



# Protocolo experimental

## As Artémias e os microplásticos: uma história sem final feliz.

### Enquadramento Teórico

Os oceanos constituem os maiores reservatórios de água (97,2%) do planeta Terra, constituindo uma fonte vital de recursos biológicos, naturais e económicos. No entanto, o Homem tem negligenciado a importância deste compartimento ambiental, poluindo os oceanos através das diversas atividades antropogénicas que desenvolve quer a nível terrestre quer a nível marítimo. Os resíduos de plástico constituem cerca de 60 a 95% do lixo marinho e têm-se tornado num problema a nível mundial, sendo atualmente considerados um dos principais poluentes responsáveis pela poluição marinha. Estima-se que cerca de 8 milhões das 300 milhões de toneladas de plástico produzidas por ano têm como destino final o oceano. Cerca de 70% afunda e acumula-se nos fundos oceânicos e estima-se que ca. 270 mil toneladas fiquem a flutuar. Apesar da elevada durabilidade, o plástico vai-se fracionando em partículas cada vez menores. Resíduos plásticos de menores dimensões (<5mm) são denominados por microplásticos e têm vindo a acumular-se nos oceanos e sedimentos nas últimas décadas. Os microplásticos também poderão provir do uso e descarga de cremes de limpeza, esfoliantes corporais, branqueadores dentífricos e de grande parte do vestuário.

Uma vez que os microplásticos têm a capacidade de absorver contaminantes, nomeadamente os Poluentes Orgânicos Persistentes (POP), quando ingeridos por espécies marinhas, constituem uma via de entrada destes POPs na cadeia alimentar marinha. Devido ao seu reduzido tamanho, os microplásticos podem ser ingeridos por organismos dos vários níveis tróficos e bioacumulados até afetarem os principais predadores.

A artémia é um pequeno crustáceo de 10 a 15 mm de comprimento bastante sensível à qualidade da água em que vive e às substâncias químicas em geral. Por esta razão é muito utilizada em avaliações de toxicidade.

## Objetivos

Os objetivos específicos desta atividade são: realizar um ensaio de toxicidade com artémia, de forma a avaliar o potencial dos microplásticos como contaminantes ou veículos de transmissão de contaminação ambiental. Esta atividade permitirá sensibilizar para a problemática do lixo marinho e em especial para a poluição por microplásticos e para os efeitos nefastos deste tipo de poluição. Este protocolo enquadra-se nas Áreas Curriculares de Ciências Naturais do 3º Ciclo do Ensino Básico e de Biologia (12º ano) do Ensino Secundário. Insere-se no Princípio Essencial 6 “O Oceano e a humanidade estão fortemente interligados” sobre a cultura científica do Oceano fomentada pelo projeto Conhecer o Oceano<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> <http://www.cienciaviva.pt/oceano/home/>  
[www.ciimar.up.pt/oCIIMARnaEscola/](http://www.ciimar.up.pt/oCIIMARnaEscola/)

Material abrangido por licença Creative Commons



## Material

- Larvas de artémia com cerca de 2 semanas de vida (podem ser obtidas antecipadamente através da eclosão de quistos segundo os procedimentos indicados na atividade “E se a salinidade se alterar?”).
- Microplásticos colhidos na praia
- Microplásticos cortados a partir de plástico limpo
- Detergente líquido concentrado para lavar a louça à mão
- Sal marinho
- Placas de Petri ou tubos de ensaio (7 por cada grupo de trabalho)
- Uma garrafa de plástico de 1,5 L
- Pipetas de Pasteur
- Pipetas graduadas de 2, 5 e 10 mL
- Marcador
- Água da torneira desclorada (água deixada em contacto com o ar, pelo menos 24 horas, para que o cloro evapore)
- Gobelés ou Erlenmeyers de 100 mL

## Procedimento

### A. Preparação das soluções para teste

1. Recolher cerca de 10g de microplásticos na praia.
2. A partir de vários resíduos de plástico limpos, provenientes da nossa utilização diária deste resíduo, cortar estes plásticos em pequenos pedaços (<5mm), de modo a produzir 20g de microplásticos.
3. Utilizando a garrafa de 1,5 L, preparar água salgada para o ensaio dissolvendo 25 g de sal marinho num 1 L de água da torneira desclorada.
4. Preparar 3 soluções com microplásticos:
  - a. Solução 1: misturar as 10g de microplásticos recolhidos na praia em 100 mL da solução de água salgada.
  - b. Solução 2: misturar 10g de microplásticos limpos em 100 mL da solução de água salgada.

