAN, R.; MADHAVAN NAIR, C.; MURTY, K.V.G.K.; DOBLE, M.** Biofouling and stability of synthetic polymers in sea water. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63, p. 884-890, 2009.

**ARTHUR, K.; LIMPUS, C.; BALAZS, G.; CAPPER, A.; UDY, J.; SHAW, G.; KEUPER-BENNETT, U.; BENNETT, P.** The exposure of green turtles (*Chelonia mydas*) to tumour-promoting compounds produced by the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* and their potential role in the aetiology of fibropapillomatosis. *Harmful Algae*, 7, p. 114–125, 2008.

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

**BATISTA, T.V.V.** Colonização de microalgas marinhas em diferentes tipos de plásticos no litoral do Paraná. Graduação (Bacharelado em Oceanografia) – Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná, 2019.

**BERS, A.V.; WAHL, M.** The influence of natural surface microtopographies on fouling. *Biofouling*, 20, p. 43–51, 2004.

**BHASKAR, T.; KANEKO, J.; MUTO, A.; SAKATA, Y.; JAKAB, E.; MATSUI, T.E.; UDDIN, M.A.** Pyrolysis studies of PP/PE/PS/PVC/HIPS-Br plastics mixed with PET and dehalogenation (Br, Cl) of the liquid products. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2004.

**BOARI, C.A.** Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

**BRUSTOLIN, M.C.; THOMAS, M.C.; MAFRA, L.L.; DA CUNHA LANA, P.** Bioturbation by the sand dollar *Encope emarginata* (Echinoidea, Mellitidae) changes the composition and size structure of microphytobenthic assemblages. *Hydrobiologia*, 779, p. 183-192, 2016.

**BRYANT, J.A.; CLEMENTE, T.M.; VIVIANI, D.A.; FONG, A.A.; THOMAS, K.A.; KEMP, P.; KARL, D.M.; WHITE, A.E.; DELONG, E.F.** Diversity and Activity of Communities Inhabiting Plastic Debris in the North Pacific Gyre. *American Society for Microbiology*, 1(3), 2016.

**BUTTERWORTH, A.; CLEGG, I.; BASS, C.** Untangled - Marine debris: A global picture of the impact on Animal Welfare and of animal-focused solutions. *World Society for the Protection of Animals*, London, 78 p., 2012.

**CAO, Y.; OLSEN, S.; GUTIERREZ, M.F.; BRUCET, S.; DAVIDSON, T.A.; LI, W.; LAURIDSEN, T.L.; SØNDERGAARD, M.; JEPPESEN, E.** Temperature effects on periphyton, epiphyton and epipelton under a nitrogen pulse in low-nutrient experimental freshwater lakes. *Hydrobiologia*, 795, p. 267-279, 2017.

**CARSON, H.S.; NERHEIM, M.S.; CARROLL, K.A.; ERIKSEN, M.** The plastic-associated microorganisms of the North Pacific Gyre. *Marine Pollution Bulletin*, 75(1–2), p. 126-132, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.07.054>

**CASABIANCA, S.; CAPELLACCI, S.; GIACOBBE, M. G.; DELL'AVERSANO, C.; TARTAGLIONE, L.** Plastic-associated harmful microalgal assemblages in marine environment. *Environmental Pollution*, 244, 617–626, 2019.

**CHEN, X. C.; XIONG, X.; JIANG, X. M.; SHI, H. H.; WU, C. X.** Sinking of floating plastic debris caused by biofilm development in a freshwater lake. *Chemosphere*, 222, 856–864, 2019.

**COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M.** Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49, 711–745, 1995.

**DA GAMA, B. A. P.; PEREIRA, R. C.; COUTINHO, R.** Bio-incrustação marinha. In: *Biologia Marinha*, 2ª ed., p. 299–318, 2008.

**DOBRETISOV, S.; ABED, R. M. M.; VOOLSTRA, C. R.** The effect of surface colour on the formation of marine micro and macrofouling communities. *Biofouling*, 29, 617–627, 2013.

