

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
ENGENHARIA AMBIENTAL

CAMILA MAGRI MAFFEI

**Efeitos ecotoxicológicos da exposição do invertebrado bentônico *Chironomus sancticaroli*
(Diptera, Chironomidae) ao microplástico polietileno**

São Carlos, SP

2021

Camila Magri Maffei

Efeitos ecotoxicológicos da exposição do invertebrado bentônico *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) ao microplástico polietileno

Versão Corrigida

Monografia apresentada ao curso de graduação em Engenharia Ambiental da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Juliano José Corbi

São Carlos, SP

2021

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).

M187e Maffei, Camila Magri
Efeitos ecotoxicológicos da exposição do
invertebrado bentônico *Chironomus sancticaroli*
(Diptera, Chironomidae) ao microplástico polietileno /
Camila Magri Maffei; orientador Juliano José Corbi. São
Carlos, 2021.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, 2021.

1. Ecotoxicologia. 2. Microplástico. 3.
Macroinvertebrados aquáticos. 4. Contaminantes
emergentes. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): **Camila Magri Maffei**

Data da Defesa: 02/12/2021

Comissão Julgadora:

Resultado:

Juliano José Corbi (Orientador(a))

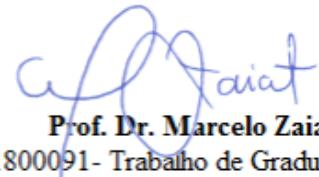
Aprovado

Davi Gasparini Fernandes Cunha

Aprovado

Guilherme Rossi Gorni

Aprovado



Prof. Dr. Marcelo Zaiat

Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação

RESUMO

MAFFEI, C. M. **Efeitos ecotoxicológicos da exposição do invertebrado bentônico *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) ao microplástico polietileno.** 2021. Trabalho de Graduação. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2021.

A entrada de poluentes emergentes em sistemas aquáticos é cada vez mais recorrente em virtude do crescimento da população humana e do desenvolvimento tecnológico. Estudos recentes têm revelado o risco da contaminação plástica em ambientes aquáticos, sobretudo à contaminação originada por microplásticos (partículas poliméricas de origem primária ou secundária com tamanho inferior a 5 mm). Nos últimos anos, tem sido observada a ocorrência de microplásticos em ecossistemas de água doce e toxicidade relacionada às espécies de invertebrados, peixes, aves aquáticas. Entretanto, os efeitos biológicos para muitas espécies-chave de água doce ainda são desconhecidos. Diante deste cenário, neste projeto foram investigados os efeitos ecotoxicológicos de microplásticos do tipo polietileno, de tamanho entre 40-48 μ m, para a espécie de inseto *Chironomus sancticaroli*. Foram conduzidos bioensaios agudo (96h) e crônico (240h), para avaliar os possíveis impactos que estas micropartículas podem acarretar na espécie selecionada. Foram analisados dados de sobrevivência, alteração no tamanho do corpo e também no peso das larvas, quando submetidas às concentrações de 40, 80, 160, 320 e 640 mg L⁻¹. De acordo com os resultados, a presença do microplástico apresentou potencial de toxicidade em *C. sancticaroli*, principalmente no ensaio agudo, no qual afetou a sua sobrevivência. Já no ensaio crônico, a presença do microplástico não afetou significativamente a sobrevivência, bem como o seu peso e comprimento após 10 dias de exposição. Porém, nesse ensaio observou-se uma diferença significativa na sobrevivência entre a solução controle e a solução com concentração de 640 mg MP L⁻¹, indicando uma possível ingestão e efeitos na espécie a longo prazo. Assim, tendo em vista a baixa quantidade de ensaios realizados neste trabalho, seria ideal a realização de mais ensaios de toxicidade, bem como a análise de outros potenciais efeitos, visando a obtenção de resultados mais precisos e conclusivos.

Palavras-chave: Microplásticos. Contaminantes emergentes. Águas continentais. Macroinvertebrados aquáticos. Ecotoxicidade.

ABSTRACT

MAFFEI, C. M. **Ecotoxicological effects of benthic invertebrate *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) exposure to polyethylene microplastic.** 2021. Trabalho de Graduação. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2021.

The entry of emerging pollutants into aquatic systems is increasingly recurrent due to human population growth and technological development. Recent studies have revealed the risk of plastic contamination in aquatic environments, especially contamination caused by microplastics (polymer particles of primary or secondary origin with less than 5 mm size). In the last years, the occurrence of microplastics in freshwater ecosystems and the toxicity related to invertebrate species, fish and waterfowl has been observed. However, the biological effects for many freshwater species are still unknown. Thereby, this project investigated the ecotoxicological effects of polyethylene microplastic, size between 40-48 μ m, for the insect specie *Chironomus sancticaroli*. Short-term (96h) and chronic (240h) bioassays were conducted to analyse the possible impacts that these microparticles may cause on the selected specie. Data on survival, change in body size and larvae weight were analyzed. Data on survival, changes in larval lenght and weight were analyzed when subjected to doses of 40, 80, 160, 320 and 640 mg MP L⁻¹. According to the results, the presence of microplastics presented potential toxicity in *C. sancticaroli*, specially in short-term exposure, which affected their survival. In the chronic bioassay, the presence of microplastic did not significantly affected their survival, weight and length after 10 days of exposure. However, in this assay there was a significant difference in survival between the control solution and the concentration of 640 mg MP L⁻¹, suggesting possibility of ingestion and long-term effects in the specie. Thus, as the low number of tests performed in this work, it would be importante to conduct more toxicity tests, as well as the analysis of other potential effects, aiming to obtain more accurate and conclusive results.

Keywords: Microplastics. Emerging Contaminants. Freshwater. Aquatic Macroinvertebrates. Ecotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais tipos de plásticos produzidos no mundo, sua abreviatura, estrutura química, densidade e aplicações.....	21
Figura 2 – Ciclo de vida de <i>Chironomus</i> sp. A – ovo, B - larva, C – pupa (1 - recente, 2 - madura) e D – mosquito (direita - macho e esquerda - fêmea).....	27
Figura 3 – Cultivo de <i>Chironomus sancticaroli</i>	30
Figura 4 – Seleção das larvas de IV instar para a realização de ensaios agudos.....	31
Figura 5 – Vista geral de um ensaio agudo.....	32
Figura 6 – Vista geral de um ensaio crônico.....	33
Figura 7 – Taxas de sobrevivência média e desvios-padrão para <i>C. sancticaroli</i> sob exposição ao microplástico em ensaio de curta duração (96 h).....	34
Figura 8 – Taxas de sobrevivência média e desvios-padrão para <i>C. sancticaroli</i> sob exposição ao microplástico em ensaio crônico (240 h).....	35
Figura 9 – Box-plot de peso de larvas de <i>C. sancticaroli</i> sob exposição ao microplástico em ensaio crônico (240 h).....	36
Figura 10 – Box-plot de comprimento de larvas de <i>C. sancticaroli</i> sob exposição ao microplástico em ensaios de longa duração (240 h).....	37
Figura 11 – Possíveis cenários de bioacumulação de substâncias por microplásticos.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de MP em corpos d'água ao longo do Mundo.....	24
---------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Ecotoxicologia e poluentes emergentes.....	18
2.2 Microplásticos.....	20
2.3 Medidas para limitar o uso do plástico.....	22
2.4 Impactos de microplásticos em espécies.....	23
2.5 Ocorrência em ambientes aquáticos.....	24
2.6 <i>Chironomus sancticaroli</i>	26
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Microplásticos.....	29
4.2 Seleção das concentrações.....	29
4.3 Organismo-teste, cultivo e manutenção.....	29
4.4 Preparação das soluções-teste de microplásticos.....	30
4.5 Exposições do <i>Chironomus sancticaroli</i> ao microplástico polietileno.....	31
4.5.1 Teste de toxicidade aguda.....	31
4.5.2 Teste de toxicidade crônica.....	32
4.6 Tratamento estatístico dos dados.....	33
5. RESULTADOS.....	34
5.1 Ensaio de toxicidade aguda (96h).....	34
5.2 Ensaio de toxicidade crônica (240h).....	35
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÃO.....	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

O aumento da população humana implicou na elevada demanda por alimentos, água de qualidade, cuidados médicos, terras para agricultura, espaços habitáveis, energia e bens. Essas demandas implicaram no uso de substâncias tais como pesticidas, compostos químicos, polímeros e nanomateriais, e estes estão contaminando o meio ambiente e colocando em risco o bem-estar da espécie humana e dos ecossistemas (DUNLAP e JORGENSON, 2012).

Até o ano de 2016, estima-se que a produção total de plástico esteve em cerca de 335 milhões de toneladas, (PLASTICS EUROPE, 2017). O Brasil é o 4º país na geração de resíduos plásticos no mundo, gerando cerca de um quilo de plástico por habitante por semana. Os primeiros colocados são os Estados Unidos, China e Índia. Além disso, apenas 1,28% do total produzido no Brasil é reciclado, bem abaixo da média mundial de 9%, e uma parcela significativa desses materiais acaba sendo descartado em ruas, córregos e lixões (WWF, 2019).

