

BÁRBARA RANI BORGES

**INTERAÇÕES E IMPACTOS DE DISTINTOS MICROPLÁSTICOS
SOBRE MICROALGAS E MACROINVERTEBRADOS AQUÁTICOS**

Sorocaba
2022

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

ciências
ambientais

BÁRBARA RANI BORGES

**INTERAÇÕES E IMPACTOS DE DISTINTOS MICROPLÁSTICOS
SOBRE MICROALGAS E MACROINVERTEBRADOS AQUÁTICOS**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" na Área de Concentração Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Pompêo
Coorientador: Dr. Lucas Gonçalves Queiroz

Sorocaba

2022

R197i Rani-Borges, Bárbara
Interações e impactos de distintos microplásticos sobre microalgas e
macroinvertebrados aquáticos / Bárbara Rani-Borges. -- , 2023
162 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara,
Orientador: Marcelo Pompêo
Coorientador: Lucas Gonçalves Queiroz

1. Microplásticos. 2. Ecologia aplicada. 3. Ecotoxicologia. 4.
Ecossistemas aquáticos. 5. Poluentes emergentes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Interações e impactos de microplásticos em modelos aquáticos: microalgas e macroinvertebrados

AUTORA: BÁRBARA RANI BORGES

ORIENTADOR: MARCELO LUIZ MARTINS POMPÊO

COORIENTADOR: LUCAS GONÇALVES QUEIROZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Ambientais, área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCELO LUIZ MARTINS POMPÊO (Participação Virtual)
Departamento de Ecologia / Instituto de Biociencias Universidade de Sao Paulo USP

Profª. Drª. DANIELLE REGINA GOMES RIBEIRO-BRASIL (Participação Virtual)
Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)

Prof. Dr. THIAGO LOPES ROCHA (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia / Universidade Federal de Goiás, UFG

Prof. Dr. GUILHERME MALAFAIA PINTO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano

Profª. Drª. ODETE ROCHA (Participação Virtual)
Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva / Universidade Federal de São Carlos

Sorocaba, 02 de dezembro de 2022

Dedico todo meu trabalho e esforço aos meus pais e irmã, vocês são a minha casa.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marcelo Pompêo, meu orientador, por ter apoiado e motivado meu crescimento profissional e por ter me guiado durante todo o processo de construção da tese. Agradeço, especialmente, por ter me dado total liberdade de fazer ciência.

Ao Dr. Lucas Queiroz, meu coorientador, pelas discussões infinitas que nos levaram aos melhores desenhos experimentais. Entre risadas (muitas), eu não posso mensurar o quanto aprendi e evoluí trabalhando com você. Ao Lucas, meu amigo, o meu muito obrigada pela intensidade, companhia e paciência. (E obrigada.)

A todos do Laboratório de Limnologia, que nunca hesitaram em me ajudar e pela companhia nesses anos, em especial: Lucas, Karen, Thaís, Ivan e Xavi. Obrigada!

À Daniele Miranda, por tudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da UNESP, por proporcionar minha formação acadêmica e profissional e à Secretaria de Pós-Graduação, em especial ao Carlos Reche, pelo auxílio nas questões burocráticas do dia-a-dia e pela preocupação e paciência na tentativa de resolvê-los, sempre com muita gentileza e eficiência.

À Secretaria de Pós-Graduação em Ecologia da USP.

Aos professores Dr. Rômulo Ando do Laboratório de Espectroscopia Molecular (IQ-USP) por auxiliar nas análises químicas; Dr. Federico Brown do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento (IB-USP), por auxiliar nas análises de microscopia de fluorescência; Dra Teresa de Paiva do Laboratório de Ecotoxicologia Aquática e de Caracterização e Tratamento de Efluentes (Escola de Engenharia de Lorena-USP) por auxiliar nas análises bioquímicas.

À Alexandra Elbakyan, por abrir o conhecimento para todos.

Aos doutorandos Eduardo Carmine (IQ-USP), Beatriz de Moraes (IQ-USP) e Caio Prado (EEL-USP) pelo apoio nas análises complementares que ajudaram a enriquecer o meu trabalho.

À Rufford Foundation, por ter financiado projeto correlato (Grant. ID. 32839-1).

I also would like to thank Professors Angela Ivask, Randel Kreitsberg, Richard Meitern, Arvo Tuvikene and Margit Heinlaan for having me at the University of Tartu and at the Võrtsjärve Limnological Station. And to the Estonian government and the European Union for the Dora Plus scholarship. I am grateful for the opportunity to meet and work with great researchers, who spent a lot of time teaching me. A special thanks to everyone who showed me how amazing Estonia can be! I also thank all the friends I made on my way during my Estonian adventure: Mathilde, Ciara, Bianca, Stefania and Kairi. It wouldn't have been the same without you. It was amazing!

“Never ever accept 'Because you are a woman' as a reason for doing or not doing anything.”

Chimamanda Ngozi Adichie

RESUMO

Rani-Borges, B. Interações e impactos de distintos microplásticos sobre microalgas e macroinvertebrados aquáticos. 2022. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) – Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Sorocaba, 2022.

