

Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise

MARCELA CABETTE CRIVELLENTI

**Estudo Químico e Biológico do Fluido Gastrointestinal de Tartarugas Marinhas Mortas  
Relacionadas à Ingestão de Plásticos Coletadas em Cananéia,  
Litoral Sul do Estado de São Paulo**

*Marcela Crivelenti*

Assinatura do Aluno

*André Luiz Meleiro Porto*

Assinatura do Orientador

**Orientador:** Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

Projeto de Pesquisa apresentado junto ao  
Programa de Pós-Graduação em Química  
do Instituto de Química de São Carlos  
*Área de concentração:*  
*Química Orgânica e Biológica*

São Carlos – SP

Abril, 2020

## ÍNDICE

RESUMO	3
1. INTRODUÇÃO	4
1.1 Estudos envolvendo a presença de contaminantes presentes no ambiente marinho	7
2. JUSTIFICATIVA	9
3. OBJETIVOS	10
4. MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1 Coleta das tartarugas verdes mortas e a extração do fluido gastrointestinal	11
4.1.1 <i>Extração do líquido do trato gastrointestinal</i>	12
4.2 Extração por partição líquido-líquido do fluido gastrointestinal de tartarugas verdes mortas	14
4.3 Análises do fluido gastrointestinal de tartarugas verdes mortas por técnicas cromatográficas para a identificação e a quantificação dos compostos	14
4.3.1 <i>Cromatografia a gás com detector por ionização de chamas (GC-FID)</i>	14
4.3.2 <i>Cromatografia a gás acoplada à espectroscopia de massas (GC-MS)</i>	14
4.3.3 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)</i>	14
4.3.4 <i>Otimização dos parâmetros cromatográficos</i>	15
4.3.4.1 <i>Validação do método analítico</i>	15
4.4 Cultivo em meio sólido para o isolamento de microrganismos presentes no fluido gastrointestinal de tartarugas verdes mortas	15
5. PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA	16
6. EQUIPE	16
7. REFERÊNCIAS	17

## RESUMO

Os resíduos plásticos produzidos pelo homem correspondem a mais de 90% de todo o lixo marinho. Entre o período de 1950-2015 a produção global e anual de plásticos aumentou de 1,5 milhão para 299 milhões de toneladas. Listado pelo *Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente* (em português: PNUMA) como sendo um problema muito crítico e análogo às mudanças climáticas. Por exemplo, estima-se que mais de 690 espécies de organismos marinhos já foram relacionadas à ingestão de plásticos. Entre as espécies ameaçadas destacam-se as tartarugas marinhas, pelo comportamento móvel ou de deslocamento, são vulneráveis aos impactos da poluição por plásticos especialmente pela ingestão de micropartículas. Além disso, os resíduos plásticos possuem outros agravantes, pois devidos as suas propriedades hidrofóbicas são capazes de acumular/absorverem tanto metais tóxicos quanto outros compostos orgânicos, como os *Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PCBs)*. Estas substâncias tóxicas encontram-se presentes no ambiente marinho pela ação antropogênica, os quais podem ser liberados durante a ingestão e promovendo a morte de inúmeras espécies. Destaca-se também que os plásticos no trato gastrointestinal do indivíduo poderá liberar substâncias tóxicas como bisfenol A e ftalatos. Assim, este projeto visa o estudo químico e biológico do fluido gastrointestinal de tartarugas marinhas mortas relacionadas à ingestão de plásticos presentes no mar, cujos quelônios foram coletados em Cananéia, no litoral Sul do Estado de São Paulo. A principal etapa do estudo químico envolverá a extração por partição líquido-líquido do fluido gastrointestinal obtido das tartarugas e através das técnicas cromatográficas (GC-MS, GG-FID, HPLC) identificar e quantificar as principais classes de substâncias presentes. A parte biológica envolverá o inóculo do fluido gastrointestinal intestinal em meio de cultura sólido, para em seguida realizar o isolamento de microrganismos, os quais poderão ser utilizados futuramente na biodegradação de resíduos plásticos e outros organopoluentes presentes no ambiente marinho.

**Palavras-chave:** Lixo marinho; Organopoluentes; Política Nacional de Resíduos Sólidos; Tartarugas; Plásticos; Microrganismos.

## 1. INTRODUÇÃO

O lixo marinho consiste em qualquer material sólido perdurável podendo ser processado ou fabricado, no qual é descartado ou desprezado no ambiente marinho e costeiro. Há diversas maneiras de dispersão desses materiais, podendo ser transportados do continente por rios, sistemas de drenagens como esgotos ou através do escoamento fluvial. Dentre as classes de lixos marinhos, tem-se os majoritariamente os plásticos, mas também se encontram madeiras, metais, vidros, pneus, tecidos, entre outros (Galgani et al., 2010).

O lixo antropogênico presente no fundo dos mares, nas superfícies, bem como nas praias aumentou consideravelmente nas últimas décadas e estando presente em todos os oceanos (Ryan, 2014). O homem é responsável por gerar quantidades relevantes de resíduos e o plástico é o principal componente, tornando-se onipresente e formando até 95% dos resíduos que se concentram no ambiente marinho (Topçu et al. 2013; Thiel et al. 2013). Entre 1950-2015 a produção mundial de plásticos totalizou cerca de 359 milhões de toneladas (Garside, 2019).

Uma grande parte desses materiais tem um processo de decomposição lenta, sendo que alguns não se decompõem ou levam até mesmo centenas de anos para se degradarem (Galil et al. 1995; Galgani et al. 2000; Ramirez-Llodra et al. 2013). Portanto, a longevidade dos detritos plásticos e a sua capacidade de dispersão são fatores preocupantes na atualidade, uma vez que a sua produção e o descarte são crescentes (Barnes et al., 2009; Wabnitz e Nichols, 2010; Reisser et al., 2014b).

Devido ao intemperismo, a bioincrustação, a flutuabilidade e a densidade relativa dos plásticos, o seu tempo de vida e o seu deslocamento variam muito durante o período em que se encontram dispersos no ambiente marinho, resultando nas diferentes formas de distribuição, estando presentes na superfície, na forma de colunas d'água profundas, praias, encostas e em geleiras (Colton e Knapp, 1974; Barnes et al., 2009; Law et al. 2010; Browne et al. 2010; Claessens et al., 2013; Collignon et al., 2012; Obbard et al., 2014).