Assim, o plástico tem sido uma das principais fontes de poluição de florestas e, especialmente, dos oceanos, cerca de 100 mil animais a morte anualmente. A maior parte dos plásticos chega aos oceanos através de rios, os quais historicamente são utilizados pelo homem como local de descarte. Cientistas estimam que em 2050 exista mais plástico do que peixes nos oceanos, caso o consumo e o descarte incorreto continuem nesse ritmo (NATIONAL GEOGRAPHIC, 2021). O plástico possui a característica de acumular no ecossistema, já que é altamente resistente, adsorve substâncias perigosas e degrada em micropartículas, responsáveis pelo sufocamento, imobilização e inanição de muitos seres vivos (PERTUSSATTI, 2020).

Nos últimos anos, os impactos associados a estas partículas no ambiente aquático marinho e continental tem sido explorados. Todavia, o número de estudos publicados relacionados à presença de microplásticos em águas doces é inferior aos relacionados ao ambiente marinho, havendo uma necessidade do aumento do campo de estudo em águas continentais, dado o potencial risco que este contaminante oferece à biota aquática (EERKES-MEDRANO e THOMPSON, 2018).

Desse modo, estudos vem indicando ingestão e efeitos que essas partículas causam nas espécies, como por exemplo em golfinhos, peixes, anfípodes, crustáceos e equinodermos (ZHU et al, 2018; ASCER, 2015; THOMSON et al., 2009; MURRAY e COWIE, 2011; HART, 1991). Porém, ainda há uma carência de informações sobre os potenciais efeitos causados em invertebrados aquáticos (ASCER, 2015). Assim, nesse estudo investigou-se a toxicidade de microplásticos no macroinvertebrado aquático *Chironomus sancticaroli*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ecotoxicologia e poluentes emergentes

O conceito de ecotoxicologia surgiu em 1969, quando o francês René Truhaut a definiu como sendo o estudo qualitativo e quantitativo dos efeitos tóxicos das substâncias naturais ou sintéticos nos ecossistemas, incluindo organismos vivos, populações animais ou vegetais, terrestres ou aquáticas (TRUHAUT, 1977). As etapas em que a ecotoxicologia consiste são: determinação dos contaminantes e suas respectivas destinações; estimação do grau de periculosidade para os organismos vivos; analisar os padrões máximos estabelecidos para tal substância; diagnosticar os efeitos no ambiente; e, por fim, tomar medidas controlando tais emissões (de KRUIJF, 1988).

A ecotoxicologia aquática visa analisar os efeitos dos poluentes sobre organismos que sejam representativos no ambiente aquático (RAND, WELLS e MCCARTY, 1995). Os corpos hídricos são expostos constantemente a substâncias tóxicas as quais podem ser lançadas tanto diretamente através de efluentes, quanto indiretamente, através da contaminação do ar e do solo (GHERARDI-GOLDSTEIN et al, 1990). Deste modo, as fontes de emissão de contaminantes podem ser provindas de efluentes industriais (metais pesados, por exemplo), drenagem agrícola (que muitas vezes contém agrotóxicos), derrames acidentais de substâncias químicas e lançamento de esgotos domésticos em rios e mares (ARIAS et al., 2007).

Além de ser o principal receptor dos contaminantes, o ambiente aquático é muito diverso e dinâmico, contendo interações complexas entre os componentes, sejam bióticos ou abióticos (RAND, WELLS e MCCARTY, 1995). Assim, a preocupação com a qualidade e conservação das águas se tornou de suma importância, e nos últimos anos houve um crescente aumento de pesquisas que buscam entender os impactos no ambiente aquático (NEGREIROS, 1997).

A partir da aplicação de ensaios ecotoxicológicos foi possível ter uma maior fiscalização da poluição hídrica, permitindo a criação de padrões de qualidade para águas e efluentes industriais, como a CONAMA 357 e a CONAMA 430, respectivamente. Os ensaios biológicos são importantes porque revelam efeitos que não seriam identificados por análises físico-químicas. No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) são as principais instituições a implementarem regulamentos sobre o uso de bioensaios para monitoramento ambiental (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Porém, embora as metodologias de controle de substâncias químicas em recursos hídricos causada por efluentes industriais, domésticos ou oriundos de atividades agrícolas sejam conhecidas, ainda não são conhecidos parâmetros e técnicas eficientes o bastante para se controlar os agentes poluidores chamados de contaminantes emergentes (ALVES, 1997; NEGREIROS, 1997). Os contaminantes emergentes são classificados como substâncias naturais, sintéticas ou microrganismos que não costumam ser monitorados pois não estão inclusos em legislações, além de apresentarem dificuldade de identificação e manipulação, porém, são possivelmente tóxicos ao ambiente e/ou aos seres vivos (CANELA et al., 2014). Alguns exemplos desses contaminantes são os pesticidas, fármacos, hormônios e microplásticos.

2.2 Microplásticos

Os microplásticos são partículas de plástico praticamente invisíveis a “olho nu”. Não há uma definição sobre seu tamanho padrão, os valores variam de estudo para estudo, sendo essa variação definida por diâmetros entre <1mm e <10mm. Na maior parte dos casos, adota-se um valor médio de diâmetro, <5mm (MOLCARD, et al., 2003). No presente estudo utilizou-se microplásticos de 40-48 µm de diâmetro.

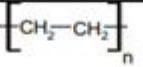
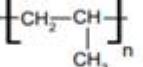
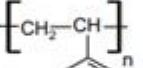
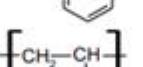
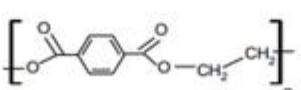
Eles podem ter origem primária ou secundária. Os primários são os advindos de cosméticos, produtos de higiene, lavagem de roupa sintética e desgaste de pneus de automóveis, e da produção de polímeros, podendo assim estar presentes em indústrias e em águas residuais. Já as fontes secundárias são provindas de plásticos maiores, os quais vão se degradando até ficarem menores (WAGNER et al., 2014).

Estas micropartículas são encontradas em diferentes formas (fragmentos, esféricas, fibras, entre outras) e possuem variada constituição química, tais como polietilenos de baixa e alta densidade, poliestireno, policloreto de vinila, polipropileno, poliamidas, policarbonatos, poliéster e polietileno tereftalato (ANDRADY, 2011; COSTA, DUARTE e ROCHA-SANTOS, 2017). A maior parte dos plásticos encontrados nas águas é composta de polietileno, polipropileno e poliestireno (Figura 1). Entre esses, o polietileno é o mais produzido mundialmente, e sua degradação é considerada lenta e difícil, devido a presença do etileno, que provém de hidrocarbonetos fósseis. Além de ser hidrofóbico, também possui alto peso molecular, alta densidade e capacidade de reter substâncias em sua estrutura, como pesticidas e metais pesados (HIDALGO-RUZ et al., 2012).

Os plásticos são produzidos através de derivados de petróleo, e são constituídos por monômeros – moléculas orgânicas. De acordo com a junção de diferentes monômeros se formam diferentes tipos de plástico, cada um com sua característica particular. Como não reagem quimicamente, não possuem capacidade de se desintegrar, apresentando difícil decomposição no meio ambiente (FREUDENRICH, 2007).

Além do próprio polímero, sua composição contém uma série de compostos químicos, potencialmente tóxicos, utilizados para aprimorar o produto em relação à sua flexibilidade, dureza e durabilidade (MARTINS, 2020; DIAS, 2016). Dessa forma, a complexidade dos materiais e a presença de aditivos dificultam o processo de reciclagem, que até hoje, foi inferior a 10% no mundo (GEYER et al., 2017).

Figura 1 - Principais tipos de plásticos produzidos no mundo, sua abreviatura, estrutura química, densidade e aplicações.

Polímero	Abreviatura	Estrutura química	Densidade (g/cm ³)	Principais aplicações
Polietileno	PE		0,91 - 0,96	Sacos de plástico, película plástica, embalagens e redes
Polipropileno	PP		0,85 - 0,91	Cordas, tampas de garrafas, redes e amortecedores de automóveis
Poliestireno	PS		1,04 - 1,10	Utensílios de cozinha descartáveis e contentores de acondicionamento de alimentos
Policloro de vinil	PVC		1,16 - 1,58	Película plástica, embalagens e materiais médico-cirúrgicos
Polietileno tereftalato	PET		1,37 - 1,45	Garrafas de água e de sumos

Fonte: Barbosa, 2017.

As micropartículas são persistentes e podem ser encontradas flutuando na superfície, em suspensão na coluna d'água, ou até mesmo depositadas no fundo. Compostos hidrofóbicos, como os poluentes orgânicos persistentes (POP), são facilmente adsorvidos pelos microplásticos, retendo assim uma alta concentração de componentes tóxicos. Ademais, as partículas são facilmente ingeridas pelos organismos aquáticos, muitas vezes confundidas com alimento, devido ao seu tamanho (SOBRAL, FRIAS E MARTINS, 2011).