**DUNCAN, E. M.; ARROWSMITH, J. A.; BAIN, C. E.; BOWDERY, H.; BRODERICK, A. C.; CHALMERS, T.; FULLER, W. J.; GALLOWAY, T. S.; LEE, J. H.; LINDEQUE,**

**P. K.; OMEYER, L. C. M.; SNAPE, R. T. E.; GODLEY, B. J.** Diet-related selectivity of macroplastic ingestion in green turtles (*Chelonia mydas*) in the eastern Mediterranean. *Scientific Reports*, 9, 11581, 2019.

**ECYCLE.** Disponível em: <https://www.ecycle.com.br/bopp-plastico-que-embaladoces-e-salgadinhos-tem-reciclagem/>. Acesso em: 08 ago. 2023.

**EICH, A.; MILDENBERGER, T.; LAFORSCH, C.; WEBER, M.** Biofilm and diatom succession on polyethylene (PE) and biodegradable plastic bags in two marine habitats: Early signs of degradation in the pelagic and benthic zone? *PLoS ONE*, 10, e0120621, 2015.

**ELASRI, M. O.; MILLER, R. V.** Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 2025–2031, 1999.

**ENDO, S.; TAKIZAWA, R.; OKUDA, K.; TAKADA, H.; CHIBA, K.; KANEHIRO, H.; OGI, H.; YAMASHITA, R.; DATE, T.** Concentration of polychlorinated biphenyls (PCBs) in beached resin pellets: variability among individual particles and regional differences. *Marine Pollution Bulletin*, 50, 1103–1114, 2005.

**FALCÃO, R. H. M.; MELO, P.; ARAUJO FILHO, M. C.; CUNHA, M. G. G. S.** Brazil-Malvinas Confluence in the South-West Atlantic Ocean: phytoplankton species, life forms and trophic mode. *Botanica Marina*, 65(6), 391–403, 2022.

**FARRAPEIRA, C. M. R.** Invertebrados macrobentônicos detectados na costa brasileira transportados por resíduos flutuantes sólidos abiogênicos. *Revista de Gestão Costeira Integrada*, 11(1), 85–96, 2011.

**FAZEY, F. M.; RYAN, P. G.** Debris size and buoyancy influence the dispersal distance of stranded litter. *Marine Pollution Bulletin*, 110, 371–377, 2016.

**FLINT, M.** Free-ranging sea turtle health. In: WYNEKEN, J.; LOHMANN, K. J.; MUSICK, J. A. (Eds.). *The Biology of Sea Turtles Volume III*. CRC Press, Boca Raton, p. 379–397, 2013.

**GALL, S. C.; THOMPSON, R. C.** The impact of debris on marine life. *Marine Pollution Bulletin*, 92, 170–179, 2015.

**GALLO, F.; FOSSI, C.; WEBER, R.; SANTILLO, D.; SOUSA, J.; INGRAM, I.; NADAL, A.; ROMANO, D.** Marine litter plastics and microplastics and their toxic chemical components: the need for urgent preventive measures. *Environmental Sciences Europe*, 30, 13–27, 2018.

**GAMA, L. R.; DOMIT, C.; BROADHURST, M. K.; FUENTES, M. M. P. B.; MILLAR, R. B.** Green turtle *Chelonia mydas* foraging ecology at 25°S in the western Atlantic: evidence to support a feeding model driven by intrinsic and extrinsic variability. *Marine Ecology Progress Series*, 542, 209–219, 2016.

**GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z.** Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18, 1049–1056, 2008.

**GOLDSTEIN, M. C.; CARSON, H. S.; ERIKSEN, M.** Relationship of diversity and habitat area in North Pacific plastic-associated rafting communities. *Marine Biology*, 161(6), 1441–1453, 2014.

**GREGORY, M. R.** Environmental implications of plastic debris in marine settings—entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking, and alien invasions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 2013–2025, 2009.