Como resultado, todos os oceanos do planeta já se encontram afetados pela poluição, inclusive às regiões dos Pólos Ártico e Antártico (e.g. Oceano Atlântico - Moser & Lee, 1992; Oceano Índico - Ryan, 2008; e Oceano Pacífico - Boerger, 2010), se tornando um dos maiores desafios ambientais enfrentados atualmente, sendo considerado pelo *Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA)* como um problema muito crítico e análogo às mudanças climáticas. Na literatura já foram relatadas mais de 690 espécies marinhas, entre elas, tartarugas, crustáceos, peixes e aves, mortos devido à contaminação dos mares por resíduos plásticos, seja através do aprisionamento em redes de pesca e em plásticos dispersos, bem como pela ingestão de

materiais particulados sólidos de diferentes tamanhos causando sérios danos aos mais diversos tipos de vida marinha (Provencher et al., 2017).

Uma vez que os plásticos persistem no ambiente marinho eles fragmentam-se em pedaços menores por ação das ondas, exposição à luz UV e por outros agentes químicos, físicos e mecânicos (Andrady, 2015). E a partir disto, as pequenas partículas tornam-se altamente biodisponíveis para um amplo espectro de organismos marinhos (Lusher, 2015).

Além disso, os microplásticos apresentam propriedades hidrofóbicas e uma grande área superficial, podendo acumular e agregar outros contaminantes, tais como os metais tóxicos, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PCBs) e derivados de petróleo, podendo ser liberados durante a ingestão (Cole et al., 2011; Cole et al., 2014a; Wright et al., 2013), causando problemas de desenvolvimento, reprodução e morte (Azzarello e Van Vleet, 1987; Wiemeyer et al., 1993; Oehlmann et al., 2009; Rochman et al., 2013a, b; Vegter et al., 2014). Inclusive há poucos estudos na literatura que relacionam os sinergismos entre os resíduos plásticos e outros organopolutantes produzidos pela ação antropogênica e que tem causados sérios danos ao ambiente marinho (Koelmans, 2015).

Desta forma a poluição marinha por resíduos plásticos gerou uma preocupação global, representando uma ameaça à degradação dos principais habitats e os efeitos prejudiciais aos ecossistemas marinhos levando a morte de inúmeras espécies de organismos vivos (Barnes et al., 2009; Vegter et al., 2014; Gall e Thompson, 2015).

Dentre as espécies ameaçadas as tartarugas marinhas são extremamente vulneráveis aos impactos da poluição por resíduos plásticos (Arthur et al., 2008; Ivar do Sul et al., 2011; Schuyler et al., 2014), devido principalmente à ingestão de diferentes tipos de detritos plásticos em todas as fases do ciclo de vida, e em especial pelo seu comportamento móvel e de longos deslocamentos nos oceanos (Jambeck et al., 2015). Destaca-se que este fenômeno já ocorre também em todas regiões do mundo e com inúmeras outras espécies de organismos marinhos (Schuyler et al., 2014).

Estima-se que aproximadamente 52% de todas as tartarugas marinhas tenham ingerido detritos plásticos, no entanto, isso varia consideravelmente entre as regiões (Schuyler et al., 2014). No Brasil 100% das tartarugas que foram pesquisadas nas praias de Lagoa do Peixe no Rio Grande do Sul haviam ingerido resíduos plásticos dos mais diversos tipos (Tourinho et al., 2010), além disso todas as espécies de tartarugas marinhas estão ameaçadas de extinção (MMA, 2014).

A fase mais frequente de ingestão é no estágio juvenil e em ambiente pelágico, embora isso possa ocorrer em todos os ciclos de vida das tartarugas (Schuyler et al., 2012). A ingestão de detritos pode apresentar vários efeitos, como uma resposta não letal, onde os resíduos sólidos apenas passam pelo trato gastrointestinal.

Um efeito subletal sendo muito mais frequente de ocorrer e mais difícil de detectar, já que pode estar associada à dieta, alterando os níveis de energia do animal, bem como maximizando o efeito da contaminação química por outros organopoluentes associados, comprometendo o sistema imunológico e aumentando a vulnerabilidade de doenças, bem como a autodefesa do animal (Landsberg et al., 1999; Aguirre e Lutz, 2004; Lewison et al., 2004; Hazel e Gyuris, 2006; Hoarau et al., 2014). E, em caso mais grave a depender do resíduo ingerido poderá ocorrer uma perfuração intestinal causando uma resposta letal ao indivíduo (Wilcox et al., 2013; Hoarau et al., 2014; Schuyler et al., 2014; Gall e Thompson, 2015).

Há duas vias de ingestão, a direta e a indireta (Carr, 1987; Bjorndal et al., 1994; Hoarau et al., 2014; Schuyler et al., 2014), sendo na primeira o consumo de fragmentos plásticos ocorrendo acidentalmente quando esses são misturados com os itens alimentares normais, por exemplo, ligado às macroalgas, ou no caso de identificação errônea do alimento pelo animal, confundindo os resíduos plásticos de diferentes origens como sendo alimentos (Di Benedetto e Awabdi, 2014; Mrosovsky, 1981; Toma's et al., 2002; Gregory, 2009; Hoarau et al., 2014). A permanência desses resíduos plásticos no intestino do animal pode levar à contaminação química pelos plastificantes, como o bisfenol A e os ftalatos, os plásticos lixiviados podem ser absorvidos pelos tecidos e atuar como desreguladores endócrinos (Oehlmann et al., 2009)

No sudeste do Brasil, nas praias de Lagoa do Peixe no Rio Grande do Sul, foram realizados estudos com trinta e quatro tartarugas verdes (Tourinho et al. 2010) sendo que 100% haviam ingeridos resíduos plásticos. No entanto, apenas três mortes estavam relacionadas diretamente à presença de resíduos plásticos, já que ocorreram danos e obstrução no sistema digestivo (Camedda et al., 2014). A ingestão de fragmentos “duros” pode ocasionar lesões internas e a obstrução intestinal (Plotkin e Amos, 1990; Derraik, 2002), outro caso comum detectado foi pela ingestão de linhas de pesca, causando danos ao intestino por peristaltismo, levando à ruptura da parede intestinal das tartarugas (Bjorndal et al., 1994; Parga, 2012; Di Bello et al., 2013).

