

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

IKARO TESSARO

Estudo dos efeitos toxicológicos de contaminantes emergentes em *Daphnia similis* associando microplásticos de polietileno ao agroquímico imidacloprido.

Lorena

2023



IKARO TESSARO

Estudo dos efeitos toxicológicos de contaminantes emergentes em *Daphnia similis* associando microplásticos de polietileno ao agroquímico imidacloprido.

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina Brazil de Paiva

Versão Corrigida

Lorena

2023

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado da Escola de Engenharia de Lorena, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Tessaro, Ikaro

Estudo dos efeitos toxicológicos de contaminantes emergentes em *Daphnia similis* associando microplásticos de polietileno ao agroquímico imidacloprido. / Ikaro Tessaro; orientadora Teresa Cristina Brazil de Paiva - Versão Original. - Lorena, 2023.  
110 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2023

1. Ecotoxicologia. 2. Microplásticos. 3. Imidacloprido. 4. Estresse oxidativo. 5. *Daphnia similis*. I. Título. II. de Paiva, Teresa Cristina Brazil, orient.

## RESUMO

TESSARO, I. **Estudo dos efeitos toxicológicos de contaminantes emergentes em *Daphnia similis* associando microplásticos de polietileno ao agroquímico imidacloprido**. 2023. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

A crescente preocupação com poluentes emergentes e seus impactos sobre corpos hídricos tem impulsionado diversos estudos. As análises ecotoxicológicas são uma das alternativas que auxiliam na investigação dos potenciais tóxicos de xenobióticos quando inseridos em sistemas ambientais, através das respostas de organismos modelos. Microplásticos (MPs) e pesticidas, em especial o imidacloprido (IMI), são compostos que têm sido cada vez mais verificados, mesmo em concentrações na ordem de micro ou nanogramas, em corpos d'água. Esses compostos apresentam uma capacidade química sinérgica com grande risco potencial para os ecossistemas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos toxicológicos do imidacloprido comercial (IMlc) e padrão (IMlp), associados ou não aos microplásticos de polietileno, em partículas virgens e fragmentadas, através de seus efeitos toxicológicos agudos, crônicos e de estresse oxidativo sobre o organismo modelo, o microcrustáceo *Daphnia similis*. A caracterização físico-química dos MPs foi realizada por Espectroscopia de Infravermelha por Transformada de Fourier (FTIR-ATR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e quantificação e mensuração por câmara de Sedgewick e Malvern 2000. Os IMIs foram caracterizados por espectrofotometria UV-Vis e submetidos a teste e avaliação de cinética de adsorção junto aos MPs. A combinação e mistura dos compostos apresentaram mudanças significativas na resposta de estresse oxidativo, no desbalanço redox dos organismos, apresentando maiores variações de atividades enzimáticas para os MPs quando associados aos pesticidas em relação aos compostos analisados isoladamente, expressando maior potencial tóxico quando em combinações. Assim, o estudo ecotoxicológico das amostras de IMI comercial e padrão mostraram-se fundamental no processo de avaliação dos MPs quando associados aos pesticidas, fornecendo informações sobre os potenciais impactos desses compostos no ecossistema aquático, além de verificar-se como mais uma ferramenta de contribuição no controle, regulamentação e remediação dos mesmos.

**Palavras-chave:** Ecotoxicologia. Microplásticos. Imidacloprido. Estresse oxidativo. *Daphnia similis*.

## ABSTRACT

TESSARO, I. **Study of the toxicological effects of emerging contaminants on *Daphnia similis* associating polyethylene microplastics with the agrochemical imidacloprid.** 2023. 110 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

The growing concern about emerging pollutants and their impacts on water bodies has driven several studies. Ecotoxicological analyses are one of the alternatives that help investigate the potential toxicity of xenobiotics when inserted into environmental systems through the responses of model organisms. Microplastics (MPs) and pesticides, especially imidacloprid (IMI), are compounds that have been increasingly detected in water bodies, even at micro- or nanogram levels. These compounds have a synergistic chemical capacity with a great potential risk to ecosystems. The study aimed to evaluate the toxicological effects of commercial (IMlc) and standard (IMlp) imidacloprid associated or not with virgin and fragmented polyethylene microplastics through their acute, chronic, and oxidative stress toxicological effects on the model organism, the microcrustacean *Daphnia similis*. The physicochemical characterization of MPs was performed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR-ATR), Scanning Electron Microscopy (SEM), and quantification and measurement by Sedgewick and Malvern 2000 chambers. The IMIs were characterized by UV-Vis spectrophotometry, and subjected to adsorption kinetics tests and evaluation with MPs. The combination and mixture of compounds presented significant changes in the oxidative stress response, with a redox imbalance of organisms, showing greater variations in enzymatic activities for MPs when associated with pesticides than for the analyzed compounds isolated and separately, expressing greater toxic potential when in combinations. Thus, the ecotoxicological study of commercial and standard IMI samples proved to be fundamental in the evaluation process of MPs when associated with pesticides, providing information on the potential impacts of these compounds on the aquatic ecosystem, as well as verifying it as another contribution tool in the control, regulation, and remediation of these pollutants.

**Keywords:** Ecotoxicology. Microplastics. Imidacloprid. Oxidative stress. *Daphnia similis*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - <i>DAPHNIA SIMILIS</i> COM 7 A 14 DIAS DE IDADE. ....	18
FIGURA 2 – RANKING MUNDIAL PARA O USO DE PESTICIDAS: QUANTIDADE POR ÁREA CULTIVADA EM COMPARATIVO DE PERÍODO POR KG/HA.....	21
FIGURA 3 - MODELOS MOLECULARES DO PESTICIDA IMIDACLOPRIDO. ....	24
FIGURA 4 - CONSUMO DE INGREDIENTES ATIVOS DE AGROTÓXICOS NO BRASIL. ....	25
FIGURA 5 - HISTOGRAMA DE SOMBRA DE MÉDIA E CONCENTRAÇÕES MÁXIMAS DE NEONICOTINÓIDES (ESCALA LOGARÍTMICA , MG.L <sup>-1</sup> ) RELATADAS A PARTIR DE ESTUDOS DE MONITORAMENTO DE ÁGUAS SUPERFICIAIS. ....	26
FIGURA 6 - GERAÇÃO E DESTINAÇÃO CUMULATIVA DE RESÍDUOS PLÁSTICOS (EM MILHÕES DE TONELADAS). AS LINHAS SÓLIDAS MOSTRAM DADOS HISTÓRICOS DE 1950 A 2015; AS LINHAS TRACEJADAS MOSTRAM PROJEÇÕES DE TENDÊNCIAS HISTÓRICAS ATÉ 2050.....	28
FIGURA 7 - VISÃO GERAL DAS CONCENTRAÇÕES DE CONTAMINANTES POR TIPO DE PARTÍCULA E SUBSTRATO. ....	31
FIGURA 8 - CONCENTRAÇÃO DE PARTÍCULAS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS .....	32
FIGURA 9 - ESPECTRO FTIR DE REFERÊNCIA DO POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE (LDPE) SOBRE OS COMPRIMENTOS DE ONDA ENTRE 3750 CM <sup>-1</sup> A 400 CM <sup>-1</sup> .....	33
FIGURA 10 - GRÁFICO DE DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DOS MPs.....	47
FIGURA 11 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA MICROPLÁSTICO VIRGEM AUMENTADO 500X.....	48
FIGURA 12 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA MICROPLÁSTICO VIRGEM AUMENTADO 50X.....	48
FIGURA 13 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA MICROPLÁSTICO FRAGMENTADO AUMENTADO 250X.....	48
FIGURA 14 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA MICROPLÁSTICO FRAGMENTADO AUMENTADO 50X.....	48
FIGURA 15 - ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR-ATR) DO MPV E MPF. ....	50
FIGURA 16 - VARREDURA DE CONCENTRAÇÃO DO IMIP.....	51
FIGURA 17 - VARREDURA DE CONCENTRAÇÃO DO IMIC.....	51
FIGURA 18 - CAPACIDADE DE ADSORÇÃO AO LONGO DO TEMPO DE TRATAMENTO PARA OS COMPOSTOS EM MISTURA, RELAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO MASSA E VOLUME.....	53
FIGURA 19 – PERCENTUAL (%) ADSORTIVO DOS TRATAMENTOS EM MISTURAS RELAÇÃO DE SORÇÃO DE COMPOSTO DO MEIO NO MICROPLASTICO, RELAÇÃO CONCETRAÇÃO INICIAL POR CONCENTRAÇÃO NO TEMPO. ....	53
FIGURA 20 - CINÉTICA DE PSEUDO-PRIMEIRA ORDEM. ....	55
FIGURA 21 - CURVA DOSE-RESPOSTA DA ANÁLISE DE TOXICIDADE AGUDA DOS COMPOSTOS IMIC E IMIP EM <i>DAPHNIA SIMILIS</i> .....	56
FIGURA 22 - CURVA DOSE-RESPOSTA DA ANÁLISE DE TOXICIDADE AGUDA DE CONCENTRAÇÕES TESTADAS EM EXPERIMENTO DE IMIC E IMIP EM <i>DAPHNIA SIMILIS</i> ...	58
FIGURA 23 - ANÁLISE PRELIMINAR DE EXPOSIÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA DE 48 HORAS DE EXPOSIÇÃO À MPV E MPF EM ORGANISMOS <i>D. SIMILIS</i> DE DIFERENTES IDADES. ....	59

FIGURA 24 - CURVA DOSE-RESPOSTA DA ANÁLISE DE TOXICIDADE AGUDA DE MPV E MPF EM <i>DAPHNIA SIMILIS</i> . .....	60
FIGURA 25 - CURVA DOSE-RESPOSTA DA ANÁLISE DE TOXICIDADE AGUDA DE CONCENTRAÇÕES TESTADAS EM EXPERIMENTO DE MPV E MPF EM <i>DAPHNIA SIMILIS</i> . .....	62
FIGURA 26 - DIAGRAMA DE RESPOSTA E SOBREVIVÊNCIA POR CONCENTRAÇÃO DO TESTE CRÔNICO EM <i>DAPHNIA SIMILIS</i> COM EXPOSIÇÃO AO IMIC POR 336 H. ....	64
FIGURA 27 - AVALIAÇÃO MÉDIA DA TOXICIDADE CRÔNICA DE IMIC POR 336 H. ....	65
FIGURA 28- CURVA DE RESPOSTA E SOBREVIVÊNCIA DO TESTE CRÔNICO EM <i>DAPHNIA SIMILIS</i> COM EXPOSIÇÃO AO IMIP POR 336 H. ....	67
FIGURA 29 - AVALIAÇÃO MÉDIA DA TOXICIDADE CRÔNICA DE IMIP POR 336 H.. ....	67
FIGURA 30 - CURVA DE RESPOSTA E SOBREVIVÊNCIA DO TESTE CRÔNICO EM <i>DAPHNIA SIMILIS</i> COM EXPOSIÇÃO AO MPV POR 336 H.....	69
FIGURA 31 - AVALIAÇÃO MÉDIA DA TOXICIDADE CRÔNICA DE MPV EM <i>DAPHNIA SIMILIS</i> POR 336 H. ....	70
FIGURA 32 - CURVA DE RESPOSTA E SOBREVIVÊNCIA DO TESTE CRÔNICO EM <i>DAPHNIA SIMILIS</i> COM EXPOSIÇÃO AO MPF POR 336 H. ....	72
FIGURA 33 - AVALIAÇÃO MÉDIA DA TOXICIDADE CRÔNICA DE MPF EM <i>DAPHNIA SIMILIS</i> POR 336 H. ....	72
FIGURA 34 – ANÁLISE COMPARATIVA DO PERCENTUAL (%) DE ATIVIDADE EM RELAÇÃO AO CONTROLE, DA ENZIMA SOD EM <i>D. SIMILIS</i> , COM EXPOSIÇÃO AO IMIC, IMIP, MPV E MPF, ISOLADAMENTE. ....	75
FIGURA 35 - ANÁLISE COMPARATIVA DO PERCENTUAL (%) DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA SOD EM RELAÇÃO AO CONTROLE, EM <i>D. SIMILIS</i> , COM EXPOSIÇÃO AO IMIC, IMIP, MPV E MPF, TESTE DE TOXICIDADE EM MISTURAS BINÁRIAS DAS CE10 E CE5. ....	78
FIGURA 36 – ANÁLISE COMPARATIVA DO PERCENTUAL (%) DE ATIVIDADE EM RELAÇÃO AO CONTROLE, DA ENZIMA CAT EM <i>D. SIMILIS</i> , COM EXPOSIÇÃO AO IMIC, IMIP, MPV E MPF, ISOLADAMENTE. ....	81
FIGURA 37 - ANÁLISE COMPARATIVA DO PERCENTUAL (%) DE ATIVIDADE EM RELAÇÃO AO CONTROLE, DA ENZIMA CAT EM <i>D. SIMILIS</i> , COM EXPOSIÇÃO AO IMIC, IMIP, MPV E MPF, TESTE DE TOXICIDADE EM MISTURAS BINÁRIAS DAS CE10 E CE5. ....	83
FIGURA 38 – ANÁLISE COMPARATIVA DO PERCENTUAL (%) DE ATIVIDADE EM RELAÇÃO AO CONTROLE, DA ENZIMA GST EM <i>D. SIMILIS</i> , COM EXPOSIÇÃO AO IMIC, IMIP, MPV E MPF, ISOLADAMENTE. ....	86
FIGURA 39 - ANÁLISE COMPARATIVA DO PERCENTUAL (%) DE ATIVIDADE EM RELAÇÃO AO CONTROLE, DA ENZIMA GST EM <i>D. SIMILIS</i> , COM EXPOSIÇÃO AO IMIC, IMIP, MPV E MPF, TESTE DE TOXICIDADE EM MISTURAS BINÁRIAS DAS CE10 E CE5. ....	88
FIGURA 40 – ANÁLISE COMPARATIVA DO PERCENTUAL (%) DE ATIVIDADE EM RELAÇÃO AO CONTROLE, DO BIOMARCADOR MDA EM <i>D. SIMILIS</i> , COM EXPOSIÇÃO AO IMIC, IMIP, MPV E MPF, ISOLADAMENTE. ....	91
FIGURA 41 - ANÁLISE COMPARATIVA DO PERCENTUAL (%) DE ATIVIDADE EM RELAÇÃO AO CONTROLE, DO BIOMARCADOR MDA EM <i>D. SIMILIS</i> , COM EXPOSIÇÃO AO IMIC, IMIP, MPV E MPF, TESTE DE TOXICIDADE EM MISTURAS BINÁRIAS DAS CE10 E CE5.....	93

