

Do abstrato ao concreto na problemática dos microplásticos:

Ensaio laboratorial simples com recurso a kits comerciais

O impacto ambiental causado pelos microplásticos tem sido alvo de investigação pela comunidade científica nos últimos anos. Devido à ubiquidade observada e aos efeitos adversos que provocam nos ecossistemas, torna-se imperativa uma avaliação ecotoxicológica e monitorização dos principais meios recetores destes poluentes emergentes. Neste contexto, este trabalho apresenta ensaios ecotoxicológicos com recurso a kits comerciais como ferramentas promissoras de avaliação ambiental de diferentes matrizes. De acordo com a literatura, verificou-se que estes kits apresentam um elevado grau de sensibilidade que é comparável com o de ensaios padronizados bem estabelecidos, podendo ser uma alternativa viável na identificação de efeitos nocivos causados pelos microplásticos. Por outro lado, por permitirem a obtenção de resultados de forma simples e célere, podem ser úteis em contexto escolar, contribuindo para o aumento da literacia científica.

Palavras-chave
kits comerciais
microplásticos
ecotoxicologia
literacia ambiental

Rui Silva^{1,2 *}

Joana Serrão^{3 * *}

Ruth Pereira^{1,2 **}

* Estes autores desempenharam papéis equivalentes na construção deste artigo.

¹ Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto.

² GreenUPorto – Centro de Investigação em Produção Agroalimentar Sustentável, Vairão.

³ CIIMAR Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Matosinhos

* jcserrao@gmail.com

** ruth.pereira@fc.up.pt

ISSN 1647-323X

INTRODUÇÃO

Desde a década de 40 que o plástico é produzido em massa e de forma crescente ao longo dos anos. A sua natureza polimérica sintética/semisintética de elevada massa molecular, resultante da polimerização de monómeros derivados de fontes petroquímicas (Fu et al., 2020), confere ao plástico alta durabilidade e persistência no meio ambiente (Figueiredo et al., 2018).

Devido à sua versatilidade, o plástico é largamente utilizado (Mammo et al., 2020). Entre as indústrias que mais consomem plástico e derivados destacam-se as que operam nas áreas da saúde, construção civil, têxtil, transportes e agricultura (Bahl et al., 2020). Algumas das utilizações compreendem o uso de plástico como material impermeável e de proteção contra fatores bióticos/abióticos, embalagem de produtos e medicamentos, produção de peças e instrumentos para a área automóvel, produção de vestuário de origem sintética, condicionadores do solo (espuma de poliuretano e flocos de poliestireno), controlo de pragas, sistemas de irrigação, entre outros (Beriot et al., 2020; Ng et al., 2018).

As características físico-químicas dos plásticos, aliadas à má utilização e gestão dos seus resíduos e a uma falta de atenção por parte das entidades competentes e indiferença ambiental por parte do consumidor, levou à acumulação em quantidades significativas destes produtos no meio ambiente, tendo já sido encontrados no ar, no solo e na água, mesmo nos locais mais inóspitos do planeta (Chen et al., 2021; Mammo et al., 2020; Scalenghe, 2018). Esta acumulação nos diversos compartimentos ambientais acarreta graves consequências, sobretudo no meio aquático e na sua biota sendo este um dos grandes reservatórios do planeta, para estes e outros resíduos.

Um problema acrescido prende-se com o facto de os polímeros de plástico, por ação de fatores ambientais (e.g. luz, radiação, U.V., temperatura), transporte e abrasão, se tornarem materiais de menores dimensões e de fácil translocação. Adicionalmente, o fenómeno de alterações climáticas (e.g. forte precipitação, diferenças significativas na pressão atmosférica, ondas de calor), intensificado pelo ser humano, potencia não só a translocação destes materiais nos ecossistemas como também a ressuspensão de partículas nas massas de água (Beriot et al., 2020).

Os microplásticos (Figura 1) de dimensão inferior a 5 mm (Mammo et al., 2020; Saavedra et al., 2019; Triebkorn et al., 2019) podem ser classificados como primários quando são produzidos e incorporados em produtos de natureza diversa, com estas dimensões; ou como secundários quando resultam da degradação física e/ou química de macroplásticos, pelos processos acima referidos, mas que podem ainda ser potenciados pela ação da biota aquática (Payton et al., 2020) e terrestre (Abel et al., 2019; Kwak & An, 2021).

Devido ao seu tamanho microscópico, estas partículas tornam-se bioacessíveis (Holmes et al., 2020) para uma panóplia imensa de organismos que são de extrema importância para os ecossistemas em que se encontram e para as funções que garantem muitos dos serviços desses ecossistemas. O impacte causado pode ser elevado e transferido ao longo das cadeias

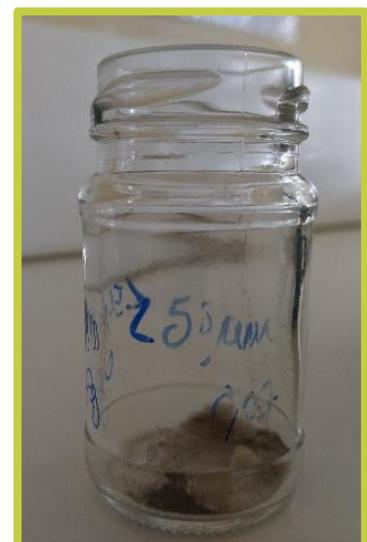


FIGURA 1: Microplásticos de dimensão inferior a 50 µm.

tróficas através de processos de bioacumulação/bioamplificação (Procter et al., 2019).

