

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS  
Curso de Engenharia Ambiental

Gabriel Botelho de Souza

Efeitos tóxicos da exposição combinada de Tetrabromobisfenol A e  
Microplásticos Polietileno em espécies nativas de águas doces brasileiras

São Carlos  
2025



Gabriel Botelho de Souza

Efeitos tóxicos da exposição combinada de Tetrabromobisfenol A e  
Microplásticos Polietileno em espécies nativas de águas doces brasileiras

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Ambiental, da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Juliano José Corbi

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2025

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

BGabr Botelho de Souza, Gabriel  
iele Efeitos tóxicos da exposição combinada de  
Tetrabromobisfenol A e Microplásticos Polietileno em  
espécies nativas de águas doces brasileiras / Gabriel  
Botelho de Souza; orientador Juliano José Corbi. São  
Carlos, 2025.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --  
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de  
São Paulo, 2025.

1. Ecotoxicologia. 2. Microplásticos Polietileno.  
3. TBBPA. 4. Bioindicadores. I. Título.

# FOLHA DE JULGAMENTO

---

Candidato(a): **Gabriel Botelho de Souza**

Data da Defesa: 14/11/2025

Comissão Julgadora:

**Juliano José Corbi (Orientador(a))**

**Gleyson Borges Castro**

**Mayara Caroline Felipe**

Resultado:

Aprovado

Aprovado

APROVADO



**Prof. Dr. Marcelo Zaiat**

Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação





*Podem me tirar tudo que tenho,  
Só não podem me tirar as coisas boas que eu já  
fiz para quem eu amo.*

*- Charlie Brown Jr.*



## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Sandra e Reinaldo, que enfrentaram de cabeça erguida todas as adversidades da vida, e desde pequeno me ensinaram o valor do trabalho, dos estudos e da empatia com o próximo. Amo vocês.

Tia Suza, minha madrinha, que transformou a vida de centenas de pessoas através da educação. Dedico esse trabalho a você.

A Maiara, minha namorada, que sempre me apoiou nos momentos difíceis e sempre me incentivou a não desistir dos meus sonhos. Te amo.

Aos amigos de Bauru que vieram pra São Carlos: Thiago, João, Miguel, Daniel e Ranza. Não seria a mesma coisa sem vocês.

A Julop e Beca pela companhia além dos estudos, admiro muito vocês.

Ao Gbzinho, por ter sido meu melhor amigo desde o primeiro dia de faculdade, pelas incontáveis risadas, e por ter aguentado a minha cara 10 horas por dia de segunda a sábado.

A República Quinta-Feira, obrigado Refil, Heitor, Nemo e Leozinho. Vocês se tornaram minha segunda família.

Ao professor Juliano José Corbi, que desde o princípio me acolheu no Laboratório de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (LEAA), pelo incentivo a pesquisa e confiança no meu trabalho. Também a todos os integrantes do LEAA, por me auxiliarem nessa jornada.

A professora Patrícia Pereira, por me receber tão bem durante minha estadia em Aveiro.

As pesquisadoras Aline Bernegossi e Fátima Brandão, pelos conselhos durante a minha carreira científica, e pelos exemplos de integridade e dedicação (além da amizade).

A FAPESP, pelo incentivo a pesquisa e confiança no trabalho desenvolvido durante os 3 anos e 6 meses de Iniciação Científica. Processo n. 2021/05513-2, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).



## RESUMO

SOUZA, G. B. **Efeitos Tóxicos da Exposição Combinada de Tetrabromobisfenol A e Microplásticos Polietileno em Espécies Nativas de Águas Doces Brasileiras**. 2025. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2025.

O Tetrabromobisfenol A (TBBPA) e os Microplásticos (MP) são contaminantes emergentes que vêm sendo detectados em corpos hídricos do Brasil e do mundo e apresentam efeitos adversos para biota aquática. Eles podem coexistir no ambiente aquático, e devido a capacidade do MP de adsorver poluentes orgânicos como o TBBPA, o efeito tóxico da mistura para a biota passou a ser estudado. Neste projeto foram realizados testes de ecotoxicidade aguda e crônica utilizando três invertebrados aquáticos nativos do Brasil, a Oligoqueta *Allonais inaequalis*, o microcrustáceo *Ceriodaphnia silvestrii* e o inseto *Chironomus sancticaroli*, a fim de avaliar os efeitos potenciais que a exposição combinada do TBBPA e MP (polietileno 40 - 48 µm) pode causar nas espécies. Os organismos foram cultivados em laboratório e os testes de sensibilidade foram realizados para garantir que os resultados pudessem ser utilizados. No teste de ecotoxicidade aguda foram analisadas respostas de sobrevivência para todos os organismos, ingestão e liberação do MP para *A. inaequalis* e *C. silvestrii*, e possíveis prejuízos na natação para *A. inaequalis*. Os testes foram realizados em combinação fatorial de concentrações dos contaminantes. Considerando combinações TBBPA+MP que não causaram efeito agudo, foram realizados testes de ecotoxicidade crônica nos quais foram analisados os efeitos das substâncias isoladas e da combinação sobre a reprodução das espécies *A. inaequalis* e *C. silvestrii*, e sobre o comprimento corporal de *C. sancticaroli*. Os resultados foram analisados estatisticamente para verificar quais exposições se diferenciam do controle. Os testes de ecotoxicidade aguda indicaram: prejuízos a sobrevivência das espécies por parte do TBBPA (LC50 médio TBBPA: *A. inaequalis* - 491,02 µg / L, *C. silvestrii* - 1262,52 µg / L, *C. sancticaroli* - 1951,70 µg / L), ingestão do MP e prejuízos à natação para a espécie *A. inaequalis*. Os testes de ecotoxicidade crônica mostraram prejuízos a reprodução de *A. inaequalis* e *C. silvestrii*, além de prejuízos ao crescimento corporal da larva de *C. sancticaroli*. A pesquisa contribuiu para avaliação dos efeitos tóxicos combinados dos contaminantes para espécies nativas de águas doces brasileiras.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. Microplásticos. TBBPA. Bioindicadores.



## ABSTRACT

SOUZA, G. B. **Ecotoxicological Effects of Combined Tetrabromobisphenol A and Polyethylene Microplastic Exposure on Native Brazilian Freshwater Species**. 2025. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2024.

Tetrabromobisphenol A (TBBPA) and Microplastics (MP) are emerging contaminants that have been detected in water bodies in Brazil and around the world, and they present adverse effects on aquatic biota. They can coexist in the aquatic environment, and also due to the MP's ability to adsorb organic pollutants such as TBBPA, the toxic effect of the mixture on biota has become a subject of study. In this project, acute and chronic ecotoxicity tests were conducted with three Brazilian native invertebrates: the Oligochaete *Allonais inaequalis*, the Microcrustacean *Ceriodaphnia silvestrii*, and the insect *Chironomus sancticaroli*, in order to assess the potential effects that combined exposure to TBBPA and MP (polyethylene 40–48 µm) may cause in these species. The organisms were cultivated in the laboratory environment, and sensitivity tests were performed to ensure that the results of the tests could be valid. In the acute ecotoxicity tests, mortality responses were analyzed for all organisms, MP ingestion and release were evaluated for *A. inaequalis*, and also possible damage to the swimming of *C. silvestrii*. The tests were conducted using a factorial combination of contaminant concentrations. Considering TBBPA+MP combinations that did not cause acute effects, chronic ecotoxicity tests were then carried out to analyze the effects of the isolated substances and the mixture on the reproduction of *A. inaequalis* and *C. silvestrii*, as well as the body growth of *C. sancticaroli*. The results were statistically analyzed to identify which exposures differed from the control. The acute ecotoxicity tests indicated: adverse effects on species survival caused by TBBPA (mean LC50 for TBBPA: *A. inaequalis* – 491.02 µg/L, *C. silvestrii* – 1262.52 µg/L, *C. sancticaroli* – 1951.70 µg/L), ingestion of MP, and impaired swimming ability for *A. inaequalis*. The chronic ecotoxicity tests showed negative effects on the reproduction of *A. inaequalis* and *C. silvestrii*, as well as on the body growth of *C. sancticaroli* larvae. This research contributed to the assessment of the combined toxic effects of the contaminants on native Brazilian freshwater species.

Keywords: Ecotoxicology. Microplastics. TBBPA. Bioindicators.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Teste de ecotoxicidade aguda da espécie <i>Allonais inaequalis</i> .....	37
Figura 2 – Parâmetros para cálculo do LC50 .....	39
Figura 3 – Interface do software Tracker® .....	40
Figura 4 – Teste de ecotoxicidade aguda da espécie <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	41
Figura 5 – Teste de ecotoxicidade aguda da espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	43
Figura 6 – Teste de ecotoxicidade crônica da espécie <i>Allonais inaequalis</i> .....	45
Figura 7 – Teste de ecotoxicidade crônica da espécie <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	47
Figura 8 – Teste de ecotoxicidade crônica da espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	49
Figura 9 – Exemplo de foto de indivíduo da espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> após 10 dias de teste..	51
Figura 10 – Estabelecimento da escala do papel milimetrado utilizando o Software ImageJ® .....	51
Figura 11 – Estabelecimento da escala do papel milimetrado utilizando o Software ImageJ® .....	52
Figura 12 – Script para cálculo do comprimento corporal da larva, resultados da análise do programa com coordenadas para os dois primeiros pontos e resultado do cálculo realizado pelo script na aba log .....	52
Figura 13 - Taxa de sobrevivência <i>Allonais inaequalis</i> nas concentrações com 0 mg / L de MP .....	54
Figura 14 - Taxa de sobrevivência <i>Allonais inaequalis</i> nas concentrações com 0 µg / L de TBBPA ..	55
Figura 15 – gráfico com a trajetória média dos organismos da espécie <i>Allonais inaequalis</i> após o teste de ecotoxicidade aguda da espécie .....	58
Figura 16 - a) Primeiro registro de presença de MP Polietileno em <i>Allonais inaequalis</i> recém dividido (pelo processo de reprodução). b) indivíduo que havia sido dividido após 48h em meio limpo, sem a indicação clara da presença de MP no tubo. Concentração: 0 TBBPA e 80 MP (réplica 1) .....	59
Figura 17 – Segundo registro presença de MP Polietileno em <i>Allonais inaequalis</i> recém dividido. Concentração: 0 TBBPA e 160 MP (réplica 1) .....	59
Figura 18 – Taxa de organismos da espécie <i>Allonais inaequalis</i> registrados com MP em seu tubo digestivo logo após o teste de ecotoxicidade aguda, agrupados por concentração de MP .....	61
Figura 19 – Taxa de organismos da espécie <i>Allonais inaequalis</i> que expeliram o MP previamente ingerido de seu tubo digestivo, durante o pós-teste de ecotoxicidade aguda da espécie .....	61
Figura 20 - Taxa de sobrevivência <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> nas concentrações com 0 mg / L de MP ..	63
Figura 21 - Taxa de sobrevivência <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> nas concentrações com 0 µg / L de TBBPA .....	63
Figura 22 – Indivíduo da espécie <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> com MP Polietileno ao redor de sua parede externa. Concentração: 320 MP + 1200 TBBPA, réplica 2 .....	66
Figura 23 – Quantidade de indivíduos em cada combinação TBBPA + MP da espécie <i>Allonais inaequalis</i> ao fim do teste de ecotoxicidade crônica .....	70
Figura 24 – Quantidade de reproduções em cada concentração de TBBPA da espécie <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> ao fim do teste de ecotoxicidade crônica .....	72
Figura 25 - Gráfico contendo a média do comprimento corporal dos organismos da espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> após 10 dias de exposição a diferentes concentrações de TBBPA .....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições do cultivo e manutenção dos organismos no LEAA .....	34
Tabela 2 - Parâmetros dos testes de sensibilidade dos organismos-teste .....	36
Tabela 3 - Parâmetros do teste de ecotoxicidade aguda da espécie <i>Allonais inaequalis</i> .....	38
Tabela 4 – Parâmetros do teste de ecotoxicidade aguda da espécie <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	42
Tabela 5 – Parâmetros do teste de ecotoxicidade aguda da espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	44
Tabela 6 - Parâmetros do teste de ecotoxicidade crônica da espécie <i>Allonais inaequalis</i> .....	46
Tabela 7 – Parâmetros do teste de ecotoxicidade crônica da espécie <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	48
Tabela 8 - Parâmetros do teste de ecotoxicidade crônica da espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	50
Tabela 9 - Organismos da espécie <i>A. inaequalis</i> vivos após 96 h do teste de ecotoxicidade aguda. ....	53
Tabela 10 - Resultados teste estatístico Two-way Anova para o teste de ecotoxicidade aguda com <i>Allonais inaequalis</i> .....	55
Tabela 11 - Resultados teste estatístico post-hoc de Tukey nas diferentes concentrações de TBBPA para o teste de ecotoxicidade aguda com <i>Allonais inaequalis</i> .....	56
Tabela 12 - Resultados teste estatístico post-hoc de Tukey nas diferentes concentrações de MP para o teste de ecotoxicidade aguda com <i>Allonais inaequalis</i> .....	56
Tabela 13 – LC50 do TBBPA calculado para as diferentes concentrações de MP fixadas para o teste de ecotoxicidade aguda da espécie <i>Allonais inaequalis</i> .....	57
Tabela 14 – Média das trajetórias percorridas por cada organismo visível ao final do teste de ecotoxicidade aguda, em 30 segundos de filmagem .....	57
Tabela 15 – Dados de organismos sobreviventes do pós-teste de ecotoxicidade aguda com a espécie <i>Allonais inaequalis</i> .....	60
Tabela 16 – Dados de organismos que ingeriram e expeliram o MP durante o pós-teste de ecotoxicidade aguda com a espécie <i>Allonais inaequalis</i> .....	60
Tabela 17 – Organismos da espécie <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> vivos após 48 h do teste de ecotoxicidade aguda .....	62
Tabela 18 - Resultados teste estatístico Two-way Anova para o teste de ecotoxicidade aguda com <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	64
Tabela 19 - Resultados teste estatístico post-hoc de Tukey nas diferentes concentrações de TBBPA para o teste de ecotoxicidade aguda com <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	64
Tabela 20 - Resultados teste estatístico post-hoc de Tukey nas diferentes concentrações de MP para o teste de ecotoxicidade aguda com <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	65
Tabela 21 – LC50 do TBBPA calculado para as diferentes concentrações de MP fixadas para o teste de ecotoxicidade aguda da espécie <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	65
Tabela 22 – Organismos da espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> vivos após 96 h do teste de ecotoxicidade aguda .....	67
Tabela 23 - Resultados teste estatístico Two-way Anova para o teste de ecotoxicidade aguda com <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	67
Tabela 24 - Resultados teste estatístico post-hoc de Tukey nas diferentes concentrações de TBBPA para o teste de ecotoxicidade aguda com <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	68
Tabela 25 - Resultados teste estatístico post-hoc de Tukey nas diferentes concentrações de MP para o teste de ecotoxicidade aguda com <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	68
Tabela 26 – LC50 do TBBPA calculado para as diferentes concentrações de MP fixadas para o teste de ecotoxicidade aguda da espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	68

Tabela 27 – Organismos da espécie <i>Allonais inaequalis</i> vivos após 10 dias do teste de ecotoxicidade crônica.....	69
Tabela 28- Resultados teste estatístico Two-way Anova para o teste de ecotoxicidade crônica com <i>Allonais inaequalis</i> .....	69
Tabela 29 – Total de reproduções da espécie <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> após 7 dias do teste de ecotoxicidade crônica.....	71
Tabela 30 - Resultados teste estatístico Two-way Anova para o teste de ecotoxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	71
Tabela 31 - Resultados teste estatístico post-hoc de Tukey nas diferentes concentrações de TBBPA para o teste de ecotoxicidade aguda com <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	71
Tabela 32 – EC50 do efeito na reprodução causado pelo TBBPA na espécie <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> , calculado para a concentração de 0 e 20 mg/ L MP, no teste de ecotoxicidade crônica .....	72
Tabela 33 – P-valores resultantes do teste estatístico de análise de variância com dois fatores aplicado nos comprimentos das larvas do teste de ecotoxicidade crônica com a espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	74
Tabela 34 - P-valores resultantes do teste de Tukey aplicado nas concentrações de TBBPA do teste de ecotoxicidade crônica com a espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	74