A poluição plástica é hoje ubíqua e permeia em praticamente todos os sistemas aquáticos, desde águas continentais, áreas costeiras, oceanos até regiões remotas e polares. Após o seu descarte e por diversas vias, os plásticos acabam chegando aos corpos d'água, onde sofrem exposição a condições ambientais, bióticas e abióticas, capazes de induzir a degradação e fragmentação dos plásticos em pedaços menores. Microplásticos (MP) são partículas antropogênicas (< 5 mm) e são hoje considerados os detritos mais difundidos nos ambientes aquáticos. Os ecossistemas de água doce são recursos especialmente suscetíveis a variações de ordem da qualidade ambiental e, a falta de dados referentes aos impactos causados por MP, exacerba a vulnerabilidade deste ambiente. Considerando este cenário, e dados recentes que demonstram que a crescente entrada de MPs no ambiente aquático pode provocar graves consequência para biota, o presente trabalho teve como objetivo a realização de uma série de ensaios toxicológicos com MP de características variadas e organismos de diferentes grupos de grande relevância para esses ecossistemas: microalgas das espécies *Chlorella vulgaris* e *Raphidocelis subcapitata*, e consumidores primários, representados por *Chironomus sancticaroli*, *Daphnia similis*, *Hyalella azteca*, *Gmelinoides fasciatus* e *Gammarus lacustris*. Os ensaios foram conduzidos com MP primários e secundários, com diâmetros de até 100 µm e concentrações variadas. Foram avaliadas respostas biológicas diferentes, de acordo com cada espécie, no geral os *endpoints* analisados foram: taxa de crescimento, atividade fotossintética, clorofila a, mortalidade, ingestão, egestão, estresse oxidativo, alterações comportamentais e biofragmentação de microplásticos pelos organismos. Os resultados mostraram que a ecotoxicidade de MP varia de acordo com as características físicas e químicas das partículas (tamanho, forma, concentração, tipo e tempo de exposição) e dos organismos interagentes, sendo que todos os organismos apresentaram algum efeito tóxico durante e após os períodos de exposição. Foram obtidos resultados diversos e inéditos que contribuem significativamente para o avanço do conhecimento na área. Pela primeira vez, foram registradas alterações à nível molecular nas espécies testadas de díptera e anfípoda após exposição sob condições ambientalmente relevantes e a biofragmentação de MP por *D. similis* e por *H. azteca*. Esses resultados reforçam a hipótese de que MP podem induzir respostas fisiológicas nas condições em que são encontrados atualmente, evidenciando os perigos a longo prazo. Futuros estudos poderão se beneficiar de tais desfechos abordados para estabelecer o padrão de distribuição de MP no ambiente e os riscos ecológicos atribuídos a esses eventos.

Palavras-chave: Plástico; Microalga; Diptera; Cladocera; Anfípode; Água doce.

ABSTRACT

Rani-Borges, B. Interactions and impacts of distinct microplastics on microalgae and aquatic macroinvertebrates. 2022. 162 p. Thesis (Doctoral Degree in Environmental Sciences) - Institute of Science and Technology, UNESP - São Paulo State University, Sorocaba, 2022.

Plastic pollution is now ubiquitous and permeates virtually all aquatic systems, from inland waters, coastal areas, oceans to remote and polar regions. After its disposal and through various ways, the plastics end up reaching water bodies, where they are exposed to environmental, biotic and abiotic conditions, capable of inducing the degradation and fragmentation of plastics into smaller pieces. Microplastics are anthropogenic particles (< 5 mm) and are now considered the most widespread debris in aquatic environments. Freshwater ecosystems are resources especially susceptible to variations in environmental quality, and the lack of data on the impacts caused by plastic microparticles exacerbates the vulnerability of this environment. Considering this scenario, and recent data that demonstrate that the increasing entry of microplastics into the aquatic environment can cause serious consequences for biota, the present work aimed to carry out a series of toxicological tests with microplastics of varied characteristics and organisms from different groups of organisms. great relevance for these ecosystems: microalgae of the species *Chlorella vulgaris* and *Raphidocelis subcapitata*, and primary consumers, represented by *Chironomus sancticaroli*, *Daphnia similis*, *Hyalella azteca*, *Gmelinoides fasciatus* and *Gammarus lacustris*. Assays were conducted with primary and secondary microplastics, with sizes up to 100 µm and varying concentrations. Different biological responses were evaluated, according to each species, in general the endpoints analyzed were: growth rate, photosynthetic activity, chlorophyll a, mortality, ingestion, egestion, oxidative stress, behavioral changes and microplastic biofragmentation by organisms. The results showed that the toxicity of microplastics varies according to the physical and chemical characteristics of the particles (size, shape, concentration, type and exposure time) and of the interacting organisms, with all organisms having some toxic effect during and after the exposure periods. Diverse and unpublished results were obtained that contribute significantly to the advancement of knowledge in the area. For the first time, changes were recorded at the molecular level in the diptera and amphipod species tested after exposure under environmentally relevant conditions and PM biofragmentation by *D. similis* and by *H. azteca*. These results reinforce the hypothesis that PM can induce physiological responses in the conditions in which they are currently found, highlighting the long-term dangers. Future studies may benefit from such addressed outcomes to establish the pattern of PM distribution in the environment and the ecological risks attributed to these events.