**GUEBERT-BARTHOLO, F. M.; BARLETTA, M.; COSTA, M. F.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A.** Using gut contents to assess foraging patterns of juvenile green turtles *Chelonia mydas* in the Paranaguá Estuary, Brazil. *Endangered Species Research*, 13, 131–143, 2011.

**GUYTON, A. C.; HALL, J. E.** *Textbook of Medical Physiology*. 12th ed. Elsevier Inc., ISBN: 978-1-4160-4574-8, Cap. 65, p. 831–840, 2011.

**HODSON, S. L.; BURKE, C. M.; BISSETT, A. P.** Biofouling of fish-cage netting: the efficacy of a silicone coating and the effect of netting colour. *Aquaculture*, 184, 277–290, 2000.

**HOIPKEMEIER-WILSON, L.; SCHUMACHER, J. F.; CARMAN, M. L.; GIBSON, A. L.; FEINBERG, A. W.; CALLOW, M. E.; FINLAY, J. A.; CALLOW, J. A.; BRENNAN, A. B.** Antifouling potential of lubricious, micro-engineered, PDMS elastomers against zoospores of the green fouling alga *Ulva (Enteromorpha)*. *Biofouling*, 20, 53–63, 2004.

**IBGE.** Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pr/paranagua/panorama>. Acesso em: 10 mar. 2020.

**ICMBIO/MMA.** Plano de Ação Nacional de Conservação de Tartarugas Marinhas. Disponível em: <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/pan/pan/pan-tartarugas-marinhas>. Acesso em: 20 dez. 2023.

**IUCN.** União Internacional para a Conservação da Natureza. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 12 jan. 2023.

**JIN, M.; YU, X. B.; YAO, Z. Y.; TAO, P. R.; LI, G.; YU, X. W.; ZHAO, J. L.; PENG, J. P.** How biofilms affect the uptake and fate of hydrophobic organic compounds (HOCs) in microplastic: insights from an in situ study of Xiangshan Bay, China. *Water Research*, 116118, 2020.

**JUNG, M. R.; BALAZS, G. H.; WORK, T. M.; JONES, T. T.; ORSKI, S. V.; RODRIGUEZ, C. V.; BEERS, K. L.; BRIGNAC, K. C.; HYRENBACH, K. D.; JENSEN, B. A.; LYNCH, J. M.** Polymer identification of plastic debris ingested by pelagic-phase sea turtles in the Central Pacific. *Environmental Science & Technology*, 52(20), 11535–11544, 2018.

**KETTNER, M. T.; OBERBECKMANN, S.; LABRENZ, M.; GROSSART, H.** The eukaryotic life on microplastics in brackish ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 538, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00538.

**KRELLING, A. P.; SOUZA, M. M.; WILLIAMS, A. T.; TURRA, A.** Transboundary movement of marine litter in an estuarine gradient: evaluating sources and sinks using hydrodynamic modelling and ground truthing estimates. *Marine Pollution Bulletin*, v. 119, n. 1, p. 48–63, 2017.

**KÜHN, S.; VAN FRANEKER, J. A.** Quantitative overview of marine debris ingested by marine megafauna. *Marine Pollution Bulletin*, v. 151, 110858, 2020.

**LANDSBERG, J. H.; BALAZS, G. H.; STEIDINGER, K. A.; BADEN, D. G.; WORK, T. M.; RUSSELL, D. J.** The potential role of natural tumor promoters in marine turtle fibropapillomatosis. *Journal of Aquatic Animal Health*, v. 11, p. 199–210, 1999.

**LARSSON, M. E.; LACZKA, O. F.; SUTHERS, I. M.; AJANI, P. A.; DOBLIN, M. A.** Hitchhiking in the East Australian Current: rafting as a dispersal mechanism for harmful epibenthic dinoflagellates. *Marine Ecology Progress Series*, v. 596, p. 49–60, 2019.

**LAUTERT, L. F. C.** Diagnóstico sócio-natural da porção sul do município de Paranaguá – PR. 1999. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1999.