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
LEAA	Laboratório de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada
MP	Microplástico
TBBPA	Tetrabromobisfenol A
TCC	Trabalho de Conclusão de Curso
USP	Universidade de São Paulo



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>2 METODOLOGIA E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>34</b>
2.1 Manutenção dos organismos-teste .....	34
2.2 Materiais .....	35
2.3 Testes de sensibilidade .....	35
2.4 Testes de ecotoxicidade aguda .....	37
2.4.1 Teste de ecotoxicidade aguda com a espécie <i>Allonais inaequalis</i> .....	37
2.4.2 Teste de ecotoxicidade aguda com a espécie <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	41
2.4.3 Teste de ecotoxicidade aguda com a espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	43
2.5 Testes de ecotoxicidade crônica .....	45
2.5.1 Teste de ecotoxicidade crônica utilizando a espécie <i>Allonais inaequalis</i> .....	45
2.5.2 Teste de ecotoxicidade crônica utilizando a espécie <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	47
2.5.3 Teste de ecotoxicidade crônica utilizando a espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	49
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
3.1 Teste de ecotoxicidade aguda utilizando a espécie <i>Allonais inaequalis</i> .....	53
3.1.1 Sobrevivência .....	53
3.1.2 Natação .....	57
3.1.3 Ingestão do MP .....	58
3.2 Teste de ecotoxicidade aguda com a espécie <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	62
3.2.1 Sobrevivência .....	62
3.2.2 Ingestão do MP .....	65
3.3 Teste de ecotoxicidade aguda com a espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	67
3.3.1 Sobrevivência .....	67
3.4 Teste de ecotoxicidade crônica com a espécie <i>Allonais inaequalis</i> .....	69
3.4.1 Reprodução .....	69
3.5 Teste de ecotoxicidade crônica utilizando a espécie <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	71
3.5.1 Reprodução .....	71
3.5 Teste de ecotoxicidade crônica utilizando a espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	74
3.5.1 Comprimento corporal.....	74
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>77</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>83</b>





## 1 INTRODUÇÃO

Os contaminantes emergentes (CE) são compostos com nível de toxicidade pouco conhecido que vêm sendo detectados em várias matrizes ambientais (solo, água e ar), e que não são facilmente removidos pelos processos comuns de tratamento de esgoto e água (Acayaba et. al, 2017). Os CEs podem ter origens naturais ou sintéticas, e podem ser provenientes da deposição irregular de resíduos, e encontrados em efluentes domésticos, industriais, hospitalares e provenientes da atividade agropecuária (Hamelsveld et. al, 2023 & Acayaba et. al, 2017). Eles não costumam estar incluídos nos programas de monitoramento de rotina, ou seja, há pouca legislação que regule seu uso, descarte e monitoramento (Richardson e Kimura, 2016).

O Tetrabromobisfenol A (TBBPA), de fórmula química  $C_{15}H_{12}Br_4O_2$ , é um dos retardantes de chamas bromados (BRFs) mais utilizados no mundo, com seu uso correspondendo a 60% do mercado (Li et al. 2021). O TBBPA é incorporado a diversos produtos industriais, com a finalidade de minimizar a propagação de chamas em caso de incêndios, mitigando danos aos produtos e diminuindo riscos de acidentes (Pieroni et al. 2017).

Sabe-se que a produção mundial de TBBPA alcançou por volta de 170 mil toneladas no ano de 2004 (Liu et al. 2016), sendo os Estados Unidos é um dos países com maior produção deste composto, estimando-se que tenham produzido entre 22 mil e 44 mil toneladas no ano de 2015 (U.S. EPA, 2020).

O TBBPA é considerado um contaminante emergente, e pode adentrar no ambiente aquático através de diversos modos, como o descarte de produtos que contém o contaminante em corpos hídricos, por meio de emissões durante a fabricação desses produtos, por meio da lixiviação de locais como lixões e aterros mal gerenciados próximos à água, e por tratamentos ineficazes em estações de tratamento de água e esgoto (Liu et al., 2016; Malkoske et al., 2016).

A grande quantidade do composto que é produzida mundialmente, somada à facilidade que ele tem de se espalhar e persistir em diversos ecossistemas, torna necessário novos estudos que busquem uma forma de removê-lo efetivamente dos corpos hídricos, e evidenciem seus possíveis efeitos adversos para a biota aquática (Pittinger; Pecquet, 2018). A detecção do TBBPA em amostras ambientais continentais já foi reportada em concentrações de até 4,8  $\mu\text{g/L}$  (Liu et al., 2016).

Alguns pesquisadores relatam que o TBBPA pode trazer riscos para a saúde de diversas espécies aquáticas, como algas, moluscos, crustáceos e peixes (He et al. 2015). Segundo estudo de European Communities (2006), o composto causou efeito de letalidade em 50% (LC50) de

diversos organismos em concentração abaixo de 1 mg/L, além de apresentar capacidade de bioacumular em peixes. Em um estudo com o microcrustáceo *Daphnia magna* a CE50-48h (concentração média de efeito) foi de 0,6 mg/L (Waijers et al., 2013) e para o inseto *Chironomus tentans* a CE50-14d foi de 0,13 mg/L (U.S. EPA, 2015). Contudo, há poucos estudos analisando as concentrações de efeito do TBBPA para espécies de ocorrência em ambientes aquáticos tropicais.

Os microplásticos (MPs), também considerados contaminantes emergentes (Richardson e Kimura, 2016), são definidos como partículas de polímeros sintéticos menores que 5 milímetros, podendo ser originados de fontes primárias ou secundárias (Gong & Xie, 2020). As fontes primárias são aquelas em que o produto já contém as partículas em tamanho inferior a 5 mm, como produtos cosméticos esfoliantes, produtos de limpeza doméstica e pastas de dente (Eerkes-Medrano et al. 2015). Já as fontes secundárias provêm da deterioração de plásticos maiores, como embalagens e sacolas plásticas (Menéndez-Pedriz, Jaumot, 2020).

Em anos recentes, cada vez mais relatos acusam a presença de MPs em ambientes aquáticos marinhos e continentais (Li et al. 2021). Estima-se que até o fim de 2025, mais de cinco trilhões de pedaços de plástico terão adentrado aos oceanos, sendo que cerca de 92% desses pedaços serão microplásticos (Eriksen et al. 2014). Em ambientes aquáticos são encontrados MPs de constituição química variada, como Polietileno (PE), Polipropileno (PP), Poliestireno (PS), e Policloreto de Vinila (PVC) (Li et al. 2021).

Os danos que os microplásticos podem causar na biota aquática são variados. Um organismo pequeno pode ingerir e ter seus tubos corporais preenchidos pelas partículas, sendo esse um efeito de curto prazo, mas também existem efeitos indiretos provenientes dos poluentes ambientais que os MPs podem adsorver, em sua maioria compostos orgânicos prejudiciais, como fármacos e retardantes de chamas bromados (Castro et al. 2020a, b, Menéndez-Pedriz, Jaumot. 2020; Li et al. 2021).

A incidência de MPs em ambientes de água continentais vem sendo detectada em corpos hídricos próximos a áreas urbanas (Eriksen et al. 2013; Anderson et al. 2017). Na pesquisa de Anderson et al. 2017, uma expedição na região dos grandes lagos da América do Norte encontrou em média 43.157 partículas de plástico/km<sup>2</sup>, sendo que uma quantidade considerável dessas partículas eram MPs de Polietileno provenientes de produtos de limpeza facial. A ingestão de MPs foi observada por Castro et al. 2020a, b para organismos de água doce: a cladocera *Daphnia magna* e a Oligoqueta *Allonais inaequalis*, ambos organismos presentes nas águas continentais de diversas regiões do mundo e do Brasil.

É certo que a ingestão de microplásticos (MPs) ocasiona um efeito negativo nos organismos de ecossistemas aquáticos continentais (Hurley et al., 2017; Sá et al., 2018). MPs e poluentes orgânicos halogenados coexistem nas águas onde são despejados resíduos, e os MPs podem reter sob sua superfície uma parcela dos poluentes orgânicos presentes no ambiente (Li et al. 2021).

Estudos de Sun et al. (2019), Yu et al. (2020) e Li et al. (2021) mostraram que os MPs de polietileno podem adsorver TBBPA e que essa combinação pode ter efeitos adversos maiores do que cada contaminante isolado. Há indícios de que os plásticos podem liberar BRFs para o meio aquático ao longo do tempo, visto que os retardantes de chamas bromados são adicionados mecanicamente aos polímeros, não havendo a formação de ligações químicas (Gaylor et al, 2013).

Os retardantes podem entrar na matriz aquática por meio do uso de equipamento ou produtos que contém os retardantes, descarte inadequado, deterioração dos materiais que contém os retardantes e a também pela formação de microplásticos secundários contendo os retardantes em sua composição, esses por sua vez podem ser consumidos pela biota (Sun et al. 2018). Assim, é de suma importância estudar as interações do TBBPA com MP, e avaliar os efeitos que ocorrem em organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos quando expostos a essa combinação.

Ensaio ecotoxicológicos são ferramentas importantes na avaliação dos efeitos negativos de contaminantes presentes em corpos hídricos (Hodgson, 2004). Esses ensaios têm como objetivo o monitoramento ambiental e a avaliação dos efeitos de substâncias, e são realizados em ambientes controlados, com temperatura, iluminação e alimentação adequadas aos organismos (Costa et al., 2008). As respostas dos organismos às amostras contendo os contaminantes são comparadas com as respostas dos organismos às amostras de controle, sem a presença do contaminante (U.S. EPA, 1992).

Nos estudos de Yu et al. (2020) foram realizados ensaios ecotoxicológicos subcrônicos com peixes-zebra, que foram expostos a uma combinação de TBBPA com microplásticos polietileno (PE). Os resultados do estudo sugerem que a co-exposição induziu um stress oxidativo maior e mais durável nos organismos do que o TBBPA ou o MP isolado.

Em outro estudo, Woods et al (2018) observou a capacidade do mexilhão filtrador *Mytilus edulis* de ingerir partículas de microplástico durante a alimentação, o que prejudicou sua taxa de filtração. O estudo sugere que o organismo possui a capacidade de recuperar-se dos danos do microplástico, pois houve uma recuperação da taxa de filtração do animal quando transferido para o meio limpo.

Dessa forma, novos estudos e testes ecotoxicológicos que evidenciem os efeitos dessa combinação em organismos aquáticos se fazem necessários. Nesta pesquisa foram investigados os efeitos de toxicidade aguda e crônica da exposição combinada de TBBPA e MP em três organismos representativos do ambiente aquático tropical brasileiro, *Allonais inaequalis*, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Chironomus sancticaroli*.

O microcrustáceo filtrador *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Cladocera: Daphnidae) é um representante do zooplâncton neotropical, utilizado em ensaios ecotoxicológicos para a avaliação da qualidade da água por ser um organismo de coluna d'água com alimentação por meio da filtração (Fonseca e Rocha, 2005; ABNT, 2017). A Oligoqueta *Allonais inaequalis* Stephenson, 1911 (Haplotaxida: Naididae) é um organismo nativo de vida livre com tolerância à meios adversos, de fácil obtenção e manutenção, além de sua presença nos corpos hídricos brasileiros (Corbi et al. 2015; Felipe et al. 2020; Rocha et al. 2018). Ambas as espécies possuem reprodução assexuada, contribuindo para a manutenção da estabilidade genética e respostas aos ensaios de ecotoxicidade (Bely & Wray, 2001; Corbi et al. 2015; ABNT, 2017). O inseto *Chironomus sancticaroli* Trivinho-Strixino e Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae) é um inseto holometábolo, ou seja, têm metamorfose completa, possuindo quatro estágios distintos em seu ciclo de vida – ovo, larva, pupa e adulto – sendo que as fases imaturas são aquáticas enquanto o adulto é terrestre. A espécie ocorre em todo o Estado de São Paulo, apresentando assim relevância ecológica para o tema da pesquisa, além de ser de fácil criação em laboratório (VIVEIROS, 2012).

O objetivo geral do projeto foi avaliar o efeito tóxico da mistura do retardador de chama Tetrabromobisfenol A (TBBPA) com o microplástico polietileno (MP de tamanho de partículas de 40 - 48  $\mu\text{m}$ ) nos organismos. Os objetivos específicos de cada teste, agrupados por espécie, foram:

- *Allonais inaequalis* (Oligoqueta)
  - Teste de ecotoxicidade aguda (96 h / 4 dias):
    - Avaliar os efeitos de diferentes combinações da mistura TBBPA+MP na sobrevivência dos organismos;
    - Avaliar a ocorrência de ingestão de MP por parte da espécie (já observado por Castro et. al, 2020b) e se ocorre a liberação da partícula quando a espécie é retirada do meio contaminado e colocada em meio limpo
    - Avaliar prejuízos na natação da espécie em organismos sobreviventes nas diferentes concentrações de TBBPA+MP.

- Teste de ecotoxicidade crônica (240 h / 10 dias)
  - Avaliar o efeito da mistura TBBPA+MP sobre a reprodução da espécie, considerando uma combinação que não causou sobrevivência no teste de ecotoxicidade aguda.
  
- *Ceriodaphnia silvestrii* (microcrustáceo)
  - Teste de ecotoxicidade aguda (48 h / 2 dias):
    - Avaliar os efeitos de diferentes combinações da mistura TBBPA+MP na sobrevivência dos organismos;
    - Avaliar a ocorrência de ingestão de MP por parte da espécie;
  - Teste de ecotoxicidade crônica (168 h / 7 dias):
    - Avaliar o efeito da mistura TBBPA+MP sobre a reprodução da espécie, considerando uma combinação que não causou sobrevivência no teste de ecotoxicidade aguda.
  
- *Chironomus sancticaroli* (inseto)
  - Teste de ecotoxicidade aguda (96 h / 4 dias):
    - Avaliar os efeitos de diferentes combinações da mistura TBBPA+MP na sobrevivência dos organismos;
  - Teste de ecotoxicidade crônica (240 h / 10 dias):
    - Avaliar se o crescimento corporal das larvas foi prejudicado pelos contaminantes.

## 2 METODOLOGIA E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 2.1 Manutenção dos organismos-teste

Os organismos *Allonais inaequalis*, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Chironomus sancticaroli* foram cultivados em sala climatizada, no Laboratório de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (LEAA), do Departamento de Hidráulica e Saneamento, USP, São Carlos, Brasil. As características do cultivo desses organismos estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições do cultivo e manutenção dos organismos no LEAA

	Temp.	Fotoperíodo	Meio de cultivo	Alimentação	Metodologia
<i>Allonais inaequalis</i>	25 ± 2°C	12 h Luz/ 12 h Escuro	Areia muflada (550°C, 4h), água filtrada sem cloro	Tetramin® (3 vezes por semana, 5 g por litro de água)	CORBI; GORNI; CORREA, 2015; FELIPE et al., 2020
<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	25 ± 2°C	12 h Luz/ 12 h Escuro	Água reconstituída	Alga e aditivo alimentar	adaptado de ABNT, 2017
<i>Chironomus Sancticaroli</i>	25 ± 2°C	12 h Luz/ 12 h Escuro	Areia muflada (550°C, 4h), Água reconstituída (adaptado de ABNT 2017 para <i>C. silvestrii</i> )	Tetramin® (3 vezes por semana, 5 g por litro de água)	OECD 235 (2011) e Fonseca (1997) e ABNT, 2017

Fonte: o autor

## 2.2 Materiais

O retardante de chamas TBBPA (97% de pureza) e o microplástico polietileno (40–48 µm; densidade 0.94 g/mL a 25 °C; ponto de fusão 144 °C) foram adquiridos pela empresa Sigma-Aldrich® (CAS # 79-94-7 e # 9002-88-4, respectivamente) e estocados ao abrigo da luz. Durante a preparação dos testes, soluções-mãe de TBBPA em metanol foram preparadas para cada concentração, garantindo que a quantidade de solvente não excedesse 0.1% em nenhum recipiente-teste, a fim de evitar potenciais efeitos adversos nos organismos-teste. As massas de microplásticos foram pesadas separadamente, utilizando uma balança analítica de alta precisão (0,00001 g), e adicionados manualmente em cada réplica contendo a solução de TBBPA, ou a água do cultivo da espécie para as réplicas dos controles.