Keywords: Plastic; Microalgae; Diptera; Cladocera. Amphipod; Freshwater.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** - Link entre os capítulos da tese de acordo com os temas, grupos e características de organismos sob investigação e tipos de polímeros utilizados (ABS: acrilonitrila butadieno estireno; PEBD: polietileno de baixa densidade; PP: polipropileno; PS: poliestireno) nos ensaios de ecotoxicidade. _____ 28
- Figura 1.2** - Caracterização de amostras de microplásticos usados nos experimentos por (a) espectroscopia de transformada de Fourier (FTIR) confirmando o tipo de polímero. (A) Acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS). (B) Polietileno de baixa densidade (PEBD). (C) Poliestireno (PS). (D) Polipropileno envelhecido (PP). _____ 30
- Figura 1.0.3** - Organismos-teste utilizados nos ensaios de ecotoxicidade com microplásticos (microalgas: *Chlorella vulgaris* e *Raphidocelis subcapitata*, díptero: *Chironomus sancticaroli*, cladóceros: *Daphnia similis*, e anfípodas: *Hyalella azteca*, *Gmelinoides fasciatus* e *Gammarus lacustris*). Imagens da própria autora. _____ 33
- Figura 1.0.4** - Mapa de ocorrência e distribuição das espécies sob investigação no mundo de acordo com dados disponíveis na plataforma GBIF. _____ 34
- Figura 2.1** - Imagem das partículas de microplástico de acrilonitrila-butadieno-estireno (MP-ABS) confirmando a forma irregular das partículas. MP-ABS corados com corante Vermelho do Nilo e visualizados por microscópio invertido com fluorescência (Leica DMI8). _____ 55
- Figura 2.0.2** - Crescimento celular (%), normalizado com o grupo controle negativo (100%, representado pela linha tracejada vermelha), e desvio padrão relativo dos dias 1 e 7 de exposição a microplásticos de acrilonitrila-butadieno-estireno (MP-ABS) em três concentrações: 384, 3840 e 38400 itens/L. (A) *Chlorella vulgaris*. (B) *Raphidocelis subcapitata*. Letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os grupos em diferentes tempos de exposição (dias 1 e 7) (Teste do exato de Fisher). O símbolo do asterisco (*) representa uma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e o grupo controle (Teste de Dunnett). Valor de p considerado significativo $p < 0,05$. _____ 58
- Figura 2.0.3** - Teor de clorofila a (%), normalizado com o grupo controle negativo (100%, representado pela linha tracejada vermelha), e desvio padrão relativo dos dias 1 e 7 de exposição a microplásticos de acrilonitrila-butadieno-estireno (MP-ABS) em três concentrações: 384, 3840 e 38400 itens/L. (A) *Chlorella vulgaris*. (B) *Raphidocelis subcapitata*. Letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os grupos em diferentes tempos de exposição (dias 1 e 7) (Teste do exato de Fisher). O símbolo do asterisco (*) representa uma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e o grupo controle (Teste de Dunnett). Valor de p considerado significativo $p < 0,05$. _____ 61
- Figura 3.1** - Visualização de partículas de MP-PP envelhecidas e coradas com vermelho do Nilo sob microscopia de fluorescência invertida. _____ 77

Figura 3.2 - Amostra representativa de ingestão de microplásticos de polipropileno (MP-PP) naturalmente envelhecidos por *Chironomus sancticarloi* durante o período de exposição (144 horas) a três diferentes concentrações (13,5; 67,5 e 135 itens/g de sedimento seco). _____ 79

Figura 3.3 - Alterações nos marcadores de estresse oxidativo em resposta a 144 horas de exposição a microplásticos de polipropileno (MP-PP) em três concentrações diferentes (C1: 13,5, C2: 67,5, C3: 135 itens/g de sedimento seco). Os níveis de (A) SOD, (B) CAT, (C) GST e (D) MDA em *Chironomus sancticarloi* são mostrados de acordo com o teor de proteína. O símbolo do asterisco (*) representa uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos marcadores de estresse oxidativo entre o tratamento e o controle negativo. _____ 81

Figura 4.0.1 - Esquema do desenho experimental com os diferentes tipos de tratamentos: controle negativo (apenas organismos, $n = 5$, sem exposição a microplásticos), controle de partículas (apenas microplásticos, sem presença de organismos), exposição de organismos ($n = 5$) a microplásticos em baixa e alta concentração (135 e 1350 itens/50 mL de meio, respectivamente). _____ 95

Figura 4.0.2 - Ingestão de microplásticos de poliestireno (MP-PS). (A): O número de partículas de MP-PS internalizadas em cada *Daphnia similis* ($n = 3$ /ponto de tempo/tratamento) após 48, 96 e 144 horas de exposição a concentração baixa (135 itens/50 mL) e alta (1350 itens/50 mL) de microplástico. Os dados são mostrados com \pm DP. (B): Uma amostra representativa de *D. similis* com dois MP-PS fluorescentes ingeridos durante o período de exposição. _____ 97

Figura 4.0.4 - Taxa de fragmentação (%) de microplásticos de poliestireno (PS-MP) por *Daphnia similis* ao longo do tempo (48, 96 e 144 horas) em comparação com o tamanho médio inicial (24,5 μ m) após exposição em duas concentrações diferentes. Dentro das barras encontra-se designado os tamanhos das partículas em μ m. (A) Baixa concentração: 135 itens/50 mL. (B) Alta concentração: 1350 itens/50 L. Os dados são apresentados como média para $n = 30$ medições \pm DP. _____ 99

Figura 4.3 - Mortalidade (%) de *Daphnia similis* após 144 horas de exposição a microplásticos de poliestireno (MP-PS) em concentrações baixas (135 itens/50 mL) e altas (1350 itens/50 mL). Os dados considerando a média de três réplicas são mostrados (\pm DP). * representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na mortalidade entre o tratamento específico e o controle negativo. _____ 102

Figura 5.1 - (A) Fragmentação de microplásticos de poliestireno (MP-PS) após 7 dias de exposição em três concentrações diferentes (C1: 540, C2: 2700, C3: 5400 itens/L). Os dados são mostrados como média para $n = 30$ medições \pm DP (B) Taxa de fragmentação (%) de MP-PS ao longo do tempo (24, 72, 120 e 168 horas) em comparação com o tamanho médio inicial (24,5 μ m) observada após interação com organismos *Hyalella azteca* sob a concentração de exposição de 540 itens/L. _____ 118