Para que seja perceptível o volume de resíduo plástico dentro do intestino do animal é necessária a realização de necropsia, análises por raios-X, infravermelho ou exame interno. Pequenas quantidades de detritos já são suficientes para bloquear o trato digestivo do animal contaminado (Bjorndal et al., 1994; Bugoni et al., 2001; Schuyler et al., 2014; Santos et al., 2015).

De acordo com Santos et al. (2015) 0,5g de detritos foram suficientes para bloquear e levar a morte de uma tartaruga verde juvenil devido a acumulação do material fecal na presença de resíduo plástico, já que há bloqueio ao sistema gastrointestinal (Davenport et al., 1993; Awabdi et al., 2013). As acumulações de quantidades significativas de resíduos plásticos dentro do intestino podem permanecer durante um tempo sem causar danos, porém a longo prazo, podem ocasionar

redução no estímulo alimentar, gerando um distúrbio alimentar e levando à desnutrição e morte do animal (Hoarau et al., 2014; McCauley e Bjorndal, 1999; Tourinho et al., 2010).

Dentre as inúmeras prioridades e preocupações de investigação de pesquisadores que estudam em áreas relacionadas à biologia marinha das tartarugas e sua conservação é a poluição do ambiente marinho (Hamann et al. 2006), dentro desse grupo de poluentes, encontram-se os resíduos plásticos, que ao serem ingeridos pelos animais acarretam efeitos potenciais diversos, como já foi discutido neste projeto.

Assim, carecem de estudos na literatura os efeitos dos resíduos plásticos e suas relações com outros contaminantes químicos tóxicos, tais como aditivos, metais tóxicos, organopoluentes e os seus efeitos biológicos no organismo do animal através da liberação de substâncias tóxicas como bisfenol, ftalatos e outros compostos. É imprescindível que sejam realizadas pesquisas que identifiquem e quantifiquem esses processos, uma vez que é uma área pouco estudada e há uma necessidade de delineamento e avaliação desses efeitos com a conservação e a preservação do ambiente marinho.

### **1.1 Estudos envolvendo a presença de contaminantes presentes no ambiente marinho**

De acordo com Colabuono (2010) foram coletadas oito espécies de aves marinhas (*Procellariiformes*) mortas nas praias do Rio Grande do Sul as quais foram avaliadas quanto à presença de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PCBs) e Pesticidas Organoclorados (OCPs) nos resíduos plásticos ingeridos, presentes no trato digestivo de cada uma das aves em estudo. Os procedimentos analíticos seguiram aqueles recomendados pelo PNUMA (1992) com algumas adaptações. Os resíduos plásticos foram colocados em um aparelho Soxhlet por 8 h usando 80 mL de *n*-hexano e cloreto de metileno (1:1, v/v). Antes da extração, PCB 103 e PCB 198, foram adicionados em todas as amostras, nos espaços em branco e material de referência como substitutos para pesticidas clorados e PCBs (Colabuono 2010).

Os extratos obtidos da extração líquido-líquido foram transferidos para uma coluna cromatográfica contendo alumina e fez a eluição com 20 mL de *n*-hexano e cloreto de metileno (7:3, v/v). Em seguida o extrato foi concentrado para um volume de 1,0 mL em hexano. O padrão interno 2,4,5,6-tetraclorometaxileno (TCMX) foi adicionado antes das análises cromatográficas para a identificação e a quantificação dos compostos (Colabuono 2010).

Os PCBs foram analisados quantitativamente usando um cromatógrafo a gás Agilent Technology 5973N acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS). Os pesticidas clorados identificados foram DDT (*o,p*-DDT; *p,p*-DDT; *o,p*-DDD; *p,p*-DDD; *o,p*-DDE e *p,p*-DDE), HCHs, clordanos, ciclodienos (aldrina, isodrina, dieldrina, endrina, hepta-cloro, epóxido de heptacloro A e

B, endossulfan I e II), metoxi-cloreto, HCB e mirex. Além de que resíduos sólidos de plásticos foram encontrados em 28% das aves em estudo (Colabuono 2010).

Um outro trabalho na literatura realizou um estudo com 24 tartarugas juvenis cabeçudas (*Caretta caretta*) mortas na região subtropical do Atlântico Norte, em Açores. Foram analisados o trato gastrointestinal de cada uma delas. De acordo com Pham (2017) verificou-se que 20 indivíduos ingeriram detritos marinhos (83%) compostos exclusivamente de resíduos plásticos (principalmente polietileno e polipropileno) identificados por infravermelho. Microplásticos (1-5 mm) representaram 25% do número total de detritos e foram encontrados em 58% dos indivíduos amostrados. Os resultados destes estudos demonstraram que a poluição por plásticos foi responsável pela fase crítica da vida das tartarugas cabeçudas no Atlântico Norte (Pham 2017).

Animais inteiros, órgãos ou conteúdos extraídos individualmente foram congelados -20 °C, ou conservados em soluções de formaldeído ou etanol para posteriores análises. Cada órgão foi cuidadosamente examinado e o intestino foi dividido em três secções (esôfago, estômago e intestinos). O material foi colocado em uma placa de Petri com água limpa. Cada tipo de plástico foi cuidadosamente coletado, enumerado, pesado, medido seguindo as recomendações do “Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas” (Galgani et al., 2013; Pham 2017).

Os plásticos extraídos dos diferentes órgãos das tartarugas foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) a fim de identificar os tipos de polímeros plásticos (Frias et al., 2014). Dentre as 24 tartarugas cabeçudas analisadas foram encontrados itens de detritos no trato gastrointestinal de 20 indivíduos (83%). Os polímeros mais comuns identificados foram o polietileno (PE, 60%), polipropileno (PP, 20%) e polímeros de diferentes misturas (12%). Os polímeros sintéticos identificados foram PE, PP, copolímero misturas entre PE e PP [PP + P (E:P)], Rayon (fibra celulósica), poli(cloreto de vinila), o PVC, poli(acetato de vinila, (PVAc) e Nylon. A quantidade crescente de detritos plásticos no Atlântico Norte representa um risco significativo para as populações de *C. carreta* (Pham 2017).