Fisicamente, devido à heterogeneidade dos materiais relativamente à forma e ao tamanho (Wagner et al. 2020), os microplásticos podem, por exemplo, interferir com processos digestivos causando bloqueios intestinais, reduzindo assim a alimentação e assimilação energética por parte dos organismos e, eventualmente, comprometendo a fertilidade dos mesmos. Os efeitos estão normalmente relacionados com o tamanho dos microplásticos, sendo que partículas com tamanho superior podem não ser ingeridas devido à limitada amplitude bucal do organismo presente (Kim & An, 2020; Zhang et al., 2020), enquanto partículas de tamanho inferior a 0.5 μm (nanoplásticos), podem induzir exposição sistémica e penetrar através dos órgãos (Botterell et al., 2020; Rainieri & Barranco, 2019).

Quimicamente, e devido à variedade de polímeros e aditivos que os constituem, os microplásticos podem provocar efeitos tóxicos nos organismos como por exemplo a redução da fertilidade e/ou o aumento da taxa de mortalidade dos mesmos (Wagner et al., 2020). Adicionalmente, os microplásticos têm a capacidade de adsorverem compostos químicos tóxicos, potenciando efeitos adversos na biota presente seja a nível terrestre ou aquático (Khalid et al., 2021; Rodríguez-Seijo et al., 2019; Tourinho et al., 2019).

Ecologicamente, os microplásticos têm a capacidade de transportar espécies invasoras por longas distâncias para novos habitat, levando à perda de biodiversidade endémica, ocorrência de pragas e doenças com possíveis consequências económicas (Khalid et al., 2021).

Devido à ubiquidade dos microplásticos (Mammo et al., 2020) e aos efeitos adversos que impactam os ecossistemas, extrema atenção deve ser dada a esta problemática na tentativa de reduzir os seus efeitos e promover a sustentabilidade ambiental. Tendo em conta a dificuldade e quase impossibilidade de remover os microplásticos do meio ambiente, torna-se imperativo alterar comportamentos. É necessário adotar uma mentalidade consciente e ecológica a fim de evitar novas entradas de cargas poluentes nos ecossistemas.

De um ponto de vista preventivo, e de modo a reduzir a poluição e os potenciais efeitos causados pelos microplásticos, uma avaliação e monitorização da qualidade do meio aquático e do meio terrestre é de extrema importância (Mankiewicz-boczek et al., 2008; DQA., 2000). O principal objetivo de uma monitorização efetiva e eficaz consiste na redução dos efeitos nocivos ao ambiente/ecossistema e na sua previsão e prevenção.

De um ponto de vista educacional, e para que se consiga diminuir a pegada ecológica provocada pelo Homem, ações de consciencialização deveriam estar presentes com maior intensidade na sociedade atual e o tema deveria ser abordado tendo em conta o público-alvo em questão. Do mesmo modo, o ensino de disciplinas especificamente direcionadas para Cidadania Ambiental, sobretudo nas gerações mais jovens, poderia ser fundamental para colmatar várias lacunas no conhecimento geral da população relativas aos efeitos que o comportamento do ser humano pode provocar nos ecossistemas.

Este trabalho tem como objetivo alertar a população para a decadência ambiental provocada pelos microplásticos e para a possibilidade de reverter esta tendência negativa. Serão apresentadas metodologias que poderão ser usadas para a monitorização ambiental, como também servir de apoio ao ensino básico, na área das ciências naturais (e.g. política dos 5R), e secundário, na área da biologia (e.g. destruição de habitats e perda de biodiversidade) e físico-química (e.g. degradação de polímeros e durabilidade dos materiais), elucidando a comunidade jovem para a problemática dos microplásticos e poluição em geral.



FERRAMENTAS DE MONITORIZAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA

Uma monitorização completa e sensível às alterações sofridas pelos sistemas não deve incluir apenas parâmetros físicos e químicos tradicionais, mas também parâmetros biológicos de diferentes tipos e com possibilidade de recurso a diferentes metodologias (Kokkali & Delft, 2014). Neste contexto, a utilização de modelos biológicos é recomendada, visto que organismos vivos conseguem medir respostas integradas a várias substâncias tóxicas e não tóxicas presentes numa determinada matriz. Isto é, organismos de diferentes sensibilidades conseguem detetar efeitos sinérgicos ou antagónicos de misturas de substâncias, assim como identificar as doses às quais esses efeitos ocorrem, por ultrapassarem a capacidade de regulação e de destoxificação dos organismos. Efeitos estes que seriam negligenciados caso se realizassem apenas análises físico-químicas individuais a cada composto (Kokkali & Delft, 2014; Szara et al., 2020).

Para que se proceda à realização de uma monitorização completa e imparcial, ensaios ecotoxicológicos padronizados pelas organizações com competências para o efeito (e.g. ISO - Organização Internacional de Normalização, OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico, AFNOR - Association Française de Normalisation) têm vindo a ser usados em muitos países, até com suporte regulamentar (DQA., 2000) para avaliação de matrizes ambientais. Não obstante a sua relevância, discute-se atualmente a adequação dos protocolos padronizados, inicialmente desenvolvidos para substâncias químicas, para novos contaminantes emergentes como nanomateriais e os resíduos de plástico (micro e nanoplásticos) dadas as suas propriedades particulares, que se caracterizam entre outros aspetos pelo baixa solubilidade e potencial de agregação.

Para que as avaliações ecotoxicológicas possam refletir os efeitos nos sistemas afetados, as baterias de ensaios a realizar devem incluir organismos de diferentes níveis tróficos, com diferentes vias de exposição e diferentes níveis de sensibilidade, desde microalgas, plantas, invertebrados, peixes, bactérias, entre outros. De um modo geral, um bom modelo biológico, para os ensaios ecotoxicológicos, é um organismo com as seguintes características: representativo de um determinado nível de sensibilidade dentro de uma gama mais vasta que se pretende caracterizar; de distribuição ampla e abundante; autóctone ou representativo do ecossistema a estudar; importância ecológica, recreativa ou comercial; suscetível de ser mantido e manipulado laboratorialmente; autoecologia, fisiologia e etologia bem conhecidas e devem permitir extrapolações.