## 2.3 Testes de sensibilidade

Testes de sensibilidade são necessários para garantir a saúde dos organismos pré-experimentos. Eles são conduzidos frequentemente no LEAA para garantir a integridade dos dados obtidos pelos testes. Os testes de ecotoxicidade aguda e crônica somente foram conduzidos se os resultados mensais dos testes de sensibilidade estavam de acordo com a carta-controle do laboratório.

Tabela 2 - Parâmetros dos testes de sensibilidade dos organismos-teste

	<i>Allonais inaequalis</i>	<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	<i>Chironomus sancticaroli</i>
<b>Substância de referência</b>	KCl	NaCl	KCl
<b>Volume</b>	60 mL	30 mL	250 mL
<b>Sedimento</b>	10 g	-	50 g
<b>Quantidade de indivíduos</b>	6	10 neonatos com menos de 24 h de vida	6 larvas III ou IV instar
<b>Exposição</b>	96 h	48 h	96 h
<b>Aeração</b>	-	-	-
<b>Temperatura</b>	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C
<b>Fotoperíodo</b>	12h L:12h E	12h L:12h E	12h L:12h E
<b>Resposta</b>	Sobrevivência	Sobrevivência	Sobrevivência
<b>Metodologia</b>	CORBI; GORNI; CORREA, (2015); FELIPE et al., (2020)	ABNT (2022)	OECD (2011); CORBI et al., (2019) DORNFELD et al. (2019)
<b>LC50 esperado (carta controle do laboratório)</b>	2,7 - 5,75 g/L KCl	0,5 - 1,85 g/L de NaCl	2,7 - 5,5 g/L de KCl.

Fonte: adaptado de Bernegossi (2022)

## 2.4 Testes de ecotoxicidade aguda


### 2.4.1 Teste de ecotoxicidade aguda com a espécie *Allonais inaequalis*

As concentrações de TBBPA do teste foram escolhidas com base em ensaios preliminares conduzidos no laboratório. As concentrações escolhidas foram de 300, 450, 675, 1000 e 1500  $\mu\text{g} / \text{L}$  (fator de multiplicação 1,5).

As concentrações de MP Polietileno foram escolhidas com base em Castro et al. (2020a, b), onde não houve registros de efeito tóxico agudo, mas foi observado que o organismo *A. inaequalis* tem capacidade de ingerir a partícula de MP. As concentrações de MP escolhidas foram de 20, 30, 80, 160 e 320  $\text{mg} / \text{L}$  (fator de multiplicação 2).

A figura 1 apresenta a combinação de concentrações do teste. Cada combinação foi testada em triplicata (3 réplicas).

Figura 1 – Teste de ecotoxicidade aguda da espécie *Allonais inaequalis*

		Teste de Ecotoxicidade Aguda					
		Espécie: <i>Allonais inaequalis</i>					
							
TBBPA ( $\mu\text{g} / \text{L}$ )		0	300	450	675	1000	1500
MP Polietileno ( $\text{mg} / \text{L}$ )	0	3	3	3	3	3	3
	20	3	3	3	3	3	3
	40	3	3	3	3	3	3
	80	3	3	3	3	3	3
	160	3	3	3	3	3	3
	320	3	3	3	3	3	3

Fonte: o autor

O teste de ecotoxicidade aguda com *A. inaequalis* foi conduzido em béqueres de vidro de 100 mL contendo 60 mL de volume das soluções, com seis organismos por réplica, seguindo a metodologia de Corbi, Gorni e Correa (2015). Contudo, o teste foi conduzido sem a presença de sedimento, a fim de permitir a observação microscópica da ingestão de MP. Os parâmetros do teste podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros do teste de ecotoxicidade aguda da espécie *Allonais inaequalis*

<i>Allonais inaequalis</i>	
<b>Solução-teste</b>	TBBPA + MPs * / água do cultivo da espécie
<b>Volume</b>	60 mL em béqueres de 100 mL
<b>Sedimento</b>	Ausente
<b>Organismos por Réplica</b>	6
<b>Tempo de Exposição</b>	96 h
<b>Número de Réplicas</b>	3
<b>Temperatura</b>	25 ± 2 °C
<b>Fotoperíodo</b>	12h claro: 12h escuro
<b>Alimentação</b>	2 mg por réplica de ração Tetramin® no início
<b>Aeração</b>	Ausente
<b>Ponto final</b>	Sobrevivência, ingestão, natação
<b>Metodologia</b>	Adaptação de Corbi, Gorni e Correa (2015)

\*combinações das concentrações

Fonte: o autor

Após 96 horas, o teste foi encerrado e o número de organismos sobreviventes foi registrado. O cálculo do LC50 (Concentração Letal 50%), indicador que representa a concentração que causa 50% de efeito letal em relação ao controle, foi realizado com base nos dados dos organismos sobreviventes. O cálculo foi realizado fixando cada concentração de MP e a análise foi realizada com os dados de organismos vivos e variando as concentrações de TBBPA. A ferramenta utilizada para o cálculo do LC50 foi a calculadora EC50 Calculator® (AAT Bioquest, 2025), utilizando a opção de três parâmetros, como mostra a figura 2.

Figura 2 – Parâmetros para cálculo do LC50

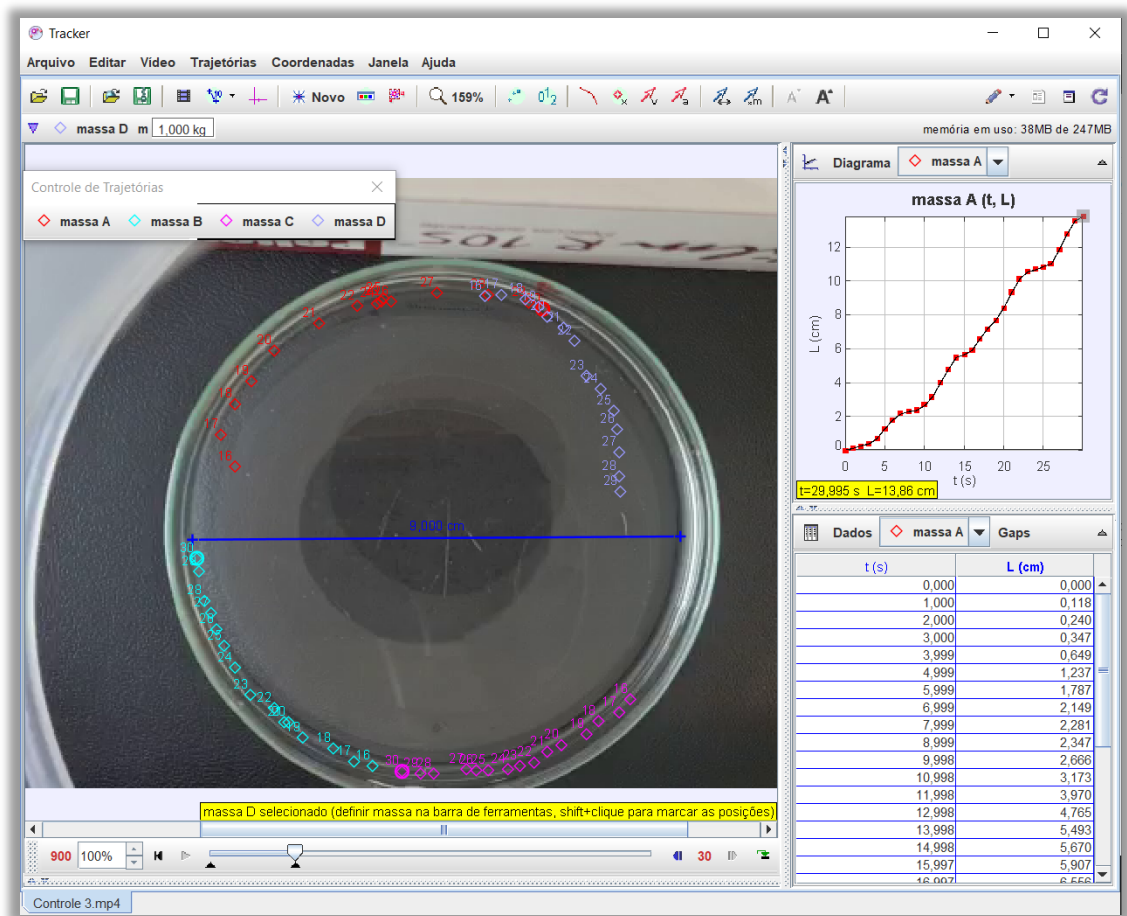
Calculator Options	
Title	EC50: 0 mg / LMP
X-axis label	TBBPA (ug/L)
Y-axis label	Organismos sobreviventes
Display error bars	<input checked="" type="checkbox"/>
Parameter mode ( <a href="#">See explanation</a> )	Three Parameter ▾
Background correction (subtract smallest response)	<input type="checkbox"/>
Normalize (divide by largest response)	<input type="checkbox"/>

Fonte: AAT Bioquest (2025)

Os organismos sobreviventes foram transferidos dos béqueres contendo a mistura para placas de Petri com água do cultivo para contagem e registro em vídeo. Gravações em vídeo de 30 segundos foram feitas para todas as réplicas com organismos sobreviventes, a fim de comparar a mobilidade dos organismos controle com a dos organismos expostos aos contaminantes.

Com o auxílio do *software* Tracker®, a largura da placa de Petri foi traçada em 9 centímetros. Foram definidos pontos de massa na extremidade de cada organismo visível em vídeo, e a cada instante de segundo de 0 a 30, a posição da extremidade do organismos foi atualizada manualmente. Ao final de 30 segundos, a trajetória total descrita por cada organismo em centímetros foi registrada.

Figura 3 – Interface do software Tracker®



Fonte: Tracker®

Além disso, até 3 organismos em cada réplica contendo MP (em algumas réplicas, menos de 3 organismos sobreviveram) foram separados em um ambiente limpo (copos plásticos contendo a água de cultivo da espécie), a fim de avaliar a ingestão de MP em um período de pós-exposição de 72 horas. Foram registradas fotografias em microscópio óptico Nikon Eclipse E200 (aumento 4x ou 10x) no momento da transferência e após 24, 48 e 72 horas, para avaliar a capacidade da espécie *A. inaequalis* expelir o MP.


Todas as fotos dos organismos foram dispostas num grande quadro virtual utilizando a Miro® (Miro team, 2022). Um exemplo de como a análise foi realizada para cada combinação de concentração de encontra no anexo 1. Buscou-se observar a ingestão do MP e a capacidade do organismo de expelir a partícula quando em meio limpo.

### 2.4.2 Teste de ecotoxicidade aguda com a espécie *Ceriodaphnia silvestrii*

As concentrações de TBBPA do teste foram escolhidas com base em ensaios preliminares conduzidos no laboratório. As concentrações escolhidas foram de 300, 600, 1200, 2400 e 4800  $\mu\text{g} / \text{L}$  (fator de multiplicação 2).

As concentrações de MP Polietileno foram as mesmas do teste com a espécie *A. inaequalis*, de 20, 30, 80, 160 e 320  $\text{mg} / \text{L}$  (fator de multiplicação 2).

Figura 4 – Teste de ecotoxicidade aguda da espécie *Ceriodaphnia silvestrii*

		Teste de Ecotoxicidade Aguda						
		Espécie: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>						
								
		TBBPA	0	300	600	1200	2400	4800
		( $\mu\text{g} / \text{L}$ )						
MP Polietileno	0	3	3	3	3	3	3	
	20	3	3	3	3	3	3	
	40	3	3	3	3	3	3	
	80	3	3	3	3	3	3	
	160	3	3	3	3	3	3	
	320	3	3	3	3	3	3	

Fonte: o autor

O teste foi conduzido em béqueres de vidro de 50 mL contendo 30 mL de volume das soluções, com 5 organismos por réplica, seguindo metodologia adaptada da ABNT NBR 13373 (2017) – “Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica — Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Crustacea, Cladocera)”. Os parâmetros do teste podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros do teste de ecotoxicidade aguda da espécie *Ceriodaphnia silvestrii*

<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	
<b>Solução-teste</b>	TBBPA + MPs * / água do cultivo da espécie
<b>Volume</b>	30 mL em béqueres de 50 mL
<b>Sedimento</b>	Ausente
<b>Organismos por Réplica</b>	5
<b>Tempo de Exposição</b>	48 h
<b>Número de Réplicas</b>	3
<b>Temperatura</b>	25 ± 2 °C
<b>Fotoperíodo</b>	12h claro: 12h escuro
<b>Alimentação</b>	Ausente
<b>Aeração</b>	Ausente
<b>Ponto final</b>	Sobrevivência, ingestão
<b>Metodologia</b>	Adaptação de ABNT NBR 13373 (2017)

\*combinações das concentrações

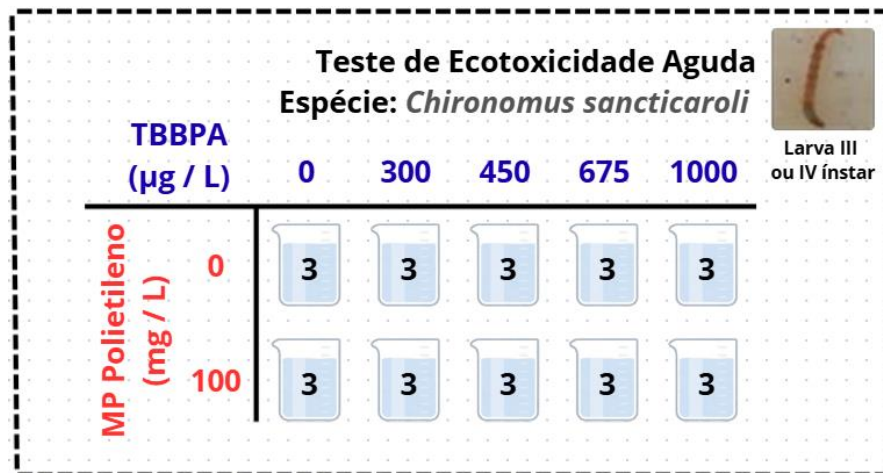
Fonte: o autor

Após 48 horas de teste, o número de organismos sobreviventes foi registrado. A metodologia de análise dos dados de sobrevivência e ingestão foi a mesma do teste de ecotoxicidade aguda com a espécie *A. Inaequalis*.

### 2.4.3 Teste de ecotoxicidade aguda com a espécie *Chironomus sancticaroli*

Foram escolhidas concentrações de TBBPA inferiores ao LC50 calculado por Bernegossi (2022), de 1526  $\mu\text{g} / \text{L}$ , para verificar se a combinação com o MP polietileno causa aumento no efeito tóxico. A concentração de 100  $\text{mg} / \text{L}$  de MP foi escolhida por ser uma concentração dentro da faixa estudada nos testes de ecotoxicidade aguda dos outros organismos. Devido ao MP em testes anteriores não ter demonstrado efeito claro na sobrevivência das outras espécies, foi escolhida apenas uma concentração para o contaminante.