## 2. JUSTIFICATIVA

Neste trabalho serão realizados estudos químico e biológico do fluido gastrointestinal de tartarugas verdes marinhas (*Chelonia mydas*) as quais foram coletadas pelo biólogo *Pedro Baes Caetano* do Departamento de Ciências Ambientais da Universidade Federal de São Carlos e cedidas pelo Instituto de Pesquisas de Cananéia (IPeC). O instituto executa o Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS) no trecho 7, correspondente aos municípios de Cananéia a Iguape (SP). A distância monitorada diariamente é de 99,1 km, além de realizar monitoramentos específicos semanais (5,4 km) e monitoramentos por uma rede de colaboradores (16,36 km).

O destino dos animais encontrados vivos e mortos é o Centro de Reabilitação e Despetrolização de Cananéia (SP). Este projeto iniciou-se em agosto de 2015 e é um dos programas desenvolvidos como condicionante do Licenciamento Ambiental Federal das atividades da PETROBRAS no Pólo Pré-Sal da Bacia de Santos. Seu principal objetivo é avaliar a interferência das atividades de produção e escoamento de petróleo realizadas na Bacia de Santos sobre as aves, tartarugas e mamíferos marinhos, através do monitoramento diário das praias e do atendimento veterinário a animais vivos e mortos. Quando mortos são realizados exames anatomopatológicos e laboratoriais a fim de se identificar a possível causa de mortes, além de avaliar a condição de saúde e de caracterizar os parâmetros biológicos desses animais (PETROBRAS, 2014).

Portanto, a nossa contribuição ao projeto é desenvolver um estudo metodológico por técnicas cromatográficas frente à presença de possíveis organocontaminantes que possam estar relacionados com a morte de tartarugas verdes identificando os principais organopoluentes associados aos resíduos plásticos.

Também será realizado um estudo microbiológico do fluido gastrointestinal fazendo o isolamento de microrganismos, os quais poderão futuramente serem utilizados na biodegradação de resíduos organopoluentes, bem como de resíduos plásticos.

Desta forma, nosso projeto justifica-se pela sua importância química, biológica e ambiental, especialmente àquelas relacionadas à identificação e a quantificação de organopoluentes associados aos resíduos plásticos presentes no ambiente marinho e sua relação com as causas de mortes de tartarugas verdes.

### **3. OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho é realizar um estudo químico e biológico sobre a incidência de resíduos sólidos em tartarugas verdes marinhas mortas coletadas na região de Cananéia-São Paulo.

Serão realizadas análises por técnicas cromatográficas (GC-MS, GC-FID, HPLC) do fluido gastrointestinal para identificar e quantificar a presença de contaminantes químicos associados aos resíduos plásticos nas tartarugas coletadas. Ainda serão realizados estudos microbiológicos através do isolamento de microrganismos presentes no fluido gastrointestinal das tartarugas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta das tartarugas verdes mortas e a extração do fluido gastrointestinal

A 1ª coleta das tartarugas verdes mortas (*Chelonia mydas*) e a extração do fluido gastrointestinal foram realizadas pelo biólogo *Pedro Baes Caetano* do Departamento de Ciências Ambientais da Universidade Federal de São Carlos e cedidas pelo Instituto de Pesquisas Cananéia (IPeC).

Dessa forma, entre agosto e novembro de 2019 foram coletados o fluido gastrointestinal de dezesseis indivíduos de tartarugas verdes em necropsia (Tabela 1). A análise necroscópica segue protocolo do Projeto Executivo Integrado do PMP-BS (PETROBRAS, 2014). A coleta de fluido foi realizada apenas na presença de resíduos plásticos e para os indivíduos com condição de carcaça considerada fresca (aparência normal, com poucos danos de decomposição, olhos e mucosas brilhantes, ausência de inchaço da carcaça ou odor forte, vísceras intactas e olhos íntegros) e pouco decomposta (carcaça intacta, inchaço evidente, olhos e mucosas secos, odor moderado, alteração de coloração de órgãos por embebição hemoglobínica, consistência normal das vísceras ainda intactas e intestino dilatado pela presença de gás).

**Figura 1.** Exemplo de indivíduo (*Chelonia mydas*) encontrado morto na região de Cananéia (SP) durante o monitoramento diário pelo IPeC, utilizado no presente trabalho.