- c. Solução 3: misturar 10g de microplásticos limpos numa solução de água salgada com detergente da loiça (95 mL da solução de água salgada + 5 mL de detergente da loiça).
5. Manter as 3 soluções em repouso durante 1 semana.
6. Ao fim de 1 semana, decantar todo o líquido da solução 3, deixando no recipiente somente os microplásticos.
7. Encher novamente o recipiente onde se encontram os microplásticos provenientes da solução 3 com 100 mL da solução de água salgada.
8. Deixar a nova solução (solução 3.1), juntamente com as outras duas soluções, em repouso durante mais 1 semana.
9. Preparar a solução de controlo positivo. Para isso misturar 1,5 mL do detergente da loiça a 50 mL da água salgada preparada. A solução deve ser agitada gentilmente com uma pipeta de Pasteur de forma a obter uma mistura homogénea sem produzir espuma.

#### B. Ensaio de Toxicidade

1. Dividir a turma em 4 grupos, sendo que cada grupo ficará com o teste de uma solução diferente (solução 1, 2, 3.1 e solução de controlo positivo)
2. Cada grupo deve receber 7 placas de Petri ou tubos de ensaio e marcar cada um(a) com uma das seguintes condições a testar: 0% (controlo negativo), 10%, 17%, 26%, 40%, 64% e 100%.
3. Encher cada placa ou tubo com a respetiva solução a testar, pipetando com as pipetas graduadas de volume adequado, os volumes indicados na tabela 1.

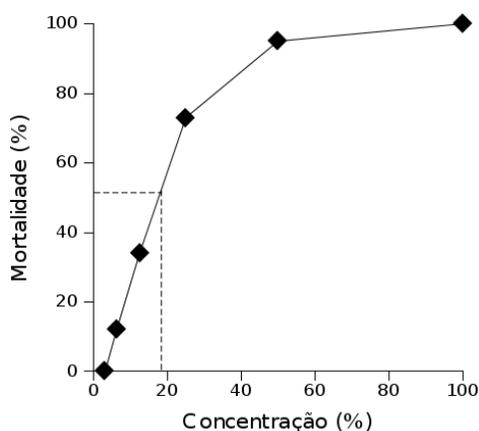
**Tabela 1.** Volumes de água salgada e solução com contaminante (solução 1, 2, 3.1 e solução de controlo positivo) a pipetar para cada tratamento.

Concentração (%)	Solução com o detergente (mL)	Solução com contaminante (mL)
0	0.0	10.0
10	1.0	9.0
17	1.7	8.3
26	2.6	7.4
40	4.0	6.0
64	6.4	3.6
100	10.0	0.0

4. Colocar 10 larvas de artémia em cada uma das placas, utilizando para o efeito as pipetas de Pasteur. Durante este passo, deve tentar-se levar a menor quantidade possível de água da cultura de larvas para as placas do ensaio. A colocação da última larva na concentração mais elevada, marca o início do ensaio (zero horas). Os alunos devem assegurar-se de que todas as larvas colocadas nas placas estão vivas. Para que este tipo de ensaio possa ser considerado válido a mortalidade observada na totalidade das placas do controlo negativo não deve exceder os 10%.
5. Avaliar a mortalidade 30 e 45 minutos após o início do ensaio, contando quantas larvas estão mortas em cada tratamento testado e registando esses resultados. Em caso de utilização de tubos de ensaio, será mais fácil contar o número de larvas vivas, obtendo-se o total de larvas mortas pela subtração do número de vivos ao total de larvas expostas.
6. A partir dos resultados elaborar a curva de toxicidade (figura 1), determinando a partir desta qual a concentração em que se espera que ocorra 50% de mortalidade nas condições experimentais utilizadas (CL50).