Segundo Geyer et al., 2017, até 2017 foram produzidas aproximadamente 63 bilhões de toneladas de plástico, o qual se popularizou na sociedade devido ao seu baixo valor e possibilidade de substituir materiais mais caros. Por ser inerte e inapto a sofrer reações químicas, ele é altamente utilizado em todos os setores – indústrias, comércios e serviços – e pode ser encontrado em quase tudo que consumimos, sendo boa parte de uso único, ou seja, com vida útil muito curta, produzida para ser utilizada uma única vez.

2.3 Medidas para limitar o uso do plástico

Os plásticos de uso único, caracterizados por durar entre 5 minutos e 1 ano, como canudos, garrafas de bebida, embalagens e sacolas são a principal preocupação em relação ao uso do plástico, pois tornam-se rapidamente rejeitos e são pouco reciclados. Assim, recentemente, diversos países estão se comprometendo a reduzir ou até extinguir alguns desses usos (PERTUSSATTI, 2020).

Bangladesh foi o primeiro país a proibir o uso de sacos plásticos. Em seguida, Chile, Nova Zelândia, Eritréia, Somalilândia, Butão, Haiti, Tanzânia, Taiwan, Macedônia e muitos outros também baniram as sacolas. A Costa Rica também se comprometeu a substituir os plásticos de uso único até 2021, lançando o projeto Zona Livre de Plástico. Além disso, alguns países criaram leis que limitam a espessura dos sacos, como Botsuana, China, África do Sul, Etiópia, Uganda e Quênia, e outros criaram impostos e taxas sobre os mesmos, tais como Irlanda, Bélgica, África do Sul, Taiwan e Dinamarca (UNEP, 2016; TENTREE, 2018; DW BRASIL, 2018).

Além da limitação no uso dos macroplásticos, alguns países tomaram a iniciativa de proibir a fabricação dos microplásticos em produtos de higiene, isto é, aqueles que foram propositalmente adicionados. O Canadá adicionou as microesferas à Lista de Substâncias Tóxicas na Lei Canadense de Proteção Ambiental em 2016, proibindo assim a fabricação, importação e venda de produtos contendo a substância (UNEP, 2016). Além desse caso, alguns estados dos Estados Unidos, como Califórnia, New Jersey, Maryland, Colorado, Illinois, Maine e Indiana (UNEP, 2016) e o Reino Unido (THE GUARDIAN, 2018) também adotaram legislações limitando o seu uso.

No Brasil, alguns estados baniram o uso de canudos descartáveis, tais como, Acre, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Norte, Santa Catarina e São Paulo. Além disso, o Distrito Federal proibiu a venda e distribuição de sacolas plásticas e São Paulo proibiu o fornecimento de copos, pratos e talheres de plástico descartável em estabelecimentos comerciais (ZAREMBA, 2020; DISTRITO FEDERAL, 2019; SÃO PAULO, 2019).

Essas medidas são importantes pois os macro e microplásticos são prejudiciais aos animais. Estudos relatam que as partículas podem ser ingeridas por diversos organismos, causando sufocamento, imobilização, inanição, disfunções e até a morte (PERTUSSATTI, 2020).

2.4 Impactos de microplásticos em espécies

Diversos estudos já revelaram a presença de microplásticos em espécies animais. No intestino do golfinho *Sousa chinensis* foram encontradas concentrações de 0,3 a 0,8 itens/g de microplástico (ZHU et al., 2018). Foi indicada também uma alteração no DNA do mexilhão *Perna perna* (ASCER, 2015), ingestão por anfípoda *Orchestia gammarellus* e poliqueta *Arenicola marina* (THOMSON et al., 2009), por crustáceo *Nephrops norvegicus* (MURRAY e COWIE, 2011), por *Daphnia magna* (CANNIFF e HOANG, 2018) e por larvas de equinodermos (HART, 1991).

Estudo realizado durante travessia no Atlântico Norte revelou que 73% dos peixes mesopelágicos coletados continham plástico em seus estômagos, sendo a maior parte do tipo polietileno. Por serem presas de peixes maiores, que por sua vez servem de alimentos para o homem, esses plásticos podem se espalhar facilmente pela cadeia (BARBOSA, 2018).

Assim, organismos maiores, como peixes e aves marinhas, podem vir a ingerir microplásticos direta ou indiretamente, caso se alimentem de organismos já contaminados. Porém, apesar de constatada a ingestão de microplásticos em muitos organismos aquáticos, ainda não existe muitas informações sobre os efeitos destes compostos em larvas de invertebrados aquáticos (ASCER, 2015).

Além da ingestão por animais, estudo realizado pela Orb Media comprovou a presença de microplásticos em garrafas de água potável. Mais de 80% das amostras coletadas ao redor do mundo, inclusive no Brasil, apresentaram as partículas plásticas, e nos Estados Unidos esse valor chegou a 94%. Os efeitos dessas partículas quando ingeridas pelos humanos ainda são desconhecidos. Segundo este estudo, uma garrafa pode conter de dezenas a milhares de partículas, sendo que a média apresentada foi de 314,6 partículas por litro. Isso se dá devido ao fato destas apresentarem dimensão muito pequena, dificultando assim sua retirada nas estações de tratamento de água e esgoto, sendo então descarregadas em rios, lagos e até nos oceanos. Dessa forma, a presença dos microplásticos nos ambientes aquáticos vem sendo cada vez mais investigada.

2.5 Ocorrência em ambientes aquáticos

A ocorrência de microplásticos em água doce tem sido documentada em diferentes concentrações e em diferentes partes do mundo. Nos rios Rhône, Aubonne e Venoge, na Suíça, microplásticos foram detectados em concentrações entre 0,10 e 64 itens/m³ (FAURE et al., 2015). Não obstante, em estuários dos rios chineses Jiaojiang, Oujiang e Minjiang, localizados próximos à zona urbana, foi observada uma variação na concentração de microplásticos entre 100 e 4100 itens/m³ (ZHAO, ZHU e LI, 2015). Nos rios Los Angeles e San Gabriel (EUA), a abundância estimada destas micropartículas chegou a 1.146.418,36 itens/m³ e 51.603 itens/m³, respectivamente (MOORE, LATTIN e ZELLERS, 2011). No estuário Yangtze e no Mar da China encontrou-se 4137,3 e 0,167 itens/m³, respectivamente (ZHAO et al., 2014). No Canadá, nas águas costeiras da Columbia Britânica, 2080 itens/m³ foram contabilizados (DESFORGES et al., 2014). No Brasil estudo realizado nos Rios Cocó e Ceará indicou uma abundância de 0,163 e 0,057 itens/m³, respectivamente (BRITO, 2018). A Tabela 1 apresenta um resumo da abundância de MP nos corpos d'água, de acordo com os trabalhos anteriores já citados.

Tabela 1 - Quantidade de MP em corpos d'água ao longo do Mundo.

Localização	Quantidade de MP (itens/m ³)	Fonte
Rio Los Angeles	1.146.418,36	Moore, Lattin e Zellers (2011)
Rio San Gabriel	51.603	Moore, Lattin e Zellers (2011)
Estuário Yangtze	4.137,3	Zhao et al. (2014)
NE Pacífico e Colúmbia Britânica	2.080	Desforges et al. (2014)
Rios Jiaojiang, Oujiang e Minjiang	100 a 4.100	Zhao, Zhu e Li (2015)
Rios Rhône, Aubonne e Venoge	0,10 a 64	Faure et al. (2015)
Mar da China Oriental	0,167	Zhao et al. (2014)
Desembocadura rio Cocó	0,163	Brito (2018)
Desembocadura rio Ceará	0,057	Brito (2018)

Fonte: Adaptado de Brito, 2018.

O microplástico foi reportado pela primeira vez na década de 70, em águas marinhas (CARPENTER e SMITH, 1972) cerca de 30 anos depois do início das indústrias de plástico (ZHU et al., 2018). Estimou-se que, em 2015, haviam mais de 250.000 toneladas de microplásticos apenas na superfície dos oceanos (ERIKSEN et al., 2014). Seus efeitos têm sido

estudados cada vez com maior frequência, porém ainda há carência de informações sobre seu potencial impacto à biota em águas doces, quando comparado ao ambiente marinho, o qual já possui um campo de estudo significativamente maior (EERKES-MEDRANO e THOMPSON, 2018). Assim, buscando ampliar o conhecimento a respeito dos possíveis efeitos nas diferentes espécies, no presente estudo investigou-se os efeitos tóxicos dos microplásticos no invertebrado aquático *Chironomus sancticaroli*.

2.6 *Chironomus sancticaroli*

Para a realização de estudos ecotoxicológicos, deve-se selecionar a espécie a ser utilizada. Diversas espécies podem ser estudadas, como invertebrados, peixes e algas. No caso dos invertebrados, fatores como facilidade de coleta e de criação em laboratório são determinantes para essa seleção. Além disso, devem ser espécies com papel funcional no ecossistema, e que sua alteração cause desordem (BERTHET, 2015).