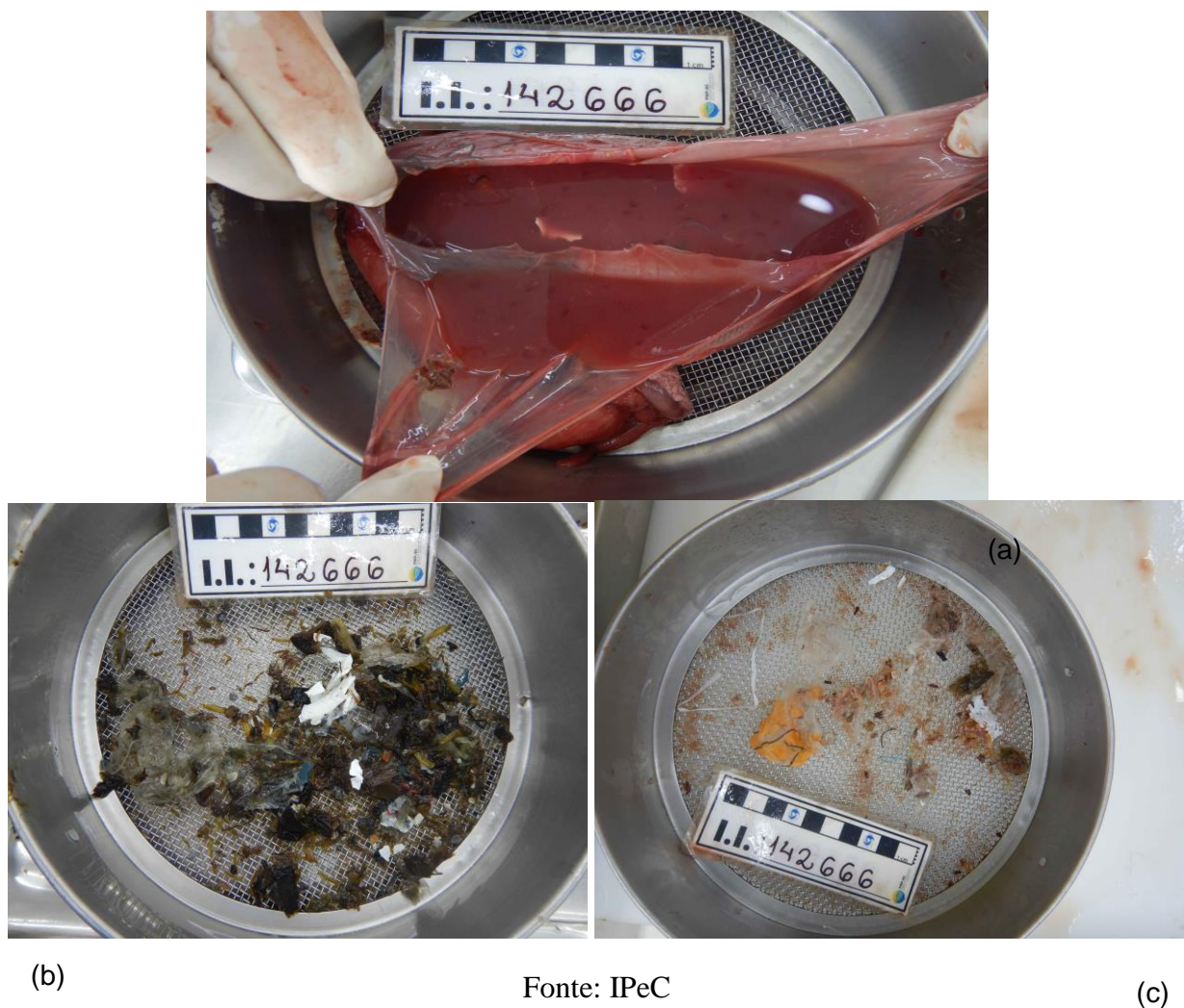
Fonte: IPeC

#### 4.1.1 Extração do líquido do trato gastrointestinal

O trato gastrointestinal (TGI) de cada tartaruga morta coletada foi retirado da cavidade corporal e os órgãos acessórios (fígado, baço e pâncreas) foram removidos. O esôfago-estômago foi seccionado dos intestinos com as extremidades seladas com um nó simples de barbante para que o conteúdo não vazasse. Cada conjunto foi dissecado separadamente e no momento da abertura foi retirado o seu conteúdo. Este foi transferido em sequência de peneiras granulométricas (2 mm, 1 mm, 0,5 mm e 0,045 mm) com uma bandeja em baixo para não o perder. Sendo escasso seu volume, utilizou-se 300 mL de água para diluição antes de peneirar.

Resíduos plásticos de até 1 mm foram coletados, fotografados e pesados. Os fluídos líquidos junto com o material da última peneira de 0,045 mm foram coletados em potes de vidro e estes congelados para análise posterior com a identificação referente ao indivíduo, como a data, a espécie e o órgão de coleta.

**Figura 2.** Estômago de *Chelonia mydas* (a) e os resíduos plásticos encontrados (b e c) no indivíduo retratado na Figura 1.



Fonte: IPeC

Todos os dados biológicos designados em necropsia dos indivíduos são de acesso público e estão disponíveis na plataforma de Sistema de Informação de Monitoramento de Biota Aquática (SIMBA) (<https://segurogis.petrobras.com.br/simba/web/sistema/>).

A Tabela 1 apresenta a relação de código numérico do Identificador de Indivíduo, que corresponde a cada tartaruga verde morta da 1ª coleta, o órgão vital do qual foram extraídos os resíduos sólidos e a sua relação de peso de material plástico coletado.

**Tabela 1.** Relação das amostras obtidas a partir do trabalho realizado no IpeC frente à 1ª coleta de tartarugas mortas por resíduos plásticos coletados no litoral Sul, em Cananéia, SP.<sup>a,b</sup>

Identificador Indivíduo	Órgão	Peso de carga plástica (g)
171572	Intestino	6,183
171572	Estômago	1,346
142666	Intestino	10,586
171562	Intestino	6,025
171562	Estômago	0,314
142669	Intestino	9,015
172021	Intestino	0,165
160721	Intestino	17,306
160721	Estômago	1,717
171792	Intestino e estômago	6,319
171570	Intestino	4,374
171570	Estômago	0,545
142672	Estômago	14,636
142672	Intestino	1,909
171794	Intestino	20,029
171791	Intestino	5,114
170807	Intestino	3,468
170807	Estômago	0,604
163152	Intestino	0,006
171569	Estômago	0,802
160269	Intestino	4,637

<sup>a</sup>Estudos realizados pelo biólogo Pedro Baes Caetano (UFSCar).

<sup>b</sup>O Identificador de Indivíduo é uma sequência numérica necessária para acessar os dados biológicos do animal na plataforma SIMBA, em sequência o órgão vital no qual foi realizada a obtenção do conteúdo e a quantidade de plástico em gramas (g) presente.

## **4.2 Extração por partição líquido-líquido do fluido gastrointestinal de tartarugas verdes mortas**

As amostras do fluido gastrointestinal serão extraídas via extração líquido-líquido ou por partição, dependendo dos seus aspectos físicos utilizando solventes orgânicos (hexano, tolueno, acetato de etila- AcOEt, acetona, metanol-MeOH). O material fluido deverá ficar em contato com o solvente orgânico e mantido em agitação mecânica vigorosa por um tempo determinado. Em seguida será filtrado para a remoção de algum material particulado presente e será realizada via extração líquido-líquido. O solvente orgânico será evaporado para obter o extrato bruto que poderá conter as substâncias extraídas do gastrointestinal. E, por último será analisado por técnicas analíticas cromatográficas (GC-MS, GC-FID, HPLC) para a identificação e a quantificação de possíveis componentes.

## **4.3 Análises do fluido gastrointestinal de tartarugas verdes mortas por técnicas cromatográficas para a identificação e a quantificação dos compostos**

### ***4.3.1 Cromatografia a gás com detector por ionização de chamas (GC-FID)***

As análises serão realizadas em aparelho do tipo Cromatógrafo a Gás (GC) da marca Shimadzu modelo GC 2010, equipado com auto-injetor AOC 20i, um detector por ionização de chamas (FID) e com uma coluna de sílica fundida DB-5MS (Agilent J&W Advanced). O gás de arraste utilizado será nitrogênio. Detalhes dos métodos serão apresentados nos relatórios e nas correspondentes publicações.