**LEITE, I. P.; MENEGOTTO, A.; LANA, P. C.; MAFRA, L. L. Jr.** A new look at the potential role of marine plastic debris as a global vector of toxic benthic algae. *Science of the Total Environment*, v. 838, p. 156262, 2022. ISSN 0048-9697.

**LIU, P.; ZHAN, X.; WU, X.; LI, J.; WANG, H.; GAO, S.** Effect of weathering on environmental behavior of microplastics: properties, sorption and potential risks. *Chemosphere*, v. 242, p. 125193, 2020.

**LOBELLE, D.; CUNLIFFE, M.** Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Marine Pollution Bulletin*, v. 62, n. 1, p. 197–200, 2011.

**LU, L.; LUO, T.; ZHAO, Y.; CAI, C.; FU, Z.; JIN, Y.** Interaction between microplastics and microorganisms as well as gut microbiota: a consideration on environmental animal and human health. *Science of the Total Environment*, v. 667, p. 94–100, 2019.

**LYNCH, J. M.** Quantities of marine debris ingested by sea turtles: global meta-analysis highlights need for standardized data reporting methods and reveals relative risk. *Environmental Science & Technology*, v. 52, 2018.

**MACHADO, S. M. O.** Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controle da formação de biofilmes indesejáveis. 2005. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Universidade do Minho, 2005.

**MAIS POLÍMEROS.** Disponível em: <http://www.maispolimeros.com.br/2018/10/15/tipos-de-plastico-2/>. Acesso em: 10 mar. 2020.

**MAFRA, LL; SOUZA, D.; MENEZES, M.; SCHRAMM, MA; HOFF, R.** Biotoxinas marinhas: últimos avanços e desafios para a segurança de frutos do mar, usando o Brasil como estudo de caso. *Current Opinion in Food Science* , v. 53, 101078, 2023. DOI: 10.1016/j.cofs.2023.101078.

**MANCINI, E.; MICCOLI, A.; PIAZZOLLA, D.; SARACENI, PR; LEZZI, M.; TIRALONGO, F.; BONIFAZI, A.; PICCHIETTI, S.; MARCELLI, M.** Fauna macrozoobêntica associada ao lixo marinho bentônico (Mar Tirreno do Norte, Itália) e primeiro relato de duas espécies de briozoários em águas italianas. *Estudos Regionais em Ciências Marinhas* , v. 47, 2021.

**MASÓ, M.; FORTUÑO, LM; JUAN, S.; DEMESTRE, M.** Comunidades de microincrustação de detritos plásticos marinhos pelágicos e bentônicos amostrados em águas costeiras do Mediterrâneo. *Scientia Marina* , v. 80S1, p. 117–127, 2016. DOI: 10.3989/scimar.04281.10A.

**MASÓ, M.; GARCÉS, J.; PAGÈS, F.; CAMP, J.** Detritos de plástico à deriva como um vetor potencial para dispersão de espécies nocivas de proliferação de algas (HAB). *Scientia Marina* , v. 107–111, 2003.

**MICHELS, J.; STIPKUGEL, A.; LENZ, M.; ENGEL, A.** Agregação rápida de microplásticos cobertos por biofilme com partículas biogênicas marinhas. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* , 2018.

**MOREIRA-GONZÁLEZ, AR; DOMIT, C.; ROSA, KMS; MAFRA, LL** Ocorrência de microalgas potencialmente tóxicas e toxinas diarreicas de moluscos nos tratamentos digestivos de tartarugas marinhas verdes ( *Chelonia mydas* ) do sul do Brasil. *Harmful Algae* , v. 128, 2023. DOI: 10.1016/j.hal.2023.102498.

**MOREIRA-GONZÁLEZ, AR** Composição e abundância de microalgas bentônicas do Complexo Estuarino da Baía de Paranaguá (sul do Brasil) com ênfase especial em espécies tóxicas. *Ocean and Coastal Research* , v. 68, 2020. DOI: 10.1590/S2675-28242020068276.

**NELMS, SE; DUNCAN, EM; BRODERICK, AC** Plástico e tartarugas marinhas: uma revisão e chamada para pesquisa. *ICES Journal of Marine Science* , v. 72, p. 359–373, 2015.