Figura 5 – Teste de ecotoxicidade aguda da espécie *Chironomus sancticaroli*



Fonte: o autor

O teste de ecotoxicidade aguda da espécie *C. sancticaroli* foi conduzido em béqueres de vidro 500 mL contendo 250 mL de volume das soluções e 60 g de sedimento (Areia muflada a 550°C, 4h), seguindo a metodologia de Fonseca (1997). Os parâmetros do teste se encontram na tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros do teste de ecotoxicidade aguda da espécie *Chironomus sancticaroli*

<b><i>Chironomus sancticaroli</i></b>	
<b>Solução-teste</b>	TBBPA + MPs * / água do cultivo da espécie
<b>Volume</b>	250 mL em béqueres de 500 mL
<b>Sedimento</b>	60 g
<b>Organismos por Réplica</b>	6 larvas III ou IV ínstar
<b>Tempo de Exposição</b>	96 h
<b>Número de Réplicas</b>	3
<b>Temperatura</b>	25 ± 2 °C
<b>Fotoperíodo</b>	12h claro: 12h escuro
<b>Alimentação</b>	2 mg por réplica de ração Tetramin® no início
<b>Aeração</b>	Ausente
<b>Ponto final</b>	Sobrevivência
<b>Metodologia</b>	Fonseca (1997)

\*combinações das concentrações

Fonte: o autor

Após 96 h de teste, o número de organismos vivos em cada réplica foi registrado.

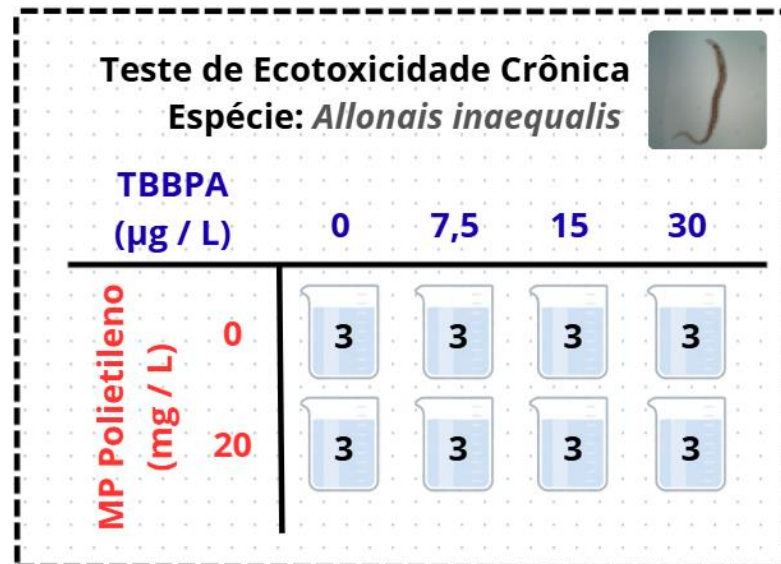
## 2.5 Testes de ecotoxicidade crônica

Os testes de ecotoxicidade crônica tiveram como objetivo analisar os efeitos a longo prazo de um possível poluente ambiental em um organismo, sendo eles: efeitos na reprodução de *A. inaequalis* e *C. silvestrii* e efeitos no crescimento corporal das larvas de *C. sancticaroli*. Os testes a seguir utilizam concentrações menores do que os testes de ecotoxicidade aguda com as mesmas espécies, visto que são realizados em um período de exposição maior.

### 2.5.1 Teste de ecotoxicidade crônica utilizando a espécie *Allonais inaequalis*

As concentrações do teste de ecotoxicidade crônica com *A. inaequalis* foram escolhidas com base nos resultados do teste de ecotoxicidade aguda e resultados de testes preliminares feitos no laboratório, sendo elas 0; 7,5; 15; e 30  $\mu\text{g} / \text{L}$  TBBPA e 0; 20  $\text{mg} / \text{L}$  MP.

Figura 6 – Teste de ecotoxicidade crônica da espécie *Allonais inaequalis*



Fonte: o autor

O teste com o organismo *A. inaequalis* foi realizado em béqueres de vidro de 100 mL contendo 60 mL das soluções, com 6 organismos por réplica, seguindo a metodologia Felipe et al. (2020), porém sem a presença de sedimento. O teste busca verificar se o Tetrabromobisfenol

A e o Microplástico Polietileno interferem na reprodução do organismo, assim utilizam-se concentrações que não causaram efeito agudo. Os parâmetros do teste se encontram na tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros do teste de ecotoxicidade crônica da espécie *Allonais inaequalis*

<i>Allonais inaequalis</i>	
<b>Solução-teste</b>	TBBPA + MPs * / água do cultivo da espécie
<b>Volume</b>	60 mL em béqueres de 100 mL
<b>Sedimento</b>	Ausente
<b>Organismos por Réplica</b>	6
<b>Tempo de Exposição</b>	10 dias
<b>Número de Réplicas</b>	3
<b>Temperatura</b>	25 ± 2 °C
<b>Fotoperíodo</b>	12h claro: 12h escuro
<b>Alimentação</b>	2 mg por réplica de ração Tetramin® no início e após 5 dias
<b>Aeração</b>	Ausente
<b>Ponto final</b>	Reprodução
<b>Metodologia</b>	Felipe et al. (2020)

\*combinações das concentrações

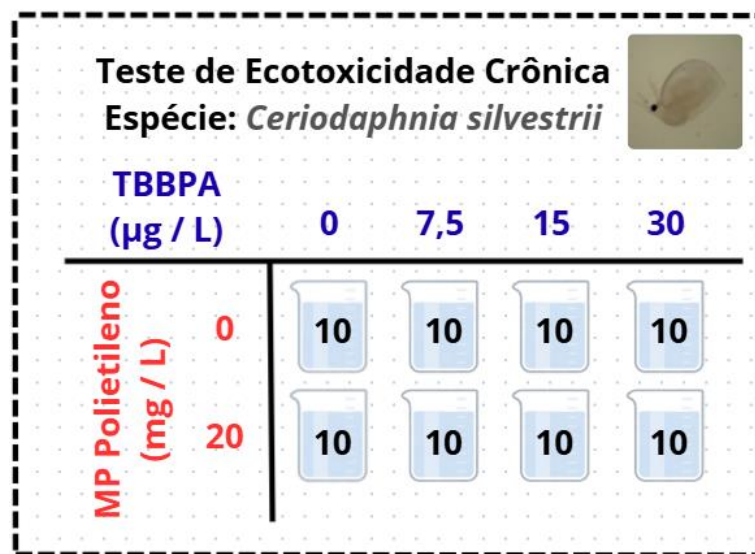
Fonte: o autor

Após 10 dias de teste, o número de organismos vivos em cada réplica foi registrado.

### 2.5.2 Teste de ecotoxicidade crônica utilizando a espécie *Ceriodaphnia silvestrii*

As concentrações do teste de ecotoxicidade crônica com *C. silvestrii* foram escolhidas com base nos resultados do teste de ecotoxicidade aguda e resultados de testes preliminares feitos no laboratório, sendo elas 0; 7,5; 15; e 30  $\mu\text{g} / \text{L}$  TBBPA e 0; 20  $\text{mg} / \text{L}$  MP.

Figura 7 – Teste de ecotoxicidade crônica da espécie *Ceriodaphnia silvestrii*



Fonte: o autor

O teste com o organismo *C. silvestrii* foi realizado em tubos de ensaio de vidro de 30 mL contendo 15 mL das soluções, com 1 organismo por réplica e 10 réplicas por combinação de concentrações, seguindo a metodologia NBR 13373 (ABNT, 2017). O teste buscou verificar se o TBBPA e o MP Polietileno interferem na reprodução do organismo, assim foram utilizadas concentrações que não causaram efeito de ecotoxicidade aguda. O teste com a *C. silvestrii* é semi-estático, ou seja, com a renovação completa do meio a cada dois dias, a alimentação ocorreu após a troca da solução-teste. Os parâmetros do teste se encontram na tabela 7.

Tabela 7 – Parâmetros do teste de ecotoxicidade crônica da espécie *Ceriodaphnia silvestrii*

<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	
<b>Solução-teste</b>	TBBPA + MPs * / água do cultivo da espécie
<b>Volume</b>	15 mL em tubos de ensaio de 30 mL
<b>Sedimento</b>	Ausente
<b>Organismos por Réplica</b>	1
<b>Tempo de Exposição</b>	7 dias
<b>Número de Réplicas</b>	10
<b>Temperatura</b>	25 ± 2 °C
<b>Fotoperíodo</b>	12h claro: 12h escuro
<b>Alimentação</b>	1 mL suspensão algácea de <i>Raphidocelis subcaptata</i> a cada renovação do meio
<b>Aeração</b>	Ausente
<b>Ponto final</b>	Reprodução
<b>Metodologia</b>	ABNT NBR 13373 (2017)

\*combinações das concentrações

Fonte: o autor

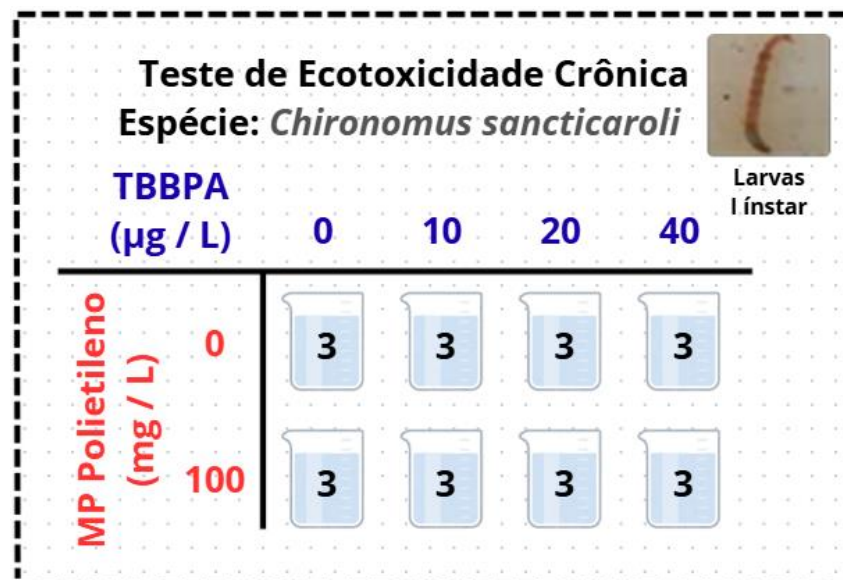
O número de organismos totais foi registrado a cada renovação do meio (2 dias). Ao fim, o número total de filhotes gerados em cada tratamento foi obtido.

### 2.5.3 Teste de ecotoxicidade crônica utilizando a espécie *Chironomus sancticaroli*

Para o teste com a espécie *C. sancticaroli*, foram escolhidas as concentrações de 0; 10; 20 e 40  $\mu\text{g} / \text{L}$  TBBPA, em combinação com as concentrações de 0 e 100  $\text{mg} / \text{L}$  MP.

O objetivo do teste é verificar se o crescimento corporal das larvas ao longo dum período de 10 dias foi prejudicado pelas combinações dos contaminantes. Ao término do teste, foram feitas fotografias das larvas em placa de petri sobre papel milimetrado, para medição do comprimento corporal com o auxílio do *software* ImageJ®, de acordo com a metodologia de Bernegossi (2022) adaptado de Trivinho-Strixino (1980).

Figura 8 – Teste de ecotoxicidade crônica da espécie *Chironomus sancticaroli*



Fonte: o autor

O teste de ecotoxicidade crônica da espécie *C. sancticaroli* foi conduzido em béqueres de vidro 500 mL contendo 250 mL de volume das soluções e 60 g de sedimento (Areia muflada a 550°C, 4h), seguindo a metodologia adaptada de Fonseca e Rocha (2004), OECD (2011) e Dornfeld et al. (2019) por Bernegossi (2022). O teste foi interrompido ao final de 10 dias para a medição do comprimento corporal dos indivíduos sob as diferentes concentrações de TBBPA e MP. Os parâmetros do teste se encontram na tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros do teste de ecotoxicidade crônica da espécie *Chironomus sancticaroli*

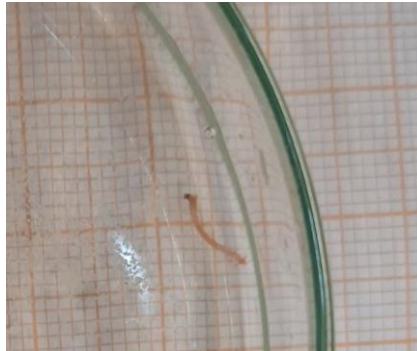
<b><i>Chironomus sancticaroli</i></b>	
<b>Solução-teste</b>	TBBPA + MPs * / água do cultivo da espécie
<b>Volume</b>	250 mL em béqueres de 500 mL
<b>Sedimento</b>	60 g
<b>Organismos por Réplica</b>	10 larvas I ínstar
<b>Tempo de Exposição</b>	10 dias
<b>Número de Réplicas</b>	3
<b>Temperatura</b>	25 ± 2 °C
<b>Fotoperíodo</b>	12h claro: 12h escuro
<b>Alimentação</b>	2 mg por réplica de ração Tetramin® no início e no 5º dia
<b>Aeração</b>	1 bolha por segundo
<b>Ponto final</b>	Análise do comprimento corporal
<b>Metodologia</b>	Bernegossi (2022) adaptado de Trivinho-Strixino (1980)

\*combinações das concentrações

Fonte: o autor

Ao final do teste, os organismos foram dispostos em placas de petri de vidro sobre papel milimetrado, e fotografias foram feitas com um celular Samsung Galaxy A55, a fim de medir o comprimento corporal dos indivíduos dos diferentes tratamentos TBPPA + MP com o auxílio do *software* ImageJ®.

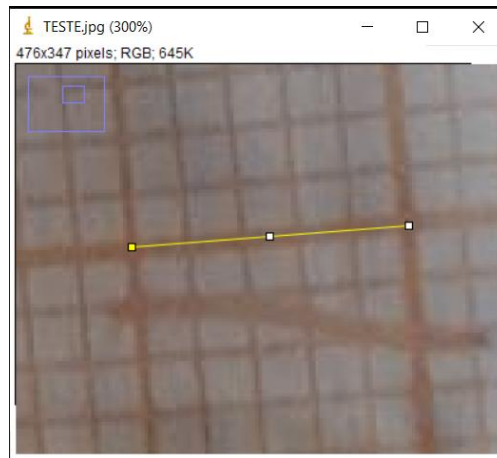
Figura 9 – Exemplo de foto de indivíduo da espécie *Chironomus sancticaroli* após 10 dias de teste



Fonte: o autor

O procedimento no *software* foi o seguinte: primeiro, estabeleceu-se a escala de 5 cm do papel milimetrado conforme mostra a figura 10.

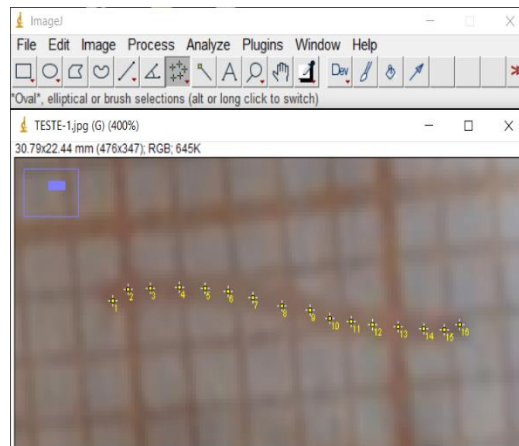
Figura 10 – Estabelecimento da escala do papel milimetrado utilizando o Software ImageJ®



Fonte: ImageJ®

Em seguida, utilizando a ferramenta *multi-point* do programa, foram colocados pontos percorrendo todo o corpo das larvas (figura 11).