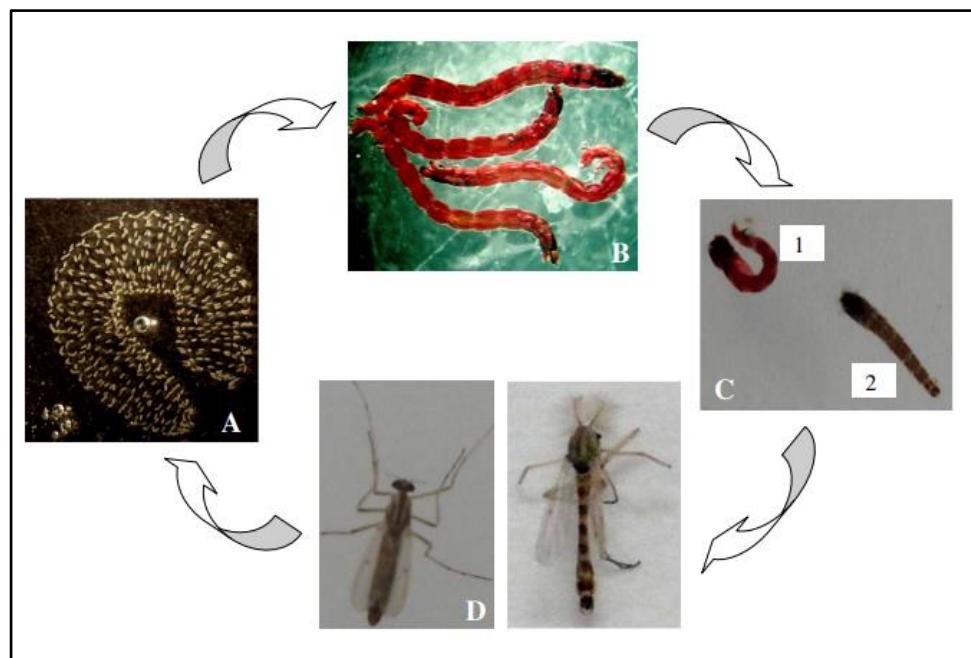
O invertebrado aquático *Chironomus sancticaroli* é um inseto da Ordem Diptera, Família Chironomidae, o qual é bastante presente em ambientes aquáticos do Estado de São Paulo. A espécie *Chironomus sancticaroli* constitui uma grande parcela da biomassa bêntica, pode ser facilmente cultivado em laboratório e possui papel importante na cadeia alimentar e na ciclagem de nutrientes dentro do ambiente aquático. Além disso, ele possui alta tolerância a variações ambientais, como pH, temperatura, profundidade e oxigênio dissolvido. (GIESY e HOKE, 1989; ARMITAGE, 1995).

Essa espécie também possui papel importante por ocupar um nível intermediário na cadeia alimentar, entre produtores primários e consumidores secundários. Sendo assim, eles se alimentam de algas, microorganismos e matéria orgânica e servem de alimento para peixes, insetos e aves, portanto, sua alteração causa um desequilíbrio no ecossistema (PORINCHU e MACDONALD, 2003).

O seu ciclo de vida é relativamente curto e constituído por quatro fases: ovo, larval (composto por quatro instares), pupa e adultos, de acordo com a Figura 2 (VIVEIROS, 2012). Na primeira fase, a fêmea deposita os ovos em um material gelatinoso, rico em nutriente, o qual é dilatado quando em contato com a água. Em seguida à incubação, os ovos eclodem, liberando as larvas. As larvas, por sua vez, apresentam um comportamento bentônico – ou seja, dependem de um substrato – e formam tubos através do próprio substrato para se protegerem de predadores durante o seu desenvolvimento.

Pouco antes de emergir, ao final do 4º instar, ocorre o estágio da pupa, na qual é construído um casulo resistente. Ao maturar, sua coloração é alterada de laranja para castanho e o casulo é rompido para que o adulto consiga emergir. Assim, os mosquitos acasalam, iniciando um novo ciclo (STRIXINO, 1980). O ciclo de vida varia de acordo com a temperatura a qual a espécie está inserida, sendo de 28 a 30 dias quando em temperaturas entre 15 e 19,5°C, e 15 a 17 dias quando em temperaturas entre 21 e 24°C (STRIXINO & STRIXINO, 1985).

Figura 2 - Ciclo de vida de *Chironomus* sp. A – ovo, B - larva, C – pupa (1 - recente, 2 - madura) e D – mosquito (direita - macho e esquerda - fêmea).



Fonte: Viveiros, 2012.

Além do *Chironomus sancticaroli*, estima-se a ocorrência de cerca de outras 15 mil espécies na família Chironomidae, distribuídas por todo o mundo (CRANSTON, 1995). Como exemplo tem-se o *C. riparius*, o qual é comumente presente na Europa, possuindo uma grande quantidade de estudos no exterior, e o *C. tepperi*, abundante na Austrália (DORNFELD, 2006; STEVENS, 1993).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade de microplásticos no macroinvertebrado aquático *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae), quando submetidos a exposições aguda (96h) e crônica (240h).

3.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito tóxico do microplásticos sobre a sobrevivência de *C. sancticaroli*;
- Analisar os efeitos da exposição no comprimento das larvas;
- Analisar os efeitos da exposição no peso das larvas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microplásticos

O microplástico a utilizado foi do tipo polietileno, de alto peso molecular, cor branca, formato esférico, tamanho entre 40-48 μm de diâmetro, densidade 0,94 g/mL a 25°C e ponto de fusão de 144°C. O produto foi adquirido pela empresa Sigma-Aldrich® e armazenado em local escuro, à temperatura ambiente (25 °C).

4.2 Seleção das concentrações

A partir das concentrações utilizadas em trabalhos já realizados, que consistiram na exposição de microplásticos a macroinvertebrados de água doce, foi possível selecionar as concentrações de microplásticos a serem testadas (CANNIFF e HOANG, 2018; REHSE, KLOAS e ZARFL, 2016).

Assim, definiu-se as concentrações em uma série geométrica: 40; 80; 160; 320 e 640 mg.L^{-1} . Essas concentrações foram baseadas no estudo de Silva et al. (2019), que utilizaram concentrações de 62,5, 125, 250, 500 e 1000 mg MP/50g de sedimento para investigar a toxicidade em *C. riparius*. Embora sejam concentrações consideradas altas, Conkle et al. (2017), argumenta que a quantidade de microplástico esteja subestimada, já que cerca de 80% dos estudos que quantificam as micropartículas consideram apenas plásticos $\geq 300 \mu\text{m}$, por usarem redes que só permitem coletar partículas desse tamanho.

4.3 Organismo-teste, cultivo e manutenção

O organismo-teste que foi exposto às concentrações selecionadas é o macroinvertebrado bentônico *Chironomus sancticaroli*. O cultivo da espécie foi realizado no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos, da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo. Conforme procedimento adaptado de Fonseca, 1997 e Trivinho-Strixino, 1980, a espécie foi sido cultivada sob aeração constante em bandejas plásticas (38 cm de comprimento

por 33 cm de largura), que continham 4 L de água reconstituída (EPA, 2002) e uma fina camada de sedimento previamente tratado, com cerca de 0,6 cm de altura. Suportes de madeira revestidos com redes de nylon (42 cm de comprimento, 36 cm de largura e 38 cm de altura) foram utilizados para que fosse evitada a perda dos organismos em fase adulta para o meio exterior (Figura 3).

O cultivo foi mantido a uma temperatura controlada de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h luz/12h escuro. A cultura foi alimentada uma vez por semana, com $22,6 \pm 1$ mg de ração para peixe TetraMin® triturada.

Figura 3 - Cultivo de *Chironomus sancticaroli*.



Fonte: Próprio autor.

4.4 Preparação das soluções-teste de microplásticos

As massas de microplástico necessárias para se alcançar cada concentração selecionada foram pesadas individualmente em balança analítica Sartorius, modelo BP211D, resolução 0,00001g. Essa metodologia foi adotada pois as partículas microplásticas se comportam de forma heterogênea na água, sendo assim, haveria uma alta imprecisão caso as soluções fossem preparadas a partir de uma solução-estoque (REHSE et al., 2016).

Assim, as massas de microplásticos (10; 20; 40; 80 e 160 mg) foram pesadas

individualmente e dispostas em bêqueres de 500 ml contendo 250 ml água reconstituída e 50 g de areia fina autoclavada a 100°C, alcançando assim as concentrações determinadas previamente (40, 80, 160, 320 e 640 mg L⁻¹). Por fim, adicionou-se 2,5 ± 0,5 mg de ração para peixe TetraMin® triturada (USEPA, 2002).

4.5 Exposições do *Chironomus sancticaroli* ao microplástico polietileno

4.5.1 Testes de toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda foi realizado para analisar a sobrevivência do organismo-teste quando exposto às concentrações de microplásticos em um curto período e foi baseado na metodologia de Fonseca (1997). Logo, 6 larvas de IV instar foram separadas do cultivo (Figura 4) e transferidas para bêqueres contendo as soluções-teste especificadas no item 3.5., liberando-os abaixo da superfície da água (Figura 5). Os testes de toxicidade aguda foram estáticos e realizados em triplicata para cada concentração e controle (água reconstituída). Os organismos foram alimentados apenas no início do teste e incubados por 96h e mantidos à temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 12h luz/12h escuro. Ao final das 96 h, cada solução foi separada para a contagem do número de organismos sobrevidentes.

Figura 4 - Seleção das larvas de IV instar para a realização de ensaios agudos.