## Análise dos resultados

Um dos parâmetros mais utilizados na avaliação do potencial tóxico de substâncias químicas para organismos aquáticos é a concentração letal mediana (CL50), ou concentração da substância testada que provoca a morte de 50% dos organismos teste nas condições experimentais em que decorrem os ensaios. Este valor é determinado com base nos resultados de ensaio de toxicidade semelhantes ao realizado, a partir da curva de toxicidade ou curva concentração-resposta (figura 1). Esta curva relaciona a concentração do químico testado com a percentagem de animais que mostram o efeito medido.



**Figura 1.** Curva de toxicidade de um detergente de lavagem de roupa para artémia. Determinação do valor de CL50.



## As Artémias e os microplásticos: uma história sem final feliz.

### Registo da experiência

1. Formula e indica as hipóteses a testar nesta experiência.
2. Indica nas tabelas seguintes os resultados obtidos nos ensaios que realizaste e calcula as respetivas percentagens de mortalidade.

**Tabela 1:** Resultados obtidos no ensaio com a solução 1 (microplásticos recolhidos na praia em solução de água salgada).

Concentração (%)	Número total de larvas expostas por concentração	Larvas mortas por concentração / Percentagem de mortalidade		Larvas mortas por concentração / Percentagem de mortalidade	
		30min		45min	
		Nº	%	Nº	%
0					
10					
17					
26					
40					
64					
100					

**Tabela 2:** Resultados obtidos no ensaio com a solução 2 (microplásticos limpos em solução de água salgada).

Concentração (%)	Número total de larvas expostas por concentração	Larvas mortas por concentração / Percentagem de mortalidade		Larvas mortas por concentração / Percentagem de mortalidade	
		30min		45min	
		Nº	%	Nº	%
0					
10					
17					
26					
40					
64					
100					

**Tabela 3:** Resultados obtidos no ensaio com a solução 3.1 (microplásticos limpos em solução de água salgada com detergente da loiça e depois transferidos para uma solução de água salgada).

Concentração (%)	Número total de larvas expostas por concentração	Larvas mortas por concentração / Percentagem de mortalidade		Larvas mortas por concentração / Percentagem de mortalidade	
		30min		45min	
		Nº	%	Nº	%
0					
10					
17					
26					
40					
64					
100					

**Tabela 4:** Resultados obtidos no ensaio com a solução de controlo positivo.

Concentração (%)	Número total de larvas expostas por concentração	Larvas mortas por concentração / Percentagem de mortalidade		Larvas mortas por concentração / Percentagem de mortalidade	
		30min		45min	
		Nº	%	Nº	%
0					
10					
17					
26					
40					
64					
100					

- Qual a percentagem de mortalidade registada nos quatro controlos negativos? O que pode significar uma mortalidade nas placas controlo superior a 10%? Porque é que isso pode invalidar o ensaio?

4. Representa as curvas de toxicidade para as quatro soluções testadas nos sistemas de eixos apresentados, legenda os eixos do X e do Y e as figuras que elaboraste. Determina graficamente o valor de CL50 das quatro soluções.

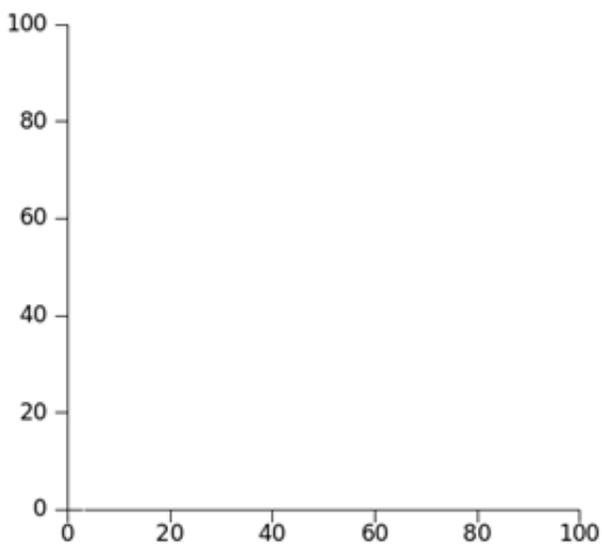


Figura 1.