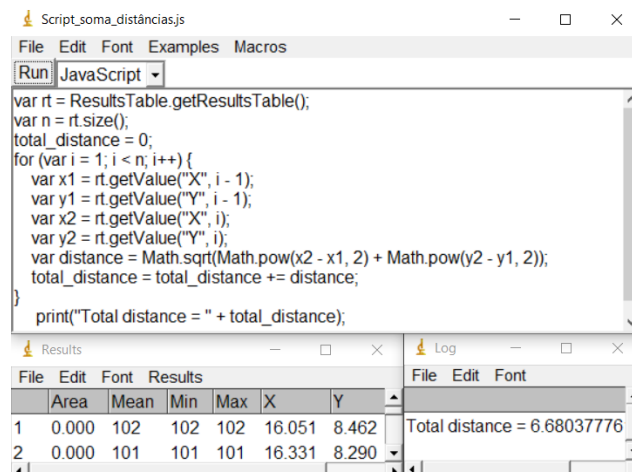
Figura 11 – Estabelecimento da escala do papel milimetrado utilizando o Software ImageJ®



Fonte: ImageJ®

Por fim, obtidas as coordenadas X e Y de cada ponto, foi elaborado um script em *Javascript* na aba *log* do programa (figura 12), a fim de calcular a distância entre as sequências de pontos e retornar o valor do comprimento corporal das larvas em milímetros.

Figura 12 – Script para cálculo do comprimento corporal da larva, resultados da análise do programa com coordenadas para os dois primeiros pontos e resultado do cálculo realizado pelo script na aba *log*



Fonte: o autor

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Teste de ecotoxicidade aguda utilizando a espécie *Allonais inaequalis*

##### 3.1.1 Sobrevivência

Os resultados em organismos vivos do teste de ecotoxicidade aguda utilizando a espécie *A. inaequalis* se encontram na tabela 9.

Tabela 9 - Organismos da espécie *A. inaequalis* vivos após 96 h do teste de ecotoxicidade aguda.

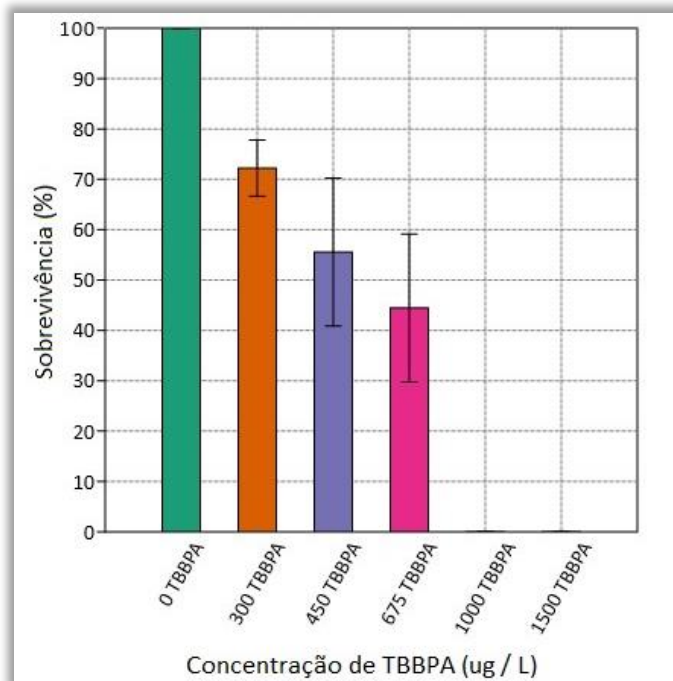
MP (mg/L)	TBBPA (µg/L)	0 TBBPA	300 TBBPA	450 TBBPA	675 TBBPA	1000 TBBPA	1500 TBBPA
0 MP	Replica 1	6	4	5	4	0	0
	Replica 2	6	5	2	1	0	0
	Replica 3	6	4	3	3	0	0
20 MP	Replica 1	6	4	5	0	0	0
	Replica 2	6	6	3	0	0	0
	Replica 3	6	2	6	0	0	0
40 MP	Replica 1	6	4	1	2	0	0
	Replica 2	6	5	3	2	0	0
	Replica 3	6	4	4	1	0	0
80 MP	Replica 1	6	6	5	1	0	0
	Replica 2	5	5	4	1	0	0
	Replica 3	6	6	4	0	0	0
160 MP	Replica 1	6	6	2	4	0	0
	Replica 2	6	4	3	1	0	0
	Replica 3	6	4	4	3	0	0
320 MP	Replica 1	6	6	6	4	0	0
	Replica 2	6	4	2	4	0	0
	Replica 3	5	6	5	3	1	0

Fonte: o autor

Através de análise visual da tabela, observa-se que a influência do MP isolado na sobrevivência dos organismos não parece ser significativa. O TBBPA, entretanto, aparenta potencial danoso à espécie, sendo que em concentrações maiores que 1000 µg / L, praticamente não houve organismos vivos após as 96 horas do teste.

Um gráfico gerado a partir do software Past® (Paleontological Statistics) versão 4.08 mostrou que a taxa de sobrevivência dos organismos expostos somente ao TBBPA foi decaindo conforme o aumento da concentração (figura 13). A taxa de sobrevivência mostrou-se abaixo de 50% na concentração de 675 µg / L TBBPA, e 0% nas concentrações superiores. Os gráficos gerados pelo programa contêm barra de erro padrão.

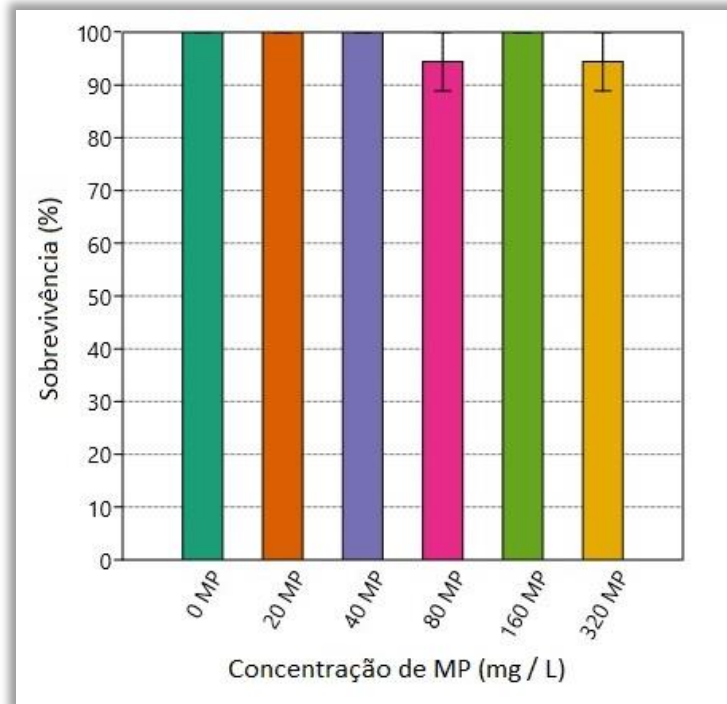
Figura 13 - Taxa de sobrevivência *Allonais inaequalis* nas concentrações isoladas de TBBPA



Fonte: Past 4.08

Ao analisar a influência do MP isolado nos organismos (concentrações sem o TBBPA), podemos observar que a substância não tem efeito aparente na sobrevivência, conforme consta no gráfico da figura 14.

Figura 14 - Taxa de sobrevivência *Allonais inaequalis* nas concentrações isoladas de MP



Fonte: Past 4.08

Para identificar se a interação desses dois poluentes causou efeito na espécie, foi realizado através do software Past® um teste estatístico denominado Two-way ANOVA (Análise de variância com dois fatores). O resultado do teste apontou que as diferentes concentrações de TBBPA influenciaram na taxa de sobrevivência dos organismos (p-valor < 0,05), já as concentrações de MP não influenciaram (p-valor > 0,05). O teste, no entanto, indicou que a interação entre esses dois fatores influencia na taxa de sobrevivência ( p-valor <0,05), conforme a tabela 10.

Tabela 10 - Resultados teste estatístico Two-way Anova para o teste de ecotoxicidade aguda com *Allonais inaequalis*

<b>TBBPA</b>	<b>3,7E-36</b>
<b>MP</b>	<b>0,09847</b>
<b>Interação</b>	<b>0,009638</b>

Fonte: Past 4.08

Ao aplicar o teste de Tukey para verificar com mais detalhes como as concentrações de TBBPA interagem com a taxa de sobrevivência, observou-se que a partir da concentração 300

$\mu\text{g} / \text{L}$  há evidência de diferença estatística significativa comparada ao controle ( $p\text{-valor} < 0,05$ ), ou seja, todas as concentrações causaram efeito agudo significativo nos organismos.

Tabela 11 - Resultados teste estatístico post-hoc de Tukey nas diferentes concentrações de TBBPA para o teste de ecotoxicidade aguda com *Allonais inaequalis*

TBBPA	0 $\mu\text{g} / \text{L}$	300 $\mu\text{g} / \text{L}$	450 $\mu\text{g} / \text{L}$	675 $\mu\text{g} / \text{L}$	1000 $\mu\text{g} / \text{L}$	1500 $\mu\text{g} / \text{L}$
0 $\mu\text{g} / \text{L}$	-	0,001769	1,825E-09	0	0	0
300 $\mu\text{g} / \text{L}$	0,001769	-	0,01118	0	0	0
450 $\mu\text{g} / \text{L}$	1,825E-09	0,01118	-	2,512E-07	0	0
675 $\mu\text{g} / \text{L}$	0	0	2,512E-07	-	2,512E-07	1,126E-07
1000 $\mu\text{g} / \text{L}$	0	0	0	2,512E-07	-	1
1500 $\mu\text{g} / \text{L}$	0	0	0	1,126E-07	1	-

Fonte: Past 4.08

Já ao aplicar o teste de Tukey para verificar se as concentrações de MP interagem com a taxa de sobrevivência, observamos que não há evidência estatística de que o composto isolado cause efeito agudo ( $p\text{-valor} > 0,05$ ), ou seja, nenhuma concentração de MP causou efeito agudo significativo no organismo.

Tabela 12 - Resultados teste estatístico post-hoc de Tukey nas diferentes concentrações de MP para o teste de ecotoxicidade aguda com *Allonais inaequalis*

MP	0 mg / L	20 mg / L	40 mg / L	80 mg / L	160 mg / L	320 mg / L
0 mg / L	-	0,9283	0,9283	1	1	0,5156
20 mg / L	0,9283	-	1	0,9283	0,9283	0,08889
40 mg / L	0,9283	1	-	0,9283	0,9283	0,08889
80 mg / L	1	0,9283	0,9283	-	1	0,5156
160 mg / L	1	0,9283	0,9283	1	-	0,5156
320 mg / L	0,5156	0,08889	0,08889	0,5156	0,5156	-

Fonte: Past 4.08

Por fim, calculou-se o LC50 do TBBPA fixando as concentrações de MP.

Tabela 13 – LC50 do TBBPA calculado para as diferentes concentrações de MP fixadas para o teste de ecotoxicidade aguda da espécie *Allonais inaequalis*

MP	0 mg / L	20 mg / L	40 mg / L	80 mg / L	160 mg / L	320 mg / L
LC50 TBBPA (µg / L)	507,6917	505,0554	426,3299	521,3282	494,6876	745,8477

Fonte: AATBIO EC50 Calculator

O LC50 médio para o teste de ecotoxicidade aguda com a espécie *A. inaequalis* foi calculado em 533,49 µg / L TBBPA.

O teste Two-way ANOVA acusou que a interação entre o TBBPA e o MP foi responsável pelo aumento do efeito agudo de ecotoxicidade que os contaminantes isolados teriam sobre a espécie (p-valor = 0,009638 < 0,05).

### 3.1.2 Natação

Para a análise do efeito dos contaminantes na natação dos organismos, com o auxílio do software Tracker®, a média da trajetória dos organismos vivos e visíveis de cada concentração foi calculada. Os valores resultantes se encontram na tabela 14.

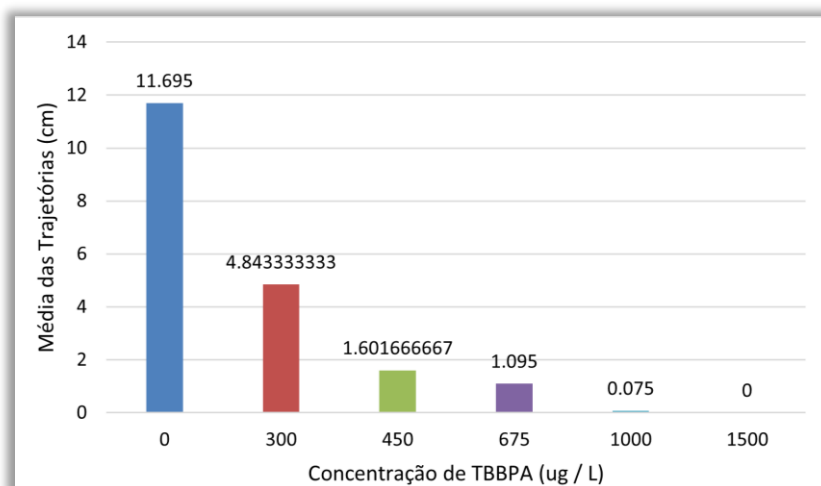
Tabela 14 – Média das trajetórias percorridas por cada organismo visível ao final do teste de ecotoxicidade aguda, em 30 segundos de filmagem

MP (mg / L)	0 mg / L	20 mg / L	40 mg / L	80 mg / L	160 mg / L	320 mg / L
TBBPA (µg / L)						
0 µg / L	12,80 cm	10,95 cm	12,32 cm	10,93 cm	12,60 cm	10,57 cm
300 µg / L	5,07 cm	5,19 cm	4,26 cm	4,59 cm	4,14 cm	5,81 cm
450 µg / L	1,15 cm	2,07 cm	1,98 cm	1,34 cm	1,51 cm	1,56 cm
675 µg / L	1,42 cm	0,95 cm	1,34 cm	1,12 cm	0,55 cm	1,19 cm
1000 µg / L	0	0	0	0	0	0,45 cm
1500 µg / L	0	0	0	0	0	0

Fonte: o autor

Um gráfico foi gerado com a média da trajetória de cada concentração de TBBPA para melhor visualização do efeito que o contaminante causa na natação da espécie (figura 15).

Figura 15 – gráfico com a trajetória média dos organismos da espécie *Allonais inaequalis* após o teste de ecotoxicidade aguda da espécie



Fonte: o autor

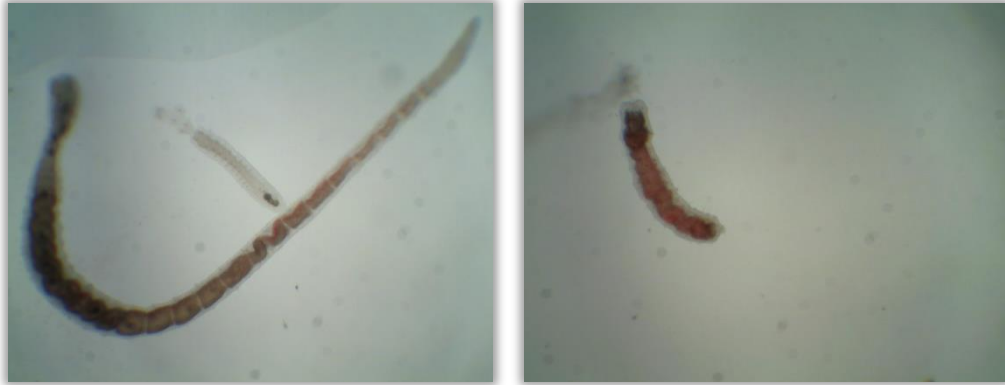
É possível observar que a partir da concentração de 300 µg / L de TBBPA, a natação dos organismos já aparenta prejuízo. Na concentração de 300 µg / L, a média da trajetória dos organismos (4,84 cm) foi 41,38 % da média da concentração de 0 µg / L TBBPA (11,69 cm). Na concentração de 450 µg / L (1,60 cm), foi de 13,69%.

### 3.1.3 Ingestão do MP

Por meio das fotos dos organismos, observamos indícios de que o organismo ingeriu o microplástico (partículas escuras no tubo digestivo), assim como já observado por Castro et al. 2020b. Também houve instâncias em que o organismo recém-separado durante sua fissão (processo reprodutivo) manteve partículas de MP em seu tubo digestivo, como observado em um organismo da concentração 0 µg / L TBBPA e 80 mg / L MP (figura 16:a).