**NUNES, TY; BROADHURST, MK; DOMIT, C.** Seletividade da ingestão de detritos marinhos por tartarugas verdes juvenis ( *Chelonia mydas* ) em uma área listada como Patrimônio Mundial da América do Sul. *Marine Pollution Bulletin* , v. 169, 2021. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112574>.

**OBERBECKMANN, S.; OSBORN, A. M.; DUHAIME, M. B.** Microbes on a bottle: Substrate, season and geography influence community composition of microbes colonizing marine plastic debris. *PLoS ONE*, 2016.

**OBERBECKMANN, S.; LOEDER, M. G. J.; GERDTS, G.; OSBORN, A. M.** Spatial and seasonal variation in diversity and structure of microbial biofilms on marine plastics

in Northern European waters. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 90, n. 2, p. 478–492, 2014.

**PFALLER, J. B.; GOFORTH, K.; GIL, M. A.; SAVOCA, M. S.; LOHMANN, K. J.** Odors from marine plastic debris elicit foraging behavior in sea turtles. *ISTS41*, 2023. Disponível em: [https://www.conftool.pro/ists41/index.php?page=browseSessions&form\\_session=1#paperID225](https://www.conftool.pro/ists41/index.php?page=browseSessions&form_session=1#paperID225). Acesso em: 22 set. 2023.

**PINOCHET, J.; URBINA, M. A.; LAGOS, M. E.** Marine invertebrate larvae love plastics: Habitat selection and settlement on artificial substrates. *Environmental Pollution*, v. 257, 2020.

**PLASTICS EUROPE.** Plastics – the Facts 2022. An analysis of European plastics production, demand and waste data. Disponível em: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/>. Acesso em: 2 out. 2023.

**POSSATTO, F. E.; SPACH, H. L.; CATTANI, A. P.; LAMOUR, M. R.; SANTOS, L. O.; CORDEIRO, N. M. A.; BROADHURST, M. K.** Marine debris in a World Heritage Listed Brazilian estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 2014.

**RAO, D. S.** Marine plankton diatoms as indicators of ocean circulation in the Bay of Bengal. *Indian Journal of Marine Sciences*, v. 19, n. 3, p. 181–184, 1976.

**REISSER, J.; SHAW, J.; HALLEGRAEFF, G.; PROIETTI, M.; BARNES, D. K. A.; THUMS, M.** Millimeter-sized marine plastics: A new pelagic habitat for microorganisms and invertebrates. *PLoS ONE*, v. 9, n. 6, e100289, 2014.

**RIZZI, M.; RODRIGUES, F. L.; MEDEIROS, L.; ORTEGA, I.; RODRIGUES, L.; MONTEIRO, D. S.; KESSLER, F.; PROIETTI, M. C.** Ingestion of plastic marine litter by sea turtles in southern Brazil: Abundance, characteristics and potential selectivity. *Marine Pollution Bulletin*, v. 140, p. 536–548, 2019. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2019.01.054.

**SANTOS, M. C. O.; OSHIMA, J. E. F.; PACÍFICO, E. S.; SILVA, E.** Group size and composition of Guiana dolphins (*Sotalia guianensis*) (Van Bénèden, 1864) in the Paranaguá Estuarine Complex, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 70, p. 111–120, 2010.

**SCHUYLER, Q. A.; WILCOX, C.; TOWNSEND, K.; HARDESTY, B. D.; MARSHALL, N. J.** Mistaken identity? Visual similarities of marine debris to natural prey items of sea turtles. *BMC Ecology*, v. 14, n. 14, p. 1–7, 2014.

**STEVENS, L. M.; GREGORY, M. R.; FOSTER, B. A.** Fouling bryozoans on pelagic and moored plastics from northern New Zealand. In: 10th International Bryozoology Conference, Wellington. *Bryozoans in Space and Time*, p. 321–340, 1996.