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RESULTADOS MÉTRICOS DOS MPV E MPF. ....	46
TABELA 2- VARREDURA DE COMPOSTOS IMIC E IMIP EM ESPECTROFOTÔMETRO.....	52
TABELA 3 - MODELO CINÉTICO DE ADSORÇÃO E PARÂMETROS RELACIONADOS.....	54
TABELA 4 - PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS DOS TESTES COM <i>DAPHNIA SIMILIS</i> .....	55
TABELA 5 - INFORMAÇÕES DE AGRUPAMENTO PARA IMIC E IMIP USANDO O MÉTODO LSD DE FISHER. ....	57
TABELA 6 - INFORMAÇÕES DE AGRUPAMENTO PARA MPV E MPF USANDO O MÉTODO LSD DE FISHER. ....	61
TABELA 7 - DADOS DE % MORTALIDADE E REPRODUÇÃO DE <i>DAPHNIA SIMILIS</i> REFERENTES ÀS CONCENTRAÇÕES DE IMIC AVALIADAS, OBTIDOS AO FINAL DO ENSAIO DE EXPOSIÇÃO CRÔNICA 336 HORAS (14 DIAS).....	63
TABELA 8 - DADOS DE SOBREVIVÊNCIA E REPRODUÇÃO DE <i>DAPHNIA SIMILIS</i> REFERENTES ÀS CONCENTRAÇÕES DE IMIP AVALIADAS, OBTIDOS AO FINAL DO ENSAIO DE EXPOSIÇÃO CRÔNICA 336 HORAS (14 DIAS).....	66
TABELA 9 - DADOS DE SOBREVIVÊNCIA E REPRODUÇÃO DE <i>DAPHNIA SIMILIS</i> REFERENTES ÀS CONCENTRAÇÕES DE MPV AVALIADAS, OBTIDOS AO FINAL DO ENSAIO DE EXPOSIÇÃO CRÔNICA 336 HORAS (14 DIAS).....	68
TABELA 10 - DADOS DE SOBREVIVÊNCIA E REPRODUÇÃO DE <i>DAPHNIA SIMILIS</i> REFERENTES ÀS CONCENTRAÇÕES DE MPF AVALIADAS, OBTIDOS AO FINAL DO ENSAIO DE EXPOSIÇÃO CRÔNICA 336 HORAS (14 DIAS). ....	71
TABELA 11 - ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SOD EM <i>D. SIMILIS</i> PARA COMPOSTOS IMIC, IMIP, MPV E MPF, ISOLADAMENTE. ....	74
TABELA 12 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SOD EM <i>D. SIMILIS</i> , DOS COMPOSTOS IMIC, IMIP, MPV E MPF, TESTE DE TOXICIDADE EM MISTURAS BINÁRIAS DAS CE10 E CE5.....	77
TABELA 13 - ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CAT EM <i>D. SIMILIS</i> PARA COMPOSTOS IMIC, IMIP, MPV E MPF, ISOLADAMENTE. ....	80
TABELA 14 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CAT EM <i>D. SIMILIS</i> , DOS COMPOSTOS IMIC, IMIP, MPV E MPF, TESTE DE TOXICIDADE MISTURAS BINÁRIAS DAS CE10 E CE5.....	82
TABELA 15 - ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE GST EM <i>D. SIMILIS</i> PARA COMPOSTOS IMIC, IMIP, MPV E MPF, ISOLADAMENTE. ....	85
TABELA 16 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SOD EM <i>D. SIMILIS</i> , DOS COMPOSTOS IMIC, IMIP, MPV E MPF, TESTE DE TOXICIDADE MISTURAS BINÁRIAS DAS CE10 E CE5.....	87
TABELA 17 - ANÁLISE DE ATIVIDADE DE MDA EM <i>D. SIMILIS</i> PARA COMPOSTOS IMIC, IMIP, MPV E MPF, ISOLADAMENTE.....	90
TABELA 18 - ATIVIDADE DO BIOMARCADOR MDA EM <i>D. SIMILIS</i> , DOS COMPOSTOS IMIC, IMIP, MPV E MPF, TESTE DE TOXICIDADE MISTURAS BINÁRIAS DAS CE10 E CE5. ....	92



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>13</b>
2.1	ECOLOGIA, TOXICOLOGIA E ECOTOXICOLOGIA	13
2.1.1	<i>Ecotoxicologia aquática</i>	14
2.1.1.1	Testes Ecotoxicológicos	15
2.1.1.2	Biomarcadores	16
2.1.1.3	Organismos modelos	17
2.2	POLUENTES EMERGENTES	19
2.2.1	<i>Agroquímicos</i>	20
2.2.1.1	Os Neoneonicotinóides	22
2.2.1.2	Imidacloprido	23
2.3	DOS PLÁSTICOS AOS MICROPLÁSTICOS	26
2.3.1	<i>O plástico</i>	26
2.3.1.1	Microplásticos ambientais	28
2.3.1.2	Microplásticos de Polietileno	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
4.1	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS MICROPLÁSTICOS VIRGENS E FRAGMENTADOS	36
4.2	TESTES DE ADSORÇÃO	37
4.3	TESTES TOXICOLÓGICOS	38
4.3.1	<i>Cultivo do organismo Daphnia similis</i>	38
4.3.2	<i>Teste de toxicidade aguda</i>	38
4.3.2.1	Preparo das solução	38
4.3.2.2	Exposição dos organismos	39
4.3.3	<i>Teste de toxicidade crônica</i>	39
4.3.4	<i>Determinação dos biomarcadores</i>	40
4.3.4.1	Preparação e análise dos biomarcadores	40
4.3.4.2	Superóxido Dismutase (SOD)	41
4.3.4.3	Catalase (CAT)	42
4.3.4.4	Glutathione S-Transferase (GST)	43
4.3.4.5	Malonaldeído (MDA)	44
4.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
5.1	QUANTIFICAÇÃO DAS MASSAS PLÁSTICAS	46
5.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	48

5.3	ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	49
5.4	ANÁLISE DE ADSORÇÃO .....	51
5.4.1	<i>Varredura dos compostos</i> .....	51
5.4.2	<i>Efeitos do tempo de reação para compostos combinados</i> .....	52
5.5	TESTES TOXICOLÓGICOS.....	55
5.5.1	<i>Teste Agudo</i> .....	56
5.5.1.1	Imidacloprido (IMI) .....	56
5.5.1.2	Microplásticos (MPs).....	58
5.5.1.2.1	Microplástico organismo 168h .....	59
5.5.2	<i>Teste Crônico</i> .....	63
5.5.2.1	Imidacloprido comercial .....	63
5.5.2.2	Imidacloprido padrão .....	65
5.5.3	<i>Microplástico virgem</i> .....	68
5.5.3.1	Microplástico fragmentado .....	70
5.5.4	<i>Atividade do sistema antioxidante</i> .....	73
5.5.4.1	Atividade de superóxido dismutase (SOD) .....	74
5.5.4.2	Atividade de catalase (CAT) .....	79
5.5.4.3	Atividade de glutathione s-transferase (GST) .....	84
5.5.4.4	Mensuração do biomarcador malondialdeído (MDA).....	89
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>95</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>97</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As ciências ambientais têm se tornado cada vez mais interdisciplinares ao longo dos anos, o que tem trazido à necessidade do desenvolvimento de abordagens inovadoras, tecnológicas e analiticamente avançadas para a compreensão dos ciclos de interações físicas, químicas e biológicas que regem as dinâmicas de vida dos ecossistemas. Essas necessidades têm levado a ramificações de inovação na bioengenharia, que instigam a construção de novos métodos de instrumentações bioanalíticas capazes de proporcionar uma melhor compreensão dos espaços temporais e dinâmicos, orgânicos e moleculares (CAMPANA; WLODKOWIC, 2018).

À medida que o crescimento populacional, as industrializações, as urbanizações e outras atividades antrópicas ocorrem de maneira desordenada, há uma interferência direta negativa na saúde humana e do meio ambiente. Essas atividades ameaçam significativamente os sistemas aquáticos, sendo a água o recurso natural considerado de maior relevância nos serviços de manutenção dos ecossistemas e na saúde da biodiversidade (DAS; KARMAKER; KHAN, 2021; POSTHUMA *et al.*, 2020; VÖRÖSMARTY *et al.*, 2010).

A ecotoxicologia aquática é uma ciência aplicada aos estudos das propriedades, comportamento e interações exercidas pelos compostos xenobióticos quando inseridos nos sistemas aquáticos. Ela avalia os efeitos que esses compostos terão nas estruturas e constituintes dos organismos, comunidades, populações e demais estruturas e sistemas que interagem e interdependem (HAHN, 2011; MARTINS *et al.*, 2022; MOISEENKO, 2008).

Com o crescente aumento do uso, consumo, geração e descarte de resíduos plásticos, eles se tornaram um poluente emergente, cada vez mais detectado nos ecossistemas aquáticos. Os resíduos plásticos presentes nos corpos hídricos sofrem ações químicas, físicas e/ou biológicas, degradando-se e fragmentando-se em partículas, fibras e filmes menores, gerando os microplásticos (MPs). Esses MPs podem absorver outros poluentes presentes no meio, representando uma ameaça indireta ao sistema e aos organismos aquáticos (KIM; AN, 2017).

Pesquisas demonstram a capacidade dos MPs em transportar poluentes como metais pesados, poluentes orgânicos, antibióticos, agroquímicos, entre outros, afetando e aumentando sua capacidade de dispersão e mobilidade no ambiente (LI *et al.*, 2021). Os MPs que transportam pesticidas podem causar contaminação cruzada e afetar a distribuição e dispersão de poluentes orgânicos em corpos d'água, sedimentos e organismos, causando danos imperceptíveis aos organismos e até mesmo a todo o ecossistema (LING *et al.*, 2017).

As investigações ambientais que utilizam microcrustáceos expressam um ponto relevante de observação sobre os agentes xenobióticos, visto sua importância nas cadeias alimentares de água doce (BOWNIK, 2017). O gênero *Daphnia* é uma das espécies zooplanctônicas mais utilizadas nos estudos ambientais, apresentando uma relação ecológica relativamente bem conhecida e sólida história evolutiva (CHIN; CRISTESCU, 2021). Microcrustáceos são amplamente utilizados em testes de toxicidade aguda e crônica, avaliando agentes químicos e águas residuais devido à sua alta sensibilidade a uma ampla gama de poluentes aquáticos. Além disso, sua facilidade de cultivo em laboratório e atividade partenogenética permite obter organismos teste com sensibilidade constante (BURATINI; BERTOLETTI; ZAGATTO, 2004).

Sendo assim, o uso e a aplicação de estudos ecotoxicológicos tornaram-se fundamentais também no processo de tomada de decisões regulatórias, importante principalmente no campo de avaliações ambientais, contribuindo e trazendo amplas implicações para o processo de proteção ambiental e desenvolvimento ecologicamente sustentável (HANSON *et al.*, 2017; MARTIN *et al.*, 2019).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Ecologia, Toxicologia e Ecotoxicologia

A ecologia e a ecotoxicologia, embora possuam berços distintos, são áreas de estudo que possuem perspectivas de atuação que se convergem para além da semelhança de suas terminologias. Atuando conjuntamente, essas ciências se tornam uma hábil ferramenta indicadora e metodológica para o combate e controle de emissões de poluentes no meio ambiente (VASSEUR; MASFARAUD; BLAISE, 2021). De forma geral e coletiva, a integração dos fatores e perspectivas ecológicas quando aplicadas nos princípios de pesquisas ecotoxicológicas beneficia e complementa a bioavaliação na previsão do impacto ecológico de poluentes nas distintas organizações de espécies e cadeias das comunidades biológicas de um ecossistema complexo (GESSNER; TLILI, 2016; HALSTEAD *et al.*, 2014).

De acordo com Borrett e Edelmann (2014), a ecologia é fundamental para compreender os desafios da avaliação ecotoxicológica, considerando a interação entre espécies e fatores ambientais para entender a saúde de populações, comunidades e ecossistemas. A ecotoxicologia surge da combinação de conceitos da ecologia e toxicologia para compreender a conservação e manutenção de sistemas naturais (HOLMSTRUP *et al.*, 2010). Enquanto os ecologistas lidam com fatores bióticos e abióticos que afetam as espécies e suas interações no ambiente, os toxicologistas tradicionalmente trabalham com testes e análises de toxicidade em organismos e tecidos isolados (LEIST; HARTUNG; NICOTERA, 2008; RELYEA; HOVERMAN, 2006).

A ecotoxicologia, também conhecida como toxicologia ambiental, é vista como uma extensão da toxicologia geral clássica. É uma ciência relativamente jovem que investiga os efeitos dos poluentes e contaminantes ambientais em elementos constituintes de um ecossistema, como animais, plantas, populações, comunidades, paisagens e toda a biosfera. É classificada como a ciência dos contaminantes na biosfera e realiza investigações sobre seus efeitos de forma geral em toda sua estrutura (NEWMAN, 2021; WELBOURN; HODSON, 2022).

### 2.1.1 Ecotoxicologia aquática

A ecotoxicologia aquática é um ramo desta ciência, que busca compreender as propriedades e interações dos xenobióticos no ecossistema aquático e seus reflexos sobre organismos, comunidades e populações. Estudos como o de Gross (2022) destacam a importância dessa área na avaliação de riscos ambientais e na proteção dos ecossistemas aquáticos. Além disso, pesquisas como a de Zhou *et al.* (2022) apontam a necessidade de compreender não apenas os efeitos diretos dos xenobióticos sobre as espécies aquáticas, mas também suas interações com outros sistemas e estruturas dependentes. Esses estudos evidenciam a relevância da ecotoxicologia aquática na gestão ambiental e no desenvolvimento de estratégias de conservação e proteção dos ecossistemas aquáticos (GROSS, 2022; ZHOU *et al.*, 2022).

Atua de maneira geral na compreensão dos riscos e efeitos prejudiciais de contaminantes ambientais dispersos no meio aquático (RELYEA; HOVERMAN, 2006), aplicando metodologias analíticas químicas associadas às biológicas. Isso facilita a integração na identificação e seleção de espécies modelos, estabelecendo os agentes estressores, problemas de biodisponibilidade, bioacumulação e efeitos ecológicos diversos por meio de análises toxicológicas, incluindo biomarcadores moleculares, bioquímicos e fisiológicos (HOOK *et al.*, 2014; TAYLOR *et al.*, 2010).

A ecotoxicologia aquática é uma ciência importante para verificar a saúde dos sistemas ambientais aquáticos, além de apresentar ferramentas para enfrentar passivos ambientais preventivamente (MAGALHÃES *et al.*, 2008). Ela atua em diversos níveis de organização, permitindo a detecção de compostos tóxicos e ecotóxicos em níveis letais e subletais, tornando-se uma excelente ferramenta biossensora para a qualidade da água (GRUE *et al.*, 2002; FERRÃO FILHO *et al.*, 2008; MAGALHÃES *et al.*, 2008). Através do uso de biomarcadores moleculares, bioquímicos e fisiológicos, essa ciência auxilia na identificação e seleção de espécies-modelo, estabelecimento de agentes estressores, problemas de biodisponibilidade, bioacumulação e efeitos ecológicos diversos (HOOK *et al.*, 2014; TAYLOR *et al.*, 2010).

Um relevante estudo de Biswas e Sarkar (2019) investigou a ecotoxicidade de diferentes tipos de nanopartículas em organismos aquáticos. Os resultados mostraram que algumas nanopartículas podem afetar a sobrevivência, crescimento e reprodução desses organismos, indicando a necessidade de uma regulamentação mais rigorosa no uso desses materiais na indústria.

Wang *et al.* (2019) avaliaram os efeitos da poluição por metais pesados em comunidades microbianas em sedimentos de rios. Os resultados mostraram que a poluição por metais pesados afetou significativamente a diversidade e composição dessas comunidades microbianas, o que pode ter consequências significativas para o funcionamento do ecossistema. Karimi *et al.* (2020) investigaram a contaminação por agrotóxicos em áreas agrícolas e seus efeitos sobre a biodiversidade. Os resultados mostraram que a contaminação por agrotóxicos pode afetar negativamente a diversidade e abundância de espécies, o que pode levar a desequilíbrios ecológicos e impactos significativos em níveis superiores da cadeia alimentar.

#### **2.1.1.1 Testes Ecotoxicológicos**

Os testes ecotoxicológicos, também conhecidos como bioensaios, apresentam e envolvem diversas metodologias de ensaios, podendo ser realizados de maneira aguda, crônica e por biomarcadores a partir de organismos modelos (MAGALHÃES *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2022).