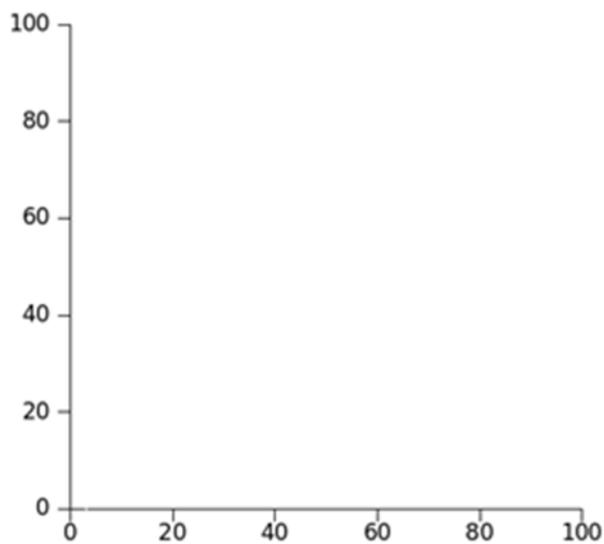


Figura 2.

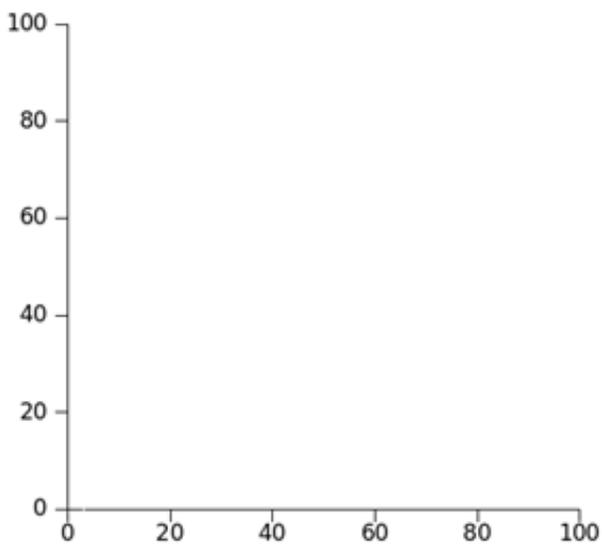


Figura 3.

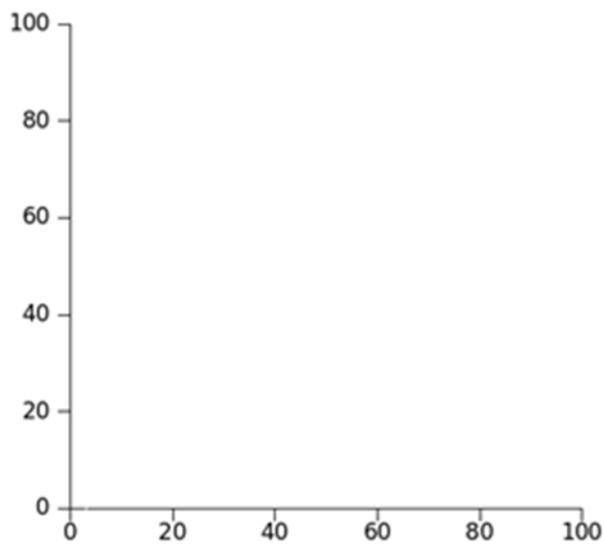


Figura 4.

5. Que conclusões tiras da experiência que realizaste?

6. Com base nas tuas conclusões, indica os principais efeitos nefastos dos microplásticos para a vida marinha, tendo em conta a capacidade de adsorção de contaminantes que os microplásticos possuem.

7. Uma vez que os microplásticos servem de via de entrada de poluentes nas cadeias alimentares, podendo afetar toda a cadeia alimentar marinha até aos predadores de topo, achas que os microplásticos poderão neste contexto afetar os seres humanos? Justifica a tua resposta.