No entanto, a monitorização da toxicidade com o auxílio a modelos biológicos apresenta algumas desvantagens, como por exemplo ser um processo moroso, requerendo não só as condições e material adequado para a elaboração do ensaio como também mão-de-obra qualificada para manter as culturas de organismos-teste. Com todos estes requisitos, os custos das avaliações ecotoxicológicas inevitavelmente aumentam (Kokkali & Delft, 2014; Marsalek & Rojícková-Padrťová, 2000). Assim, uma alternativa prática consiste na utilização de kits comerciais para realização de ensaios ecotoxicológicos. De uma forma geral, os kits comerciais utilizam um determinado organismo com base nas suas características (ciclo de vida, sensibilidade a tóxicos, modo de vida) e matrizes ambientais a testar (água, solo, sedimento), e medem parâmetros específicos (mortalidade, imobilização, crescimento, inibição alimentar, bioluminescência, germinação, entre outros) determinando concentrações efetivas para os mesmos (CE_{50} – concentração que causa uma inibição de 50% no parâmetro analisado ou que afeta 50% dos organismos testados. Os kits ecotoxicológicos são particularmente apropriados para testes de rotina, quando não existem as condições e

a experiência necessária acima referidas, mas também para utilizações pontuais, uma vez que usam bactérias liofilizadas, ovos dormentes de invertebrados ou algas imobilizadas e, portanto, são totalmente independentes da necessidade de manutenção laboratorial de culturas de stock de organismos-teste, mais apropriadas para avaliações de rotina (Marsalek & Rojícková-Padrťová, 2000).

Atualmente podem-se encontrar vários tipos de kits, disponíveis comercialmente (Tabela I) que, por utilizarem organismos e parâmetros distintos, se adequam às mais diversas necessidades.

TABELA I: Exemplos de kits comerciais para avaliação ecotoxicológica e respetivas características.

Kit	Espécie	Parâmetro	Amostra a testar
ALGALTOXKIT® Fresh water	FW: <i>Raphidocelis subcapitata</i>	Inibição de crescimento 72h	FW: Efluentes, águas superficiais/residuais, aquíferos, elutriados
ALGALTOXKIT® Marine water	MW: <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Inibição de crescimento 72h	MW: Águas costeiras/estuarinas, efluentes/elutriados salinizados
CERIODAPHTOXKIT F®	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Mortalidade 24 h	Efluentes, águas superficiais/residuais, aquíferos, elutriados
DAPHTOXKIT F® magna	<i>Daphnia magna</i>	Inibição da mobilidade 24 - 48 h	Efluentes, águas superficiais/residuais, aquíferos, elutriados
OSTRACODTOXKIT F®	<i>Heterocypris incongruens</i>	Mortalidade/inibição de crescimento 6 dias	Sedimentos, solos e resíduos sólidos
PHYTOTOXKIT® SOLID SAMPLES	Monocotiledónea: <i>Sorghum saccharatum</i> Dicotiledóneas: <i>Lepidium sativum</i> <i>Sinapis alba</i>	Monitorização da germinação de sementes e crescimento inicial 72h	Solos, lamas, efluentes, pesticidas/biocidas, resíduos sólidos
RAPIDTOXKIT®	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	Inibição alimentar 1h	Efluentes, águas superficiais/residuais, aquíferos, elutriados
ROTOXKIT®	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Mortalidade 24h	Efluentes, águas superficiais/residuais, aquíferos, elutriados
THAMNOTOXKIT F®	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	Mortalidade 24h	Efluentes, águas superficiais/residuais, aquíferos, elutriados, biotoxinas

FW (Freshwater) – Água doce; MW (Marine water) – Água salgada; Todos os kits são marca registada da empresa Microbiotests Inc., 2001 (<https://www.microbiotests.com/>)

Tendo em conta a sua simplicidade e flexibilidade, os kits disponíveis permitem elaborar diferentes tipos de ensaios e desenhos experimentais respondendo às necessidades do utilizador e aos objetivos pretendidos. É possível avaliar diferentes tempos de exposição e diferentes meios, avaliar parâmetros letais ou sub-letais, alterar o número de réplicas e testar um conjunto alargado de amostras simultaneamente.

Apesar de serem executados com relativa facilidade, é necessário a elaboração de um bom desenho experimental tendo em conta o parâmetro a ser testado e a escolha do organismo, número de réplicas e tempos de exposição adequados a fim de se obterem resultados fidedignos. Para além disso, os organismos

presentes nos kits têm de ser utilizados de acordo com as recomendações que constam no procedimento, atendendo à especificidade de janelas temporárias críticas que, se não forem cumpridas, comprometem o ensaio.



UTILIZAÇÃO DE KITS COMERCIAIS EM ECOTOXICOLOGIA

Nos últimos anos, vários trabalhos na área da toxicologia ambiental com recurso a kits comerciais têm vindo a ser publicados com resultados promissores e equiparáveis aos procedimentos padronizados.

A título de exemplo, o trabalho realizado por Szara et al. (2020) teve como objetivo criar misturas inovadoras, compostas por sedimentos presentes no leito dos rios e diversos tipos de resíduos (resíduos de celulose, cinzas, cascas de café e lamas provenientes do tratamento de águas), para serem utilizados como substrato para plantação agrícola e ornamental. Para avaliar cada mistura realizaram uma série de testes ecotoxicológicos, incluindo o RapidToxKit®, PhytotoxKit® e Ostracodtoxkit®. As amostras a testar foram preparadas tendo em conta as características de cada kit (e.g. RapidToxKit® - elutriados; Phytotoxkit® – sedimentos; Ostracodtoxkit® – solução com sedimentos) e comparadas com o controlo (sedimento do leito ou o respetivo elutriado). Os autores verificaram que a mistura com resíduos de celulose apresentava-se como sendo a mais tóxica inibindo significativamente a ingestão de alimento pelo crustáceo *T. platyurus* (RapidToxKit®), a germinação e crescimento de plantas (Phytoxkit®) e por fim, o crescimento do ostracóde (Ostracodtoxkit®). Pelo contrário, a mistura com as lamas revelou ser a menos tóxica, promovendo até estimulação no crescimento das plantas. Este estudo demonstrou o potencial de utilização de kits comerciais como ferramentas para avaliações ambientais, incorporando diversas variáveis e desenhos experimentais mais complexos.