Esses testes possuem diversas aplicações práticas, como licenciamentos, caracterizações e acompanhamentos de impactos ambientais, avaliações de risco em áreas contaminadas, dispersão e controle de efluentes, autorizações de uso de produtos e avaliações de acidentes ambientais (CETESB, 2017; HOOK *et al.*, 2014; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Magalhães *et al.* (2008) salientam que as avaliações dos químicos isoladamente não são capazes de retratar em sua totalidade o potencial impacto causado por poluentes ou contaminantes no ecossistema.

Através de respostas dos sistemas biológicos é possível observar, de fato, os efeitos e alterações toxicológicas das substâncias, verificando as possíveis interações entre elas, sejam aditivas, antagônicas ou sinérgicas, bem como a

biodisponibilidade das mesmas (COORS; DE MEESTER, 2008; HERNÁNDEZ; LACASAÑA, 2017).

Os testes de toxicidade aguda são responsáveis por diagnósticos rápidos e pontuais. Avaliam estímulos que se expressam de 0 a 96 horas, onde é possível observar os efeitos de letalidade e imobilidade nos organismos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Os testes crônicos, por sua vez, avaliam parte ou a totalidade do ciclo de vida do organismo, dependendo diretamente da avaliação aguda. O crônico avalia as concentrações de efeitos observados e causados a partir das concentrações de subletalidade, a longa duração, por efeitos fisiológicos ou comportamentais (WALKER *et al.*, 2006; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Estudos recentes, como o de Rodrigues *et al.* (2018), sobre a avaliação do impacto de um efluente de estação de tratamento de água em peixes por meio de biomarcadores, e o de Hook *et al.* (2014), sobre a ecotoxicologia de nanopartículas em sistemas aquáticos, demonstram a aplicação prática da ecotoxicologia na identificação e prevenção de riscos ambientais (HOOK *et al.*, 2014; RODRIGUES, 2018). Além disso, o estudo de Hernandez *et al.* (2017), destacam os desafios atuais e futuros da avaliação de risco ambiental, incluindo a necessidade de avaliar a toxicidade de misturas químicas e considerar a variabilidade genética dos organismos. Em conjunto, esses estudos demonstram a importância contínua da ecotoxicologia aquática para a proteção e preservação de ecossistemas aquáticos.

#### **2.1.1.2 Biomarcadores**

Biomarcadores sensíveis são indicadores amplamente aplicados na observação de baixos níveis de organização em microcontaminação. Nas avaliações de toxicidade, esses bioensaios auxiliam na discriminação da toxicodinâmica e toxicocinética do químico ambiental por meio das biotransformações ocorrentes (SKALDINA; SORVARI, 2017). A toxicocinética é a ação direta que o organismo realiza sobre a substância, sendo responsável pela caracterização direta que exerce sistemicamente em diversos níveis, como absorção, distribuição, metabolismo e excreção. A toxicodinâmica atua em um âmbito bioquímico e fisiológico no organismo toxicologicamente testado, em que o

estudo dos mecanismos de ação age sobre as funções dos seres vivos (RAND *et al.*, 2020). De maneira pontual, o composto toxicante pode agir de forma geral sobre todo o sistema ou em um determinado tecido, sobre um órgão específico, isoladamente em uma célula ou uma molécula (AMORIM, 2003; BOWNIK, A., 2017; FEITO *et al.*, 2011).

Avaliando contaminações ambientais por meio de marcadores biológicos de organismos enquanto bioindicadores de qualidade, as enzimas do citocromo P450 se apresentam como ferramentas que desempenham avaliações ambientais, nas quais as atividades desse grupo funcional estão diretamente ligadas ao processo de equilíbrio redox e estresse oxidativo em resposta ao ambiente. A presença de compostos tóxicos e toxificantes ativa as expressões de detoxificação desse grupo enzimático e seus metabólitos. Assim, verifica-se que as exposições, mesmo nas menores concentrações, causam estresse e ativam o desequilíbrio da expressão das enzimas P450. Quanto maior a toxicidade, maiores as expressões de danos toxicológicos (ADETORO; IKUABE; LAWAL, 2018; JAESCHKE; MCGILL, 2015; LARSSON, 2014).

Além dos estudos mencionados anteriormente, há diversas pesquisas que investigam o uso de biomarcadores como ferramentas para a avaliação de risco ambiental. Por exemplo, o estudo de Li *et al.* (2022), avaliou a toxicidade de um agrotóxico em peixes utilizando biomarcadores de estresse oxidativo, enquanto que o trabalho de Radwan, El-Gendy e Gad (2010), investigou a presença de metais pesados em mexilhões utilizando biomarcadores de danos celulares. Já o estudo de Brucker *et al.* (2020), utilizaram biomarcadores para avaliar a exposição a poluentes atmosféricos em seres humanos, mostrando a versatilidade dessas ferramentas na análise de diferentes tipos de contaminações ambientais.

### **2.1.1.3 Organismos modelos**

A seleção cuidadosa de organismos modelos e testes é fundamental para uma avaliação ecotoxicológica representativa e abrangente. Os organismos escolhidos devem atender a critérios de sensibilidade aos contaminantes, disponibilidade e abundância no ambiente, estabilidade e uniformidade populacional e genética, representatividade ecológica em níveis tróficos

significativos, além de permitir padronização e fácil manipulação laboratorial. Dessa forma, a escolha adequada dos organismos de teste garante resultados precisos e confiáveis, permitindo uma avaliação mais precisa do impacto dos contaminantes nos ecossistemas aquáticos (BURATINI *et al.*, 2004; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Bownik (2017) retrata os Daphnideos como organismos modelo amplamente utilizados e imprescindivelmente sensíveis em testes ecotoxicológicos aquáticos de ambientes dulcícolas. Os Daphnideos são microcrustáceos zooplânctônicos filtradores, consumidores primários que desempenham papel fundamental no nível trófico da cadeia alimentar, apresentando ciclo de vida relativamente curto e homogeneidade genética estável (BURATINI; BERTOLETTI; ZAGATTO, 2004; WU *et al.*, 2019).

Na NBR 12713 (ABNT, 2022) é descrito que *Daphnia spp* pertence à ordem Cladocera, do filo Crustacea, sendo um organismo amplamente utilizado em ensaios de qualidade da água. *Daphnia similis* conforme apresentada na Figura 1, popularmente conhecida como pulga d'água, são organismos de grande sensibilidade a agentes químicos e produzem respostas agudas e crônicas de relevante importância nas avaliações ecotoxicológicas (BURATINI *et al.* 2004).

**Figura 1 - *Daphnia similis* com 7 a 14 dias de idade.**



Fonte: ABNT, 2022.

## 2.2 Poluentes emergentes

Poluentes emergentes são substâncias tóxicas e nocivas que não haviam sido previamente identificadas como causadoras de problemas ambientais ou de saúde pública (ENYOH *et al.*, 2020). Essas substâncias incluem compostos químicos utilizados em novos produtos, tecnologias e processos industriais que surgiram recentemente, bem como subprodutos da produção humana e do uso de tecnologias avançadas (PAN *et al.*, 2019).

Produtos contaminantes emergentes são uma série de compostos potencialmente poluidores, provenientes de ações antrópicas e presentes em diversos meios, como ar, solo e água, englobando uma grande variedade de substâncias. Segundo o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA, 2019), a referência "emergente" não se deve à novidade ou contemporaneidade do composto em si, mas sim devido à crescente preocupação com suas potenciais danificações e degradações ao meio ambiente, além de sua presença em locais e volumes antes não observados (CHAPMAN, 2006; UNEP, 2019).

Os poluentes emergentes desempenham um papel cada vez mais relevante como potenciais causadores de efeitos adversos e estressores ambientais, à medida que aumenta a taxa e o volume de liberação de novos produtos e subprodutos químicos nos ecossistemas (GAVRILESCU *et al.*, 2015).

Estes poluentes podem ter efeitos adversos graves para o meio ambiente e para a saúde humana, incluindo a contaminação do solo e da água, a poluição do ar e a degradação da qualidade ambiental (MANISALIDIS *et al.*, 2020). Eles podem apresentar diversos níveis de toxicidade, variando desde efeitos agudos até crônicos. Os efeitos da exposição em organismos aquáticos têm se demonstrado diferenciados nos diversos estágios de vida desses, com um alto potencial de disruptores endócrinos, além de uma acentuada capacidade de bioacumulação (MIRANDA *et al.*, 2023).

Geissen *et al.* (2015), demonstraram que, até 2015, foram detectados cerca de 700 compostos diferentes de pelo menos 20 classes distintas de substâncias poluentes emergentes presentes nos ambientes aquáticos no

continente europeu. Os poluentes emergentes podem afetar significativamente a qualidade da água em corpos hídricos, e a avaliação dos efeitos dessas substâncias é fundamental para entender seu impacto sobre os organismos aquáticos e, conseqüentemente, sobre todo o ecossistema. Para isso, são realizados testes ecotoxicológicos em laboratório, que permitem avaliar o efeito dos poluentes emergentes sobre a sobrevivência, crescimento, reprodução e comportamento de organismos aquáticos (BRACK *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2017).

Há diversos tipos de poluentes emergentes que podem ser encontrados em rios, dentre os quais se destacam: medicamentos e drogas, produtos de higiene pessoal, plásticos, produtos farmacêuticos veterinários e produtos químicos industriais (WILKINSON *et al.*, 2017). No entanto, é válido salientar que a lista de poluentes emergentes em rios pode variar conforme a região, o tipo de atividade humana e o nível de tratamento de água disponível (BUENO *et al.*, 2012). É crucial monitorar regularmente a qualidade da água em rios e implementar medidas efetivas de prevenção e controle da poluição, a fim de minimizar os impactos desses poluentes emergentes no meio ambiente e na saúde humana (GEISSEN *et al.*, 2015).

### **2.2.1 Agroquímicos**

Os agrotóxicos, também conhecidos como agroquímicos defensivos agrícolas ou pesticidas são compostos químicos sintéticos e insumos utilizados como defensivos agrícolas para o controle de pragas e doenças causadas por vetores externos e para o manejo do crescimento das plantas, tanto em áreas rurais quanto urbanas. A classificação desses produtos pode ser realizada com base na natureza dos organismos a serem controlados, no método de operação do sistema ativo, no grupo de produtos químicos contidos ou em sua toxicidade, risco ou periculosidade ambiental (DE MORAES, 2019; INCA, 2021; INCA, 2019).

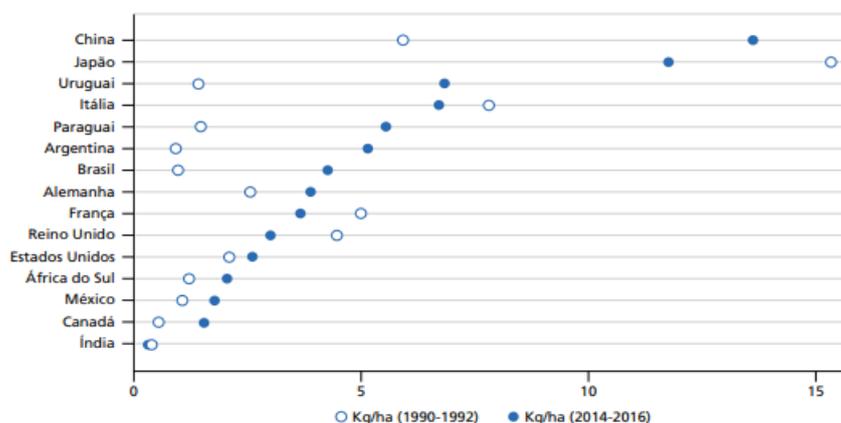
O uso, descarte e aplicação indiscriminada de agrotóxicos representam uma preocupação de grande magnitude na atualidade. A utilização inadequada dessas substâncias em sistemas e práticas agrícolas pode resultar em alterações

nos níveis de enzimas antioxidantes e oxidantes dos organismos, provocando o desenvolvimento de doenças causadas pelo estresse oxidativo (ABDOLLAHDOKHT *et al.*, 2022; RODRÍGUEZ, 2016).

Considerando o uso pretendido, os agrotóxicos podem ser classificados como inseticidas, fungicidas, herbicidas, raticidas, acaricidas, desfolhantes, dentre outras classificações, seja por grupo de produtos químicos e/ou toxinas (INCA, 2019).

A expansão do uso de agrotóxicos apresentou grande escala na dinâmica de utilização ao longo das últimas décadas. Em parte, o crescimento dessas dimensões levou à expansão do consumo de agrotóxicos no Brasil e no mundo. A Figura 2 apresenta um estudo sobre a evolução do uso de pesticidas, considerando a taxa de aplicação por área cultivada (DE MORAES, 2019).

**Figura 2 – Ranking mundial para o uso de pesticidas: Quantidade por área cultivada em comparativo de período por kg/ha.**



Fonte: De Moraes, (2019).

Os neonicotinóides surgiram como uma nova classe de inseticidas em meio à crescente preocupação com a resistência de insetos aos pesticidas organofosforados, carbamatos e piretroides que dominavam os mercados globais na década de 1990. Além disso, evidências de comprometimento do neurodesenvolvimento em crianças associado ao uso desses pesticidas organofosforados, e preocupações com a exposição dos trabalhadores também foram fatores que impulsionaram o desenvolvimento e a difusão dos

neonicotinóides. (CASSEREAU *et al.* 2017; ESKENAZI; BRADMAN; CASTORINA, 1999).

### 2.2.1.1 Os Neoneonicotinóides

Os pesticidas neonicotinóides são uma classe de inseticidas químicos que são usados na agricultura para proteger as plantações de pragas e insetos nocivos (JACTEL *et al.*, 2019). Foram desenvolvidos e registrados em 1990 e constituem um grupo de inseticidas desenvolvidos a partir da molécula de (S)-(-)-nicotina, isolada como um alcaloide de espécies do gênero *Nicotina sp.*. Esses inseticidas podem ser classificados como N-nitroguanidinas, nitrometilenos e N-cianoamidinas (JESCHKE *et al.*, 2011). Eles são chamados de "neonicotinóides" porque sua estrutura química é semelhante à da nicotina, um composto naturalmente encontrado no tabaco (JESCHKE; NAUEN, 2008).

Nas últimas décadas, os neonicotinóides se tornaram a classe de inseticidas que mais cresce na proteção de cultivos modernos, sendo amplamente utilizados contra pragas e insetos sugadores e mastigadores (GOULSON, 2013; JESCHKE; NAUEN, 2008). Segundo Humann-Guillemint *et al.* (2019), é a classe de pesticidas e inseticidas mais utilizada em todo o mundo.

Estudos científicos mostram que o uso de neonicotinóides pode causar efeitos ecológicos adversos significativos, representando uma séria ameaça aos ecossistemas aquáticos e terrestres. Esses pesticidas estão associados ao transtorno do colapso das colônias de abelhas (CCD), que pode levar a uma redução dramática nas populações de abelhas e, portanto, afetar a polinização e a produção de alimentos. Além disso, a redução nas populações de insetos também pode levar à perda de aves que se alimentam deles, resultando em um impacto negativo na biodiversidade. Esses impactos preocupantes levaram a moratórias e proibições em alguns países europeus, como medida de precaução para proteger a saúde humana, a vida selvagem e o meio ambiente. É importante adotar práticas agrícolas mais sustentáveis e seguras para minimizar os impactos dos neonicotinóides e promover a conservação da biodiversidade e da saúde do ecossistema (MASON *et al.*, 2013; OBEREMOK *et al.*, 2015).