Existem também indícios de que organismos previamente registrados com MP em seu tubo digestivo liberam a substância em meio limpo, mostrando que existe a possibilidade do organismo expelir as partículas de MP (figura 16:b). No total, foram observadas 7 instâncias em que um organismo se dividiu no pós-teste, sendo que em 2 delas é possível observar com clareza a presença de MP no tubo digestivo do indivíduo recém-dividido (figura 16:a e figura 17).

Figura 16 - a) Primeiro registro de presença de MP Polietileno em *Allonais inaequalis* recém dividido (pelo processo de reprodução). b) indivíduo que havia sido dividido após 48h em meio limpo, sem a indicação clara da presença de MP no tubo. Concentração: 0 TBBPA e 80 MP (réplica 1)



Fonte: o autor

Figura 17 – Segundo registro presença de MP Polietileno em *Allonais inaequalis* recém dividido.  
Concentração: 0 TBBPA e 160 MP (réplica 1)



Fonte: o autor

Ao fim do teste de ecotoxicidade aguda, foram monitorados 180 indivíduos, representantes de todas as réplicas com organismos vivos. Desses, 154 pertenciam a réplicas de combinações contendo o microplástico polietileno. Houve 44 registros de indivíduos com MP em seus tubos digestivos, e 17 casos em que os indivíduos expeliram o MP enquanto vivos, sendo todos os 17 registros no período de 24 horas de pós-teste. A quantidade de indivíduos vivos ia decaindo ao longo do tempo, conforme mostra a tabela 15.

Tabela 15 – Dados de organismos sobreviventes do pós-teste de ecotoxicidade aguda com a espécie *Allonais inaequalis*

MP (mg / L )	Organismos inicialmente armazenados em meio limpo pós-teste	Vivos 24h pós-teste	Vivos 48h pós-teste	Vivos 72h pós-teste
0	31	18	7	0
20	26	10	5	1
40	29	17	6	0
80	29	12	4	1
160	33	13	1	0
320	36	18	6	0

Fonte: o autor

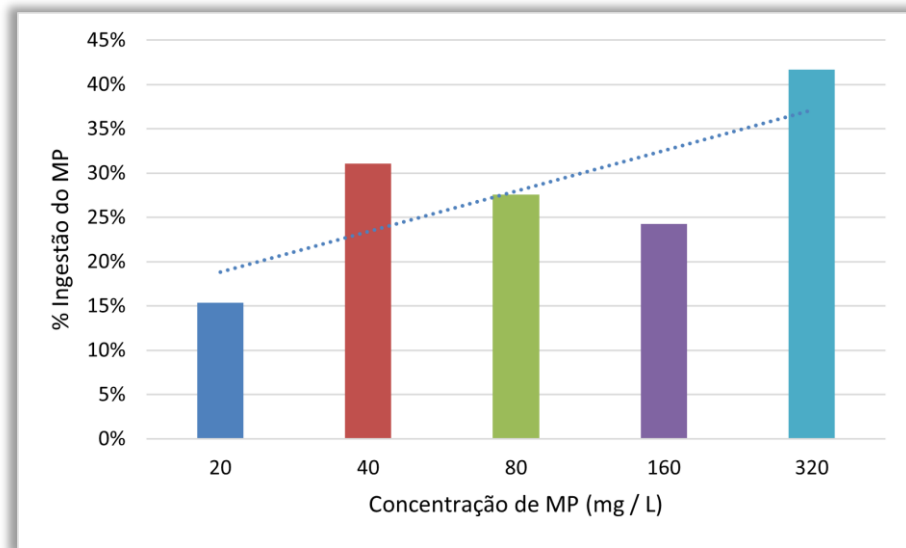
Na tabela 16, estão dispostos os dados de organismos registrados com as partículas de Polietileno em seus tubos digestivos, agrupados por concentração de MP. Os gráficos das figuras 18 e 19 retratam as porcentagens de ingestão e expulsão do MP agrupadas por concentração. Os gráficos apresentam linha de tendência.

Tabela 16 – Dados de organismos que ingeriram e expeliram o MP durante o pós-teste de ecotoxicidade aguda com a espécie *Allonais inaequalis*

MP (mg / L )	Organismos inicialmente armazenados em meio limpo pós-teste	Quantidade de organismos registrados com MP no tubo digestivo	% ingestão do MP	Quantidade de organismos que expeliram MP	% expulsão do MP
20	26	4	15%	2	50%
40	29	9	31%	5	56%
80	29	8	28%	3	38%
160	33	8	24%	3	38%
320	36	15	42%	5	33%

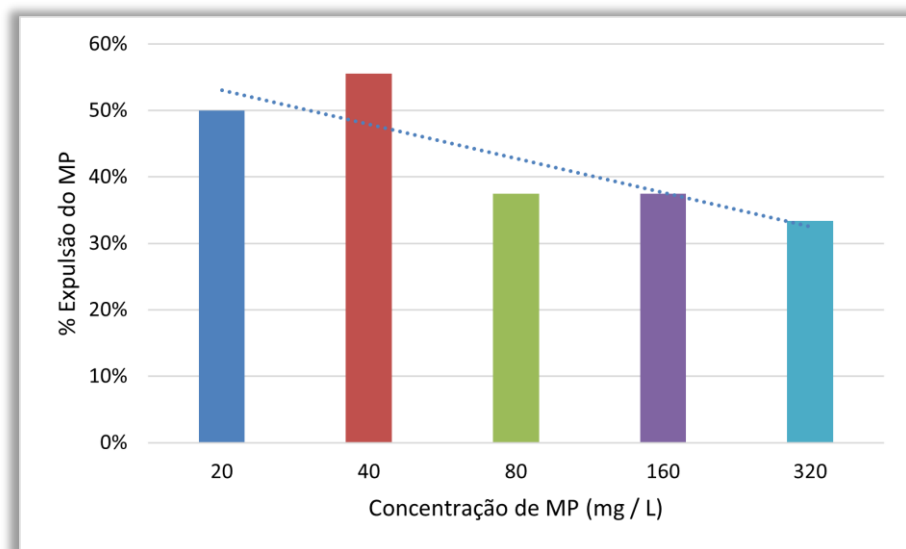
Fonte: o autor

Figura 18 – Taxa de organismos da espécie *Allonais inaequalis* registrados com MP em seu tubo digestivo logo após o teste de ecotoxicidade aguda, agrupados por concentração de MP



Fonte: o autor

Figura 19 – Taxa de organismos da espécie *Allonais inaequalis* que expeliram o MP previamente ingerido de seu tubo digestivo, durante o pós-teste de ecotoxicidade aguda da espécie



Fonte: o autor

Os gráficos indicam que a chance de encontrar MP no tubo digestivo dos indivíduos da espécie *A. inaequalis* é maior conforme a concentração de MP aumenta. Também indicam que é menos provável que o organismo consiga expelir o MP de seu tubo digestivo em concentrações maiores.

### 3.2 Teste de ecotoxicidade aguda com a espécie *Ceriodaphnia silvestrii*

#### 3.2.1 Sobrevivência

Os resultados em organismos vivos do teste de ecotoxicidade aguda com a espécie *C. silvestrii* se encontram na tabela 17.

Tabela 17 – Organismos da espécie *Ceriodaphnia silvestrii* vivos após 48 h do teste de ecotoxicidade aguda

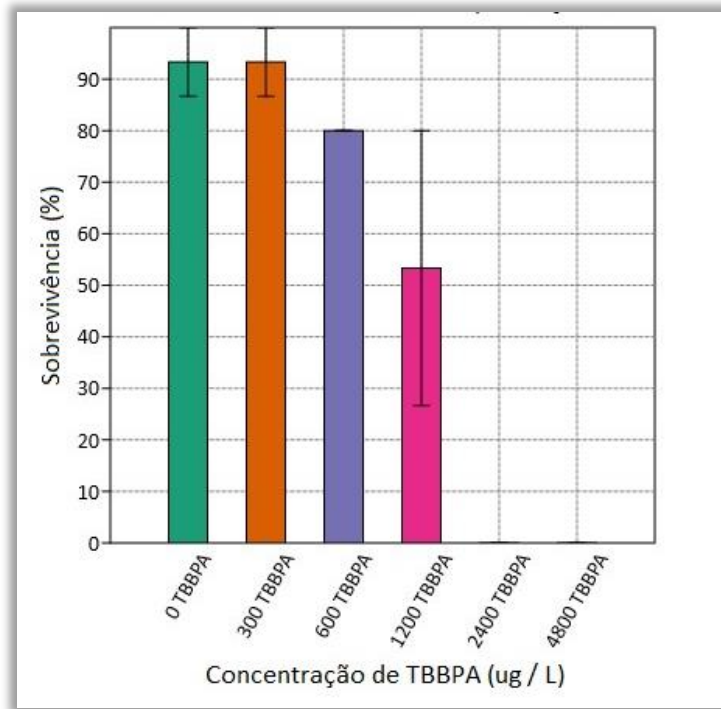
MP (mg/L)	TBBPA (µg/L)	0 TBBPA	300 TBBPA	600 TBBPA	1200 TBBPA	2400 TBBPA	4800 TBBPA
0 MP	Replica 1	5	4	4	4	0	0
	Replica 2	5	5	4	4	0	0
	Replica 3	4	5	4	0	0	0
20 MP	Replica 1	4	5	5	2	0	0
	Replica 2	5	4	5	3	0	0
	Replica 3	4	4	4	2	0	0
40 MP	Replica 1	4	4	4	1	0	0
	Replica 2	5	5	4	3	0	0
	Replica 3	4	5	4	2	0	0
80 MP	Replica 1	4	5	5	3	0	0
	Replica 2	5	4	4	4	0	0
	Replica 3	4	4	4	2	0	0
160 MP	Replica 1	5	4	4	3	0	0
	Replica 2	5	5	4	4	0	0
	Replica 3	4	5	4	3	0	0
320 MP	Replica 1	4	4	3	3	0	0
	Replica 2	5	4	4	3	0	0
	Replica 3	5	4	5	2	0	0

Fonte: o autor

A análise visual da tabela permite observar que o TBBPA apresenta ecotoxicidade aguda para a espécie, sendo nas concentrações de 2400 e 4800 µg / L TBBPA não restaram organismos vivos. O MP isolado novamente não aparenta toxicidade.

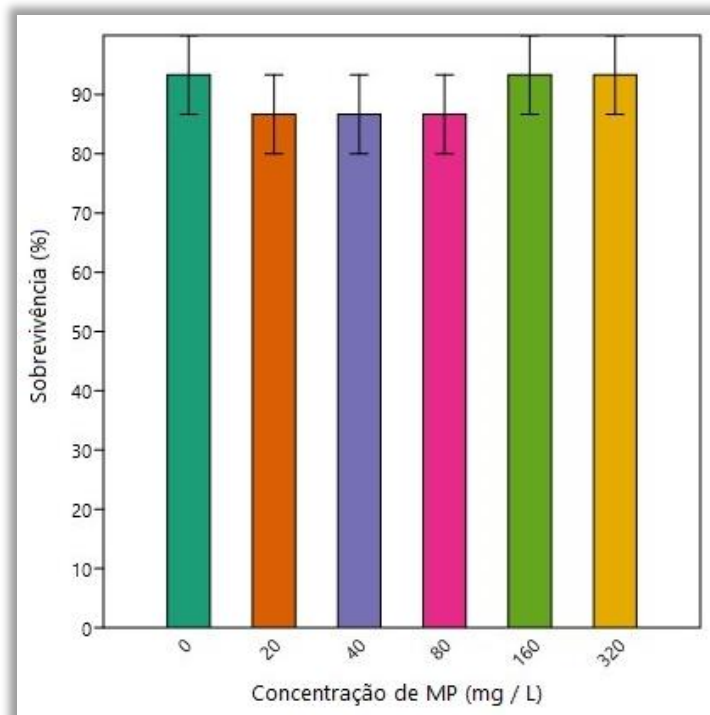
O gráfico da figura 20 representa a taxa de sobrevivência dos organismos expostos somente ao TBBPA, e o gráfico da figura 21 representa a taxa de sobrevivência dos organismos expostos somente ao MP. Os gráficos contêm barra de erro padrão.

Figura 20 - Taxa de sobrevivência *Ceriodaphnia silvestrii* nas concentrações com 0 mg / L de MP



Fonte: Past 4.08

Figura 21 - Taxa de sobrevivência *Ceriodaphnia silvestrii* nas concentrações com 0 µg / L de TBBPA



Fonte: Past 4.08

Para verificar se a interação dos poluentes causa efeito na espécie, foi realizado através do software Past® o teste estatístico Two-way ANOVA. O resultado do teste apontou que as diferentes concentrações de TBBPA influenciaram na taxa de sobrevivência dos organismos ( $p$ -valor  $< 0,05$ ), já as concentrações de MP não influenciaram ( $p$ -valor  $> 0,05$ ). O teste indicou que a interação entre esses dois fatores não influencia na taxa de sobrevivência ( $p$ -valor  $> 0,05$ ), conforme a tabela 18.

Tabela 18 - Resultados teste estatístico Two-way Anova para o teste de ecotoxicidade aguda com *Ceriodaphnia silvestrii*

<b>TBBPA</b>	5,141E-42
<b>MP</b>	0,8128
<b>Interação</b>	0,95

Fonte: Past 4.08

O teste de Tukey para o TBBPA mostra que a partir de 1200  $\mu\text{g} / \text{L}$ , há evidência de efeito tóxico ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) (tabela 19). Já o teste de Tukey para o MP mostra que nenhuma das concentrações interferiram na sobrevivência da espécie.

Tabela 19 - Resultados teste estatístico post-hoc de Tukey nas diferentes concentrações de TBBPA para o teste de ecotoxicidade aguda com *Ceriodaphnia silvestrii*

<b>TBBPA</b>	<b>0 <math>\mu\text{g} / \text{L}</math></b>	<b>300 <math>\mu\text{g} / \text{L}</math></b>	<b>600 <math>\mu\text{g} / \text{L}</math></b>	<b>1200 <math>\mu\text{g} / \text{L}</math></b>	<b>2400 <math>\mu\text{g} / \text{L}</math></b>	<b>4800 <math>\mu\text{g} / \text{L}</math></b>
<b>0 <math>\mu\text{g} / \text{L}</math></b>	-	0,9998	0,5863	0	0	0
<b>300 <math>\mu\text{g} / \text{L}</math></b>	0,9998	-	0,7547	0	0	0
<b>600 <math>\mu\text{g} / \text{L}</math></b>	0,5863	0,7547	-	4,441E-09	0	0
<b>1200 <math>\mu\text{g} / \text{L}</math></b>	0	0	4,441E-09	-	0	0
<b>2400 <math>\mu\text{g} / \text{L}</math></b>	0	0	0	0	-	1
<b>4800 <math>\mu\text{g} / \text{L}</math></b>	0	0	0	0	1	-

Fonte: Past 4.08

Tabela 20 - Resultados teste estatístico post-hoc de Tukey nas diferentes concentrações de MP para o teste de ecotoxicidade aguda com *Ceriodaphnia silvestrii*

MP	0 mg / L	20 mg / L	40 mg / L	80 mg / L	160 mg / L	320 mg / L
0 mg / L	-	0,9998	0,9988	1	0,	0,9942
20 mg / L	0,9998	-	0,9942	0,9988	0,9645	0,9998
40 mg / L	0,9645	0,9942	-	0,9645	0,7547	0,9998
80 mg / L	1	0,9998	0,9645	-	0,9942	0,9942
160 mg / L	0,9942	0,9645	0,7547	0,9942	-	0,887
320 mg / L	0,9942	0,9998	0,9998	0,9942	0,887	-

Fonte: Past 4.08

Por fim, calculou-se o LC50 do TBBPA fixando as concentrações de MP.