**SUN, Y.; YUAN, J.; ZHOU, T.; ZHAO, Y.; YU, F.; MA, J.** Laboratory simulation of microplastics weathering and its adsorption behaviors in an aqueous environment: A systematic review. *Environmental Pollution*, v. 265, p. 114864, 2020.

**TENDER, C. DE; DEVRIESE, L. I.; HAEGEMAN, A.; MAES, S.; VANGEYTE, J.; CATTRIJSE, A.; DAWYNDT, P.; RUTTINK, T.** Temporal dynamics of bacterial and fungal colonization on plastic debris in the North Sea. *Environmental Science & Technology*, v. 51, p. 7350–7360, 2017.

**TEUTEN, E. L.; SAQUING, J. M.; KNAPPE, D. R. U.; BARLAZ, M. A.; JONSSON, S.; BJÖRN, A.; ROWLAND, S. J.; THOMPSON, R. C.; GALLOWAY, T. S.; YAMASHITA, R.; et al.** Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 364, n. 1526, p. 2027–2045, 2009.

**THIEL, M.; HAYE, P. A.** The ecology of rafting in the marine environment. III. Biogeographical and evolutionary consequences. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*, v. 4, p. 323–429, 2006.

**TIBIRIÇA, C. E. J. A.; LEITE, I. P.; BATISTA, T. V. V.; FERNANDES, L. F.; CHOMÉRAT, N.; HERVE, F.; HESS, P.; MAFRA JR, L. L.** *Ostreopsis cf. ovata* bloom in Currais, Brazil: Phylogeny, toxin profile and contamination of mussels and marine plastic litter. *Toxins*, v. 11, n. 8, p. 446, 2019.

**VEGTER, A. C.; BARLETTA, M.; BECK, C.; BORRERO, J.** Global research priorities to mitigate plastic pollution impacts on marine wildlife. *Endangered Species Research*, v. 25, p. 225–247, 2014.

**VÉLEZ-RUBIO, G. M.; TERYDA, N.; ASAROFF, P. E.; ESTRADES, A.; RODRIGUEZ, D.; TOMÁS, J.** Differential impact of marine debris ingestion during ontogenetic dietary shift of green turtles in Uruguayan waters. *Marine Pollution Bulletin*, v. 127, p. 603–611, 2018.

**VIRSEK, M. K.; LOVESIN, M. N.; KOREN, S.; KRAZAN, A.; PETERLIN, M.** Microplastics as a vector for the transport of the bacterial fish pathogen species *Aeromonas salmonicida*. *Marine Pollution Bulletin*, p. 301–309, 2017.

**WARD, C. P.; REDDY, C. M.** Opinion: We need better data about the environmental persistence of plastic goods. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 117, n. 26, p. 14618–14621, 2020. DOI: 10.1073/pnas.2008009117.

**WILCOX, C.; PUCKRIDGE, C. M.; SCHUYLER, Q. A.; TOWNSEND, K. A.; HARDESTY, B. D.** A quantitative analysis linking sea turtle mortality and plastic debris ingestion. *Scientific Reports*, v. 8, p. 12536, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-30038-z.

**WILDERMANN, N.; GREDZENS, C.; AVENS, L.; BARRIOS-GARRIDO, H.; BELL, I.; BLUMENTHAL, J.; BOLTEN, A. B.; BRAUN MCNEILL, J.; CASALE, P.; DI DOMENICO, M.; et al.** Informing research priorities for immature sea turtles through expert elicitation. *Endangered Species Research*, v. 37, 2018. DOI: 10.3354/esr00916.

**XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.** Monitorização e modelação da estrutura de biofilme. *Boletim de Biotecnologia*, 2005.

**ZARDUS, J. D.; NEDVED, B. T.; HUANG, Y.; TRAN, C.; HADFIELD, M. G.** Microbial biofilms facilitate adhesion in biofouling invertebrates. *Biological Bulletin*, v. 214, p. 91–98, 2008.