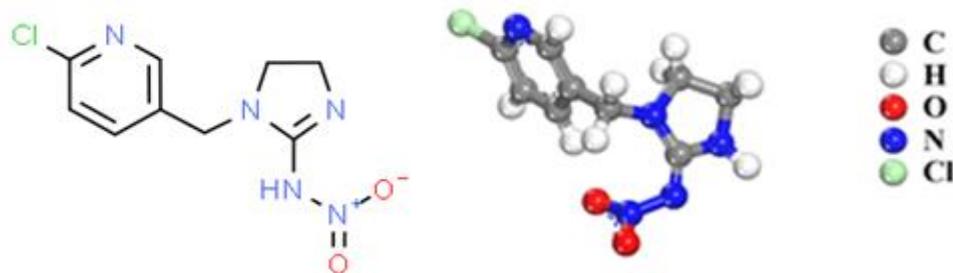
Segundo Oberemok *et al.* (2015), os pesticidas inseticidas atuam principalmente em três alvos no sistema nervoso: a acetilcolinesterase, que é uma enzima essencial para a transmissão de impulsos nervosos (organofosforados e carbamatos); os canais de sódio dependentes de voltagem através das membranas nervosas (piretróides e diclorodifeniltricloreto - DDT); e principalmente os receptores nervosos de acetilcolina (os neonicotinóides) (NIU *et al.*, 2022).

A história de sucesso dos inseticidas neonicotinóides começou em 1991, quando a Bayer CropScience lançou seu precursor, o IMI, que é o inseticida mais vendido do mundo há anos (JESCHKE; NAUEN, 2008).

### **2.2.1.2 Imidacloprido**

O imidacloprido (IMI) é um inseticida da classe dos neonicotinóides e é amplamente utilizado em todo o mundo em culturas como cana-de-açúcar, citros, algodão e café. Embora tenha benefícios na agricultura, o IMI também pode ter efeitos tóxicos e genotóxicos em organismos não alvo. Segundo dados do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) de 2020, o IMI é o pesticida mais vendido e o nono princípio ativo mais comercializado no Brasil. Isso se deve ao grande número de usos possíveis e ao número de culturas autorizadas a usar o pesticida (IBAMA, 2021; RODRIGUES, 2016).

O IMI é um inseticida nitroguanidina sistêmico, composto orgaonitrogenado contendo um grupo nitro, que é N-ligado a uma guanidina, com princípios neuroativos que age como agonista do receptor de acetilcolina, atacando o sistema nervoso central dos insetos organismos alvo, sendo eficaz contra diversas pragas. A toxicidade oral aguda e crônica do IMI e seus principais metabólitos (5-hidroxiimidacloprid, 4,5-dihidroxiimidacloprid, desnitroimidacloprid, ácido 6-cloronicotínico, olefina e derivado de ureia), conforme estrutura na Figura 3 com fórmula molecular e modelo molecular do pesticida IMI (1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidin-2-ilidenoamina) (SUCHAIL *et al.*, 2001).

**Figura 3 - Modelos moleculares do pesticida Imidacloprido.**

Fonte: Adaptados de Li *et al.* (2021) e Steve (2007).

O neonicotinóide IMI, assim como a nicotina, que é o composto de onde este é modelado se liga aos receptores nicotínicos de acetilcolina nas células dos organismos. Nos mamíferos, os receptores nicotínicos de acetilcolina são encontrados nas células do sistema nervoso central e periférico. Nos insetos e hemípteros, esses receptores são restritos ao sistema nervoso central. Enquanto a ativação baixa a moderada desses receptores causa estimulação nervosa, níveis altos superestimulam e bloqueiam os receptores, causando paralisia e morte. O IMI atua como um agonista parcial do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) e pode também ser tóxico para organismos não-alvo (GUPTA *et al.*, 2019).

O receptor nicotínico de acetilcolina é ativado pelo neurotransmissor acetilcolina, e sua atividade é encerrada pela ação da acetilcolinesterase, que quebra a acetilcolina. Os neonicotinóides são capazes de se ligar irreversivelmente a esses receptores, pois a acetilcolinesterase não consegue distinguir e quebrar esses pesticidas. Isso se deve ao fato de que os neonicotinóides se ligam aos receptores de neurônios de hemípteros de maneira mais eficiente do que aos receptores de neurônios de mamíferos. Como resultado, esses pesticidas são mais tóxicos para os hemípteros do que para os mamíferos. A baixa toxicidade dos neonicotinóides em mamíferos se deve, em grande parte, à ausência de átomos de nitrogênio carregados em pH fisiológico. Essas moléculas não carregadas conseguem atravessar a barreira hematoencefálica dos insetos, enquanto são filtradas pelas barreiras hematoencefálicas dos mamíferos. No entanto, alguns dos produtos de degradação dos neonicotinóides podem ser tóxicos para animais e humanos. (TOMIZAWA *et al.*, 2021).

De acordo com o Boletim de Vendas de Agroquímicos (IBAMA, 2021), aproximadamente 609 mil toneladas do princípio ativo de agrotóxicos foram comercializadas no Brasil até 2020, o que corresponde a um aumento de aproximadamente 79% em relação aos últimos dez anos da pesquisa. O histórico de vendas entre 2010 e 2020 é mostrado na Figura 4.

**Figura 4 - Consumo de ingredientes ativos de agrotóxicos no Brasil.**



Fonte: IBAMA, 2021.

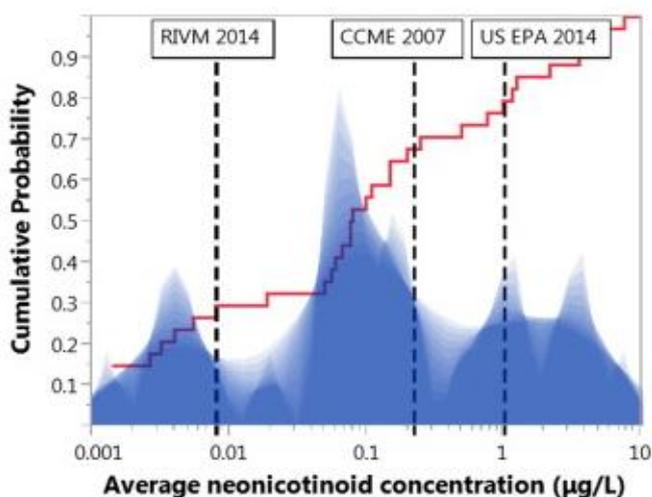
Estes pesticidas possuem um perfil ambiental preocupante, sendo altamente persistentes e com alto potencial de lixiviação e escoamento, o que significa que podem ser facilmente transportados para as águas superficiais e ser tóxicos para os organismos aquáticos (ALSAFRAN *et al.*, 2022). Devido à sua alta solubilidade em água, a entrada desses compostos em corpos d'água pode potencializar os riscos à saúde humana e aos ecossistemas aquáticos. Por isso, é importante controlar o uso desses pesticidas e adotar práticas agrícolas mais sustentáveis para reduzir sua entrada nos corpos d'água (EL-KAMMAH *et al.*, 2022).

Como já mencionado, as concentrações ambientais de IMI em águas superficiais de rios podem variar dependendo da região e das práticas agrícolas locais. Vários estudos têm relatado a presença de IMI em águas superficiais, com concentrações que variam de traços a níveis elevados em diferentes regiões (BONMATIN *et al.*, 2015).

Segundo Morrissey *et al.* (2015), as concentrações ambientais de neonicotinóides em águas superficiais em todo o mundo estão dentro da faixa que

pode ter impactos de curto e longo prazo nos ecossistemas aquáticos em grandes escalas espaciais, sendo que as de IMI são detectadas em concentrações que variam entre 0,001 e 320,0  $\mu\text{g/L}$ , conforme mostra a Figura 5.

**Figura 5 - Histograma de sombra de média e concentrações máximas de neonicotinóides (escala logarítmica,  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) relatadas a partir de estudos de monitoramento de águas superficiais.**



Fonte: Adaptado de Morrissey *et al.* (2015).

Portanto, o uso excessivo e inadequado de pesticidas como o IMI pode ter impactos significativos nos ecossistemas aquáticos e na saúde humana. É importante que sejam adotadas práticas agrícolas mais sustentáveis e medidas de controle de poluição para minimizar a presença de pesticidas em rios e outros corpos d'água e proteger a vida aquática e o meio ambiente em geral (MAHMOOD *et al.*, 2016).

## 2.3 Dos plásticos aos microplásticos

### 2.3.1 O plástico

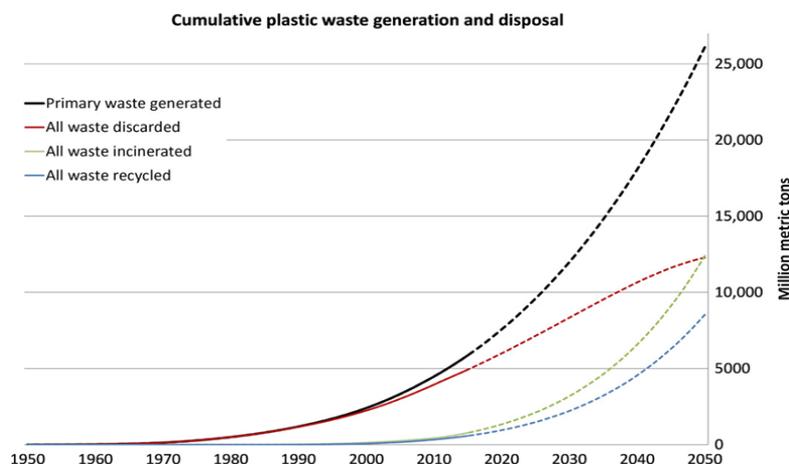
A ciência dos materiais é uma disciplina que estuda e classifica uma ampla variedade de produtos sólidos, naturais e sintéticos. Entre as diversas categorias de materiais, os polímeros correspondem a um ramo complexo e extenso dessa área do conhecimento. Os materiais poliméricos apresentam uma ampla gama de características e podem ser provenientes de diversas fontes (BRAZEL; ROSEN, 2012).

De forma geral, estes materiais são classificados em grandes subgrupos, que são os plásticos (termoplásticos, termorrígidos e termofixos), fibras, revestimentos, adesivos, espumas, filmes e elastômeros (SHRIVASTAVA, 2018). A partir desta classificação geral, as especificações são definidas de acordo com a especificidade desses materiais, seja em relação à sua origem, estrutura de cadeia, composição química, propriedades físicas e método de polimerização (CALLISTER, 2019).

A maior classe de materiais poliméricos com o maior número de produtos de diferentes tipos de composição está enquadrada na classificação de plásticos. Os materiais plásticos possuem essa denominação por referência ao grego "plastikos", que significa capaz de se moldar (KAUSHIK, 2019). Devido às suas propriedades físicas e químicas, esses materiais têm a capacidade de fácil maleabilidade quando expostos a certos níveis de temperatura, compreendendo a grande maioria dos materiais do grupo macro de termoplásticos (ALHAZMI; ALMANSOUR; ALDHAFEERI, 2021; CALLISTER, 2008).

Os plásticos são materiais poliméricos formados a partir da união de cadeias moleculares longas compostas por macromoléculas repetitivas de monômeros (SHRIVASTAVA, 2018). Eles são amplamente produzidos industrialmente e estão presentes em uma vasta gama de bens de consumo e de uso. Até 2015, cerca de 6.300 Mt de resíduos plásticos foram gerados, dos quais apenas cerca de 9% foram reciclados, 12% foram incinerados e 79% foram acumulados em aterros ou no ambiente natural. Conforme mostra a Figura 6, prevê-se que esse volume quadruple até 2050 (GEYER *et al.*, 2017).

**Figura 6 - Geração e destinação cumulativa de resíduos plásticos (em milhões de toneladas). As linhas sólidas mostram dados históricos de 1950 a 2015; as linhas tracejadas mostram projeções de tendências históricas até 2050.**



Fonte: Geyer *et al.* (2017).

A poluição aquática e terrestre por plásticos vem gerando uma série de preocupações em relação aos ecossistemas e à saúde ambiental, animal e humana (BOELEEE *et al.*, 2019). Por décadas, os plásticos vêm sendo encontrados em grande abundância nos ambientes naturais, e sua natureza de longa permanência e difícil degradação potencializa os impactos adversos sobre a biodiversidade (BAIA *et al.*, 2020). A poluição por resíduos de plástico é hoje um dos problemas ambientais mais complexos. Uma vez no ambiente, a degradação química e física leva à fragmentação dos plásticos (GALL *et al.*, 2015; MARTINS, 2020).

Segundo Lebreton *et al.* (2017), foi estimado que 1,15 a 2,41 milhões de toneladas de resíduos plásticos entram nos oceanos todos os anos a partir dos rios, sendo que os 20 principais rios poluentes, localizados principalmente na Ásia, representam 67% do total global de contribuição deste potencial poluidor.

### 2.3.1.1 Microplásticos ambientais

Os microplásticos (MPs) são classificados como um dos tipos de poluentes ambientais emergentes, cada vez mais detectados em ambientes de águas superficiais (COOK *et al.*, 2020). MPs são fragmentos sólidos de material polimérico com tamanho variando entre 1  $\mu\text{m}$  e 5 mm, que podem ser encontrados em diversas formas e apresentações no meio ambiente, incluindo fragmentos, fibras, filmes e microesferas (FRIAS *et al.*, 2019). Essas partículas

podem ser primárias, ou seja, produzidas diretamente na forma de MPs, ou secundárias, resultantes da degradação de plásticos maiores (SYBERG *et al.*, 2015). A definição técnica de MPs pode variar dependendo do campo de estudo, mas em geral refere-se a partículas sólidas de plástico de tamanho reduzido que podem ser encontradas em diversos ambientes, desde oceanos, solos e até mesmo no ar (NIKIEMA *et al.*, 2022).

A poluição por MPs é causada por diversas atividades humanas, o que contribui para a presença dessas partículas em ambientes terrestres e aquáticos. As fontes antrópicas incluem o descarte inadequado de plásticos, a lavagem de roupas sintéticas, o uso de produtos de cuidados pessoais contendo microesferas de plástico, atividades marítimas e a liberação de efluentes industriais contendo MPs (AN *et al.*, 2020).

Estudos têm mapeado as principais fontes potenciais de MPs e sua poluição nos ambientes aquáticos (WAGNER; LAMBERT, 2018). Embora haja muitas investigações sobre MPs encontrados nos mares e oceanos, o número de estudos realizados sobre ambientes de água doce é relativamente menor. No entanto, esses estudos destacam considerações relevantes, mostrando que a atividade humana, principalmente a urbanização e a densidade populacional, está relacionada às maiores concentrações de poluição por MPs nesses ambientes (KATAOKA *et al.*, 2019; YAO *et al.*, 2019).

Investigações recentes têm apontado para a identificação gradual de MPs de diferentes composições poliméricas em amostras de água de rios, lagos, sedimentos e estações de tratamento, indicando a presença crescente e variada desses poluentes (BAPTISTA NETO *et al.*, 2019).

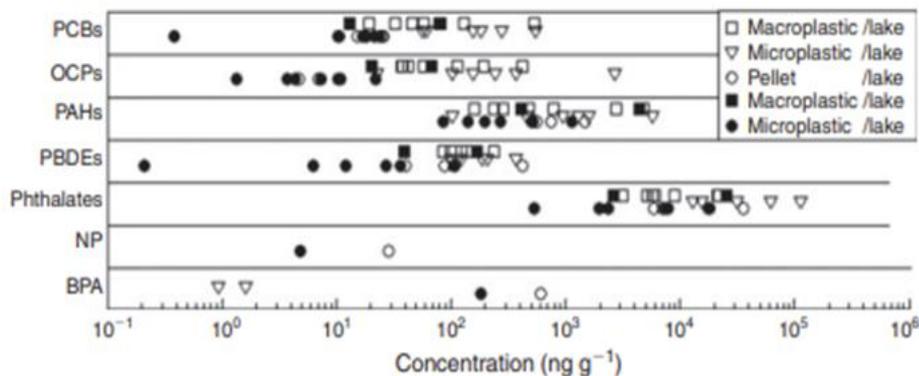
Os MPs presentes em corpos hídricos podem ser compostos de diversas resinas poliméricas, como polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), poliéster (PET), policarbonato (PC), policloreto de vinila (PVC) e poliamida (PA), entre outras (SHIM *et al.*, 2016). As composições variam de acordo com a origem do material ou dos produtos. A identificação das composições poliméricas é importante para entender a origem da poluição e traçar estratégias para reduzir a sua contaminação (PAKHOMOVA; VAN, 2020).