Tabela 21 – LC50 do TBBPA calculado para as diferentes concentrações de MP fixadas para o teste de ecotoxicidade aguda da espécie *Ceriodaphnia silvestrii*

MP	0 mg / L	20 mg / L	40 mg / L	80 mg / L	160 mg / L	320 mg / L
LC50 TBBPA (µg / L)	1278,694	1208,2366	1126,7297	1286,1699	1375,5079	1299,789

Fonte: AATBIO EC50 Calculator

O LC50 médio para o teste de ecotoxicidade aguda com a espécie *C. silvestrii* foi calculado em 1262,52 µg / L TBBPA.

### 3.2.2 Ingestão do MP

Durante o processo de fotografia em microscopia óptica, realizado logo após o teste, não foi possível observar ingestão do MP por parte da espécie, visto que as partículas não são pequenas o suficiente para entrar no tubo do microcrustáceo. Podemos observar, por exemplo, na figura 22, um organismo representante da réplica 2 da concentração de 1200 TBBPA + 320 MP, com partículas de micropástico apenas em sua parede externa.

Figura 22 – Indivíduo da espécie *Ceriodaphnia silvestrii* com MP Polietileno ao redor de sua parede externa. Concentração: 320 MP + 1200 TBBPA, réplica 2



Fonte: o autor

### 3.3 Teste de ecotoxicidade aguda com a espécie *Chironomus sancticaroli*

#### 3.3.1 Sobrevivência

Os resultados em organismos vivos do teste de ecotoxicidade aguda com a espécie *C. sancticaroli* se encontram na tabela 22.

Tabela 22 – Organismos da espécie *Chironomus sancticaroli* vivos após 96 h do teste de ecotoxicidade aguda

MP (mg/L)	TBBPA (µg/L)	0 TBBPA	300 TBBPA	450 TBBPA	675 TBBPA	1000 TBBPA
0 MP	Replica 1	6	6	6	6	5
	Replica 2	6	6	6	5	4
	Replica 3	6	6	6	6	6
100 MP	Replica 1	6	6	6	6	5
	Replica 2	6	6	6	6	6
	Replica 3	6	6	6	5	5

Fonte: o autor

Foi aplicado um teste estatístico denominado Two-way ANOVA nos valores de organismos sobreviventes. O resultado do teste apontou que as diferentes concentrações de TBBPA influenciaram na taxa de sobrevivência dos organismos ( $p$ -valor  $< 0,05$ ), as concentrações de MP e a interação entre os dois fatores não influenciaram na taxa de sobrevivência ( $p$ -valor  $> 0,05$ ) (tabela 23).

Tabela 23 - Resultados teste estatístico Two-way Anova para o teste de ecotoxicidade aguda com *Chironomus sancticaroli*

TBBPA	0,01525
MP	0,6874
Interação	0,9528

Fonte: Past 4.08

O teste de Tukey para o TBBPA mostra que na concentração de 1000 µg / L, há evidência de efeito tóxico ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) (tabela 24). Já o teste de Tukey para o MP mostra que a concentração de 100 mg / L não interfere na sobrevivência da espécie (tabela 25).

Tabela 24 - Resultados teste estatístico post-hoc de Tukey nas diferentes concentrações de TBBPA para o teste de ecotoxicidade aguda com *Chironomus sancticaroli*

TBBPA	0 µg / L	300 µg / L	450 µg / L	675 µg / L	1000 µg / L
0 µg / L	-	1	1	0,6995	0,03064
300 µg / L	1	-	1	0,6995	0,03064
450 µg / L	1	1	-	0,6995	0,03064
675 µg / L	0,6995	0,6995	0,6995	-	0,3313
1000 µg / L	0,03064	0,03064	0,03064	0,3313	-

Fonte: Past 4.08

Tabela 25 - Resultados teste estatístico post-hoc de Tukey nas diferentes concentrações de MP para o teste de ecotoxicidade aguda com *Chironomus sancticaroli*

MP	0 mg / L	20 mg / L
0 mg / L	-	0,6874
20 mg / L	0,6874	-

Fonte: Past 4.08

O LC50 do TBBPA foi calculado para as concentrações de 0 e 100 mg / L MP.

Tabela 26 – LC50 do TBBPA calculado para as diferentes concentrações de MP fixadas para o teste de ecotoxicidade aguda da espécie *Chironomus sancticaroli*

MP	0 mg / L	100 mg / L
LC50 TBBPA (µg / L)	1618,0855	2285,3252

Fonte: AATBIO EC50 Calculator

A concentração de 100 mg / L de MP não foi responsável por diminuir o LC50 calculado para o TBBPA por Bernegossi (2022), de 1526 µg / L. A média do LC50 foi calculada em 1951,70 µg / L.

### 3.4 Teste de ecotoxicidade crônica com a espécie *Allonais inaequalis*

#### 3.4.1 Reprodução

A quantidade de organismos vivos ao final dos 10 dias de teste se encontra na tabela 27.

Tabela 27 – Organismos da espécie *Allonais inaequalis* vivos após 10 dias do teste de ecotoxicidade crônica

MP (mg/L)	TBBPA (µg/L)	0 TBBPA	80 TBBPA
0 MP	Replica 1	15	6
	Replica 2	18	6
	Replica 3	17	7
20 MP	Replica 1	25	5
	Replica 2	22	7
	Replica 3	14	11

Fonte: O autor

O teste estatístico Two-way Anova mostrou que a concentração de 80 µg / L de TBBPA teve influência na reprodução da espécie (p-valor < 0,05) (tabela 28). O MP isolado e a interação entre os poluentes não apresentaram efeitos com diferença estatística do controle.

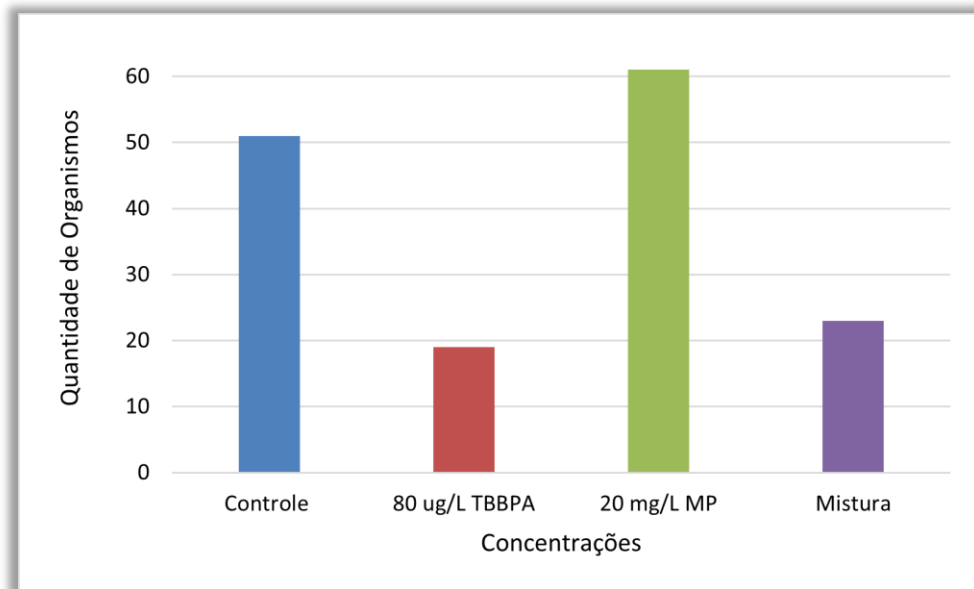
Tabela 28- Resultados teste estatístico Two-way Anova para o teste de ecotoxicidade crônica com *Allonais inaequalis*

TBBPA	0,0003296
MP	0,2296
Interação	0,5607

Fonte: Past 4.08

O gráfico da figura 23 mostra que o controle e a concentração com 20 mg / L MP apresentaram mais reproduções do que as concentrações com a presença do TBBPA.

Figura 23 – Quantidade de indivíduos em cada combinação TBBPA + MP da espécie *Allonais inaequalis* ao fim do teste de ecotoxicidade crônica



Fonte: o autor

### 3.5 Teste de ecotoxicidade crônica utilizando a espécie *Ceriodaphnia silvestrii*

#### 3.5.1 Reprodução

O total de reproduções dos organismos da espécie ao final do teste de ecotoxicidade crônica se encontra na tabela 29.

Tabela 29 – Total de reproduções da espécie *Ceriodaphnia silvestrii* após 7 dias do teste de ecotoxicidade crônica

MP (mg/L)	TBBPA (µg/L)	0 TBBPA	7,5 TBBPA	15 TBBPA	30TBBPA
0 MP	Soma das réplicas	109	77	71	62
20 MP	Soma das réplicas	111	69	71	38

Fonte: Past 4.08

O teste estatístico Two-way Anova mostrou que o TBBPA teve influência na reprodução da *C. silvestrii* (p-valor < 0,05) (tabela 30). O MP isolado e a interação entre os poluentes não apresentaram efeitos com diferença estatística do controle.

Tabela 30 - Resultados teste estatístico Two-way Anova para o teste de ecotoxicidade crônica com *Ceriodaphnia silvestrii*

TBBPA	0,003635
MP	0,2537
Interação	0,4889

Fonte: Past 4.08

O teste de Tukey para o TBBPA mostra que na concentração de 15 µg / L, há evidência de prejuízo à reprodução da espécie (p-valor < 0,05) (tabela 31).

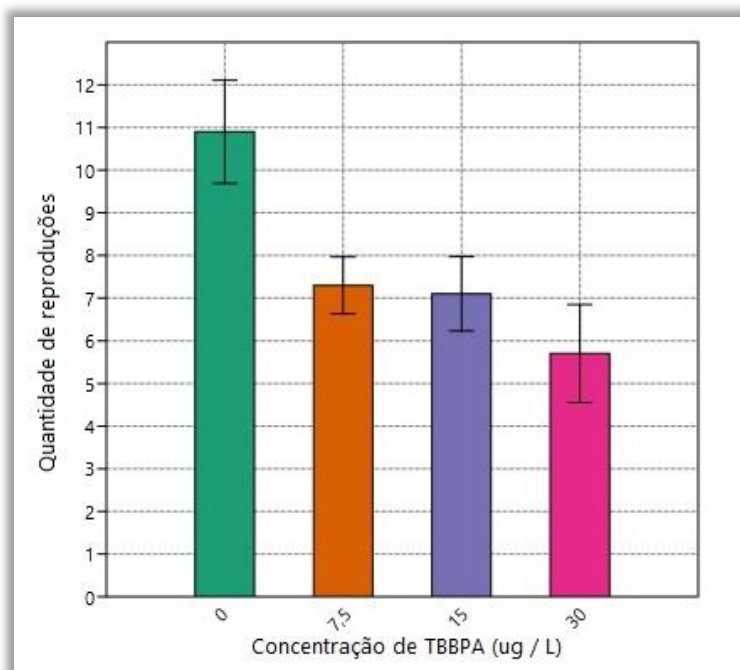
Tabela 31 - Resultados teste estatístico post-hoc de Tukey nas diferentes concentrações de TBBPA para o teste de ecotoxicidade aguda com *Ceriodaphnia silvestrii*

TBBPA	0 µg / L	7,5 µg / L	15 µg / L	30 µg / L
0 µg / L	-	0,06121	0,04325	0,002483
7,5 µg / L	0,06121	-	0,999	0,6712
15 µg / L	0,04325	0,999	-	0,7553
30 µg / L	0,002483	0,6712	0,7553	-

Fonte: Past 4.08

O gráfico da figura 24 ilustra a quantidade de reproduções em cada concentração de TBBPA. O gráfico contém barra de erro padrão.

Figura 2415 – Quantidade de reproduções em cada concentração de TBBPA da espécie *Ceriodaphnia silvestrii* ao fim do teste de ecotoxicidade crônica



Fonte: Past 4.08

O EC50 do TBBPA para o efeito na reprodução da *C. silvestrii* foi calculado para as concentrações de 0 e 20 mg / L MP.

Tabela 32 – EC50 do efeito na reprodução causado pelo TBBPA na espécie *Ceriodaphnia silvestrii*, calculado para a concentração de 0 e 20 mg/ L MP, no teste de ecotoxicidade crônica

MP	0 mg / L	20 mg / L
<b>LC50 TBBPA (µg / L)</b>	58,2909	18,3315

Fonte: AATBIO EC50 Calculator

A concentração de 20 mg / L aparenta contribuir para a toxicidade do TBBPA para a reprodução da espécie *C. silvestrii*. Entretanto, para melhor compreensão dessa hipótese, seria

necessário a realização de testes com uma maior variedade de concentrações. A média dos EC50 foi calculada em 38,3112  $\mu\text{g} / \text{L}$  TBBPA.

### 3.5 Teste de ecotoxicidade crônica utilizando a espécie *Chironomus sancticaroli*

#### 3.5.1 Comprimento corporal

Com os valores de comprimento corporal obtidos, foi realizado um teste estatístico *Two-way ANOVA* através do *software* Past® 4.08. O resultado do teste apontou que o TBBPA influenciou no crescimento corporal dos organismos ( $p$ -valor  $< 0,05$ ). A interação TBBPA + MP não foi responsável por impactar o crescimento dos organismos. O MP apresenta um  $p$ -valor no limite para ser considerado como impactante no crescimento corporal dos organismos. Os resultados do teste se encontram na tabela 33.

Tabela 33 – P-valores resultantes do teste estatístico de análise de variância com dois fatores aplicado nos comprimentos das larvas do teste de ecotoxicidade crônica com a espécie *Chironomus sancticaroli*

<b>TBBPA</b>	2,93E-11
<b>MP</b>	0,05041
<b>Interação</b>	0,2547

Fonte: Past 4.08

Um pós-teste de Tukey mostrou que as três concentrações de TBBPA diferem do controle, e, portanto, influenciaram no crescimento corporal dos organismos ( $p$ -valor  $< 0,05$ ). As concentrações de 20 e 40  $\mu\text{g/L}$  de TBBPA são as únicas que não diferem entre si, conforme pode ser observado na tabela 34.

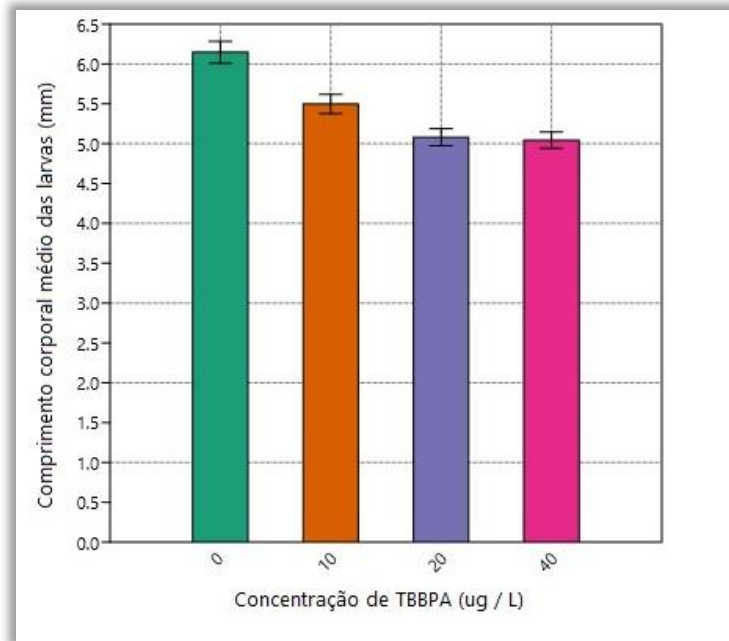
Tabela 34 - P-valores resultantes do teste de Tukey aplicado nas concentrações de TBBPA do teste de ecotoxicidade crônica com a espécie *Chironomus sancticaroli*

<b>TBBPA</b>	<b>0 <math>\mu\text{g/L}</math></b>	<b>10 <math>\mu\text{g/L}</math></b>	<b>20 <math>\mu\text{g/L}</math></b>	<b>40 <math>\mu\text{g/L}</math></b>
<b>0 <math>\mu\text{g/L}</math></b>	-	0,000622	3,355E-09	9,449E-10
<b>10 <math>\mu\text{g/L}</math></b>	0,000622	-	0,05716	0,03158
<b>20 <math>\mu\text{g/L}</math></b>	3,355E-09	0,05716	-	0,9961
<b>40 <math>\mu\text{g/L}</math></b>	9,449E-10	0,03158	0,9961	-

Fonte: Past 4.08

Foi gerado um gráfico de barras para facilitar a observação visual dos efeitos do TBBPA no crescimento corporal dos organismos, contendo também barras de erro padrão.