Figura 5.2 - Microfotografias por microscopia eletrônica de varredura de microplásticos de poliestireno (MP-PS) após exposição a *Hyalella azteca* sob concentração de 340 itens/L. (A) Partículas originais. (B-F) Partículas recuperadas do meio após 7 dias de exposição com *H. azteca*, apresentando bordas irregulares e rachaduras. As setas destacam os pontos de interesse. As barras de escala representam 10 μ m (A-B, D-E) ou 1 μ m (C e F). _____ 120

Figura 5.0.3 - Imagens de microscopia de fluorescência invertida de microplásticos de poliestireno ingeridos (MP-PS) dentro de indivíduos de *Hyalella azteca* em diferentes órgãos, após 7 dias de exposição. _____ 121

Figura 5.4 - Alterações nos marcadores de estresse oxidativo em resposta a 7 dias de exposição a microplásticos de poliestireno (MP-PS) em três concentrações diferentes (C1: 540, C2: 2700, C3: 5400 itens/L). Os níveis de (A) SOD, (B) CAT, (C) GST e (D) MDA em *H. azteca* são mostrados de acordo com o teor de proteína. O símbolo de asterisco (*) representa uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos marcadores de estresse oxidativo entre o tratamento selecionado e o controle negativo. _____ 123

Figura 6.0.1 - Visualização de partículas de MP-PEBD coradas com vermelho do Nilo sob microscopia de fluorescência. _____ 141

Figura 6.2 - Microplásticos de polietileno fluorescente de baixa densidade (MP-PEBD) ingeridos que foram recuperados do trato gastrointestinal de *Gmelinoides fasciatus* (A-B) ou *Gammarus lacustris* (E-F) e MP-PEBD recuperado de excrementos (C-D de *G. fasciatus*; G-H de *G. lacustris*). As barras de escala representam 100 μm . Todas as imagens mostram visualizações representativas das amostras especificadas. _____ 143

Figura 6.3 - Mortalidade dos anfípodos *Gmelinoides fasciatus* (A: após 7 dias; B: após 14 dias) e *Gammarus lacustris* (C: após 7 dias; D: após 14 dias) após exposição a microplásticos de polietileno de baixa densidade (MP-PEBD), controle positivo com paraquat e a partículas naturais de SiO_2 (sílica). * representa uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na mortalidade entre o tratamento específico e o controle negativo. _____ 146

Figura 6.4 - Atividade de natação medida de acordo com o tempo (% do tempo) gasto em movimento por (A) *Gmelinoides fasciatus* e (B) *Gammarus lacustris* após 14 dias de exposição a vários tratamentos. * representa uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na atividade entre o tratamento selecionado e as condições sem exposição. Os dados para duas réplicas com três animais cada são mostrados usando boxplots. _____ 148

Figura 6.5 - Alterações nos marcadores de estresse oxidativo em resposta a 14 dias de exposição em baixa (2 $\mu\text{g/L}$) e alta (2 mg/L) exposição a MP-PEBD, controle positivo de estresse oxidativo com paraquat a 1 $\mu\text{g/L}$ e micropartícula natural de sílica a 2 $\mu\text{g/L}$ (baixa) e 2 mg/L (alta). Os níveis de (A) SOD, (B) GSH, (C) GPx em *G. fasciatus* e níveis de (D) SOD, (E) GSH, (F) GPx em *G. lacustris* são mostrados como Unidades/mg de proteína. * representa uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos marcadores de estresse oxidativo entre o tratamento selecionado e as condições sem exposição, ** representa $p < 0,01$, *** representa $p < 0,001$. _____ 150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Resumo dos objetivos e principais resultados e conclusões dos dezoito artigos sobre ambientes de água doce no Brasil. Ref.: referências.	25
Tabela 1.2 - Parâmetros usados nos ensaios ecotoxicológicos em condições de laboratório para exposição de microplásticos em organismos de água doce e resultados de experimentos de campo (especificando os organismos ou amostra em teste, local para experimentos de campo, tipo de polímero, tamanho dos fragmentos, concentração e duração). Ref: referências.	26
Tabela 1.3 - Características físicas e químicas dos microplásticos utilizados nos ensaios toxicológicos (nome dos polímeros, sigla, origem, tamanho, morfologia, imagens das partículas por microscopia de fluorescência com magnificação de 10x e densidade).	30
Tabela 3.1 - Ingestão de microplásticos de polipropileno envelhecido (MP-PP). Número de partículas de MP-PP presentes no trato gastrointestinal de indivíduos de <i>Chironomus sancticarloi</i> (n = 6) após 48, 96 e 144 horas em três condições de exposição. O número de partículas de MP é dado pelo número médio de MP por tratamento \pm DP.	78
Tabela 3.2 - Mortalidade (% \pm DP) de larvas de <i>Chironomus sancticarloi</i> após 144 horas de exposição sob três concentrações diferentes de microplásticos de polipropileno e controle negativo (sem a presença do poluente).	82
Tabela 4.1 - Concentração molar de nutrientes inorgânicos do meio MS.	114
Tabela 6.1 - As concentrações usadas no estudo em diferentes sistemas de medidas. Para microplásticos PEBD, o número total de partículas (p) no tanque (tq) e itens/L (p/L) são mostrados. Esses dados são a média para n = 3 medições. (n.m. não foi medido / n.a. não se aplica).	137
Tabela 6.2 - Balanço ingestão-egestão de microplásticos de polietileno de baixa densidade (MP-PEBD). Número de partículas de MP-PEBD presentes nos intestinos de indivíduos de <i>Gmelinoides fasciatus</i> (n = 29) e de <i>Gammarus lacustris</i> (n = 10) após 14 dias de exposição a baixa ou alta concentração de MP. O número de partículas de MP excretadas é dado pelo número médio de MP por tanque (50 mL de amostra de excremento) após 7 e 14 dias de exposição ao MP-PEBD em baixa e alta concentração. Os dados são mostrados com \pm DP. n.d.: não disponível.	142