Os tipos poliméricos mais encontrados nos ambientes aquáticos de água doce seguem a ordem PE, PP, PS, PVC e PET, respectivamente (KOELMANS *et al.*, 2019).

Assim, a contaminação ambiental com detritos plásticos é uma preocupação global em relação aos corpos hídricos. E com isso, os vestígios de MPs presentes no meio ambiente representam aspectos de alto impacto negativo para esses sistemas. Além disso, os MPs podem conter aditivos como corantes e plastificantes tóxicos, que são potenciais poluentes ambientais. Eles também têm a capacidade e viabilidade de adsorver e potencializar outros agentes e poluentes nocivos e prejudiciais presentes no meio, como produtos farmacêuticos, pesticidas, sintéticos variados, metais e organoclorados, dentre outros. Esses poluentes podem ser liberados para a biota após a ingestão e o contato com os organismos, causando efeitos tóxicos variados (ADYARI *et al.*, 2020; PRATA *et al.*, 2018; WARDROP *et al.*, 2016).

Faure *et al.* (2015) realizaram uma investigação sobre a poluição plástica nas águas superficiais de Genebra, na Suíça, em 2012. O estudo analisou a natureza, concentrações e interação dos MPs com outros poluentes presentes. Os resultados mostraram que os MPs foram encontrados em todas as matrizes investigadas, como sedimentos de praia, superfícies de lagos e rios. Alguns dos contaminantes mais concentrados, como bifenilos policlorados (PCBs) e pesticidas organoclorados (OCPs), em particular o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), foram associados aos MPs, como mostrado na Figura 7, que apresenta uma visão geral das concentrações de contaminantes por tipo de partícula e substrato.

**Figura 7 - Visão geral das concentrações de contaminantes por tipo de partícula e substrato.**



Fonte: Faure *et al.* 2015.

No estudo de Wang (2019), foi reunido o que se sabe sobre os efeitos ecotoxicológicos de MPs e compostos associados na biota aquática de água doce. Até o momento, os estudos de toxicidade de MPs têm se concentrado principalmente nos possíveis efeitos nocivos dos MPs ingeridos (incluindo os tóxicos associados) sobre a fauna aquática. No entanto, sabe-se muito menos sobre os impactos da exposição de MPs em produtores primários aquáticos, o processo de transferência trófica de MPs e substâncias associadas, bem como as implicações do consumo de produtos aquáticos para a saúde humana. Isso ressalta a necessidade de maior envolvimento e desenvolvimento da comunidade acadêmico-científica em pesquisas nesses processos.

De acordo com Yan *et al.* (2019) e Zhao *et al.* (2014), amostragens de superfície realizadas na foz dos rios Yangtze e das Pérolas, na China, demonstraram que as concentrações de MPs nessas regiões foram consideravelmente mais altas do que em qualquer outro rio amostrado no mundo.

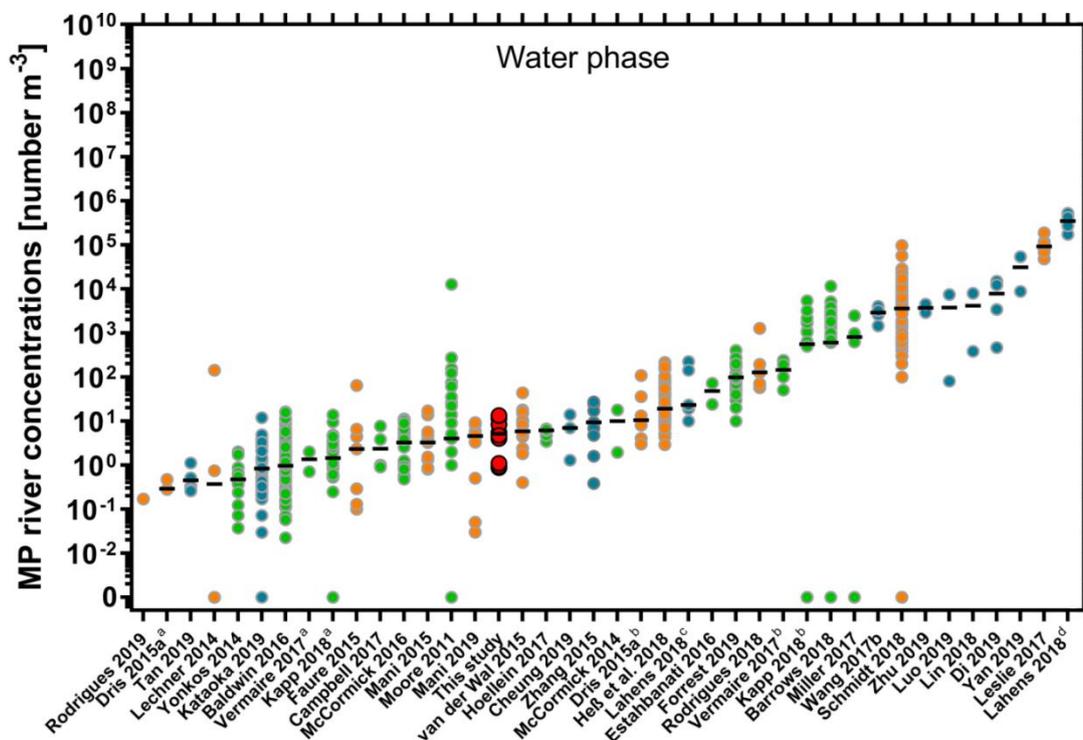
Na região do trecho urbano e estuário do Rio das Pérolas, a abundância e distribuição de MPs na água foram de 19.860 partículas/m<sup>3</sup> e 8.902 partículas /m<sup>3</sup>, respectivamente, seguida pelo rio Yangtze com 4.137 partículas/m<sup>3</sup>.

Rodrigues *et al.* (2018), demonstraram que a abundância de MPs nas águas do rio Antuã, em Portugal, variou de 58 a 193 partículas/m<sup>3</sup> em março e 71 a 1265 partículas/m<sup>3</sup> em outubro. Chen *et al.* (2022), demonstraram que a abundância média de MPs na água superficial do rio Xiangxi foi de (6,64±1,32) partículas/L.

No Brasil, em Ferraz *et al.* (2020) apontaram uma incidência de 330,2 partículas/L, o que equivale a  $3,3 \times 10^5$  partículas/m<sup>3</sup>, em água não tratada do Rio Sinos, no Rio Grande do Sul.

Em uma pesquisa global sobre MPs em rios, as concentrações médias variaram em 5 ordens de magnitude, variando de  $3,69 \times 10^{-2}$  a  $4,14 \times 10^3$  partículas/m<sup>3</sup>. Até o momento, as avaliações ambientais em rios e outras fontes de água doce ao redor do mundo indicam um intervalo de concentração entre 1 a  $10^9$  conforme mostrado na Figura 8 (KOELMANS *et al.*, 2019; LEBRETON *et al.*, 2017; SCHERER *et al.*, 2020).

Figura 8 - Concentração de partículas em águas superficiais



Fonte: Adaptado de Scherer *et al.*(2020).

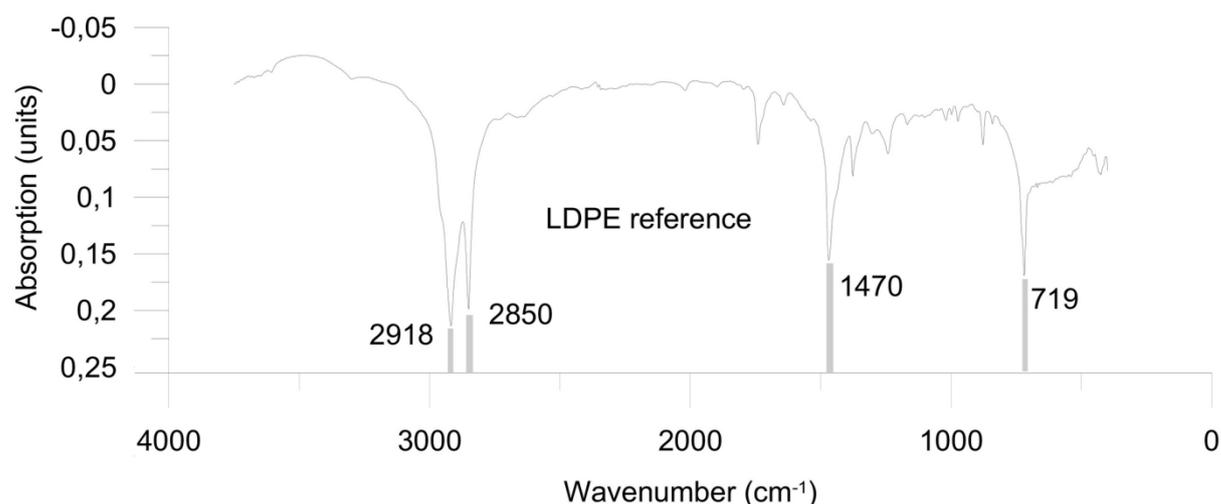
### 2.3.1.2 Microplásticos de Polietileno

Atualmente, o PE é o polímero mais produzido e utilizado em todo o mundo, com previsão de crescimento contínuo à medida que a demanda do consumidor por aplicações como automóveis, construção e embalagens continua a aumentar. De acordo com dados de 2019, a demanda global por PE foi estimada em 47 milhões de toneladas métricas (PELLER *et al.*, 2021).

O PE é um polímero amplamente utilizado na produção de uma grande variedade de produtos. Além dos já mencionados acima, ele é empregado em muitas outras aplicações. Alguns dos principais exemplos incluem tubos e conexões, brinquedos, artigos esportivos, artigos de higiene e beleza, revestimentos de fios e cabos elétricos, sacolas de compras, móveis de jardim, tanques de armazenamento, entre outros. Devido à sua facilidade de produção, baixo custo, resistência, durabilidade e versatilidade, a sua ampla utilização torna o PE a classe de polímeros mais consumida (GEYER, 2020; RONCA, 2017).

Pertencente ao grupo de poliolefinas, o PE é processado a partir do gás etano. Este polímero plástico apresenta polimerização ocorrente pelo alongamento da cadeia através do acoplamento dos meros ao grupo da extremidade, aos quais as moléculas de eteno são unidas por ligações covalentes. Na análise por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (Fourier-Transform Infrared spectroscopy - FTIR) de polietileno de baixa densidade (LDPE), os valores de absorção da curva de referência são contados em unidades de absorbância. As cargas são mostradas na Figura 9 (HAHN *et al.*, 2019; KOLTZENBURG; MASKOS; NUYKEN, 2017)

**Figura 9 - Espectro FTIR de referência do polietileno de baixa densidade (LDPE) sobre os comprimentos de onda entre  $3750\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ .**



Fonte: Adaptado de Hahn *et al.*, 2019.

Segundo Rehse (2016), os MPs de PE possuem a mais alta abundância em ecossistemas aquáticos. É um dos polímeros mais populares e contribui significativamente com MPs para ambientes de água doce, sendo considerado o

polímero sintético mais onipresente encontrado em corpos d'água. Browne *et al.* (2011), em uma análise FTIR realizada na fração de tamanho de 630-5000 µm de uma amostra ambiental específica, revelaram que menos de 50% do peso total do plástico encontrado era constituído por PE (COOK *et al.*, 2020; GEYER *et al.*, 2017).

Os MPs possuem a capacidade de sorver outros poluentes concomitantes, orgânicos ou inorgânicos, e apresentam o risco de ação sinérgica toxicológica potencializada. Além disso, podem persistir, transferir e bioacumular ao longo do nível trófico, tornando-se muito difícil de remover e levando consigo os demais poluentes adsorvidos (SANTOS *et al.*, 2020).

Os MPs podem atuar como transportadores de pesticidas no ambiente aquático, representando um grande risco potencial. Li *et al.* (2021), verificaram a capacidade de adsorção de agrotóxicos em MPs, especificamente em MPs de PE com IMI. Eles indicaram que a adsorção de superfície era o mecanismo exclusivo para a adsorção do pesticida em MPs, e as configurações finais de adsorção revelaram interações complexas entre as moléculas de pesticidas e os átomos de carbono e hidrogênio nas moléculas de PE.

No geral, os resultados de estudos sinalizam que os efeitos tóxicos dos MPs e poluentes podem variar dependendo das propriedades específicas dos grupos funcionais de poluentes e MPs, sendo esses evidenciados cada vez mais nos estudos sobre a toxicidade de diferentes combinações de MPs e poluentes (KIM *et al.*, 2017).

### 3 OBJETIVOS

Avaliar a ecotoxicidade dos poluentes emergentes, o pesticida imidacloprido (IMI) e o microplástico (MPs) de polietileno (PE), utilizando o microcrustáceo *Daphnia similis*.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Caracterizar e comparar as condições físicas e químicas dos MPs de PE, virgens (MPv) e fragmentados (MPf), e as relações de concentração do IMI comercial (IMlc) e padrão (IMlp).
- Compreender a relação entre adsorção e absorção do IMlc e IMlp por MPv e MPf.
- Avaliar a toxicidade aguda e crônica dos compostos IMlc, IMlp, MPv e MPf sobre o organismo *D. similis* isoladamente.
- Avaliar a atividade do sistema antioxidante do organismo *D. similis* através dos biomarcadores oxidativos SOD, CAT, GST e MDA para cada composto, isoladamente e em associação.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção e caracterização dos microplásticos virgens e fragmentados

Os MPs de PE linear de baixa densidade foram doados pela empresa Valmaster - Lorena, e foram separados por tamisação em peneiras graduais em um agitador mecânico. Foram selecionados os particulados retidos nas peneiras com diâmetros de <150 e >170 mesh, correspondendo a diâmetros de 100 a 88 µm. Para verificar o tamanho médio das partículas, foi utilizado o equipamento analisador de partículas por difração laser Malvern Mastersizer 3000 (PRINA *et al.*, 2021).

O processo de fragmentação descrito neste estudo baseou-se no trabalho de Schür *et al.* (2020). Foram utilizados pellets de PE para produzir MPs irregulares. Os pellets foram congelados em nitrogênio líquido e, em seguida, moídos em um moinho de impacto (modelo básico IKA® A11) a 50/60 Hz por 30 segundos. Esse processo foi repetido duas a quatro vezes para produzir quantidades suficientes de MPs. Após a moagem, as partículas foram separadas por tamisação e selecionadas as partículas retidas, conforme mencionado anteriormente.

Para contar o número de partículas presentes em uma determinada massa de 0,059 g das amostras de MPv e MPf, foi preparada uma solução contendo 10% (v/v) de Tween 80 em um volume final de 10 mL. Em seguida, 1 mL da solução foi adicionado a uma câmara de contagem Sedgewick para visualização em microscópio óptico. Esse procedimento foi repetido 10 vezes para cada tipo de amostra, a fim de determinar o número de partículas por volume de solução. Os resultados foram expressos em partículas/m<sup>3</sup> e a média dos valores foi calculada, seguindo o método descrito por Vroom *et al.* (2017).

A composição química dos MPv e MPf de LDPE foi comparativamente analisada por meio de espectroscopia FTIR-ATR (IRPrestige-21/Shimadzu). Além disso, foram obtidas imagens superficiais das partículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV - Hitachi TM3000), com as amostras recobertas com prata e utilizando 5kV de voltagem e detector de elétrons retroespalhados para observação visual..