Fonte: Próprio autor.

Figura 5 – Vista geral de um ensaio agudo.



Fonte: Próprio autor.

4.5.2 Teste de toxicidade crônica

No teste crônico, foram utilizadas larvas de I instar. Para isso, ocorreu a separação de desovas do cultivo e, após sua eclosão, foram utilizadas 15 larvas em cada solução-teste e controle. A duração do teste foi de 240 horas (10 dias) sob aeração constante e a alimentação aconteceu no início (a partir da preparação da solução-teste) e após 4 dias, a partir da adição de $2,5 \pm 0,5$ mg de ração para peixe TetraMin® triturada.

Além da investigação da sobrevivência, o ensaio crônico buscou investigar potenciais efeitos do microplástico sobre o desenvolvimento das larvas. Assim, após o teste, as larvas foram conservadas em álcool 70%, tiveram seu comprimento medido e também foram pesadas em balança de alta precisão. Para a medição do comprimento, foram montadas e fotografadas lâminas com as larvas de cada solução-teste, as quais foram medidas com o auxílio do software Image J.

Em todos os testes, os bêqueres foram cobertos para diminuição do contato com o meio externo. No teste crônico, os bêqueres foram cobertos por tecido tule para impedir a perda de organismos emergidos, atados com elástico látex, para acoplamento das mangueiras de aeração (Figura 6).

Figura 6 – Vista geral de um ensaio crônico.



Fonte: Próprio autor.

4.6 Tratamento estatístico dos resultados

Para tratamento estatístico dos dados, utilizou-se o software PAST. Para isso, primeiramente aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk para definir se os resultados se comportam como uma distribuição normal ou não-normal. Assim, quando $p \geq 0,05$, a distribuição é normal, e quando $p < 0,05$ a distribuição é não-normal.

Caso atenda a uma distribuição normal, deve-se aplicar o teste ANOVA para descobrir se há diferenças significativas entre os resultados (caso $p \leq 0,05$ há diferenças significativas e caso $p > 0,05$, as diferenças são não significativas - considerando uma confiança de 95%). Já para o caso de distribuição não-normal, aplica-se o teste de Kruskal-Wallis. Por último, aplica-se também o teste de Dunn's post-hoc, para avaliar se há diferenças significativas entre as diferentes concentrações e a solução controle.

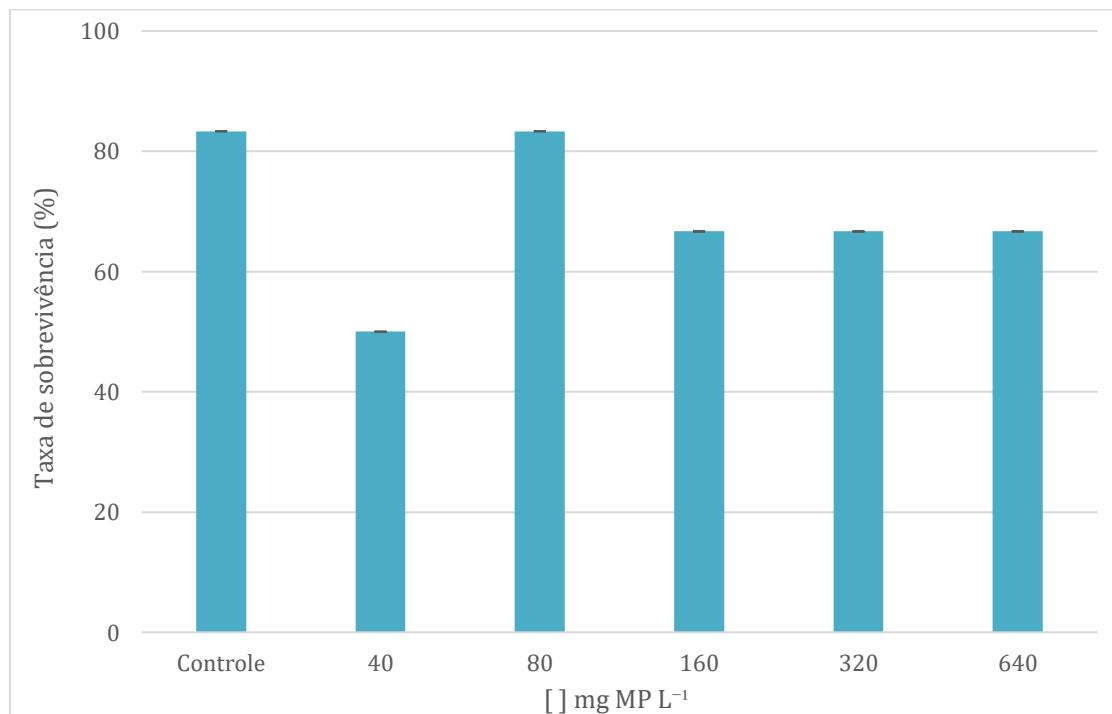
5. RESULTADOS

5.1 Ensaio de toxicidade aguda (96 h)

No ensaio de toxicidade de curta duração, a menor taxa de sobrevivência observada foi em 40 mg MP L^{-1} (50%). Em 160, 320 e 640 mg MP L^{-1} a taxa de sobrevivência foi a mesma (66,67%), enquanto em 80 mg MP L^{-1} observou-se a maior taxa (83,33%), conforme descrito na Figura 7. De acordo com o teste de Kruskal Wallis, não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de sobrevivência entre as concentrações estudadas. Porém, esse resultado não foi conclusivo pois o valor de p foi igual a 0,05138 (muito próximo do limite de 0,05), e observando os resultados é possível notar que houve um impacto do microplástico sobre a sobrevivência dos indivíduos. Comparando a concentração de 40 mg MP L^{-1} e o controle, observou-se uma diferença significativa, segundo o teste de Dunn's post hoc ($p = 0,006432$).

Observa-se também que em nenhuma das concentrações houve desvio padrão, ou seja, os bêqueres de cada concentração apresentaram exatamente o mesmo número de indivíduos sobreviventes.

Figura 7 - Taxas de sobrevivência média e desvios-padrão para *C. sancticaroli* sob exposição ao microplástico em ensaio de curta duração (96 h).



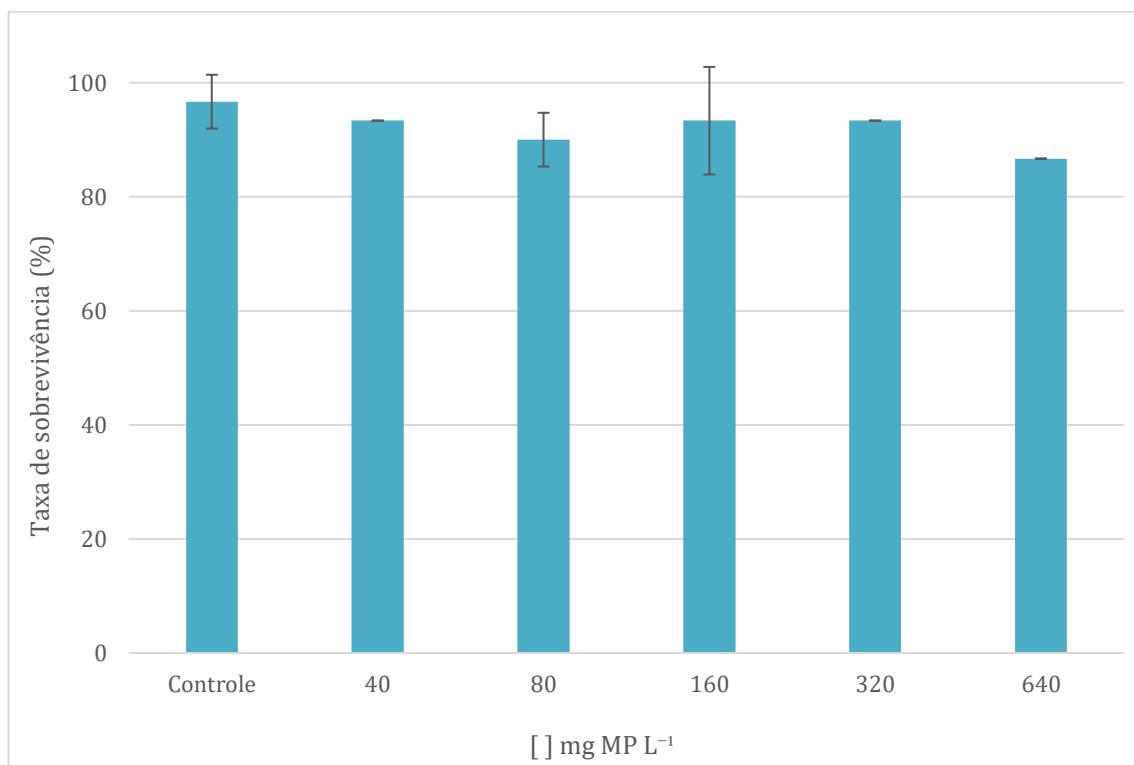
Fonte: próprio autor.