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	13
PUBLICAÇÕES RELACIONADAS À TESE	19
Artigos decorrentes (em periódicos)	19
Publicações relacionadas não incluídas na tese	19
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL	21
1 APRESENTAÇÃO	21
2 ENUNCIADO DO PROBLEMA	21
3 BREVE STATUS DA PESQUISA COM MICROPLÁSTICOS EM ECOSISTEMAS DE ÁGUA DOCE	23
3.1 Status da pesquisa no Brasil	23
3.2 Status da pesquisa no mundo	27
4 OBJETIVOS GERAIS DA PESQUISA	28
5 MICROPLÁSTICOS TESTADOS	29
5.1 Acrilonitrila butadieno estireno (ABS)	31
5.2 Polietileno (PE)	31
5.3 Polipropileno (PP)	32
5.4 Poliestireno (PS)	32
6 ORGANISMOS-TESTE	32
6.1 Microalgas	35
6.1.1 Chlorella vulgaris	35
6.1.2 Raphidocelis subcapitata	36
6.2 Ordem: Diptera	36
6.3 Ordem: Cladocera	37
6.4 Ordem: Anfípoda	38

REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO 2 – <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Raphidocelis subcapitata</i>	51
Efeitos de microplásticos de ABS em microalgas sob concentrações realistas	51
Resumo	51
Abstract	52
1 INTRODUÇÃO	53
2 MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1 Caracterização do microplástico	55
2.2 Espécies testadas	56
2.3 Desenho experimental e análises	56
2.4 Análises estatísticas	57
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.1 Inibição de crescimento	58
3.2 Clorofila a	60
3.3 Implicações ambientais da interação entre MP e microalgas	62
4 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	65
CAPÍTULO 3 – <i>Chironomus sancticaroli</i>	69
Respostas biológicas de <i>Chironomus sancticaroli</i> à exposição a microplásticos de PP naturalmente envelhecidos sob concentrações realistas	69
Resumo	69
Abstract	70
1 INTRODUÇÃO	71
2 MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1 Microplástico	73
2.2 Cultivo de <i>C. sancticaroli</i>	73

2.3 Exposição de organismos a microplásticos de PP	74
2.4 Ingestão de fragmentos de PP	74
2.5 Atividade enzimática	74
2.5.1 Superóxido dismutase (SOD)	75
2.5.2 Catalase (CAT)	75
2.5.3 Glutathione S-transferase (GST)	75
2.5.4 Malonaldeído (MDA)	76
2.6 Análise estatística	76
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
3.1 Caracterização do MP-PP	77
3.2 Ingestão de microplásticos	78
3.2 Biomarcadores de estresse oxidativo	80
3.3 Mortalidade de <i>C. sancticaroli</i> após período de exposição	82
4 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	84
CAPÍTULO 4 – <i>Daphnia similis</i>	90
<i>Daphnia similis</i> está desempenhando um papel significativo na biofragmentação de microplásticos em meio à toxicidade?	90
Resumo	90
Abstract	91
1 INTRODUÇÃO	91
2 MATERIAL E MÉTODOS	93
2.1 <i>Daphnia similis</i>	93
2.2 Microplástico	94
2.3 Exposição de <i>Daphnia similis</i> a microplásticos de PS	94
2.3.1 Ingestão e taxa de biofragmentação de PS	95
2.3.2 Sobrevivência de <i>Daphnia similis</i> após exposição	96
2.4 Análises estatísticas	96
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
3.1 Ingestão de esferas de PS	96

3.2 Biofragmentação de microplásticos de PS por <i>Daphnia similis</i>	98
3.3 Mortalidade de organismos devido a exposição a microplásticos de PS	101
4 CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS	104
CAPÍTULO 5 – <i>Hyaella azteca</i>	109
Biofragmentação de microplásticos de poliestireno pelo anfípode <i>Hyaella azteca</i>	109
Resumo	109
Abstract	110
1 INTRODUÇÃO	111
2 MATERIAL E MÉTODOS	112
2.1 Microplástico	112
2.2 Exposição de <i>Hyaella azteca</i> a MP-PS	113
2.2.1 Ensaio de biofragmentação	114
2.2.2 Biomarcadores de estresse oxidativo	115
2.2.2.1 Superóxido Dismutase (SOD)	115
2.2.2.2 Catalase (CAT)	116
2.2.2.3 Glutathione S-transferases (GST)	116
2.2.2.4 Malonaldeído (MDA)	116
2.2.3 Mortalidade	117
2.3 Análises estatísticas	117
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
3.1 Caracterização do MP-PS	117
3.2 Biofragmentação de MP-PS por <i>Hyaella azteca</i>	118
3.3 Biomarcadores de estresse oxidativo	122
3.4 Mortalidade de anfípodas devido à exposição a microplásticos PS	124
4 CONCLUSÕES	125
CAPÍTULO 6 – <i>Gmelinoides fasciatus</i> e <i>Gammarus lacustris</i>	132
Efeitos de concentrações ambientalmente relevantes de microplásticos em anfípodas	132