**ZETTLER, E. R.; MINCER, T. J.; AMARAL-ZETTLER, L. A.** Life in the “Plastisphere”: Microbial communities on plastic marine debris. *Environmental Science & Technology*, v. 47, n. 13, p. 7137–7146, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1021/es401288x>.

**ZHANG, B.; YANG, X.; LIU, L.; CHEN, L.; TENG, J.; ZHU, X.; ZHAO, J.; WANG, Q.** Spatial and seasonal variations in biofilm formation on microplastics in coastal waters. *Science of the Total Environment*, v. 770, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145303>.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Anexo I

Tabela 2 - Lista com as Tartarugas-verde analisadas no presente estudo, incluindo o código obtidos a partir da plataforma de dados públicos denominado "Sistema de Informação de Monitoramento da Biota Aquática" (SIMBA-Petrobras), que possui os dados biológicos de cada indivíduo necropsiado. Seu estágio de decomposição (escala numérica crescente: Nível 2 – Carcaça Fresca: O animal ainda mantém a maior parte de sua aparência original. Não há sinais evidentes de decomposição avançada; Nível 3 - Início de Decomposição: A decomposição começou a se instalar, com sinais claros de mudanças físicas; Nível 4 – Decomposição avançada: A decomposição avançou significativamente, com forte deterioração dos tecidos. Nível 5 – Esqueletização ou Restos Secos: A maior parte dos tecidos moles foi consumida, restando apenas ossos e alguns restos secos). A incidência de fibropapilomatose (FP), seu comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) e informações sobre a presença de plástico no estômago e/ou no intestino. ND: não determinado; n/a: dado não disponível.

Código <i>C. mydas</i> (SIMBA)	Estágio de decomposição	Data de encalhe	FP	CCC	Plástico no Estômago		Plástico no Intestino	
CEM012574	4	16/04/22	ND	66.0	Estômago	Não	n/a	n/a
CEM016000	4	08/04/22	Não	30.5	Estômago	Não	Intestino	Sim
CEM012571	4	12/04/22	Não	35.6	Estômago	Não	Intestino	Não
CEM012572	2	15/04/22	Não	30.2	Estômago	Sim	Intestino	Sim
CEM015999	3	16/04/22	Não	43.3	Estômago	Não	Intestino	Não
CEM015996	4	16/04/22	Sim	52.1	Estômago	Não	n/a	n/a
CEM030434	4	21/04/22	ND	38.1	Estômago	Não	n/a	n/a
CEM012582	3	26/04/22	Não	34.1	Estômago	Sim	Intestino	Não
CEM012598	3	13/05/22	Não	31.9	n/a	n/a	Intestino	Sim
CEM026490	3	13/05/22	Não	32.5	Estômago	Não	Intestino	Não
CEM012601	4	16/05/22	ND	29.4	Estômago	Não	Intestino	Sim
CEM037945	3	21/05/22	Não	33.4	Estômago	Sim	Intestino	Sim
CEM037952	3	22/05/22	Não	34.7	Estômago	Não	n/a	n/a
CEM037956	3	28/05/22	Não	33.5	n/a	n/a	Intestino	Sim
CEM037957	2	28/05/22	Não	35.8	n/a	n/a	Intestino	Sim
CEM016046	4	04/06/22	ND	32.0	Estômago	Não	Intestino	Não
CEM016056	2	11/06/22	Não	31.0	n/a	n/a	Intestino	Sim
CEM016082	4	12/06/22	Não	45.4	Estômago	Sim	Intestino	Sim
CEM045818	4	15/06/22	ND	28.6	Estômago	Não	Intestino	Sim
CEM045826	4	19/06/22	ND	38.6	Estômago	Não	n/a	n/a
CEM048068	3	19/06/22	Não	33.9	Estômago	Sim	Intestino	Não
CEM052438	4	25/06/22	ND	33.0	Estômago	Não	Intestino	Sim
CEM052437	3	25/06/22	Sim	34.5	n/a	n/a	Intestino	Sim
CEM042984	4	30/06/22	Não	33.5	n/a	n/a	Intestino	Sim
CEM044755	4	04/07/22	ND	33.4	n/a	n/a	Intestino	Sim
CEM054099	2	04/07/22	Não	32.9	n/a	n/a	Intestino	Sim
CEM054111	4	04/07/22	ND	30.5	n/a	n/a	Intestino	Sim
CEM044892	2	05/07/22	Não	33.0	Estômago	Não	Intestino	Não
CEM044984	4	06/07/22	ND	33.5	Estômago	Não	Intestino	Sim
CEM045745	4	09/07/22	ND	34.2	n/a	n/a	Intestino	Não
CEM053995	3	09/07/22	Não	43.7	Estômago	Não	Intestino	Não
CEM037995	4	14/07/22	ND	34.6	Estômago	Não	n/a	n/a