Mavakala et al. (2016) utilizou o RapidToxKit® e o Ostracodtoxkit® para avaliar o potencial efeito tóxico de lixiviados e sedimentos recolhidos de uma lagoa de drenagem em quatro pontos de amostragem numa lixeira, respetivamente. Para maior representatividade, a amostragem foi feita no período seco (maio a agosto) e no período chuvoso (janeiro a abril). Para o RapidToxKit®, submeteram os organismos aos lixiviados sem diluição e diluídos 10, 100 e 1000 vezes, perfazendo um total de quatro concentrações com um tempo de exposição de 60 min. Para o Ostracodtoxkit®, mediram os efeitos crónicos da exposição aos sedimentos a testar durante 6 dias. Os resultados obtidos para o RapidToxKit® apresentaram uma taxa de inibição de 100% para todos os pontos/períodos de amostragem para as concentrações não diluídas. No entanto, para as concentrações diluídas, verificaram taxas de inibição superiores no período chuvoso comparativamente ao período seco. Em relação ao Ostracodtoxkit®, e de forma semelhante, verificaram maior percentagem de mortalidade no período chuvoso (100%), quando comparado com o período seco (28,4% a 100%). De acordo com os autores, os resultados indicaram que as amostras recolhidas, quer dos lixiviados, quer dos sedimentos oriundos da lagoa de drenagem no período chuvoso apresentavam toxicidade superior, possivelmente devido ao fenómeno de percolação, um facto verificado por ambos os kits e que foi avaliado de forma diferente tendo em conta as matrizes líquidas e sólidas testadas.



POTENCIAL DOS KITS COMERCIAIS PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE MICRO/NANOPLÁSTICOS

Recentemente, vários artigos têm referido o uso de kits comerciais para avaliação destes poluentes emergentes.

O trabalho realizado por Saavedra et al. (2019) teve como objetivo aprofundar conhecimento relativamente ao comportamento dos micro/nanoplásticos em ambiente aquático e efeitos causados pelos mesmos no zooplâncton. Para o efeito, foram escolhidas nanoesferas com 200 nm de amidina e poliestireno-carboxila como resíduos plásticos modelo e três kits (DaphToxKitF®; RotoxKit®; ThamnoToxKit®) com espécies diferentes para maior representatividade do meio aquático. Os organismos foram expostos a concentrações crescentes (10 – 400 mg/L) de nanoesferas na presença ou ausência de alginato/ácido húmico (usados como modelos de matéria orgânica). Os resultados obtidos, transversais aos três kits utilizados, demonstram um efeito tóxico crescente com o aumento gradual das concentrações e ainda que os compostos de amidina apresentaram maior toxicidade quando comparados com os compostos de poliestireno-carboxila. Verificaram ainda, atendendo aos CE₅₀ registados, uma sensibilidade decrescente começando pelo DaphToxKit®, seguido de RotoxKit® e por fim ThamnoToxKit®. Adicionalmente, na presença de matéria orgânica, os efeitos negativos causados pelas nanoesferas foram significativamente reduzidos, resultando num aumento dos valores de CE₅₀ para todos os organismos.

Naha et al. (2009) tentaram caracterizar e avaliar a toxicidade de Poli N-isopropilacrilamida (PNIPAM) isoladamente e em mistura com N-terc-butilacrilamida (PNIPAM/BAM), dois polímeros que fazem parte da constituição de plásticos. Para o efeito, escolheram uma bateria de ensaios incluindo o uso do kit comercial ThamnoToxKit® e a realização de três ensaios padronizados, nomeadamente o ensaio de Microtox® (bactéria *Vibrio fischeri*), o ensaio de inibição de crescimento com a microalga *R. subcapitata* e o ensaio de imobilização com *D. magna*. Foram testadas diferentes concentrações, previamente escolhidas como tendo efeito observável nos organismos, e os ensaios seguiram as indicações presentes nos respetivos protocolos. Os organismos-teste apresentaram sensibilidades distintas para cada um dos compostos. Concluiu-se que, para as condições a testar, compostos químicos foram mais tóxicos para os crustáceos e a bactéria, comparativamente à microalga. Adicionalmente, verificou-se que o uso do kit comercial demonstrou, uma vez mais, sensibilidade comparável à de ensaios padronizados para a avaliação de compostos constituintes dos microplásticos.

O trabalho realizado por Casado et al. (2013) pretendeu comparar a sensibilidade de uma série de testes ecotoxicológicos, avaliando o potencial efeito provocado por vários compostos, entre eles nanoplásticos de poliestireno com diferentes diâmetros. A bateria de testes escolhida foi idêntica à do estudo anterior. As concentrações testadas foram escolhidas de acordo com ensaios realizados previamente. Os autores registaram efeitos tóxicos em todos os testes realizados à exceção do ensaio Microtox®. A toxicidade dos nanoplásticos demonstrou estar relacionada com o seu diâmetro.

Concluindo, a aplicação de kits comerciais na avaliação de poluentes emergentes, nomeadamente nano e microplásticos, demonstram sensibilidade suficiente e equiparável à de ensaios padronizados.