Figura 25 - Gráfico contendo a média do comprimento corporal dos organismos da espécie *Chironomus sancticaroli* após 10 dias de exposição a diferentes concentrações de TBBPA



Fonte: Past 4.08

Pode-se inferir, portanto, que o TBBPA é capaz de prejudicar o crescimento corporal de larvas da espécie *C. sancticaroli* em concentrações tão pequenas quanto  $10 \mu\text{g/L}$ . Novos estudos com uma gama maior de concentrações são necessários para identificar se a combinação do contaminante TBBPA com microplásticos pode aumentar o efeito prejudicial das substâncias isoladas.

#### 4. CONCLUSÃO

Os testes ecotoxicológicos foram uma ferramenta importante na avaliação dos diferentes efeitos prejudiciais que o Tetrabromobisfenol A e os Microplásticos Polietileno podem causar nas espécies de água doce brasileiras.

Para a Oligoqueta *A. inaequalis*, pôde-se observar que a sobrevivência da espécie foi prejudicada significativamente a partir de 300 µg / L de TBBPA no teste de ecotoxicidade aguda. A natação da espécie também é prejudicada a partir dessa mesma concentração. A ingestão do MP também foi observada, e durante o processo reprodutivo, foi possível observar que os novos organismos podem reter MP em seu tubo digestivo advindos dos organismos parentais. O teste de ecotoxicidade crônica mostrou que a concentração de 80 µg / L de TBBPA causa prejuízos na reprodução da espécie.

Para o microcrustáceo *C. silvestrii*, observou-se que a espécie é um mais resistente ao TBBPA e que não ingere MP. A primeira concentração de TBBPA que causou efeito agudo na sobrevivência foi a de 1200 µg / L. A reprodução da espécie, no entanto, é afetada a partir de concentrações tão pequenas quanto 15 µg / L.

Já a espécie *C. sancticaroli* teve sua sobrevivência prejudicada a partir de 1000 µg / L TBBPA no teste de ecotoxicidade aguda. No teste de ecotoxicidade crônica, observou-se que, a partir de 10 µg / L de TBBPA, o crescimento corporal da espécie já era prejudicado.

Em geral, o Microplástico Polietileno isolado não é um fator contribuinte para os diferentes efeitos de ecotoxicidade avaliados. Entretanto, o teste estatístico Two Way Anova feito com os resultados do teste de ecotoxicidade aguda com a espécie *A. inaequalis* acusaram que a interação TBBPA + MP foi responsável pelo aumento do efeito na sobrevivência dos organismos.

## REFERÊNCIAS

AAT Bioquest, Inc. Quest Graph™ EC50 Calculator. AAT Bioquest. Disponível em: <<https://www.aatbio.com/tools/ec50-calculator>>. Acesso em 01/10/2025.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR 13373: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp.(Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro: ABNT, 2017.

ACAYABA, R. D., MONTAGNER, C. C., & VIDAL, C. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. 2017. <[https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422017000901094&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422017000901094&script=sci_arttext)>.

ANDERSON, P. J., WARRACK, S., LANGEN, V., et al. Microplastic contamination in Lake Winnipeg, Canada. *Environmental Pollution*, 225, 223–231. 2017. <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.02.072>>.

BELY, A. E.; Wray, G. A. Evolution of regeneration and fission in annelids: insights from engrailed and orthodenticle-class gene expression. *Development* 128(14):2781–2791. 2001.

BERNEGOSSI, A. C. Avaliação da toxicidade do retardador de chamas Tetrabromobisfenol A em matriz de efluente doméstico sintético e isolado. 2022. <<https://doi.org/10.11606/T.18.2022.tde-17022023-190848>>.

CASTRO, G. B.; BERNEGOSSI, A. C.; FELIPE, M. C.; CORBI, J. J. Is the development of *Daphnia magna* neonates affected by short-term exposure to polyethylene microplastics? *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, v. 55, n. 8, p. 935–946, 2020a. <<https://doi.org/10.1080/10934529.2020.1756656>>.

CASTRO, G.B., BERNEGOSSI, A.C., PINHEIRO, F.R. et al. Effects of Polyethylene Microplastics on Freshwater Oligochaeta *Allonais inaequalis* (Stephenson, 1911) Under Conventional and Stressful Exposures. *Water Air Soil Pollut* 231, 475, 2020b. <<https://doi.org/10.1007/s11270-020-04845-y>>.

CORBI, J. J.; GORNI, G. R.; CORREA, R. C. An evaluation of *Allonais inaequalis* Stephenson, 1911 (Oligochaeta: Naididae) as a toxicity test organism. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, v. 10, n. 1, p. 7–11, 2015.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R. R.; ESPINDOLA, E. L. G. G.; REGINA, C.; OLIVI, P. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. *Quimica Nova*, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

CASTRO, G.B., BERNEGOSSI, A.C., PINHEIRO, F.R. et al. Effects of Polyethylene Microplastics on Freshwater Oligochaeta *Allonais inaequalis* (Stephenson, 1911) Under Conventional and Stressful Exposures. *Water Air Soil Pollut* 231, 475, 2020b. <<https://doi.org/10.1007/s11270-020-04845-y>>.

EERKES-MEDRANO, D., THOMPSON, R. C., & ALDRIGE, D. C. (2015). Microplastics in freshwater systems: a review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water Research*, 75, 63–82. <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.012>>.

ERIKSEN, M., MASON, S., WILSON, S., et al. (2013). Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Marine Pollution Bulletin*, 77, 177–182. <<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.007>>.

EUROPEAN COMMUNITIES/JOINT RESEARCH CENTRE. European Union Risk Assessment Report -2,2,6,6-tetrabromo-4,4-isopropylidenediphenol. v. 63, p. 170, 2006.

FELIPE, M. C.; BERNEGOSSI, A. C.; CASTRO, G. B.; PINHEIRO, F. R.; NADAI, B. L.; CARDOSO-SILVA, B. N.; CORBI, J. J. The use of an *Allonais inaequalis* reproduction test as an ecotoxicological bioassay. *Ecotoxicology*, v. 29, n. 5, p. 634–638, 2020. Access: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10646-020-02232-1>>.

FONSECA, A. L. Avaliação da qualidade da água do rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados. [s.l.] 220 p. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 1997.

FONSECA, A. L & ROCHA, O. The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a Neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). 2005.

GAYLOR, M.O.; HARVEY, E.; Hale, R.C. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) accumulation by earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to biosolids-, polyurethane foam microparticle-, and Penta-BDE-amended soils. *Environ. Sci. Technol.*, 47 (2013), pp. 13831-13839

GONG, J., & XIE, P. (2020). Research progress in sources, analytical methods, eco-environmental effects, and control measures of microplastics. *Chemosphere*, 254, 1–10. <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126790>>.

HE, Q.; WANG, X.; SUN, P. WANG, Z.; WANG, L. Acute and chronic toxicity of tetrabromobisphenol A to three aquatic species under different pH conditions. *Aquat. Toxicol.*, 164, pp. 145-154, 2015.

HODGSON, E. Introduction to toxicology. In: HODGSON, E. (Ed.). *A textbook of modern toxicology*. 3. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. p. 2–11.

HURLEY, R. R.; WOODWARD, J. C.; ROTHWELL, J. J. Ingestion of Microplastics by Freshwater *Tubifex* Worms. *Environmental Science & Technology*, [s.l.], 2017, v. 51, n. 21, p.12844-12851. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.7b03567>.

LI, S.; MA, R.; ZHU, X.; LIU, C.; LI, L.; YU, Z.; CHEN, X.; LI, Z.; YANG, Y. Sorption of tetrabromobisphenol A onto microplastics: Behavior, mechanisms, and the effects of sorbent and environmental factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 210, p. 111842, 2021. <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111842>>.

LIU, K. et al. A review of status of tetrabromobisphenol A (TBBPA) in China. *Chemosphere*, v. 148, p. 8–20, 2016.

MALKOSKE, T.; TANG, Y.; XU, W.; YU, S.; WANG, H. A review of the environmental distribution, fate, and control of tetrabromobisphenol A released from sources. *Sci. Total. Environ.*, 569–570 (2016), pp. 1608-1617.

MENÉNDEZ-PEDRIZA, A.; JAUMOT, J. Interaction of Environmental Pollutants with Microplastics: A Critical Review of Sorption Factors, Bioaccumulation and Ecotoxicological Effects. *Toxics*, 2020. <<https://doi.org/10.3390/toxics8020040>>.

MIRO TEAM. MIRO® 2022. Disponível em: <<https://miro.com/pt/>>.

OECD. Test No. 235: *Chironomus* sp., Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. 2011.

<<https://doi.org/10.1787/9789264122383-en>>.

PIERONI, M. C.; LEONEL, J.; FILLMANN, G. Brominated flame retardants: a review. *Química Nova*, v. 40, n. 3, 2017.

PITTINGER, C. A.; PECQUET, A. M. Review of historical aquatic toxicity and bioconcentration data for the brominated flame retardant tetrabromobisphenol A (TBBPA): effects to fish, invertebrates, algae, and microbial communities. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 15, p. 14361–14372, 2018.

RICHARDSON, S. D.; KIMURA, S. Y. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry*. 88, 1, 546–582, 2016.

ROCHA, O.; NETO, A.J.G.; DOS SANTOS LIMA, J.C. et al. Sensitivities of three tropical indigenous freshwater invertebrates to single and mixture exposures of diuron and carbofuran and their commercial formulations. *Ecotoxicology* 27, 834–844, 2018.

<https://doi.org/10.1007/s10646-018-1921-9>.

SÁ, L. C. et al. Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future?. *Science of The Total Environment*, v. 645, p.1029-1039, 2018. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.207>.

SUN, B.; YUANAN, H.; CHENG, H.; TAO, S. Releases of brominated flame retardants (BFRs) from microplastics in aqueous medium: Kinetics and molecular-size dependence of diffusion. *Water Research*. v. 151, 215-225, 2019.

TRIVINHO-STRIXINO, S. Estudos sobre a fecundidade de *Chironomus sancarlensis* sp. (Diptera: Chironomidae). 1980. 182 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1980.

U.S. EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Draft Scope of the Risk Evaluation for 4,4'-(1-Methylethylidene)bis[2, 6-dibromophenol]. p. 22, 2020.

U.S. EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Technical support document for water quality-based toxics control. v. 57, 1992.

U.S. EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. TSCA Work Plan Chemical Problem Formulation and Initial Assessment: Tetrabromobisphenol A and Related Chemicals Cluster Flame Retardants. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. 2015.

VIVEIROS, W. *Chironomus sancticaroli* - do cultivo em laboratório ao ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento, 2012, 91f, Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

WAAIJERS, S. L. et al. Toxicity of new generation flame retardants to *Daphnia magna*. *Science of the Total Environment*, v. 463–464, p. 1042–1048, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.110>>.

WOODS, M.N.; STACK, M.E.; FIELDS, D.M.; SHAW, S.D.; MATRAI, P.A.

Microplastic fiber uptake, ingestion, and egestion rates in the blue mussel (*Mytilus edulis*)

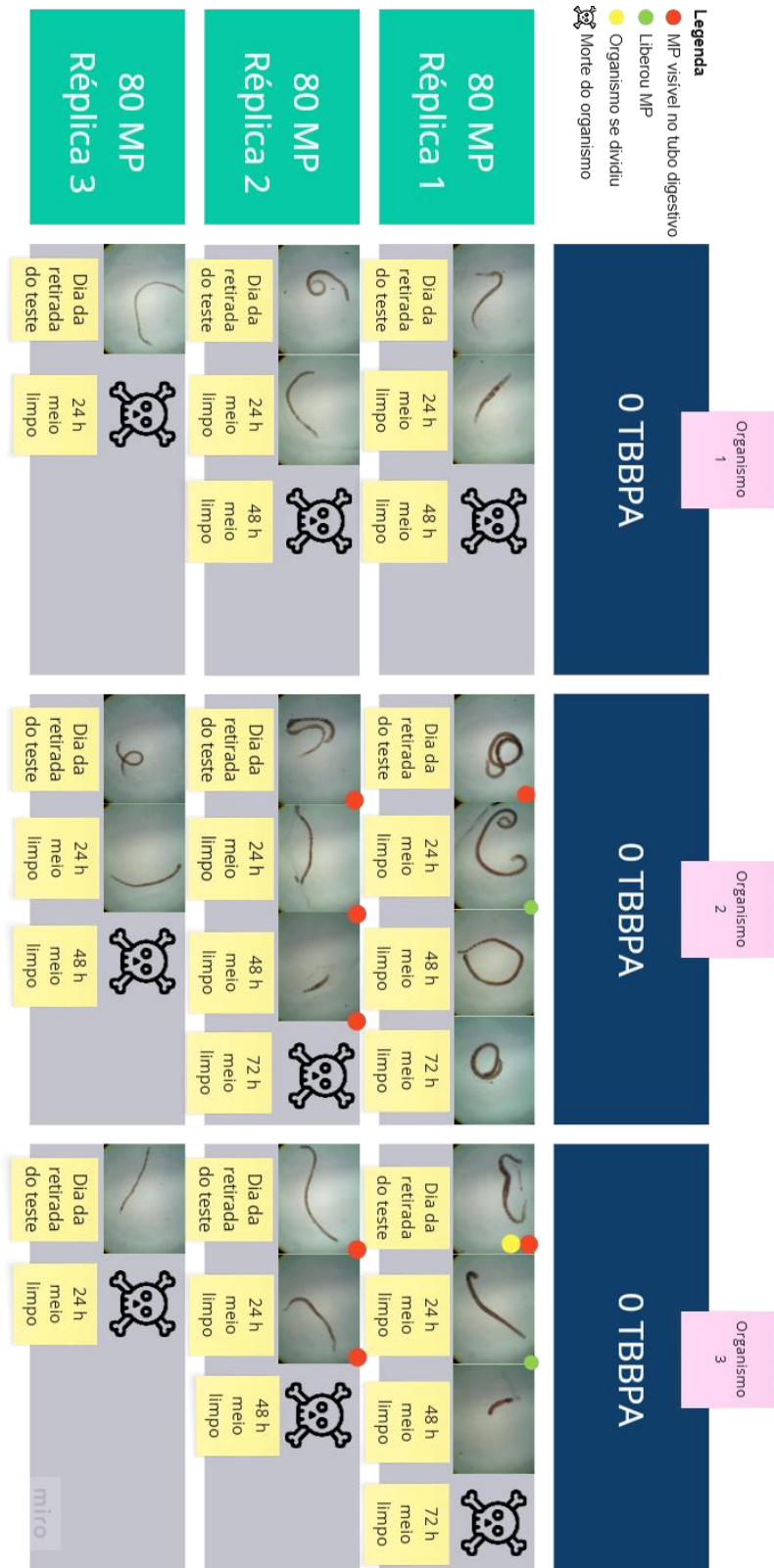
*Mar. Pollut. Bull.*, 137 (2018), pp. 638-645, 10.1016/j.marpolbul.2018.10.061.

YU, Y.; MA, R.; QU, H.; ZUO, Y.; YU, Z.; HU, G.; LI, Z.; CHEN, H.; LIN, B.; WANG, B.; YU, G. Enhanced adsorption of tetrabromobisphenol a (TBBPA) on cosmetic-derived plastic microbeads and combined effects on zebrafish. *Chemosphere*, v. 248, p. 126067, 2020. Acesso: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126067>>.



ANEXO

Anexo 1 - Exemplo de quadro individual (concentração: 0 µg / L TBBPA e 80 mg / L MP)



Fonte: Miro®