## 4.2 Testes de adsorção

Com base em metodologias adaptadas de Wu *et al.* (2020) e LI *et al.* (2021), foram realizados os testes de adsorção. Para isso, foram utilizados 50 mg de MPv e MPf, acrescidos de 5 mg do IMIc, IMIp em 100 ml de água reconstituída para *Daphnia similis* a 21°C, para obtenção dos parâmetros de massa e volume.

A avaliação foi realizada em condições similares, com valores de concentrações de referência de Wang *et al.* (2020), sob rotação orbital de 200 rpm e coleta de 13 alíquotas nos intervalos de 0 a 48 horas (0, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 19, 21, 24, 27, 43 e 48 horas). Todas as amostras de soluções foram filtradas através de membranas de filtro de sistema orgânico de 0,22 µm. Após a filtração, as concentrações de pesticidas foram determinadas por espectrofotômetro UV (Kasvi K37-UVVIS) (WANG *et al.*, 2020).

A curva padrão de pesticidas foi determinada por espectrofotometria UV antes dos experimentos de adsorção, por varredura UV de banda completa de soluções de pesticidas nas faixas de 200-400 nm, determinando o comprimento de onda máximo de absorção (nm). A capacidade de adsorção dos MPs foi calculada pela Equação 1. A porcentagem sorvida foi calculada de acordo com a Equação 2 e a cinética pela Equação 3 (LI *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2020).

A Equação 1 para calcular a capacidade de adsorção dos MPs foi adaptada de Wang *et al.* (2020) e LI *et al.* (2021) e é dada por:

Equação 1

$$Q_t = \frac{(C_0 - C_t)V}{m}$$

Onde  $Q_t$  é a capacidade de adsorção de MPs ( $\text{mg.g}^{-1}$ ),  $C_0$  é a concentração inicial de pesticidas ( $\text{mg.L}^{-1}$ ),  $C_t$  é a concentração residual de pesticidas em qualquer momento ( $\text{mg.L}^{-1}$ ),  $V$  é o volume de solução de pesticidas (L), e  $m$  é a massa de MPs (g).

Equação 2

$$\%adsor = \left( \frac{C_o - C_t}{C_o} \right) \times 100$$

A cinética de adsorção dos pesticidas pelos MPs é descrita pela Equação 3 de pseudo-primeira ordem:

Equação 3

$$\ln(Q_e - Q_t) = \ln Q_e - k_1 t$$

Onde  $K_1$  é a constante de taxa cinética de pseudo-primeira ordem ( $1.h^{-1}$ ) e  $t$  é o tempo de adsorção (h) capacidade de adsorção unitária de MPs no equilíbrio de adsorção ( $Q_e$ ).

### 4.3 Testes toxicológicos

#### 4.3.1 Cultivo do organismo *Daphnia similis*

No Laboratório de Ecotoxicologia da Escola de Engenharia de Lorena - USP, os organismos *D. similis* foram cultivados seguindo os protocolos da norma NBR 12713/22 para o preparo de água reconstituída. As condições foram ajustadas para pH entre 7,0 e 7,6, dureza entre 40 e 48  $mg.L^{-1}$  de  $CaCO_3$ , condutividade de 140 a 160  $\mu S.cm^{-1}$  e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Os organismos foram alimentados diariamente com microalgas *Raphidocelis subcapitata* ( $1 \times 10^5$  células  $mL^{-1}$ ) e alimento composto fermentado ( $1 mL.L^{-1}$ ), preparado com ração para trutas Tetramin® ( $5 g.L^{-1}$ ) e extrato de levedura *Saccharomyces cerevisiae* ( $1 g.L^{-1}$ ).

#### 4.3.2 Teste de toxicidade aguda

##### 4.3.2.1 Preparo das soluções

A solução estoque de IMIp foi preparada em metanol (99,9%, grade HPLC conforme descrição de fabricante), na concentração de  $10 mg.mL^{-1}$ . Com base nos resultados preliminares de toxicidade, a concentração da solução estoque foi determinada para que a concentração de metanol nos ensaios finais não

ultrapassasse  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de acordo com a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OECD nº 211 (OECD, 2012).

A solução estoque IMIc produto comercial Galeão® (IMI/ingredientes inertes (70:30,(m/m)) foi preparado diretamente em água destilada em concentração de  $1\text{g.L}^{-1}$ .

As exposições de MPv e MPf em concentração massa volume de  $\text{mg.L}^{-1}$  foram pesados em balança analítica e agitado em água de cultivo por 15 minutos a 200 rpm com  $22^{\circ}\text{C}$  em shaker conforme Rehse, Kloas e Zarfl (2016).

#### **4.3.2.2 Exposição dos organismos**

Para determinar as concentrações de efeito em 50% da população, seguindo as diretrizes da NBR 12713/22, foram realizados ensaios toxicológicos utilizando neonatos com 6 a 24 horas de vida, expondo 20 organismos por tratamento, divididos em quatro repetições durante 48 horas, sob temperatura controlada de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo ajustado de 12 horas claras/12 horas escuras.

As concentrações de IMIc utilizadas foram ((controle) 0,0; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100;  $200 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), sendo a solução estoque diluída em água reconstituída. As concentrações de IMIp utilizadas foram ((controle) 0,0; 1,56; 3,13; 4,16; 6,25; 8,33;  $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), sendo a solução estoque diluída em água reconstituída. As concentrações de MPv e MPf utilizadas foram ((controle) 0,0; 6,25; 12,5; 25, 50, 100,  $200 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), sendo pesadas e preparadas diretamente em água reconstituída.

Durante o teste, não foi oferecido alimento e, ao final do experimento, foi verificada a mortalidade ou a imobilidade dos organismos. Todos os testes foram realizados em triplicata (OECD, 2012, QUEIROZ *et al.*, 2020; REHSE; KLOAS; ZARFL, 2016,).

#### **4.3.3 Teste de toxicidade crônica**

O efeito crônico foi avaliado seguindo as diretrizes da OCDE nº. 211 (OECD, 2012), como realizado por Mackevica *et al.* (2015), com adaptações. Os testes crônicos foram conduzidos com base nas concentrações efetivas

determinadas pelo teste agudo. Foram realizados ensaios com cinco concentrações abaixo da CE50 para cada composto, sendo estas: CE, 20, 15, 10, 5 e 2,5, mais controle. Os organismos neonatos com idade entre 6 e 24 horas foram distribuídos em quatro repetições, cada uma contendo cinco indivíduos, totalizando 20 organismos por concentração.

Os experimentos foram realizados em triplicata. Durante os ensaios, as soluções de teste foram renovadas a cada 48 horas, com a adição de alimento (25  $\mu$ L de algas e 23  $\mu$ L de alimento complementar) ao longo de 336 horas. Os neonatos e as mortalidades posteriores foram contabilizados a cada troca de solução, possibilitando a observação da curva de reprodução e dos efeitos crônicos ao longo do tempo de exposição, verificando a capacidade da espécie de se reproduzir e sobreviver, analisando a taxa de reprodução, comportamento, redução da longevidade e estresse oxidativo (DO PRADO *et al.*, 2021; TIMBRELL; BARILE, 2023).

#### **4.3.4 Determinação dos biomarcadores**

Para verificar o potencial toxicológico dos MPs associados aos IMIs, foram utilizados biomarcadores enzimáticos de estresse oxidativo como teste de toxicidade dos compostos, isoladamente e em combinações de misturas. Para isso, o microcrustáceo *D. similis* foram exposto aos compostos MPv, MPf, IMIp e IMIc nas concentrações de efeito observado em 5%, 10% e 20% (CE5, CE10 e CE20). As combinações de poluentes, envolvendo interações dos compostos expostos foram, IMIc+MPv, IMIc+MPf, IMIp+MPv e IMIp+MPf, nas concentrações de efeito observado em 5% e 10% (CE5 e CE10). A concentração desses compostos foi determinada utilizando uma série de avaliações dos testes agudos e crônicos, e os biomarcadores de estresse oxidativo foram aplicados para avaliar a toxicidade dessas misturas (CHENG *et al.*, 2020; NUGNES *et al.*, 2022; KIM *et al.*, 2017,).

##### **4.3.4.1 Preparação e análise dos biomarcadores**

Conforme descrito na metodologia Do Prado *et al.* (2021), os neonatos foram isolados e alimentados diariamente até completarem sete dias de vida. Em seguida, 50 indivíduos foram expostos para cada tratamento e mantidos até 48

horas de experimento, estes foram feitos em triplicata para avaliação de efeitos crônicos.

Ao final do experimento, os organismos foram transferidos para tubos cônicos com tampa e submetidos à eutanásia em banho frio por 20 minutos. Os tubos foram centrifugados a 2.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C e os organismos foram macerados com o auxílio de um bastão de vidro após adição de 0,6 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,4). Os tubos foram centrifugados novamente quatro vezes a 3.000 rpm por 20 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi utilizado para as reações dos biomarcadores.

A espectrofotometria UV/Vis (Dynamica, modelo Halo DB-20, feixe duplo) foi utilizada para analisar os biomarcadores, sendo que a concentração de proteína foi determinada de acordo com o ensaio de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão.

#### **4.3.4.2 Superóxido Dismutase (SOD)**

Seguindo o método descrito por Marklund, S. e Marklund, G. (1974) adaptado por Do Prado *et al.* (2021), a atividade da SOD foi avaliada. Em um microtubo protegido da luz, foram adicionados 60 µL da amostra (homogenato) e 1327 µL de tampão tris-EDTA, sendo homogeneizados por 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 75 µL da solução de pirogalol (0,039 g em 20 mL de água destilada) e homogeneizados novamente por 30 segundos. As amostras foram incubadas no escuro por 30 minutos e a reação foi interrompida com a adição de 37 µL de HCl 1M. Foram retiradas alíquotas (700 µL) para leitura em um espectrofotômetro a 420 nm, em cubetas de quartzo. A solução de branco foi preparada seguindo o mesmo procedimento, mas o homogenato foi substituído por solução tampão fosfato-salino (PBS). O controle foi submetido a todas as etapas descritas, exceto o processo de incubação por 30 minutos.

A atividade da SOD foi determinada pela capacidade de inibir a redução do pirogalol por radicais superóxido, e expressa em  $\mu\text{g.mL}^{-1} \text{ptna.min}^{-1}$  necessária para causar 50% da inibição da redução do pirogalol, conforme a Equação 4.

## Equação 4

$$\text{Atividade de SOD} = ((\text{Abs a} \times 100 / \text{Abs controle}) / 50) \times 1000 / \text{proteína}$$

A Equação 4 é utilizada para calcular a atividade da SOD e é expressa em  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{ptna} \cdot \text{min}^{-1}$ . A equação considera a absorbância da amostra (Abs a), o fator de porcentagem (100), o fator de inibição de 50% de atividade enzimática (50), o fator de conversão (1000, para converter de  $\mu\text{g}$  para mg) e a concentração de proteína em  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

**4.3.4.3 Catalase (CAT)**

A atividade da enzima catalase foi avaliada utilizando um ensaio enzimático descrito por Aebi (1984) e adaptado por Do Prado *et al.* (2021). O ensaio consistiu na mistura das soluções estoque de tampão fosfato de potássio (Merck) 100 mM e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , Vetec) 20 mM na proporção 1:1 (v/v), juntamente com 10  $\mu\text{L}$  de homogenato, em um ambiente climatizado a 18 °C e escuro. A solução de teste foi diluída apenas no dia da análise e foi preparada no máximo até 48 horas antes do teste.

O tampão fosfato de potássio foi preparado em uma concentração de 100 mM e pH 6,5, utilizando o sal fosfato de potássio monobásico e dibásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), respectivamente, na proporção 3:7 (m/m) e volume final de 1 L de água destilada. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi preparado a 20 mM, diluindo 1,1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 30% em água destilada, completando o volume para 500 mL.

Os ensaios foram monitorados através da redução da absorbância por consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , medido por espectrofotometria em 240 nm ao longo de 3 minutos. A atividade enzimática foi expressa em termos do consumo de 1 nmol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto por mg de proteína, calculada pela Equação 5. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  de  $40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para o cálculo da atividade enzimática.

## Equação 5

$$\text{Atividade de CAT} = ((\text{Abs inicial} - \text{Abs final}) \times 100) / 2 / (40 \times \text{proteína})$$

Onde a Abs inicial é a absorvância inicial da reação; Abs final é a absorvância em 2 min; 50 é o fator de diluição; 2 é o tempo de análise; 40 é o fator de extinção molar ( $\text{mM}\cdot\text{cm}^{-1}$ ); proteína é a quantidade de proteína da amostra.

#### 4.3.4.4 Glutathione S-Transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada utilizando a metodologia adaptada por Do Prado *et al.* (2021). Para isso, uma solução de glutathione reduzida (GSH, Sigma-Aldrich) a 9,5 mM foi preparada em tampão fosfato de potássio 100 mM, utilizando os sais  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (na proporção 3:7, m/m) e EDTA (1 mM) para ajuste do pH final a 6,5. A solução de GSH foi adicionada à solução de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, Sigma-Aldrich) a 21 mM em metanol na proporção 1:1 (v/v). A leitura do branco foi realizada por adição de 990  $\mu\text{L}$  da solução GSH/CDNB e 10  $\mu\text{L}$  de água destilada, enquanto a mesma proporção da amostra para o branco foi seguida, com a adição de 10  $\mu\text{L}$  do homogenato em vez de água destilada. Todo o processo foi realizado em ambiente climatizado a 18 °C e no escuro, com a leitura da reação sendo medida em espectrofotômetro a 340 nm. A atividade da GST foi determinada pela medida do aumento da absorvância, correspondente ao consumo da solução CDNB-GSH e à formação do conjugado S-2,4-dinitrofenil, utilizando a Equação 6.

Equação 6

$$\text{Atividade de GST} = \left\{ \left[ \frac{A}{(C_0 \times 9.6)} \right] \times 100 \right\} / (\text{proteína} \times C) \times 1000$$

Onde A representa a variação da absorvância em relação ao tempo de análise (min),  $C_0$  é o caminho óptico ( $\text{cm}^{-1}$ ), 9,6 é o fator de extinção molar ( $\text{mM}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), 100 é o fator de diluição da amostra, proteína é a concentração da proteína em  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , C é a concentração de proteína adicionada em  $\text{mg}/\text{mL}$  e 1000 é o fator de conversão para  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

#### 4.3.4.5 Malonaldeído (MDA)

A atividade de MDA foi avaliada por meio da reação com as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que é um indicador de peroxidação lipídica, utilizando o método de reação do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) conforme descrito por Campos e colaboradores (2014), adaptada por Do Prado *et al.* (2021). A mistura de reação foi preparada adicionando-se 0,5 mL do homogenato, 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 20 mM (diluído em PBS 75 mM, pH 2,5). As amostras foram aquecidas em banho-maria a 96 °C por 30 minutos e, em seguida, resfriadas em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de butanol, homogeneizados e centrifugados a 14.000 rpm e 4 °C por 5 minutos. Os sobrenadantes foram lidos em espectrofotômetro a 532 nm para quantificação das concentrações de MDA. Para os controles, foram preparados tubos contendo 1 mL de TBA e 0,5 mL de homogenato. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de MDA formado ao longo de 30 minutos de reação, calculados pela Equação 7, onde a variação de absorvância (A) foi dividida pelo tempo (30 min) e o produto foi multiplicado pelo fator de extinção molar ( $9,6 \text{ mM cm}^{-1}$ ) e pelo caminho óptico (Co, cm). A concentração de proteína adicionada (C,  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) foi determinada pela relação da concentração de proteína da amostra (proteína,  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) e o fator de diluição (1000).