### ***4.3.2 Cromatografia a gás acoplada à espectroscopia de massas (GC-MS)***

As análises serão realizadas em um aparelho Shimadzu/GC 2010, acoplado a um auto injetor Shimadzu/AOC-5000 e um detector de massas (Shimadzu MS2010 Plus) com impacto eletrônico (70 eV) equipado com uma coluna de sílica fundida DB-5MS (Agilent J&W Advanced). O gás de arraste será o hélio a 65 kPa. Detalhes dos métodos serão apresentados nos relatórios e nas correspondentes publicações.

### ***4.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)***

Será empregado um sistema cromatográfico Shimadzu, composto pelos seguintes módulos: Sistema de bombeamento LC-20AT, desgaseificador DGU-20A5, amostrador automático SIL-20AHT, detector UV-VIS SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A e controlador de sistema CBM-20A. Equipado com colunas específicas para a separação dos analitos. Detalhes dos métodos serão apresentados nos relatórios e nas correspondentes publicações.

#### **4.3.4 Otimização dos parâmetros cromatográficos**

Os parâmetros cromatográficos e espectrométricos para o método analítico de quantificação dos compostos identificados serão otimizados experimentalmente a partir das análises da banda cromatográfica e pela resposta do analito em função da variação dos valores de cada parâmetro. Cada método será desenvolvido de acordo com os compostos identificados. Para a quantificação dos analitos será utilizado padrão interno ou externo.

##### **3.3.4.1 Validação do método analítico**

Para a realização da validação do método analítico será utilizada as normas da ANVISA, seguindo as recomendações a partir da Resolução ANVISA RE nº 899 de 29/05/2003, onde serão avaliadas a linearidade, seletividade, especificidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limites de detecção e quantificação, estabilidade do analito durante o tempo de preparo e análise por ciclos de congelamento curtos e longos, requeridos para a execução da validação do método analítico (ANVISA<sup>d</sup>, 2003). Para a obtenção da curva analítica, inicialmente será utilizada o método padrão interno.

#### **4.4 Cultivo em meio sólido para o isolamento de microrganismos presentes no fluido gastrointestinal de tartarugas verdes mortas**

Para a obtenção de uma cultura pura a partir de uma cultura mista será através da semeadura dos microrganismos na superfície de meio de cultura sólido em placas de Petri, o que permitirá a formação de colônias. O crescimento microbiano significará o desenvolvimento de uma população a partir de uma ou algumas células, este poderá ser evidenciado a olho nu.

*Composição do meio sólido para isolamento de bactérias:* Em um frasco do tipo Schott serão adicionados 1,0 L de água destilada, 8 g de Nutriente *broth* e 20 g de Agar. A solução será submetida à agitação em agitador magnético. Em seguida o meio de cultura será esterilizado em autoclave (121 °C, 1,5 kPa) e após resfriar à temperatura de 45 °C será adicionado em placas de Petri. Toda manipulação será realizada em cabine de fluxo laminar (Veco) previamente limpa com álcool 70%, solução de HClO 2% e luz germicida UV (254 nm).

*Composição do meio sólido para isolamento de fungos:* Será realizado o mesmo protocolo para o isolamento das bactérias, porém será utilizado o extrato de mate 2% e Agar 20%.

No segundo semestre de 2020 uma 2ª coleta poderá ser realizada para os estudos de novas amostras, padronizando o método da coleta para minimizar as contaminações e os interferentes nas análises químicas mas, principalmente biológicas.

## 5. PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA

O Quadro 1 apresenta o plano de trabalho e o cronograma de atividades que serão desenvolvidos ao longo do projeto.

<b>Quadro 1.</b> Plano de trabalho e o cronograma das atividades que serão desenvolvidas no decorrer do projeto.				
Atividade/Período	1º Semestre 2020.1	2º Semestre 2020.2	1º Semestre 2021.1	2º Semestre 2021.2
Redação do projeto	x			
Revisão bibliográfica	x	x	x	x
Estudo piloto	x	x		
Extração por partição líquido-líquido		x		
Análises do fluido gastrointestinal		x	x	
Cultivo em meio sólido		x		
Redação artigo		x	x	
Coleta das tartarugas verdes mortas		x	x	
Nova coleta e padronização do método			x	x
Repetição das análises químicas e biológicas				x
Redação da dissertação			x	x
Defesa da dissertação				x

## 6. EQUIPE

Prof. Dr. André Luiz Melerio Porto (IQSC-USP)

Mestranda: Marcela Cabette Crivellenti (IQSC-USP)

Sr. Pedro Baes Caetano (Biólogo, responsável pela coleta do material cedido pelo IPeC)

Sra. Priscilla Carla dos Santos Costa (Médica Veterinária, Doutoranda no Laboratório de Patologia Comparada de Animais Silvestres - USP, Ex-Coordenadora de Necropsias do IPeC)

Sr. Bruno Marreto Canônico (Médico Veterinário, Coordenador de Necropsias do IPeC)



## 7. REFERÊNCIAS

- Aguirre, A. A., and Lutz, P. L. Marine turtles as sentinels of ecosystem health: is fibropapillomatosis an indicator? **EcoHealth**, v. 1, p. 275–283, 2004.
- Andrady, A. L. Persistence of plastic litter in the oceans. **Marine Anthropogenic Litter**, p. 57–72, 2015.
- Arthur, K. E., Boyle, M. C., and Limpus, C. J. Ontogenetic changes in diet and habitat use in green sea turtle (*Chelonia mydas*) life history. **Marine Ecology Progress Series**, v. 362, p. 303–311, 2008.
- Awabdi, D. R., Siciliano, S., and Di Benedetto, A. P. M. 2013. First information about the stomach contents of juvenile green turtles, *Chelonia mydas*, in Rio de Janeiro, South-Eastern Brazil. **Marine Biodiversity Records**, v. 6, 2013.
- Azzarello, M., and Van Vleet, E. Marine birds and plastic pollution. **Marine Ecology Progress Series**, v. 37, p. 295–303, 1987.
- Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 1985–1998, 2009.
- Bjorndal, K. A., Bolten, A. B., and Lagueux, C. J. Ingestion of marine debris by juvenile sea turtles in coastal Florida habitats. **Marine Pollution Bulletin**, v. 28 p. 154–158, 1994.
- Boerger, C., Lattin, G., Moore, S., Moore, C. Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 12, p. 2275–2278, 2010.
- Browne, M. A., Galloway, T. S., and Thompson, R. C. Spatial patterns of plastic debris along estuarine shorelines. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 9, p. 3404–3409, 2010.
- Bugoni, L., Krause, L., and Petry, M. V. Marine debris and human impacts on sea turtles in Southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, p. 1330–1334, 2001.
- Camedda, A., Marra, S., Matiddi, M., Massaro, G., Coppa, S., Perilli, A., Ruiu, A., et al. Interaction between loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) and marine litter in Sardinia (Western Mediterranean Sea). **Marine Environmental Research**, v. 100, p. 25–32, 2014.
- Carr, A. Impact of non degradable marine debris on the ecology and survival outlook of sea turtles. **Marine Pollution Bulletin**, v. 18, p. 352–356, 1987.
- Claessens, M., Van Cauwenberghe, L., Vandegehuchte, M. B., and Janssen, C. R. New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 70, p. 227–233, 2013.
- Colabuono, F. I., Taniguchi, S., and Montone, R. C. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in plastics ingested by seabirds. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 4, p. 630–634, 2010.

- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., and Galloway, T. S. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 12, p. 2588–2597, 2011.
- Cole, M., Webb, H., Lindeque, P. K., Fileman, E. S., Halsband, C., and Galloway, T. S. Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. **Scientific Reports**, v. 4, p. 4528, 2014.
- Collignon, A., Hecq, J.-H., Glagani, F., Voisin, P., Collard, F., and Goffart, A. Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 4, p. 861–864, 2012.
- Colton, J. B., Burns, B. R., and Knapp, F. D. Plastic particles in surface waters of the northwestern Atlantic. **Science**, v. 185, n. 4150, p. 491–497, 1974.
- Davenport, J., Balazs, G. H., Faithfull, J., and Williamson, D. A. Astruvite faecolith in the leatherback turtle *Dermochelys coriacea* Vandelli. A means of packaging garbage? **Herpetological Journal**, v. 3, p. 81–83, 1993.
- Derraik, J. G. B. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 842–852, 2002.
- Di Bello, A., Valastro, C., Freggi, D., Lai, O. R., Crescenzo, G., and Franchini, D. Surgical treatment of injuries caused by fishing gear in the intracoelomic digestive tract of sea turtles. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 106, p. 93–102, 2013.
- Di Benedetto, A. P. M., and Awabdi, D. R. How marine debris ingestion differs among megafauna species in a tropical coastal area. **Marine Pollution Bulletin**, v. 88, p. 86–90, 2014.
- Frias, J.P.G.L., Otero, V., and Sobral, P. Evidences of microplastics in samples of zooplankton from Portuguese coastal waters. **Marine Environmental Research**, v. 95, p. 89–95, 2014.
- Galgani, F., Leaute, J.P., Moguedet, P., Souplet, A., Verin, Y., Carpentier, A., Goraguer, H., Latrouite, D., Andral, B., Cadiou, Y., Mahe, J.C., Poulard, J.C., Nerisson, P. Litter on the sea floor along European coasts. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, p. 516–527, 2000.
- Galgani, F., Fleet, D., Van Franeker, F., Katsanevakis, S., Maes, T., Mouat, J., Oosterbaan, L., Poitou, I., Hanke, G., Thompson, R. C., Amato, E., Birkun, A., Janssen, C. Marine strategy framework directive task group 10 report on marine litter. **European Union, Luxembourg**, 2010.
- Galgani, F., Hanke, G., Werner, S., Oosterbaan, L., Nilsson, P., Fleet, D., Kinsey, S., Thompson, R.C., van Franeker, J., Vlachogianni, T., Scoullou, M., Veiga, J.M., Palatinus, A., Matiddi, M., Maes, T., Korpinen, S., Budziak, A., Leslie, H., Gago, J., Liebezeit, G., Guidance on monitoring of marine litter in European Seas. **European Union, Luxembourg**. 2013.
- Galil, B. S., Golik, A. and Turkay, M. Litter at the bottom of the sea: a sea bed survey in the eastern Mediterranean. **Marine Pollution Bulletin**, v. 30, p. 22–24, 1995.
- Gall, S. C., and Thompson, R. C. 2015. The impact of debris on marine life. **Marine Pollution Bulletin**, v. 92, p. 170–179, 2015.

Garside, M. Global plastic production statistics. **Statista**. 2019.

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**, v. 364, p. 2013–2025, 2009.

Hamann, M., Grech, A., Wolanski, E., and Lambrechts, J. Modelling the fate of marine turtle hatchlings. **Ecological Modelling**, v. 222, p. 1515–1521, 2011.

Hazel, J., and Gyuris, E. Vessel-related mortality of sea turtles in Queensland, Australia. **Wildlife Research**, v. 33, p. 149–154, 2006.

Hoarau, L., Ainley, L., Jean, C., and Ciccione, S. Ingestion and defecation of marine debris by loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, from by-catches in the South-West Indian Ocean. **Marine Pollution Bulletin**, v. 84, p. 90–96, 2014.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Portaria MMA Nº 444, 2014.

Ivar do Sul, J. A., Santos, I. R., Friedrich, A. C., Matthiensen, A., and Fillmann, G. Plastic pollution at a sea turtle conservation area in NE Brazil: contrasting developed and undeveloped beaches. **Estuaries and Coasts**, v. 34, p. 814–823, 2011.

Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., et al. Plastic waste inputs from land into the ocean. **Science**, v. 347, p. 768–771, 2015.

Koelmans, A. A. Modeling the role of microplastics in bioaccumulation of organic chemicals to marine aquatic organisms. A critical review. **Marine Anthropogenic Litter**, 309–324, 2015.

Landsberg, J. H., Balazs, G. H., Steidinger, K. A., Baden, D. G., Wada, M., Work, T. M., Rabalais, N. N., et al. The potential role of natural tumor promoters in marine turtle fibropapillomatosis. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 11, p. 199–210, 1999.

Law, K. L., Morét-Ferguson, S., Maximenko, N. A., Proskurowski, G., Peacock, E. E., Hafner, J., et al. Plastic accumulation in the North Atlantic subtropical gyre. **Science**, v. 329, p. 1185–1188, 2010.