5.2 Ensaio de toxicidade crônica (240 h)

No ensaio crônico, a menor taxa de sobrevivência observada foi em 640 mg MP L^{-1} (86,67%), seguida pela concentração de 80 mg MP L^{-1} (90%). Já em 40, 160 e 320 mg MP L^{-1} a taxa de sobrevivência foi a mesma (93,33%), conforme a Figura 8. Não foram observadas diferenças significativas nas taxas de sobrevivência entre as concentrações estudadas, segundo o teste de Kruskal Wallis ($p = 0,2011$). Entretanto, de acordo com o teste de Dunn's post hoc, observou-se uma diferença significativa entre a concentração de 640 mg MP L^{-1} e a solução controle ($p = 0,01778$).

Na concentração de 160 mg MP L^{-1} observou-se um maior desvio padrão, sendo assim a taxa de sobrevivência variou mais entre as amostras (entre 86,67% e 100%), seguida pela concentração de 80 mg MP L^{-1} , na qual a taxa variou entre 86,67 e 93,33%. Em todas as outras concentrações - 40, 320 e 640 mg MP L^{-1} – não houve desvio padrão.

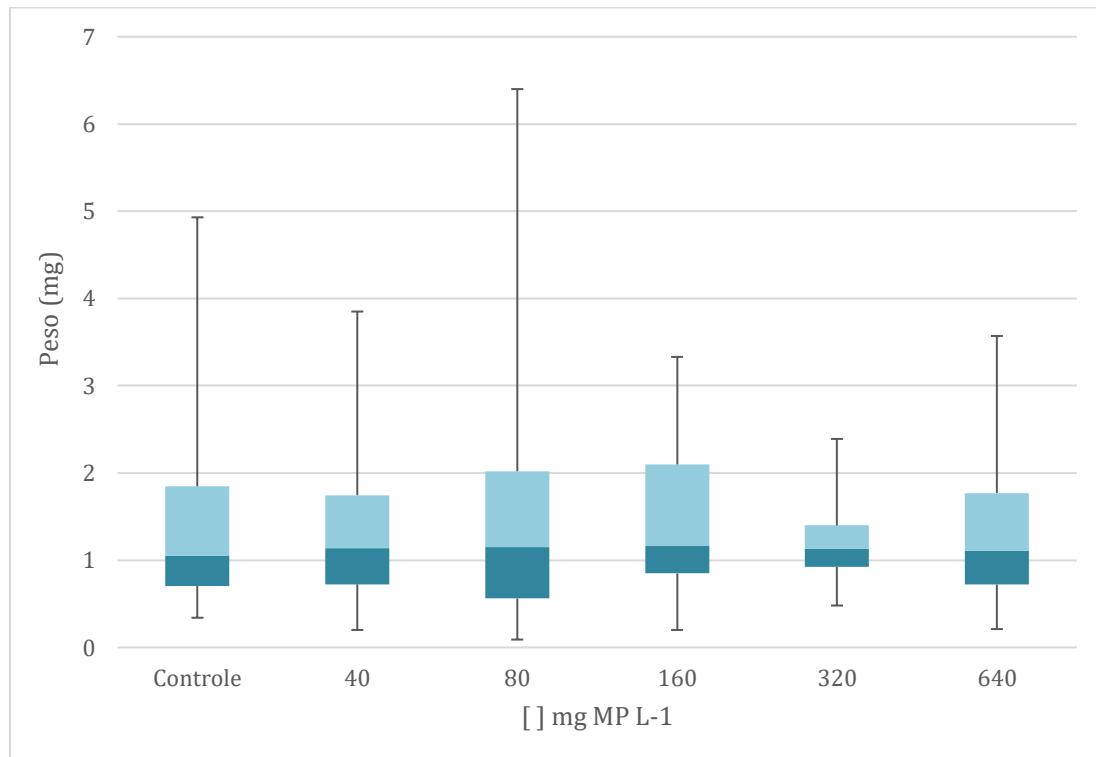
Figura 8 - Taxas de sobrevivência média e desvios-padrão para *C. sancticaroli* sob exposição ao microplástico em ensaio crônico (240 h).



Fonte: próprio autor.

Em relação ao peso das larvas, a menor mediana de peso ocorreu em 640 mg MP L^{-1} (1,11 mg), seguida pela concentração de 320 mg MP L^{-1} (1,13 mg). Já a maior mediana de peso observada foi para a concentração de 160 mg MP L^{-1} (1,165 mg) (Figura 9). Não se observou diferenças significativas entre as concentrações, segundo o teste de Kruskal Wallis ($p = 0,9336$).

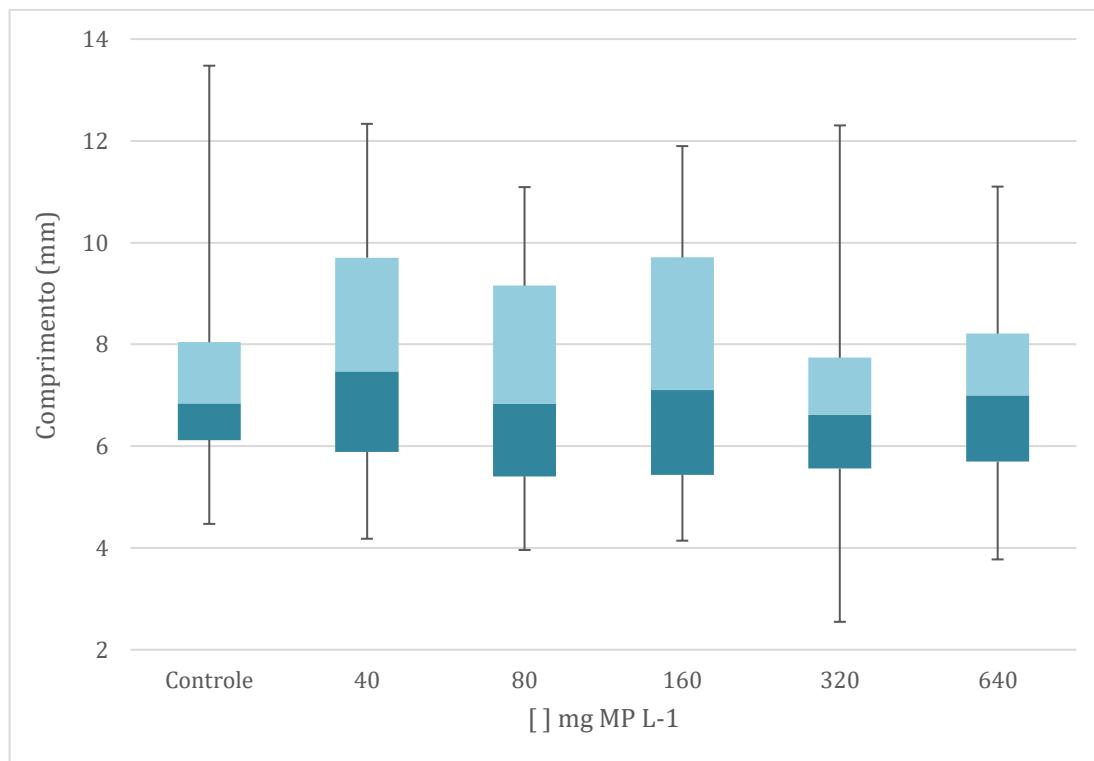
Figura 9 – Box-plot de peso de larvas de *C. sancticaroli* sob exposição ao microplástico em ensaio crônico (240 h).



Fonte: próprio autor.

Em relação ao comprimento das larvas, a maior mediana de comprimento ocorreu em 40 mg MP L^{-1} (7,471 mm), seguida pela concentração de 160 mg MP L^{-1} (7,102 mm). As menores medianas observadas foram para as concentrações de 320 mg MP L^{-1} (6,618 mm), 80 mg MP L^{-1} (6,827 mm) e 640 mg MP L^{-1} (6,994 mm) (Figura 10). Nesse caso, o teste de Kruskal Wallis também não apontou diferenças significativas entre as concentrações ($p = 0,4391$).

Figura 10 – Box-plot de comprimento de larvas de *C. sancticaroli* sob exposição ao microplástico em ensaios de longa duração (240 h).



Fonte: próprio autor.

6. DISCUSSÃO

Nos ensaios realizados, agudo e crônico, o microplástico não teve impacto significativo na sobrevivência de *C. sancticaroli*, segundo o teste estatístico de Kruskal Wallis. Porém, no ensaio agudo esse resultado não foi conclusivo e indicou a ocorrência de impacto do microplástico sobre a sobrevivência, sobretudo na concentração de 40 mg MP L⁻¹. Já no ensaio crônico, observou-se uma diferença significativa entre a solução controle e a solução com concentração de 640 mg MP L⁻¹, maior concentração analisada. Sendo assim, é possível que a espécie tenha ingerido as micropartículas, levando à inanição. Mais testes seriam necessários para a obtenção de resultados mais assertivos.

Estudo realizado por Silva et al. (2019), confirmou a presença de partículas de polietileno no intestino de larvas de *Chironomus riparius*. Comparando diferentes tamanhos de microplástico, as larvas ingeriram maior quantidade de partículas menores (32-63 µm), mesmo quando exposta a solução em que 90% das partículas eram maiores (63-250 µm e 120-500 µm), reforçando a possibilidade de ingestão nesse caso, já que o microplástico utilizado no presente estudo possui tamanho semelhante (40-48 µm).