Equação 7

$$\text{Atividade de MDA} = \text{Abs a} \times (20 \times C_e / \text{Abs controle})$$

Onde a Abs a é a absorvância da amostra; 20 é a concentração em mM de MDA padrão;  $C_e$  é o coeficiente de extinção molar 220,32 e Abs controle é a absorvância da amostra controle.

#### 4.4 Análises estatísticas

Para verificar e comparar os dados e resultados observados nos tratamentos, foram realizadas análises estatísticas. Para isso, foram utilizados testes como Tukey, Análise de Fisher, t de Student ou Kruskal Wallis, bem como Análise de

Variância (ANOVA) One-way e Análise de Probit, de acordo com a natureza dos dados que foram classificados como paramétricos ou não paramétricos. Para a análise, foram utilizados os softwares MINITAB21, Origin 2020 e Microsoft Excel, a fim de gerar tabelas e gráficos que apresentassem os resultados de forma clara e objetiva.

A determinação das concentrações que causam efeito tóxico agudo e crônico nos organismos testados foi realizada através do teste de Fisher, seguido pela análise de variância (ANOVA One-way), a fim de verificar a significância das médias das concentrações utilizadas nos experimentos. As concentrações que causam efeito tóxico em 50% dos organismos (CE50, 20, 10, 5 e 2,5) foram obtidas por meio da análise de Probit, utilizando o software MINITAB 21. Os resultados obtidos tiveram um limite de confiança de 95%. Gráficos e tabelas foram elaborados utilizando o software Microsoft Excel para expressar os resultados.

A diferença entre as atividades enzimáticas e dos marcadores de estresse oxidativo de GST, CAT, MDA e SOD para cada um dos tratamentos e o grupo controle foi avaliada através da análise de variância (ANOVA One-way) seguida pelo teste de Tukey, utilizando o software MINITAB 21. O limite de confiança de 95% foi fornecido para os resultados obtidos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Quantificação das massas plásticas

A contagem do número de partículas para o MPv e MPf, resultaram em uma concentração de  $3,7 \times 10^9 \pm 0,82$  e  $3,9 \times 10^9 \pm 0,78$  partículas/m<sup>3</sup>, respectivamente. Na análise quantitativa das massas verificou que em 0,0059 g em 10 mL levou às relações de  $2,18 \times 10^6$  e  $2,29 \times 10^6$  partículas por grama de amostra, ocorrendo um desvio padrão de  $\pm 0,82$  e  $\pm 0,78$ , partículas por  $\mu\text{L}$  de soluções analisadas, respectivamente.

A Tabela 1 representa os resultados métricos para quantificação das massas plásticas utilizadas no estudo para compreensão e observação dos efeitos destes.

Tabela 1 - Resultados métricos dos MPv e MPf.

Parâmetros	Amostras	
	MPv	MPf
Uniformidade	0,19	0,563
Área Específica de Superfície (m <sup>2</sup> /kg)	56,41	62,04
D [3;2] ( $\mu\text{m}$ )	106	96,7
D [4;3] ( $\mu\text{m}$ )	113	152
<b>D Med (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>109,5</b>	<b>124,35</b>
1 mg (Partículas/m <sup>3</sup> )	$3,7 \times 10^9 \pm 0,82$	$3,9 \times 10^9 \pm 0,78$

Fonte: Próprio autor.

Os resultados métricos obtidos por meio da análise com o equipamento Mastersizer 3000, mostraram a uniformidade, que é uma medida do desvio absoluto da mediana, a área superficial específica, que é a área total das partículas dividida pela massa da amostra, e os parâmetros D[3;2] e D[4;3], que são a média ponderada do volume e da superfície das partículas, respectivamente.

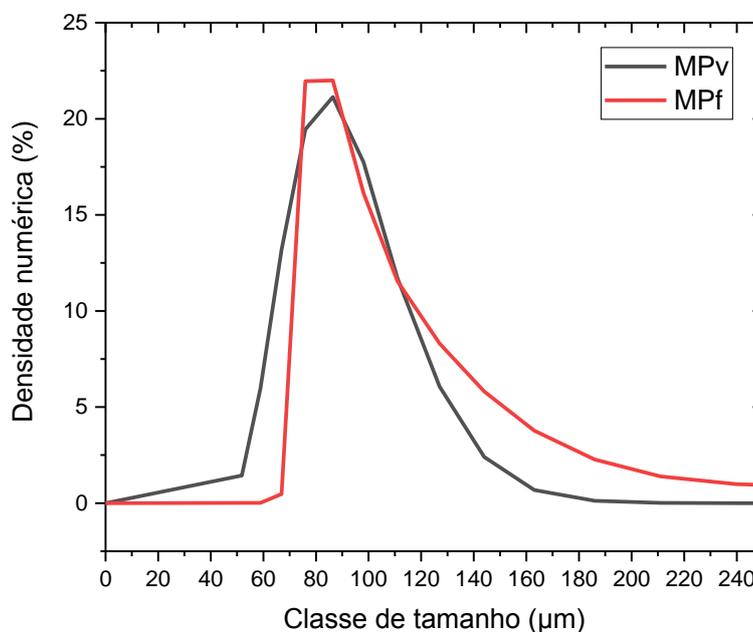
A análise de uniformidade das partículas realizada medindo o desvio absoluto da mediana é uma medida de como as partículas varia em tamanho em relação à mediana da distribuição.

Quanto menor o valor de uniformidade, mais homogênea é a distribuição de tamanho de partículas. O equipamento utiliza a técnica de difração a laser para

medir o tamanho de partículas em uma amostra, e a análise de uniformidade é um dos parâmetros que pode ser obtido a partir dos resultados da análise.

O D Med ( $\mu\text{m}$ ), é a média ponderada da superfície e do volume das partículas, baseados na interação de D[3;2] e D[4;3] e indica o tamanho médio das partículas em termos de volume e de área superficial. Esses parâmetros são importantes para caracterizar a distribuição de tamanho de partículas em uma amostra e podem ser utilizados para comparar diferentes amostras ou para monitorar mudanças na distribuição de tamanho ao longo do tempo conforme Figura 10.

**Figura 10 - Gráfico de distribuição de tamanho dos MPs.**



Fonte: Próprio autor.

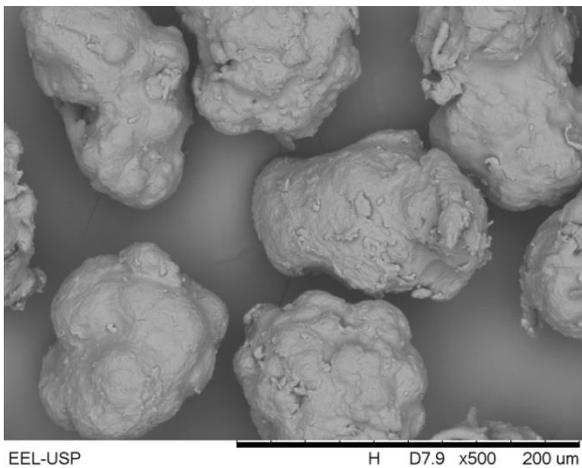
Para Koelmans *et al.* (2019), a concentração de MPs em  $2,7 \times 10^8$  partículas/ $\text{m}^3$  apresenta um cenário crítico de contaminação plástica.

De acordo com literatura a compreensão do volume correlacionado a contagem em número de itens em particulados considerando o tamanho destes e seus resultados métricos, são cruciais no processo de caracterização e especificação da contaminação dos ambientes naturais por MPs bem como seus potenciais impactos diretos sobre estes (CHEN *et al.*, 2022; FERRAZ *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2018; WANG, 2019; YAN *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2014).

## 5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

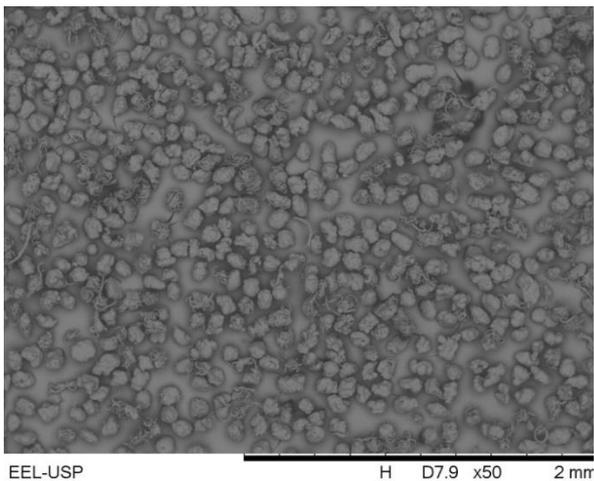
As Figuras 11 a 14 apresentam as imagens da microscopia eletrônica de varredura realizadas sobre as partículas de microplásticos virgem (MPv) e fragmentadas (MPf), onde as Figura 11 e 12 apresentam o MPv aumentado em 500x e 50x, respectivamente, as Figura 13 e 14 apresentam o MPf aumentado em 250x e 50x.

**Figura 11 - Microscopia Eletrônica de Varredura microplástico virgem aumentado 500x.**



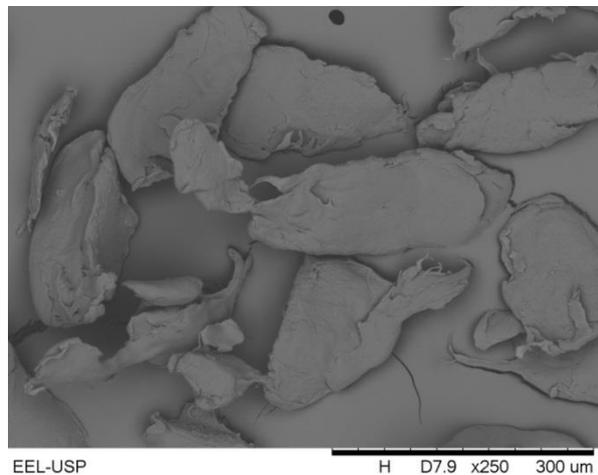
Fonte: Próprio autor.

**Figura 12 - Microscopia Eletrônica de Varredura microplástico virgem aumentado 50x.**



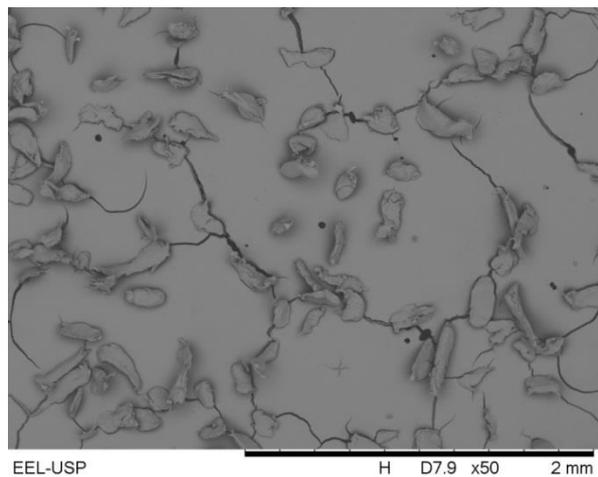
Fonte: Próprio autor.

**Figura 13 - Microscopia Eletrônica de Varredura microplástico Fragmentado aumentado 250x.**



Fonte: Próprio autor.

**Figura 14 - Microscopia Eletrônica de Varredura microplástico Fragmentado aumentado 50x.**



Fonte: Próprio autor.

A análise por MEV revelou notáveis diferenças entre as partículas de microplásticos MPf e as partículas MPv. A superfície das partículas MPf se apresentou extremamente irregular, caracterizada por uma topografia rugosa, muitas fendas, rachaduras e áreas quebradas. Por outro lado, as partículas MPv apresentaram uma superfície uniforme e lisa, sem apresentar uma topografia com fendas, rachaduras ou áreas quebradas. Essas diferenças de superfícies além de estarem relacionadas a processos de degradação e/ou exposição a condições adversas, que afetaram a integridade das partículas MPf, também são associadas sua perda de resiliência à impactos em baixas temperaturas.

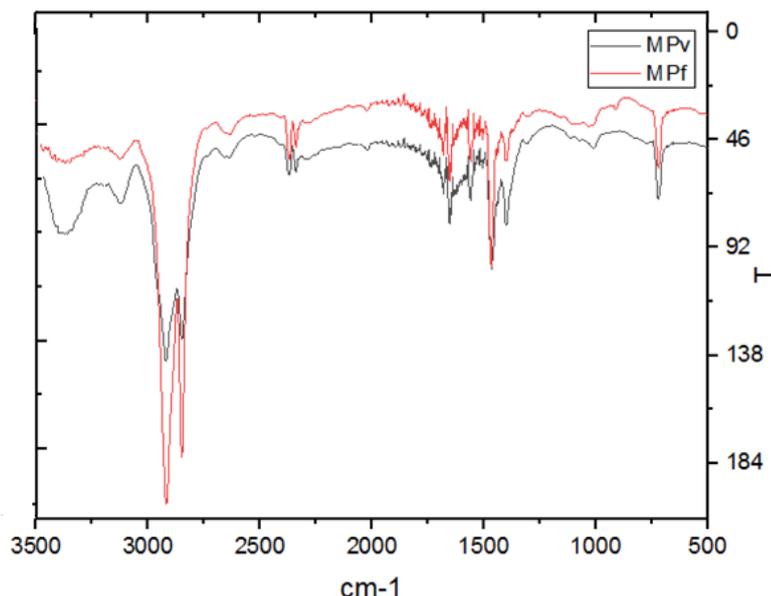
Huang, Hu e Wang (2023), descrevem as análises de microscopia eletrônica de varredura como um dos métodos mais relevantes e importantes para a análise de superfície da morfologia de MPs devido a precisão e nitidez ótica apresentadas nas resoluções das ampliações amostrais.

Além disso, a utilização de microscopias para análises comparativas também permite a observação de eventuais alterações na superfície das partículas de MPs expostas a diferentes condições ambientais ou químicas, o que pode fornecer informações importantes sobre os processos de degradação e os possíveis efeitos no meio ambiente e na saúde humana (BURNS; BOXALL, 2018).

### **5.3 Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

A técnica de espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para identificar os compostos presentes nos MPv e MPf, produzidos a partir do material LDPE. Os resultados da análise FTIR são apresentados em um gráfico que mostra a intensidade da absorção de energia em função do número de onda (frequência) da radiação infravermelha utilizada. Cada tipo de molécula possui uma assinatura única que pode ser identificada com base nos picos de absorção correspondentes em determinadas frequências. A identificação das bandas típicas presentes no LDPE foi possível por meio da análise das assinaturas espectrais de absorção de energia infravermelha apresentadas pelos MPs conforme Figura 15.

**Figura 15 - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-ATR) do MPv e MPf.**



Fonte: Próprio autor.

O espectro FTIR de polietileno de baixa densidade (LDPE) é caracterizado por várias bandas típicas de absorção, que são atribuídas a diferentes vibrações moleculares, incluindo vibrações de estiramento C-H, vibrações de deformação C-H e vibrações de estiramento C-C. Os picos de absorção são identificados por sua posição no espectro, medida em número de onda, e pela intensidade relativa (HOSSEINI; JAFARI, 2020).

A Figura 15 apresentou as características espectrais observadas nos compostos de polietileno citados por Gulmine *et al.* (2002), Da Silva; Wiebeck, (2017) e Hahn *et al.* (2019), em que o espectro de análise da amostra virgem e fragmentada exibiram bandas nas regiões de 2918 e 2848, 1467 e 1404, 723 e 718  $\text{cm}^{-1}$ .