Lewison, R., Crowder, L., Read, A., and Freeman, S. Understanding impacts of fisheries by catch on marine megafauna. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 19, p. 598–604, 2004.

Lusher, A. L., Burke, A., O'Connor, I., and Officer, R. Microplastic pollution in the Northeast Atlantic Ocean: validated and opportunistic sampling. **Marine Pollution Bulletin**, v. 88, n. 1-2, p. 325–333, 2014.

Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Nº 899, 2003.

McCauley, S. J., and Bjorndal, K. A. Dietary dilution from debris ingestion: sublethal effects in post-hatchling loggerhead sea turtles. **Conservation Biology**, v. 13, p. 925–929, 1999.

Moser, Mary L.; Lee, David S. A fourteen-year survey of plastic ingestion by western North Atlantic seabirds. **Colonial Waterbirds**, p. 83-94, 1992.

- Mrosofsky, N. **Plastic jellyfish**. Marine Turtle Newsletter, v. 17, p. 5–7, 1981.
- Obbard, R. W., Sadri, S., Wong, Y. Q., Khitun, A. A., Baker, I., and Thompson, R. C. Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice. **Earth's Future**, v. 2, n. 6, p. 315–320, 2014.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K. O., Wollenberger, L., et al. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 364, p. 2047–2062, 2009.
- Parga, M. L. Hooks and sea turtles: a veterinarian's perspective. **Bulletin of Marine Science**, v. 88, p. 731–741, 2012.
- Pham, C. K., Rodríguez, Y., Dauphin, A., Carriço, R., Frias, J. P. G. L., Vandeperre, F., Bjørndal, K. A. Plastic ingestion in oceanic-stage loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) off the North Atlantic subtropical gyre. **Marine Pollution Bulletin**, v. 121, n. 1-2, p. 222–229, 2017.
- Plotkin, P., and Amos, A. Effects of anthropogenic debris on sea turtles in the Northwestern Gulf of Mexico. **In Proceedings of the Second International Conference on Marine Debris**, p. 736–743, 1990.
- PETROBRAS. Projeto Executivo do Monitoramento de Praias da Bacia de Santos PMP-BS – Fase 1. 2014.
- Provencher, Jennifer F. et al. Quantifying ingested debris in marine megafauna: a review and recommendations for standardization. **Analytical Methods**, v. 9, n. 9, p. 1454–1469, 2017.
- Ramirez-Llodra, E., De Mol, B., Company, J. B., Coll, M., & Sardà, F. Effects of natural and anthropogenic processes in the distribution of marine litter in the deep Mediterranean Sea. **Progress in Oceanography**, v. 118, p. 273–287, 2013.
- Reisser, J., Shaw, J., Hallegraeff, G., Proietti, M., Barnes, D. K., Thums, M., et al. Millimeter-sized marine plastics: a new pelagic habitat for microorganisms and invertebrates. **PLoS ONE**, v. 9, p. e100289, 2014b.
- Rochman, C. M., Hoh, E., Kurobe, T., and Teh, S. J. Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. **Scientific Reports**, v. 3, p. 3263, 2013b.
- Rochman, C. M., Browne, M. A., Halpern, B. S., Hentschel, B. T., Hoh, E., Karapanagioti, H. K., Rios-Mendoza, L. M., et al. Classify plastic waste as hazardous. **Nature**, v. 494, p. 169–171, 2013a.
- Ryan, P. G. Seabirds indicate changes in the composition of plastic litter in the Atlantic and south-western Indian Oceans. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, n. 8, p. 1406–1409, 2008.
- Ryan, P. G. 2014. Litter survey detects the South Atlantic 'garbage patch'. **Marine Pollution Bulletin**, v. 79, n. 1-2, p. 220–224, 2014.
- Santos, R. G., Andrades, R., Boldrini, M. A., and Martins, A. S. Debris ingestion by juvenile marine turtles: an underestimated problem. **Marine Pollution Bulletin**, v. 93, p. 37–43, 2015.

Schuyler, Q., Hardesty, B. D., Wilcox, C., and Townsend, K. Global analysis of anthropogenic debris ingestion by sea turtles. **Conservation Biology**, v. 28, p. 129–139, 2014.

Sistema de informação de monitoramento da biota aquática. Banco de dados do pmp-bs fase 1. 2019.

Thiel, M., Hinojosa, I. A., Miranda, L., Pantoja, J. F., Rivadeneira, M. M., & Vásquez, N. Anthropogenic marine debris in the coastal environment: A multi-year comparison between coastal waters and local shores. **Marine Pollution Bulletin**, v. 71, n. 1-2, p. 307–316, 2013.

Toma's, J., Guitart, R., Mateo, R., and Raga, J. A. Marine debris ingestion in loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, from the Western Mediterranean. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 211–216, 2002.

Topçu, E. N., Tonay, A. M., Dede, A., Öztürk, A. A., & Öztürk, B. Origin and abundance of marine litter along sandy beaches of the Turkish Western Black Sea Coast. **Marine Environmental Research**, v. 85, p. 21–28, 2013.

Tourinho, P. S., Ivar do Sul, J. A., and Fillmann, G. Is marine debris ingestion still a problem for the coastal marine biota of Southern Brazil? **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, p. 396–401, 2010.

Vegter, A., Barletta, M., Beck, C., Borrero, J., Burton, H., Campbell, M., Costa, M., et al. Global research priorities to mitigate plastic pollution impacts on marine wildlife. **Endangered Species Research**, v. 25, p. 225–247, 2014.

Wabnitz, C., and Nichols, W. J. Plastic pollution: an ocean emergency. **Marine Turtle Newsletter**, v. 129, p. 1–4, 2010.

Wiemeyer, S. N., Bunck, C. M., and Stafford, C. J. Environmental contaminants in bald eagle eggs—1980–84—and further interpretations of relationships to productivity and shell thickness. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 24, p. 213–227, 1993.

Wilcox, C., Hardesty, B., Sharples, R., Griffin, D., Lawson, T., and Gunn, R. Ghostnet impacts on globally threatened turtles, a spatial risk analysis for northern Australia. **Conservation Letters**, v. 6, p. 247–254, 2013.

Wright, S. L., Thompson, R. C., & Galloway, T. S. The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. **Environmental Pollution**, v. 178, p. 483–492, 2013.