Assim, caso fosse comprovada a presença de micropartículas no intestino das larvas, poderia haver uma acumulação ao longo da cadeia alimentar, chegando nos consumidores secundários - principalmente peixes - que se alimentariam de presas já contaminadas e, por fim, ao próprio ser humano, novamente se contaminando por consumo indireto (Cho et al., 2021). Sabendo disso, estudos realizados indicam severos efeitos que os microplásticos causam nos peixes, como: redução de crescimento, obstrução do trato intestinal, inflamações, desregulação do metabolismo e perda de energia (HORTON et al., 2017; ROCHMAN et al., 2014.).

Em relação ao comprimento e peso das larvas, aparentemente a presença do microplástico não afetou o desenvolvimento da espécie, já que não foram observadas diferenças significativas entre as soluções. Em ambos os parâmetros – comprimento e peso -, a concentração de 320 mg MP L⁻¹ apresentou resultados mais expressivos, o que poderia indicar que essa é a concentração mais afetada, mas, para isso, mais ensaios seriam necessários para confirmação da hipótese.

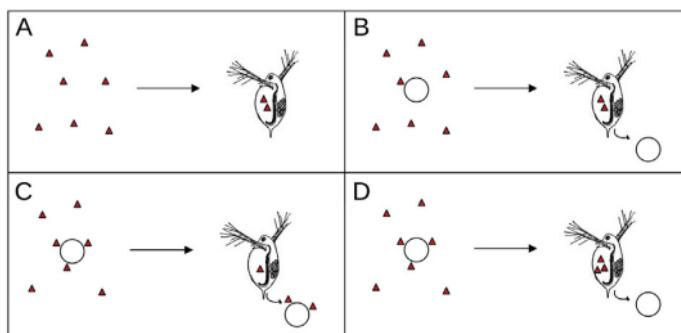
Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Setyorini et al. (2020), em que não foram observados efeitos significativos no peso e comprimento da cabeça das larvas de *Chironomus riparius* quando expostas a microfibras de PET de 50 µm, em relação as amostras controle.

Além do tamanho e da concentração, o formato dos microplásticos também pode interferir nos efeitos causados nos organismos, como argumenta Au et al. (2015). Estudo realizado com o anfípode de água doce *Hyalella azteca*, indicou maior toxicidade com microplásticos de formas irregulares de polipropileno formada por redes marinhas (20-75 mm de comprimento por 20 mm de diâmetro) quando comparados às microesferas de polietileno (10-27 μm). Isso possivelmente ocorre pelas fibras interagirem com o intestino de forma diferente do que as microesferas.

Outro fator a ser considerado é a sorção de substâncias químicas pelo MP. Tourinho et al. (2019) estipularam possíveis cenários a respeito da bioacumulação de substâncias, sendo eles: A – sem a presença de MP's; B – MP's não interferem na bioacumulação; C – redução de bioacumulação; D – vetor para bioacumulação (Figura 11). Essa variação ocorre devido a diferentes afinidades entre produtos químicos e MP's, capacidade de ingestão pelo organismo, tipo de material, tamanho e formato dos MP's.

Assim, Ziajahromi et al. (2019) observaram que a sorção de bifentrina pelos microplásticos antes da exposição reduziu a biodisponibilidade e toxicidade para *Chironomus tepperi*, provavelmente devido a uma baixa dessorção após a exposição. Assim, a bifentrina quando exposta sozinha foi mais tóxica do que quando tendo sua exposição combinada a presença de MP's, em ensaios agudos de 48 horas. Por outro lado, estudo realizado por Qu et al. (2018) mostrou que altas concentrações de MP (50 mg L^{-1}) acumularam maior quantidade de venlafaxina no fígado de peixe *Misgurnus anguillicaudatus*, aumentando a bioacumulação de contaminantes e a toxicidade sobre a espécie.

Figura 11 – Possíveis cenários de bioacumulação de substâncias por microplásticos.



Fonte: Tourinho et al. (2019).

7. CONCLUSÃO

Com os ensaios realizados concluiu-se que o microplástico apresenta potencial de toxicidade e pode ter afetado a sobrevivência de *Chironomus sancticaroli*, sobretudo no ensaio agudo, onde o resultado do teste estatístico foi inconclusivo e a análise dos dados permitiu observar que a contaminação afetou a sobrevivência dos indivíduos. Já no ensaio crônico, a presença do microplástico não afetou significativamente a sobrevivência de *C. sancticaroli*, contudo, observou-se uma diferença significativa entre a solução controle e a solução com concentração de 640 mg MP L⁻¹, indicando a possibilidade de ingestão e efeitos na espécie a longo prazo.

Em relação ao comprimento e peso das larvas, não se observou resultados significativos que poderiam impactar o desenvolvimento da espécie. Entretanto, seria importante a realização de mais ensaios de toxicidade, bem como a análise de outros potenciais efeitos, como ingestão das partículas e combinação do microplástico com substâncias químicas, visando a obtenção de resultados mais conclusivos sobre os impactos do microplástico em invertebrados aquáticos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F. Ministério do meio ambiente quer garantias na recuperação de áreas. Saneamento Ambiental, 48, p. 14-19, 1997.

ARIAS, A. R. L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. Ciência & Saúde Coletiva, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007.

ARMITAGE, P.D. 1995: The behaviour and ecology of adults. In Armitage, P.D., Cranston, P.S. and Pinder, L.C., editors, *The Chironomidae: the biology and ecology of nonbiting midges*. London: Chapman and Hall, 194–224.

ASCER, L.G., 2015. Efeitos de microplásticos na fisiologia do mexilhão *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo- SP.

BARBOSA, A. Efeitos ecotoxicológicos de microplásticos e outros contaminantes ambientais em *Daphnia magna*. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, 2017.

BARBOSA, V. 73% dos peixes em zona do Oceano Atlântico ingerem microplásticos. Revista Exame, 21 fev. 2018. Disponível em: <<https://exame.com/ciencia/mais-de-70-de-peixes-de-zona-no-atlantico-ingerem-microplastico>>. Acesso em: 15/08/2021.

BERTHET, B. (2015). Reference Species. Aquatic Ecotoxicology, 205–227. doi:10.1016/b978-0-12-800949-9.00009-7

BESSELING, E. et al. Nanoplastic Affects Growth of *S. obliquus* and Reproduction of *D. magna*. Environmental Science & Technology, [s.l.], v. 48, n. 20, p.12336-12343, 10 out. 2014.

BRITO, C. D. A. Microplásticos na Plataforma continental do Ceará: Desembocaduras dos Rios Cocó e Ceará. Universidade Federal do Ceará, 2018.

CANELA, M. C. et al. Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil/ Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas. São Carlos: Editora Cubo, 2014.

CANNIFF, P. M.; HOANG, T. C. Microplastic ingestion by *Daphnia magna* and its enhancement on algal growth. *Science of The Total Environment*, [s.l.], v. 633, p. 500-507, ago. 2018.

CARPENTER, E.J., SMITH, K.L., 1972. Plastics on the Sargasso Sea surface. *Science* 175, 1240–1241.

CHO, Y.; SHIM, W. J.; JANG, M.; HAN, G. M.; HONG, S. H. (2021). Nationwide monitoring of microplastics in bivalves from the coastal environment of Korea. *Environmental Pollution*, 270, 116175. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.116175

CONKLE, J. L., BÁEZ DEL VALLE, C. D.; TURNER, J. W. (2017). Are We Underestimating Microplastic Contamination in Aquatic Environments? *Environmental Management*, 61(1), 1–8.

CRANSTON, P.S. 1995. Introduction, p. 1–7. In: Armitage, P.D.; Cranston, P.S.; Pinder, L.C.V. (Eds). *The Chironomidae: The Biology and Ecology of non-biting Midges*. Chapman & Hall, London.

DIAS, D. A. (2016). Migração de contaminantes de materiais de embalagem. INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ. Obtido em 03 de 09 de 2019, de https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/17578/1/Dias_Diogo_Alexandre_Belfo.pdf

DISTRITO FEDERAL. Lei nº 6.322, de 10 de julho de 2019. Dispõe sobre a proibição da distribuição ou venda de sacolas plásticas e disciplina a distribuição e venda de sacolas biodegradáveis ou biocompostáveis a consumidores, em todos os estabelecimentos comerciais do Distrito Federal, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.sinj.df.gov.br/sinj/Norma/271fddce0c8541afbb212a432b10949b/>>. Acesso em: 20/08/2021.

DORNFELD, C. B. (2006). Utilização de *Chironomus* sp (Diptera, Chironomidae) para a avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais. Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, EESC-USP.

DUNLAP, R.; JORGENSEN, A., 2012. Environmental problems. In: The Wiley-Blackwell Encyclopedia of Globalization. Ritzer G. (Ed.). Blackwell Publishing.

DW BRASIL. Chile bane sacolas plásticas no comércio. Disponível em: <<https://www.dw.com/pt-br/chile-bane-sacolas-pl%C3%A1sticas-no-com%C3%A9rcio/a-44949989>>. Acesso em: 28 maio 2019.