Resumo	132
Abstract	133
1 INTRODUÇÃO	133
2 MATERIAL E MÉTODOS	136
2.1 Organismos estudados	136
2.2. Preparação e caracterização de microplásticos PEBD	136
2.3. Exposição de anfípodes a microplásticos PEBD	137
2.3.1. Preparação de alimentos com microplásticos de PEBD	137
2.3.2. Desenho experimental para exposição de animais ao PEBD	138
2.4. Efeitos de concentrações ambientalmente relevantes de microplásticos em anfípodes	139
2.4.1. Ingestão e egestão de microplásticos de PEBD por anfípodes	139
2.4.2. Análise da mortalidade de anfípodes	139
2.4.3. Análise da atividade de natação de anfípodes	139
2.4.4. Análise de marcadores de estresse oxidativo em anfípodes	140
2.5. Análise estatística dos dados	141
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	141
3.1. Características dos microplásticos PEBD	141
3.2. Ingestão e egestão de microplásticos por anfípodes	142
3.3. Mortalidade de anfípodes devido à microplásticos de PEBD	145
3.4. Impacto de microplásticos de PEBD na atividade de natação de anfípodes	147
3.5. Estresse oxidativo induzido por microplásticos de PEBD	149
4 CONCLUSÕES	152
REFERÊNCIAS	154
CAPÍTULO 7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	161
1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS DESFECHOS	161
2 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS MICROPLÁSTICOS E ORGANISMOS-TESTE EMPREGADOS	161
3 PERSPECTIVAS DA PESQUISA COM MICROPLÁSTICOS	162

PUBLICAÇÕES RELACIONADAS À TESE

Artigos decorrentes (em periódicos)

1. **Rani-Borges, B.**, Martins, T.F.G., Pompêo, M.L.M. 2021. Status of Brazilian research in microplastics present in aquatic ecosystems: freshwater. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*. 16, 106-117.
2. **Rani-Borges, B.**, Queiroz, L.G., Ferreira, K.S., Martins, T.F.G., Vicente, E., Ando, R.A., Pompêo, M. Effects of ABS microplastics on microalgae under realistic concentrations. (em processo de submissão)
3. **Rani-Borges, B.**, Queiroz, L.G., Prado, C.C.A., Brazil, T.C.P., Pompêo, M. 2023. Biological responses of *Chironomus sancticaroli* to exposure to naturally aged PP microplastics under realistic concentrations. *Ecotoxicology*.
4. **Rani-Borges, B.**, Queiroz, L.G., Melo, E.C., Pompêo, M. 2023. Are *Daphnia similis* playing a significant role in microplastic biofragmentation amid toxicity? *Water, Air and Soil Pollution*.
5. **Rani-Borges, B.**, Queiroz, L.G., Prado, C.C.A., et al. 2022. Expressive Biofragmentation of Polystyrene Microplastics by the Amphipod *Hyalella Azteca*. Preprint available at SSRN. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4206912>.
6. **Rani-Borges, B.**, Meitern, R., Teesalu, P., Raudna-Kristoffersen, M., Kreitsberg, R., Heinlaan, M., Tuvikene, A., Ivask, A. 2022. Effects of environmentally relevant concentrations of microplastics on amphipods. *Chemosphere*. 309, 136599. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136599>.

Publicações relacionadas não incluídas na tese

Artigos em periódicos

1. **Rani-Borges, B.**, Moschini-Carlos, V., Pompêo, M. 2021. Microplastics and freshwater microalgae: what do we know so far? *Aquatic Ecology*. 55, 363-377. <https://doi.org/10.1007/s10452-021-09834-9>.
2. **Rani-Borges, B.**, Queiroz, L.G., Prado, C.C.A., et al. Oxidative stress of *Hyalella azteca* in response to chronic exposure to naturally aged PP microplastics. (em processo de submissão)
3. **Rani-Borges, B.**, Queiroz, L.G., Kreitsberg, R., et al. Occurrence of microplastic in environmental protection areas. (em processo de submissão)

Capítulos de livro

1. **Rani-Borges, B.**, Vicente, E., Pompêo, M. 2022. Plásticos e microplásticos: Poluição em reservatórios. In: Marcelo Pompêo; Viviane Moschini-Carlos; Julio César López-Doval. (Org.). Aspectos da ecotoxicidade em ambientes aquáticos. 1ed.São Paulo: Instituto de Biociências, v. 1, p. 1-23.
2. **Rani-Borges, B.**, Queiroz, L.G., Pompêo, M. 2022. Protocolo para recuperação e caracterização de microplásticos de matrizes ambientais. In: Marcelo Pompêo; Bárbara Rani-Borges; Teresa Cristina Brazil Paiva. (Org.). Microplásticos nos ecossistemas: impactos e soluções. 1ed.São Paulo: Instituto de Biociências, v. 1, p. 8-27.
3. **Rani-Borges, B.**, Pompêo, M. 2022. Microplásticos como transportadores de poluentes em água doce e no solo. In: Marcelo Pompêo; Bárbara Rani-Borges; Teresa Cristina Brazil Paiva. (Org.). Microplásticos nos ecossistemas: impactos e soluções. 1ed.São Paulo: Instituto de Biociências, v. 1, p. 118-133.