KITS DE ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS PARA FINS EDUCATIVOS

Os kits de ensaios ecotoxicológicos, pelas razões descritas acima, podem igualmente ser excelentes ferramentas para o ensino experimental da ecotoxicologia a nível do ensino superior, ou para abordar temáticas de contaminação ambiental no ensino básico e secundário. Como por exemplo na área de remediação ambiental de matrizes líquidas e sólidas, na abordagem aos poluentes emergentes e fenómenos de eutrofização e conseqüente aparecimento de toxinas, a nível de avaliação de novos compostos químicos e farmacológicos, podendo ainda potenciar a mudança comportamental e a necessidade de adoção de tecnologias ecológicas e sustentáveis.

Para melhor compreensão do funcionamento dos kits comerciais, tendo em conta o perfil e potencial dos mesmos em contexto escolar, seja para uma melhor aprendizagem teórico-prática e/ou como forma de consciencialização para as conseqüências da poluição generalizada, ou para os efeitos de determinados contaminantes específicos (e.g. os microplásticos) apresenta-se de seguida uma clarificação do protocolo de um kit, o RapidToxKit® (Microbiotest Inc.), para promover a sua utilização nos diferentes níveis de ensino.

Protocolo RapidToxKit

O RapidToxKit®, tal como o nome indica, é um kit específico para matrizes de água doce capaz de produzir resultados ecotoxicológicos de forma rápida (15 a 60 minutos). Avalia o efeito que potenciais contaminantes que se encontrem em solução/suspensão no meio teste provocam na capacidade de alimentação do crustáceo aquático *Thamnocephalus platyurus* (Figura 2).

Princípio do método

Após exposição do organismo à substância teste, é adicionada uma suspensão de microesferas vermelhas que simulam o alimento. Em organismos saudáveis e, portanto, no controlo (água doce padrão sem substância teste), é expectável que os organismos ingiram as microesferas, resultando numa mudança de cor do trato digestivo de transparente para vermelho, o que é facilmente visualizado com recurso a um estereoscópio. Os organismos afetados pela exposição ao tóxico ou a amostras com potencial tóxico, deixam de se alimentar, e, portanto, não ingerem as microesferas ou então ingerem-nas em menor número. A presença ou a ausência de microesferas coloridas no trato digestivo dos crustáceos no seu estado larvar é observada 15 a 30 minutos após a adição das mesmas ao meio em que se encontram os organismos (Microbiotests Inc., 2001).

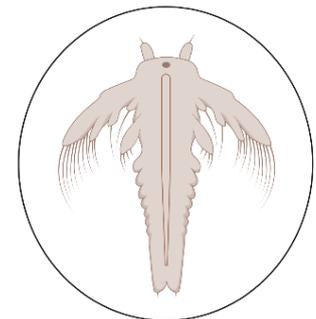


FIGURA 2: Organismo-teste *Thamnocephalus platyurus*. Criado em biorender.com

Tendo em conta a simplicidade e flexibilidade do kit, consegue-se elaborar diferentes tipos de ensaios e desenhos experimentais, de resposta a diferentes questões científicas que podem ser colocadas pelos estudantes num exercício de ensino-aprendizagem centrado na resolução de problemas.

O organismo-teste *T. platyurus* habita o meio aquático de água doce, desempenhando funções importantes para o bom funcionamento do ecossistema (Brausch & Smith, 2009a). Sendo organismos filtradores (herbívoros e detritívoros), estes crustáceos alimentam-se de partículas presentes na coluna de água, diminuindo a carga orgânica do meio e servem ainda de alimento para níveis tróficos superiores. A fácil

manipulação em laboratório (curto ciclo de vida e ovos em estado dormente de fácil eclosão), a sua importância ecológica, a abundante distribuição, a sua sensibilidade a xenobióticos (Papadopoulos et al., 2019), fisiologia e etologia bem caracterizadas tornam este crustáceo um bom organismo teste. Brausch & Smith (2009b) verificaram ainda adaptações intraespecíficas relativamente à sensibilidade apresentada em organismos que habitam locais rodeados por flora nativa em comparação a organismos que habitam locais rodeados por campos agrícolas. A permanência em habitats fustigados por agentes fitossanitários desenvolve um certo grau de resistência relativamente a organismos da mesma espécie que habitam locais menos poluídos.

Cada kit inclui 2 tubos com cistos¹ (Figura 3) em estado dormente, frasco com água doce (meio de manutenção dos organismos), 3 frascos de incubação Figura 4), 3 tubos de ensaio para transferência dos organismos eclodidos (subamostragem) (Figura 5), 48 tubos de ensaio e 6 suportes (Figura 4), microesferas, fixador (lugol - usado para sacrificar e preservar os organismos), placas de observação e grelhas com contraste para facilitar a contagem (Figura 6). Material necessário não incluído: micropipetas, câmara incubadora, vórtex (opcional) e estereoscópio (lupa).

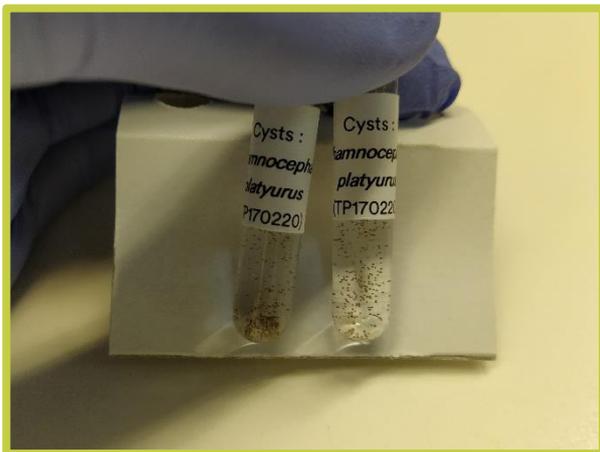


FIGURA 3: Tubos com cistos hidratados.



FIGURA 4: Frasco de incubação com cistos.



FIGURA 5: Tubos de ensaio, de subamostragem e suportes.