<b>CEM054002</b>	4	15/07/22	ND	32.7	Estômago	Sim	Intestino	Não
<b>CEM038010</b>	4	20/07/22	ND	34.0	n/a	n/a	Intestino	Não
<b>CEM028998</b>	2	22/07/22	Não	32.2	n/a	n/a	Intestino	Não
<b>CEM028477</b>	2	24/07/22	Não	36.5	Estômago	Não	Intestino	Não
<b>CEM038027</b>	4	27/07/22	Não	33.2	Estômago	Não	Intestino	Não
<b>CEM038030</b>	3	27/07/22	Não	35.6	Estômago	Não	Intestino	Não
<b>CEM038085</b>	3	28/07/22	Não	35.6	Estômago	Não	Intestino	Sim
<b>CEM038094</b>	4	29/07/22	ND	35.7	Estômago	Não	Intestino	Sim
<b>CEM038086</b>	3	29/07/22	Não	32.8	Estômago	Não	Intestino	Não
<b>CEM029008</b>	4	30/07/22	ND	33.5	Estômago	Sim	Intestino	Sim
<b>CEM038235</b>	3	30/07/22	Não	34.0	Estômago	Não	Intestino	Não
<b>CEM038497</b>	4	04/08/22	Não	31.0	n/a	n/a	Intestino	Não
<b>CEM030386</b>	4	08/08/22	ND	29.4	Estômago	Não	Intestino	Não
<b>CEM024095</b>	4	17/08/22	Não	31.5	n/a	n/a	Intestino	Não

## 8.2. Anexo II

Tabela 3 - Lista das microalgas encontradas no trato digestivo de tartarugas-verde.

<b>Bacillariophyceae</b>
<b>Amphorales</b>
<i>Amphora</i> spp.
<b>Asterionellales</b>
<i>Asterionellopsis</i> spp.
<b>Bacillariales</b>
<i>Biddulphia pulchella</i>
<b>Coscinodiscales</b>
<i>Coscinodiscus</i> spp.
<b>Cymbellales</b>
<i>Licmophora</i> sp.
<b>Ebriales</b>
<i>Ebria tripartita</i>
<b>Grammatophorales</b>
<i>Grammatophora marina</i>
<b>Melosirales</b>
<i>Melosira</i> spp.
<b>Naviculales</b>
<i>Climacosphenia moniligera</i>
<i>Coconneis</i> sp.
<i>Diploneis</i> spp.
<i>Navicula</i> spp.
<b>Pleurosigmatales</b>
<i>Pleurosigma</i> spp.
<b>Thalassiosirales</b>
<i>Cyclotella</i> sp.
<i>Cylindrotheca</i> spp.
<i>Dictyocha fibula</i>
<i>Dictyocha octonaria</i>
<i>Planktoniella sol</i>
<i>Thalassionema</i> spp.
<i>Thalassiosira</i> sp.
<b>Dinophyceae</b>
<b>Dinophysiales</b>
<i>Dinophysis acuminata</i>
<i>Dinophysis tripos</i>
<b>Peridinales</b>
<i>Ornithocercus</i> spp.
<i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i>

<i>Phalacroma rotundatum</i>
<i>Prorocentrum cf. fukuyoi</i>
<i>Prorocentrum lima</i>
<i>Pyrophacus steinii</i>