Resumos e apresentações de eventos

1. **Rani-Borges, B.**, Meitern, R., Teesalu, P., Raudna-Kristoffersen, M., Kreitsberg, R., Heinlaan, M., Tuvikene, A., Ivask, A. 2022. Effects of environmentally relevant concentrations of microplastics on amphipods. The 3rd Tropical Ocean and Marine Sciences International Symposium – TOMSY. “Ocean research for a sustainable future”. Malásia.
2. **Rani-Borges, B.**, Queiroz, L.G., Martins, T.F.G., Kreitsberg, R., Pompêo, M. 2022. Detection of microplastics in Environmental Protection Area (Itupararanga Reservoir - Sao Paulo). II Conferência Brasileira de Projetos de Conservação da Biodiversidade, Recife. Brasil.
3. **Rani-Borges, B.** 2022. Microplásticos em sedimentos de ecossistemas de água doce: Origem, presença e impactos negativos à biota. In: Seminário Conectando Peixes, Rios e Pessoas, 2022. A Problemática dos Plásticos nos Ecossistemas de Água Doce, v. IV. Brasil.
4. **Rani-Borges, B.**, Vicente, E., Moschini-Carlos, V., Queiroz, L.G., Ando, R.A., Pompêo, M. 2022. Microplastic pollution in surface waters of the Itupararanga reservoir (São Paulo, Brazil): the first approach. 2º Congresso da Sociedade Ibérica de Ecologia (SIBECOL) e o XXI congresso da Associação Ibérica de Limnologia (AIL). Portugal.
5. **Rani-Borges, B.**, Martins, T.F.G., Ferreira, K.S., Biamont-Rojas, I.E., Pompêo, M. 2021. Nano- and Microplastics in surface water of reservoirs A survey on the world scenario. VIII Simpósio de Ecologia de Reservatórios. Visão Múltipla e Integrativa de Conhecimentos. Brasil.
6. **Rani-Borges, B.**, Martins, T.F.G., Ferreira, K.S., Biamont-Rojas, I.E., Santos, G.L.M., Pompêo, M. 2021. Mortality of *Hyalella azteca* to microplastics exposure. VI Congreso Uruguayo de Zoología y III Encuentro Internacional de Ecología Conservación, 2021. 60 Aniversario de la SZU. Uruguai.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL

1 APRESENTAÇÃO

A presente tese de doutorado encontra-se estruturada em 7 capítulos, iniciando com a introdução do tema, seguindo para pesquisa desenvolvida em laboratório, a qual encontra-se ao longo dos capítulos 2 a 6, e finalizando com a apresentação das considerações finais (capítulo 7).

Os capítulos apresentados neste documento incluem o conteúdo parcial ou total de artigos científicos já publicados ou em processo de submissão. Todos os trabalhos que estão aqui reproduzidos tiveram a discente como primeira autora e principal condutora dos experimentos, análises e escrita dos manuscritos.

2 ENUNCIADO DO PROBLEMA

Plásticos são polímeros sintéticos produzidos pela polimerização de monômeros derivados de petróleo, carvão ou gás natural (Cole et al., 2011; Plastics Europe, 2015). Atualmente existem centenas de diferentes tipos de plásticos (Andrady e Neal, 2009), sendo que 90% da produção global corresponde a polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), policloreto de vinila (PVC) e polietileno tereftalato (PET) (Phuong et al., 2016).

O plástico é um material de baixo custo que pode ser produzido e moldado com características variadas em termos de tamanho, forma, densidade e flexibilidade/rigidez (Wagner e Lambert, 2017). É considerado muito estável e é um dos materiais mais versáteis do mundo. As mais diversas áreas utilizam o plástico em suas atividades, produtos e serviços, como nas indústrias de embalagens, automotiva, têxtil e eletrônica, bem como na agricultura, saúde e utilidades domésticas, equipamentos de segurança, construção civil, tintas e brinquedos para crianças e animais de estimação (Berger et al., 2015; Wagner e Lambert, 2017; Wooten e Smith, 2013; Worm et al., 2017).

Atualmente, uma das maiores preocupações da sociedade é a enorme quantidade de artefatos plásticos descartados de forma inadequada no meio ambiente, onde estão sob

processo constante de fragmentação, sendo lentamente transformados em inúmeras partículas de microplásticos (MP) (Backhaus e Wagner, 2020). MP podem ser classificados de acordo com várias de suas características físicas e químicas, como tipo de polímero, cor e formato da partícula, mas uma das classificações mais utilizadas refere-se à sua via de origem, dividindo-os em MP primários e secundários (Cole et al., 2011). Os MP primários são aqueles fabricados industrialmente com tamanhos de até 5 mm para uma finalidade específica, ou seja, são partículas que existem como resultado de sua liberação direta e que acabam no ambiente por meio de sistemas de tratamento de esgoto, aterros sanitários ou deposição de resíduos sólidos em locais inadequados. Já os MP secundários ocorrem como resultado de processos de quebra ou fragmentação de materiais plásticos maiores, devido a vários fatores, como radiação ultravioleta, condições de vento e ondas, atrito e temperatura (Wagner e Lambert, 2017). De modo geral, os MP secundários nada mais são do que MP primários já processados, transformados em produtos, como garrafas, sacolas, roupas, etc.

Organismos aquáticos estão especialmente vulneráveis à presença de MP no ambiente, podendo sofrer efeitos deletérios em decorrência do período de exposição. Estudos realizados em várias espécies de animais aquáticos, incluindo crustáceos, invertebrados, peixes, algas e zooplâncton (Bergami et al., 2017; Chae e An, 2017; Ma et al., 2016) apontam que micropartículas plásticas ingeridas ou aspiradas podem ser adsorvidas por organismos e atravessar as barreiras imunológicas, afetando órgãos, tecidos e até a funcionalidade das células, causando efeitos tóxicos ou letais (Rafiee et al., 2018).

Os diferentes formatos de MP são capazes de induzir respostas variadas nos organismos expostos, já que as características intrínsecas a cada tipo estabelecem uma interação diferente com os organismos (Wright et al., 2013), podendo ser absorvidos, ficar aderidos à membrana externa ou, inclusive, servir como superfície para o crescimento de microrganismos, por exemplo. Além disso, a distribuição espacial e os processos de bioacumulação e biomagnificação são diretamente influenciados pelas características morfológicas dos fragmentos (Auta et al., 2016).