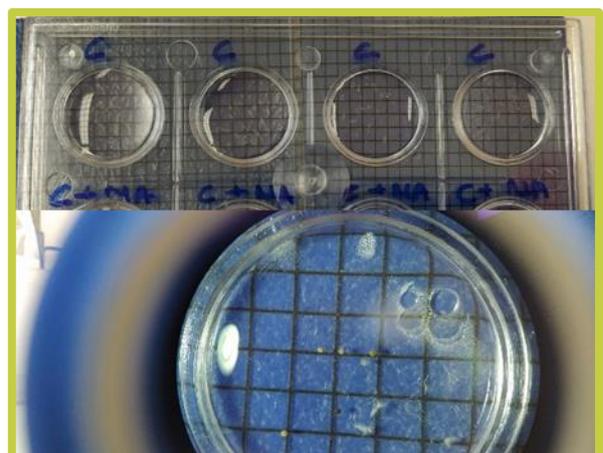


FIGURA 6: Placas de observação com grelha de contagem com contraste. Vista normal (cima) e vista com lupa (baixo).

¹ Estruturas homólogas a ovos

Metodologia do ensaio (Microbiotests Inc., 2001)

1. Pré-hidratação
 - Abrir tubo de cistos e adicionar 1 mL de água doce padronizada;
 - Fechar o tubo, agitar levemente para suspender todos os cistos e deixar 1 hora em repouso à temperatura ambiente.

2. Eclosão dos cistos
 - Despejar todo o conteúdo do tubo no frasco de incubação e, com um 1 mL fazer uma nova transferência, certificando que todos os cistos são transferidos;
 - Adicionar 8 mL de água doce ao frasco de incubação, abanar gentilmente para homogeneizar a amostra e colocar na câmara;
 - Incubar por 30 h a 45 h, a 25°C sob iluminação contínua (3000-4000 lux).

3. Preparação das soluções a testar
 - Encher os tubos de ensaio com o controlo (ASTM/água doce padrão) e com as soluções teste (aproximadamente 5 mL por tubo de ensaio);
 - Repetir o passo anterior para todas as réplicas.

4. Exposição dos organismos à substância teste
 - Retirar o frasco com os organismos eclodidos da câmara de incubação, agitar suavemente garantindo que todos os organismos estão em suspensão e transferir, num movimento rápido, todo o conteúdo para o tubo de subamostragem;
 - Calibrar a micropipeta de 1 mL para 0,50 mL, colocar a ponta aproximadamente a meio do tubo de subamostragem, ressuspender os organismos e transferir 0,50 mL da suspensão larvar para cada tubo de ensaio, repetindo o procedimento em cada transferência;
 - Tapar todos os tubos, colocá-los na câmara incubadora a 25°C, sem luz, por 15 min, 30 min ou 60 min (consoante os objetivos do estudo).

5. Adição das microesferas
 - Agitar vigorosamente o frasco que contém as microesferas vermelhas, se possível usando um vórtex, para obtenção de uma mistura homogénea;
 - Adicionar 0,20 mL da suspensão de microesferas a cada um dos tubos de ensaio;
 - Tapar todos os tubos de ensaio, distribuir homogeneamente as microesferas e colocá-los na incubadora entre 15 min a 30 min a 25°C sem luz.

6. Fixação dos organismos
 - Assim que terminar o tempo de contacto com as microesferas, adicionar 3 gotas do agente fixador a cada tubo de ensaio;
 - Tapar todos os tubos e aguardar aproximadamente 5 min para que os organismos mortos sedimentem no fundo.

7. Visualização e contagem dos organismos
 - Retirar os organismos de cada um dos tubos de ensaio para os poços de observação com a micropipeta de 1mL calibrada para 0,30 mL;
 - Colocar a ponta próximo dos organismos e, num movimento rápido, recolher o conteúdo;
 - Esvaziar o conteúdo no primeiro poço de observação;
 - Com recurso a uma lupa contar o número total de organismos, distinguindo aqueles que apresentam o tubo digestivo com cor avermelhada;
 - Excluir todos os organismos em que não seja possível visualizar o tubo digestivo (opacos com cor amarelada);
 - Repetir este procedimento para todos os poços.

8. Critérios de validação, cálculos e interpretação dos resultados
 - Os controlos devem apresentar uma taxa de ingestão $\geq 50\%$, caso contrário o ensaio é inválido e deve ser descartado.
 - Para cada conjunto de réplicas deve-se calcular a % média de ingestão;
 - A % de inibição de ingestão, calcula-se de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{inibição de ingestão} = \frac{\% \text{ média de ingestão no controlo} - \% \text{ média de ingestão na amostra}}{\% \text{ média de ingestão no controlo}} \times 100$$
 - % de inibição de ingestão $\geq 30\%$ sugere forte suspeita de compostos indesejáveis (toxicidade) nas amostras testadas.

VANTAGENS E LIMITAÇÕES DOS KITS COMERCIAIS

Uma das vantagens da utilização de kits é a inclusão de todo o material consumível necessário à realização do protocolo, com a replicação adequada. Deste modo, podem-se obter resultados fiáveis de forma simples e rápida, evitando qualquer tipo de cultivo ou manutenção de organismos-teste. Assim, há uma redução dos eventuais custos da experiência e requisitos que de outro modo poderiam comprometer a realização destes ensaios em contexto escolar. No entanto, o material que acompanha o kit não é reutilizável constituindo uma carga residual acrescida (Kokkali & Delft, 2014; Microbiotests Inc., 2001), um aspeto negativo sobretudo para aplicações de rotina, e não para fins educacionais.

Outra limitação, dependendo do kit utilizado, é a necessidade de equipamentos para a eclosão e crescimento dos organismos em condições específicas (estufas; câmaras de incubação), concentração e/ou separação de fases líquidas e sólidas (centrífuga), visualização e obtenção de resultados (lupa; mesa de luz; espectrofotómetro). Apesar de serem equipamentos comuns em ambiente laboratorial, mesmo em escolas secundárias e de ensino básico, como não vêm incluídos com os kits, podem impedir a realização plena dos mesmos. Contudo, e no caso do kit em análise nesta publicação, as condições exigidas podem, com alguma criatividade, serem obtidas com facilidade (e.g. sala com temperatura e luminosidade controladas).