EERKES-MEDRANO, D.; THOMPSON, R. Occurrence, fate, and effect of microplastics in freshwater systems. Microplastic contamination in aquatic environments, [s.l.], p. 95-132, 2018.

ERIKSEN, M. et al. Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. PLoS ONE 9(12): e111913. 2014.

FREUDENRICH, C. HowStuffWorks – Como funciona o plástico. Publicado em 14 de dezembro de 2007. Disponível em <http://ciencia.hsw.uol.com.br/plastico.htm>. Acesso em: 29 de agosto de 2020.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. Science Advances. v. 3, n. 7, p. e1700782, 2017.

GHERARDI-GOLDSTEIN et al. Procedimentos para Utilização de Testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB): São Paulo, 1990.

HART, M.W., 1991. Particle captures and the method of suspension feeding by echinoderm larvae. Biol. Bull., 180(1), 12-17.

HIDALGO-RUZ, V.; GUTOW, L.; THOMPSON, R.; THIEL, M. 2012. Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environmental Science and Technology*, 46: 3060-3075.

HORTON, A. A.; WALTON, A.; SPURGEON, D. J.; LAHIVE, E.; SVENDSEN, C. (2017). Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Science of the total environment*, v. 586, p. 127-141. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.01.190

de KRUIJF, H.A.M.; de ZWART, D.; VISWANATHAN, P.N.; RAY, P.K. Manual on Aquatic Ecotoxicology. Ed. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1988, cap. 4.

MARTINS, M, F, S. Poluição por plástico: A crise ambiental e as políticas europeias e nacionais. Dissertação de Mestrado em Gestão do Território, Área de Especialização em Ambiente e Recursos Naturais. Universidade Nova de Lisboa. 2020.

MOLCARD, A., GRIFFA, A.; ALIANI, M. S. (2003). Floating debris in the Ligurian Sea, northwestern Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin*, pp. 1142-1149.

MOORE, C. J.; LATTIN, G.L.; ZELLERS, A.F. Quantity and type of plastic debris flowing from two urban rivers to coastal waters and beaches of Southern California. *Revista de Gestão Costeira Integrada*, [s.l.], v. 11, n. 1, p.65-73, mar. 2011.

MURRAY, F.; COWIE, P.R., 2011. Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1207, 1217.

NATIONAL GEOGRAPHIC. Plásticos chegam aos oceanos por mais de mil rios. Disponível em: <<https://www.nationalgeographicbrasil.com/meio-ambiente/2021/05/plasticos-chegam-aos-oceanos-por-mais-de-mil-rios>>. Acesso em: 25/08/2021.

NEGREIROS, S. CETESB conclui inventário e prepara plano de ação, Saneamento Ambiental, n. 46, p. 30-34, 1997.

ORB MEDIA. Contém plástico: microplástico encontrado em água engarrafada global. Disponível em: <<https://orbmedia.org/stories/cont%C3%A9m-pl%C3%A1stico/>>. Acesso em: 20 maio 2019.

PERTUSSATTI, C. A. Gestão ambiental de resíduos plásticos no Brasil: Subsídios para uma Diretriz Nacional. Escola Nacional de Administração Pública. Brasília, 2020.

PORINCHU, D. F.; MACDONALD, G. M. The use and application of freshwater midges (Chironomidae: Insecta). *Progress In Physical Geography*, [s.l.], 2003, v. 27, n. 3, p.378-422.

QU, H.; MA, R.; WANG, B.; ZHANG, Y.; YIN, L.; YU, G.; DENG, S.; HUANG, J.; WANG, Y. (2018). Effects of microplastics on the uptake, distribution and biotransformation of chiral antidepressant venlafaxine in aquatic ecosystem. *Journal of Hazardous Materials*, 359, 104–112. doi:10.1016/j.jhazmat.2018.07.016.

RAND, G.M.; WELLS, P.G.; MCCARTY, L.S. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*; Rand, G. M., ed.; 2nd ed., Taylor & Francis: Washington, 1995, cap. 1.

REHSE, S.; KLOAS, W.; ZARFL, C. Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilization of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, [s.l.], v. 153, p.91-99, jun. 2016.

ROCHMAN, C. M.; KUROBE, T.; FLORES, I.; TEH, S. J. (2014). Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. *Science of the total environment*, 493, 656-661. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.06.051

SÃO PAULO (Município). Lei nº 17.261, de 13 de janeiro de 2020. Dispõe sobre a proibição de fornecimento de produtos de plástico de uso único nos locais que especifica. Disponível em: <<http://legislacao.prefeitura.sp.gov.br/leis/lei-17261-de-13-de-janeiro-de-2020>>. Acesso em: 20/08/2021.

SETYORINI, L.; MICHLER-KOZMA, D.; SURES, B.; GABEL, F. (2021). Transfer and effects of PET microfibers in *Chironomus riparius*. *Science of The Total Environment*, 757, 143735.

SILVA, C. J. M.; SILVA, A. L. P.; GRAVATO, C.; PESTANA, J. L. T. (2019). Ingestion of small-sized and irregularly shaped polyethylene microplastics affect *Chironomus riparius* life-history traits. *Science of The Total Environment*, 672, 862–868.

SOBRAL, P.; FRIAS, J.; MARTINS, J. Microplásticos nos oceanos - um problema sem fim à vista. Instituto do Mar, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. Departamento de Biologia Animal e Centro de Oceanografia, 2011.

STEVENS, M. M. (1993). Larval Development in *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) Under Laboratory Conditions. *Environmental Entomology*, 22(4), 776–780. doi:10.1093/ee/22.4.776

STRIXINO, S. T. Estudos sobre a fecundidade de *Chironomus sancarlensis* sp. n. (Diptera: Chironomidae). 1980. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo.

STRIXINO, G. & STRIXINO, S. T. A temperatura e o desenvolvimento larval de *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). *Ver. Bras. Zool.* V. 3, n. 4, p. 177-180, 1985.

TENTREE. New Zealand announces nationwide plastic bag ban. Disponível em: <<https://www.tentree.com/blogs/posts/new-zealand-announces-nationwide-plastic-bag-ban?>>. Acesso em: 28 maio 2019.

THE GUARDIAN. Plastic microbeads ban enters force in UK. Disponível em: <https://www.theguardian.com/environment/2018/jan/09/plastic-microbeads-ban-enters-force-in-uk?CMP=fb_gu>. Acesso em: 20 de maio 2019.

THOMPSON, R.C.; SWAN, S.H.; MOORE, C.J.; vom SAAL, F.S., 2009. Our plastic age. *Philos. T. Roy. Soc. B.* 364, 1973-1976.

TOURINHO, P. S.; KOCÍ, V.; LOUREIRO, S.; VAN GESTEL, C. A. M. (2019). Partitioning of chemical contaminants to microplastics: Sorption mechanisms, environmental distribution and effects on toxicity and bioaccumulation. *Environmental Pollution*. doi:10.1016/j.envpol.2019.06.030.

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

TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. Larvas de Chironomidae (Diptera) do Estado de São Paulo: Guia de identificação e diagnose de gêneros. São Carlos, UFSCar, 227p. 1995.

TRUHAUT, R. 1977. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1: 151-173

UNEP, Marine Litter Legislation: a toolkit for policymakers, 2016, 2016, p. 25.

USEPA. 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluent and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA- 821-R-02-012. U.S. Environmental Protection Agency. Office of Water. Washington, D.C.

VIVEIROS, W. *Chironomus sancticaroli* – do cultivo em laboratório ao ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo. 2012.

WAGNER, et al. Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environmental Sciences Europe*, v. 26 (1). 2014.

WWF - World Wildlife Fund. Brasil é o 4º país do mundo que mais gera lixo plástico. 04 mar. 2019. Disponível em: < <https://www.wwf.org.br/?70222/Brasil-e-o-4-pais-do-mundoque-mais-gera-lixo-plastico>>. Acesso em: 29/08/2021.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (2006). Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. Editora Rima, São Carlos, SP. 478 p.

ZAREMBA, J. Em um ano, canudos de plástico são proibidos em 8 estados e no DF. Folha de São Paulo, 07 jan. 2020. Disponível em: <<https://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2020/01/em-um-ano-canudos-de-plastico-sao-proibidos-em-8-estados-e-no-df.shtml>>. Acesso em: 20/08/2021.

ZHAO, S.; ZHU, L; LI, D. Microplastic in three urban estuaries, China. Environmental Pollution, [s.l.], v. 206, p. 597-604, nov. 2015.

ZHU et al., 2018. Cetaceans and microplastics: First report of microplastic ingestion by a coastal delphinid, *Sousa chinensis*. Science of the Total Environment 659, 649–654.

ZIAJAHROMI, S.; KUMAR, A.; NEALE, P. A.; LEUSCH, F. D. L. (2019). Effects of polyethylene microplastics on the acute toxicity of a synthetic pyrethroid to midge larvae (*Chironomus tepperi*) in synthetic and river water. Science of The Total Environment.

ZONA LIBRE DE PLASTICO. Estrategia nacional para la substitución de plástico de um solo uso por alternativas renovables y compostables. Disponível em: <<http://zonalibredeplastico.org/>>. Acesso em: 29 maio 2019.