A maioria dos estudos com MP têm se concentrado nos impactos dos MP em consumidores das cadeias alimentares aquáticas e as informações sobre os organismos na base da cadeia alimentar são bastante limitadas até o momento. A especial falta de dados no que diz respeito à interação entre MP e os produtores primários e consumidores primários, é grave do ponto de vista ecológico. Organismos como microalgas e os diversos

CAPÍTULO 7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS DESFECHOS

As pesquisas atuais com MP têm focado principalmente no ambiente marinho, enquanto os impactos de MP em ecossistemas de água doce são muito menos estudados. Deste modo, dada a importância dos habitats de água doce para a manutenção da biodiversidade, é essencial a realização de mais estudos para revelar os efeitos do MP também para a sua biota. Por ora, os estudos dos efeitos dos MP em organismos de água doce indicam que os efeitos tóxicos agudos causados por MP podem não ser tão evidentes sob baixas concentrações, ou ainda sob concentrações ambientalmente relevantes. Por isso, exposições de caráter de médio a longo prazo devem ser investigados.

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que a ecotoxicidade dos MP é variada de acordo com as características físicas e químicas das partículas (tamanho, forma, concentração, tipo dos MP e tempo de exposição) e dos organismos interagentes. Para os organismos foi possível observar que apresentaram algum efeito tóxico durante e após os períodos de exposição a MP. De modo geral, com base nos dados apresentados, é possível sugerir os *endpoints* que foram mais afetados, de acordo com cada classe de organismo estudado, foram: redução da produção de pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a*) para as microalgas; estresse oxidativo para os díptera e anfípoda; mortalidade para os cladóceras.

Também é importante destacar que todos os consumidores primários investigados ingeriram as partículas as quais foram expostos. Ambas espécies testadas (*D. similis* e *H. azteca*), mostraram-se capazes de reduzir os tamanhos das partículas de forma eficiente, portanto, de induzir a biofragmentação.

2 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS MICROPLÁSTICOS E ORGANISMOS-TESTE EMPREGADOS

Ao longo dos 5 estudos experimentais realizados, foram utilizados microplásticos compostos pelas principais matrizes poliméricas produzidas e encontradas no ambiente, garantindo relevância ecológica para os estudos e, conseqüentemente, para os resultados obtidos. Tendo em vista aproximar os resultados de estudos laboratoriais ao que ocorre no ambiente em condições naturais, também foram usadas partículas variadas no que diz

respeito a morfologia (MP regulares e irregulares), origem (MP primário e secundário), estados de conservação (virgem e envelhecido) e com tamanhos variados, incluindo as faixas que são mais frequentemente encontradas no ambiente com tamanhos entre 50 e 630 µm (Klein et al., 2015; Laermanns et al., 2021).

Uma deficiência adicional dos estudos atuais de MP em ambientes aquáticos é o uso de concentrações de exposição irrealisticamente altas. A grande maioria dos estudos é feita com concentrações entre 50 e 10.000 partículas de MP por mL (Capolupo et al., 2018; Phuong et al., 2016), que excedem significativamente as concentrações de MP medidas no ambiente natural.

Diante da carência de estudos envolvendo concentrações realistas, bem como tempos de exposição mais longos, foram propostos designs experimentais que levaram em conta dados ambientais e períodos de exposição prolongados (subcrônico e crônico) em todos os experimentos.

Relativamente aos organismos utilizados como modelos nos ensaios de ecotoxicidade, estes foram todos viáveis do ponto de vista experimental. Os *endpoints* avaliados variaram de acordo com as particularidades de cada grupo estudado, assim como as respostas biológicas. Nenhum organismo se mostrou completamente resistente frente à exposição aos MP. Assim, os organismos-teste adotados no presente estudo se mostraram bons bioindicadores de contaminação ambiental no que se refere a MP. O grupo que se mostrou mais sensível foi de cladóceras, apresentando sensibilidade à nível individual.

3 PERSPECTIVAS DA PESQUISA COM MICROPLÁSTICOS

A busca pela compreensão dos impactos que podem ser causados pela presença de MP nos ecossistemas aquáticos continentais está se tornando indispensável. Sabe-se que a pesquisa sobre MP e sua relação com invertebrados é escassa, mas crescente e que há muitos obstáculos a serem superados em termos de limitações técnicas e metodológicas na pesquisa com MP. Assim, há uma necessidade urgente de mais pesquisas sobre a interação entre as diferentes estruturas químicas MP e os diversos organismos que compõem esses ecossistemas.

REFERÊNCIAS

- Capolupo, M., Franzellitti, S., Valbonesi, P., et al. (2018). Uptake and transcriptional effects of polystyrene microplastics in larval stages of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Pollution*, 241, 1038–1047. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.035>.
- Klein, S., Worch, E., & Knepper, T. P. (2015). Occurrence and spatial distribution of microplastics in river shore sediments of the Rhine-Main area in Germany. *Environmental Science & Technology*, 49, 6070–6076. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00492>.
- Laermans, H., Lehmann, M., Klee, M., et al. (2021). Tracing the horizontal transport of microplastics on rough surfaces. *Microplastics and Nanoplastics*, 1, 11. <https://doi.org/10.1186/s43591-021-00010-2>.
- Phuong, N. N., Zalouk-Vergnoux, A., Poirier, L., et al. (2016). Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments? *Environmental Pollution*, 211, 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.035>.