Os organismos possuem janelas temporárias críticas de desenvolvimento e de diferentes características/sensibilidades que devem ser respeitadas de acordo com o protocolo do kit. Por exemplo, os organismos do RapidToxKit, devem ser usados exatamente no período compreendido entre as 30 – 45 h após incubação. Antes das 30 h, não apresentam um tubo digestivo completo, sobrevivendo das reservas vitelinas e, portanto, sem capacidade de ingestão. Acima das 45 h após incubação, os organismos podem sofrer de inanição (fome), comprometendo o seu *fitness* e capacidade de ingestão das microesferas.

Adicionalmente, no caso deste kit em específico, não existe instrução clara de que não possa ser utilizado de forma faseada. No entanto alguns componentes, nomeadamente as microesferas, demonstraram uma degradação significativa quando, depois de abertas, se tentaram conservar no frigorífico, comprometendo posteriores fases do ensaio. De referir ainda que, na etapa 2, eclosão dos cistos, apesar da lavagem do tubo recomendada pelo fornecedor ser de 1 mL, os restantes 8 mL a adicionar devem também ser utilizados, um a um, como lavagem, de forma a garantir que todos cistos sejam transferidos para o frasco de incubação.

De um ponto de vista científico, é necessário ter em conta a variabilidade biológica existente sendo que nem todos os organismos reagem da mesma forma quando presentes nas mesmas condições. De facto, esta é uma limitação transversal a todos os ensaios com organismos vivos podendo não haver sincronização, por exemplo, na eclosão e crescimento de organismos e germinação de sementes. Mas este problema só se ultrapassa com a correta replicação.

Assim, é possível que a percentagem de organismos saudáveis/aptos para o ensaio, em cada réplica, não seja total, havendo um mínimo necessário para a validação do ensaio, que deve ser garantido nos controlos permitindo desta forma uma comparação equilibrada com as réplicas das amostras analisadas (Kokkali & Delft, 2014; Microbiotests Inc., 2001).

CONCLUSÃO

Os avanços técnico-científicos na área da ecotoxicologia tornaram evidente a necessidade de utilizar modelos biológicos nas mais variadas avaliações e permitiram o desenvolvimento de ferramentas de monitorização ambiental e toxicológica mais abrangentes e eficazes. Ao longo dos últimos anos, os kits comerciais têm-se demonstrado uma ferramenta fiável, prática e económica e as suas aplicações são cada vez mais amplas.

Perante novos tipos de poluentes existem muitas questões a serem respondidas, o caso dos microplásticos não é exceção. Neste contexto, e por incluírem uma vasta gama de organismos-teste, cada vez mais trabalhos de pesquisa com microplásticos têm vindo a ser desenvolvidos com recurso a kits comerciais para a avaliação dos seus efeitos ecotoxicológicos. Até ao momento, e considerando a sua aplicação com outras substâncias potencialmente tóxicas, a utilização deste tipo de kits tem-se demonstrado promissora, apresentando um elevado grau de sensibilidade que é comparável com o de ensaios padronizados bem estabelecidos.

Por outro lado, a educação permite sensibilizar as gerações mais jovens para os efeitos negativos causados não só pelos microplásticos, mas também por outros poluentes. Através da experimentação e contacto com prático com a vertente científica, visualizando o efeito que poluentes causam em determinados organismos, ocorre, mais facilmente, uma interiorização lúcida e consciente por parte do indivíduo, alertando-o para a problemática da poluição. Assim, os kits comerciais poderão ser uma mais-valia em contexto escolar, uma vez que, pela facilidade de realização, permitem demonstrar, de forma simples, como se realizam ensaios toxicológicos, consolidando conceitos e contribuindo para a literacia científica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bahl S, Dolma J, Singh JJ, Sehgal S (2020). Biodegradation of plastics: A state of the art review. *Materials Today: Proceedings*.
- Beriot N, Peek ., Zornoza R, Geissen V, Lwanga EH (2021). Low density-microplastics detected in sheep faeces and soil: A case study from the intensive vegetable farming in Southeast Spain. *Science of The Total Environment*, 755, 142653.
- Botterell ZL, Beaumont N, Cole M, Hopkins FE, Steinke M, Thompson RC, Lindeque PK (2020). Bioavailability of Microplastics to Marine Zooplankton: Effect of Shape and Infochemicals. *Environmental Science & Technology*, 54(19), 12024-12033.
- Brausch JM, Smith PN (2009a). Mechanisms of resistance and cross-resistance to agrochemicals in the fairy shrimp *Thamnocephalus platyurus* (Crustacea: Anostraca). *Aquatic Toxicology*, 92(3), 140-145.
- Brausch, JM, Smith PN (2009b). Pesticide resistance from historical agricultural chemical exposure in *Thamnocephalus platyurus* (Crustacea: Anostraca). *Environmental Pollution*, 157(2), 481-487.
- Casado MP, Macken A, Byrne HJ (2013). Ecotoxicological assessment of silica and polystyrene nanoparticles assessed by a multitrophic test battery. *Environment international*, 51, 97-105.
- Chen Y, Awasthi AK, Wei F, Tan Q, Li J (2020). Single-use plastics: Production, usage, disposal, and adverse impacts. *Science of The Total Environment*, 141772.
- União Europeia (2000) Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Outubro de 2000 que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, 327.
- Figueiredo GM, Vianna TMP (2018). Suspended microplastics in a highly polluted bay: Abundance, size, and availability for mesozooplankton. *Marine Pollution Bulletin*, 135, 256-265.
- Fu Z, Chen G, Wang W, Wang J (2020). Microplastic pollution research methodologies, abundance, characteristics and risk assessments for aquatic biota in China. *Environmental Pollution*, 115098.
- Holmes LA, Thompson RC, Turner A (2020). In vitro avian bioaccessibility of metals adsorbed to microplastic pellets. *Environmental Pollution*, 261, 114107.

- Khalid N, Aqeel M, Noman A, Hashem M, Mostafa YS, Alhaithloul HAS, Alghanem SM (2020). Linking effects of microplastics to ecological impacts in marine environments. *Chemosphere*, 128541.
- Kim SW, An YJ (2020). Edible size of polyethylene microplastics and their effects on springtail behavior. *Environmental Pollution*, 266, 115255.
- Kokkali V, Delft W (2014). Overview of commercially available bioassays for assessing chemical toxicity in aqueous samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 61, 133-155.
- Kwak JI, An YJ (2021). Microplastic digestion generates fragmented nanoplastics in soils and damages earthworm spermatogenesis and coelomocyte viability. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 124034.
- Mammo F, Amoah I, Gani K, Pillay L, Ratha S, Bux F, Kumari S (2020). Microplastics in the environment: Interactions with microbes and chemical contaminants. *Science of The Total Environment*, 140518.
- Mankiewicz-Boczek J, Nałęcz-Jawecki G, Drobniewska A, Kaza M, Sumorok B, Izydorczyk K, Zalewski M, Sawicki J (2008). Application of a microbiotests battery for complete toxicity assessment of rivers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(3), 830-836.
- Marsalek B, Rojícková-Padrťová R (2000). Selection of a battery of microbiotests for various purposes—The Czech experience. *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*, 95-101.
- Mavakala BK, Le Faucheur S, Mulaji CK, Laffite A, Devarajan N, Biey EM, Giuliani G, Kabatusuila P, Mpiana PT (2016). Leachates draining from controlled municipal solid waste landfill: detailed geochemical characterization and toxicity tests. *Waste Management*, 55, 238-248.
- MicroBiotests Inc. 2001, Rapidtoxkit. Rapid Toxicity Screening Microbiotest. Ghent, Belgium
- Naha PC, Casey A, Tenuta T, Lynch I, Dawson KA, Byrne HJ, Davoren M (2009). Preparation, characterization of NIPAM and NIPAM/BAM copolymer nanoparticles and their acute toxicity testing using an aquatic test battery. *Aquatic Toxicology*, 92(3), 146-154.
- Ng EL., Lwanga EH, Eldridge SM, Johnston P, Hu HW, Geissen V, Chen D (2018). An overview of microplastic and nanoplastic pollution in agroecosystems. *Science of The Total Environment*, 627, 1377-1388.
- Papadopoulos KP, Argyriou R, Economou CN, Charalampous N, Dailianis S, Tatoulis TI, Tekerekopoulou AG, Vayenas DV (2019). Treatment of printing ink wastewater using electrocoagulation. *Journal of Environmental Management*, 237, 442-448.
- Payton TG, Beckingham BA, Dustan P (2020). Microplastic exposure to zooplankton at tidal fronts in Charleston Harbor, SC USA. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 232, 106510.
- Procter J, Hopkins FE, Fileman ES, Lindeque PK (2019). Smells good enough to eat: Dimethyl sulfide (DMS) enhances copepod ingestion of microplastics. *Marine Pollution Bulletin*, 138, 1-6.
- Rainieri S, Barranco A (2019). Microplastics, a food safety issue? *Trends in Food Science & Technology*, 84, 55-57.
- Rodríguez-Seijo A, Santos B, da Silva EF, Cachada A, Pereira R (2019). Low-density polyethylene microplastics as a source and carriers of agrochemicals to soil and earthworms. *Environmental Chemistry*, 16(1), 8-17.
- Saavedra J, Stoll S, Slaveykova VI (2019). Influence of nanoplastic surface charge on eco-corona formation, aggregation and toxicity to freshwater zooplankton. *Environmental Pollution*, 252, 715-722.
- Scalenghe R (2018). Resource or waste? A perspective of plastics degradation in soil with a focus on end-of-life options. *Heliyon*, 4(12), e00941.
- Souza Machado AA, Kloas W, Zarfl C, Hempel S, Rillig MC (2018). Microplastics as an emerging threat to terrestrial ecosystems. *Global Change Biology*, 24(4), 1405-1416.
- Szara M, Baran A, Klimkowicz-Pawlas A, Tarnawski M (2020). Ecotoxicological and chemical properties of the roznów reservoir bottom sediment amended with various waste materials. *Journal of Environmental Management*, 273, 111176.
- Tourinho PS, Kočf V, Loureiro S, van Gestel CA (2019). Partitioning of chemical contaminants to microplastics: Sorption mechanisms, environmental distribution and effects on toxicity and bioaccumulation. *Environmental Pollution*, 252, 1246-1256.
- Triebkorn R, Braunbeck T, Grummt T, Hanslik L, Huppertsberg S, Jekel M, Knepper TP, Kraiss S, Müller YK, Pittrof M, Ruhl AS, Schmiege H, Schur C, Strobel C, Wagner M, Zumbulte N, Kohler HR (2019). Relevance of nano- and microplastics for freshwater ecosystems: a critical review. *Trends in Analytical Chemistry*, 110, 375-392.
- Zhang Y, Wolosker MB, Zhao Y, Ren H, Lemos B (2020). Exposure to microplastics cause gut damage, locomotor dysfunction, epigenetic silencing, and aggravate cadmium (Cd) toxicity in *Drosophila*. *Science of The Total Environment*, 744, 140979.
- Zimmermann L, Göttlich S, Oehlmann J, Wagner M, Völker C (2020). What are the drivers of microplastic toxicity? Comparing the toxicity of plastic chemicals and particles to *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 267, 115392.