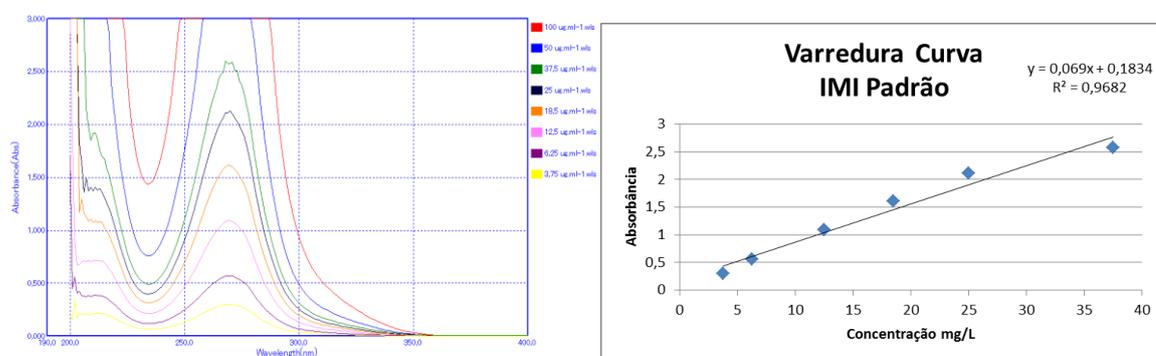
Conforme os autores, para os compostos de polietileno linear de baixa densidade são encontrados as bandas típicas para uma amostra, nos quais se verificam bandas fortes de transmitâncias na faixa entre 2916 e 2850  $\text{cm}^{-1}$ , representando estiramentos de  $\text{CH}_2$ , alongamento assimétrico e alongamento simétrico na estrutura química do LDPE  $(\text{C}_2\text{H}_4)_n$ . o sinal forte em 1463  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídos e representam a ligação simples flexão de CH, e os dobramentos tesouras respectivamente. As bandas em 718  $\text{cm}^{-1}$  representaram o padrão de vibração de balanço do grupo  $\text{CH}_2$ .

## 5.4 Análise de Adsorção

### 5.4.1 Varredura dos compostos

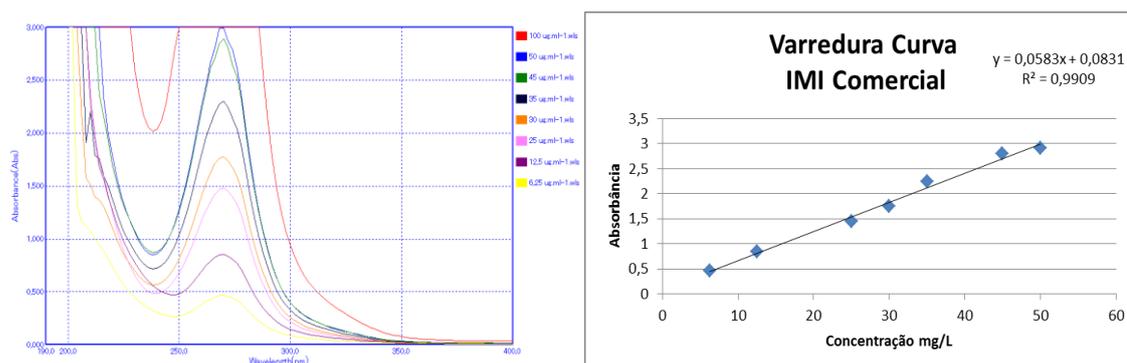
O comprimento de onda máximo de absorção para os compostos foi de 270 nm (IMIc), 269 a 270 nm (IMIp) conforme Figura 16 e Figura 17. Apresentaram uma boa relação linear entre absorção de UV e concentração de pesticidas. Os compostos foram analisados na faixa de 10-100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e o coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) foi de 0,99 e 0,96 para os compostos, comercial e padrão respectivamente.

Figura 16 - Varredura de concentração do IMIp.



Fonte: Próprio autor.

Figura 17 - Varredura de concentração do IMIc.



Fonte: Próprio autor.

O composto comercial apresentou uma diferença média de 26% de diferença de concentração em relação ao padrão. O que corresponde ao padrão analítico 70:30 do composto comercial em relação ao gral 99,9% (em HPLC conforme fabricante) do composto Padrão. O comprimento de onda característico e a equação da curva padrão de pesticidas são mostrados na Tabela 2

Tabela 2- Varredura de compostos IMIc e IMIp em Espectrofotômetro.

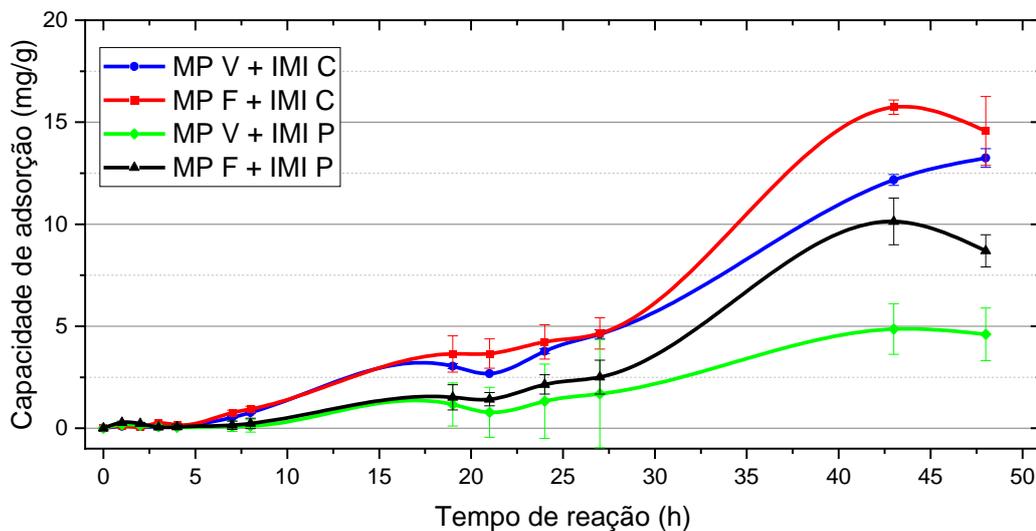
Varredura Compostos					
IMI	Concentração ug.m <sup>-1</sup> l	λ Pico	λ Vale	ABS nm	Reg. Linear
Padrão	3,75	269	367	0,301	y = 0,069x + 0,1834 R <sup>2</sup> = 0,9682
	6,25	269	234	0,567	
	12,5	270	234	1,085	
	18,5	269	234	1,605	
	25	270	234	2,111	
	37,5	270	234	2,574	
	50	extrap.	234	-	
	100	extrap.	234	-	
Comercial	6,25	270	248	0,459	y = 0,0583x + 0,0831 R <sup>2</sup> = 0,9909
	12,5	270	248	0,84	
	25	270	240	1,454	
	30	270	238	1,745	
	35	270	238	2,249	
	45	270	238	2,802	
	50	270	238	2,912	
	100	extrap.	238	-	

Fonte: Próprio autor.

#### 5.4.2 Efeitos do tempo de reação para compostos combinados

A Figura 18 demonstra a capacidade de adsorção dos pesticidas Padrão e Comercial na concentração de 5mg. L<sup>-1</sup> MPv e MPf na concentração de 50 mg.L<sup>-1</sup> com a extensão e aumento do tempo de reação até 48 horas. A adsorção dos compostos se mostrou similar nas primeiras 5 horas sem distinção de comportamentos significativos, seguida de aumento em 19-27 h. Observou-se o equilíbrio de comportamento das misturas alcançado em 28-42 h e, em seguida a taxa de adsorção diminuiu em cerca de 44-48 h.

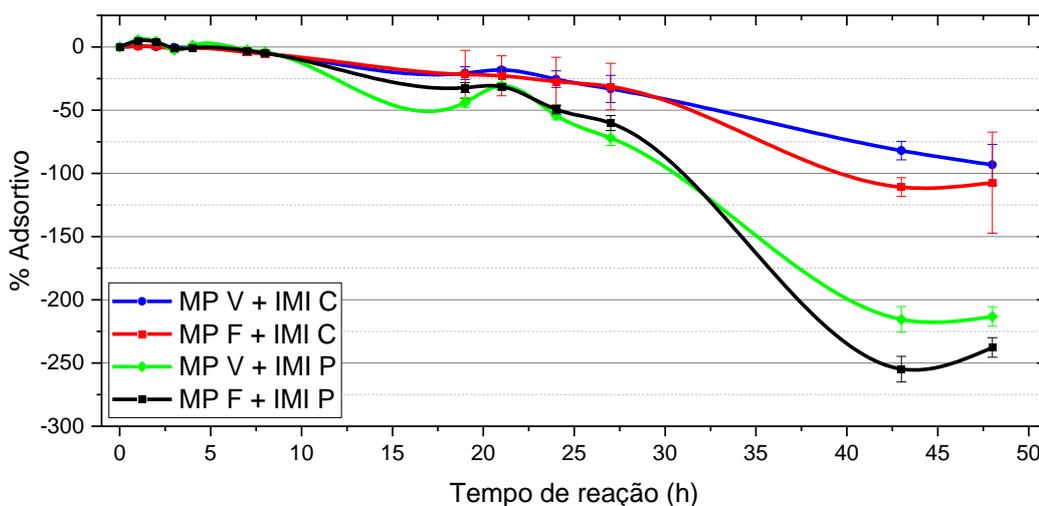
**Figura 18 - Capacidade de adsorção ao longo do tempo de tratamento para os compostos em mistura, relação de concentração massa e volume.**



Fonte: Próprio autor.

Conforme mostrado na Figura 19 abaixo, o modelo de capacidade e taxa de adsorção foi mais adequado para descrever o processo de comportamento de adsorção dos dois pesticidas em MPs de PE virgem e fragmentados. Isso indica que a adsorção física em vez de quimissorção foi a principal força para a adsorção de pesticidas em MPs (LI *et al.*, 2017).

**Figura 19 – Percentual (%) adsorvido dos tratamentos em misturas relação de sorção de composto do meio no microplástico, relação concentração inicial por concentração no tempo.**



Fonte: Próprio autor.

Na Figura 19 a relação demonstrou um comportamento inversamente proporcional entre a capacidade de adsorção versus o percentual adsorvido de

remoção, devido à característica de apolaridade e dissolução dos compostos. A dosagem de sorção dos MPs em relação aos sítios de interação dos adsorventes com os compostos podem ser observados ocupados pelos pesticidas disponíveis em solução aquosa. Conforme avaliado na MEV a superfície dos MPs fragmentados apresentam irregularidade e reentrâncias, o que segundo Wang *et al.* (2020), facilita a sorção de pesticidas conforme se destacou tanto para o composto padrão quanto comercial.

A Tabela 3 mostra os parâmetros relacionados para avaliação da cinética de interação dos compostos de pesticidas em MPs PE. A adsorção pelo modelo de pseudo-primeira ordem utilizada foi a mais adequada para verificar e descrever o processo de cinética de adsorção (LI *et al.*, 2021).

**Tabela 3 - Modelo cinético de adsorção e parâmetros relacionados.**

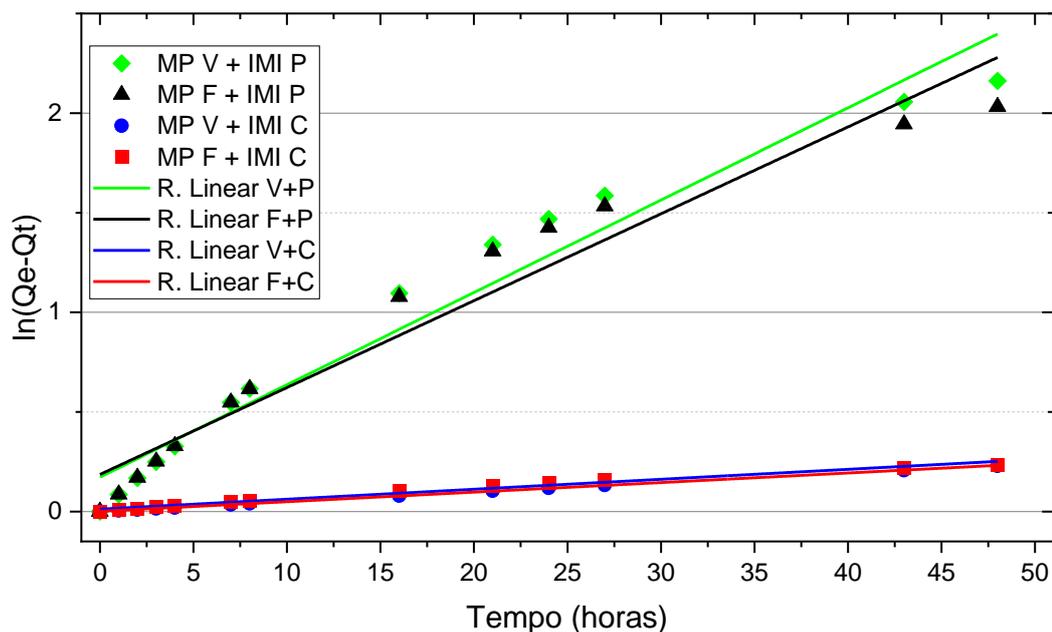
Cinética de Pseudo-primeira ordem			
Composições	$Q_e$	$k_1$	$R^2$
MP V + IMI P	2,779	0,031	0,9613
MP F + IMI P	2,480	0,036	0,9514
MP V + IMI C	1,953	0,003	0,9997
MP F + IMI C	0,376	0,020	0,9826

$Q_e$ =Equilíbrio de adsorção,  $k_1$ =Constante de taxa cinética de pseudo-primeira e  $R^2$ =Regressão linear

Fonte: Próprio autor.

A Figura 20 apresenta a dinâmica de apresentação da cinética de pseudo-primeira ordem dos compostos ao longo do experimento. Demonstrando a tendência comportamental de resposta dos compostos nas concentrações testadas para o ambiente em água de cultivo para *D. similis*, em concentrações referentes à literatura, onde o composto padrão apresentou maior afinidade no sítio ativo de adsorvidade que o composto comercial, tanto no MPv quanto no MPf, demonstrando assim diferenças substanciais no comportamento destes.

Figura 20 - Cinética de Pseudo-primeira ordem.



Fonte: Próprio autor.

## 5.5 Testes toxicológicos

As concentrações de CEO, CENO,  $CE_{50}$  em cada tratamento estão expressas na Tabela 4, compreendem os parâmetros toxicológicos agudos e crônicos. Para os compostos IMIc, IMIp, MPv e MPf. Os testes foram conduzidos no mesmo período de tempo e a concentração do solvente utilizado para a solução de IMIp foi de  $0,1 \text{ mL.L}^{-1}$ , limite determinado pela OECD (2012).

Tabela 4 - Parâmetros toxicológicos dos testes com *Daphnia similis*.

Composto	<i>Daphnia similis</i>			mg.L <sup>-1</sup> IC de 95%
	CEO	CENO	CI/CL/CE 50	
IMIc	7,52	5,02	39,419	mg.L <sup>-1</sup>
	(0,85; 1,14)	(0,52; 0,81)	(30,37; 48,47)	IC de 95%
IMIp	0,136	0,068	1,596	mg.L <sup>-1</sup>
	(0,81; 1,11)	(0,56; 0,86)	(1,36; 1,82)	IC de 95%
MPv	18,57	9,29	292,50	mg.L <sup>-1</sup>
	(0,32; 0,67)	(0,39; 0,74)	(254,1; 330,9)	IC de 95%
MPf	10,6	5,3	136,21	mg.L <sup>-1</sup>
	(0,18; 0,61)	(0,05; 0,47)	(98,7; 173,7)	IC de 95%

Fonte: Próprio autor.

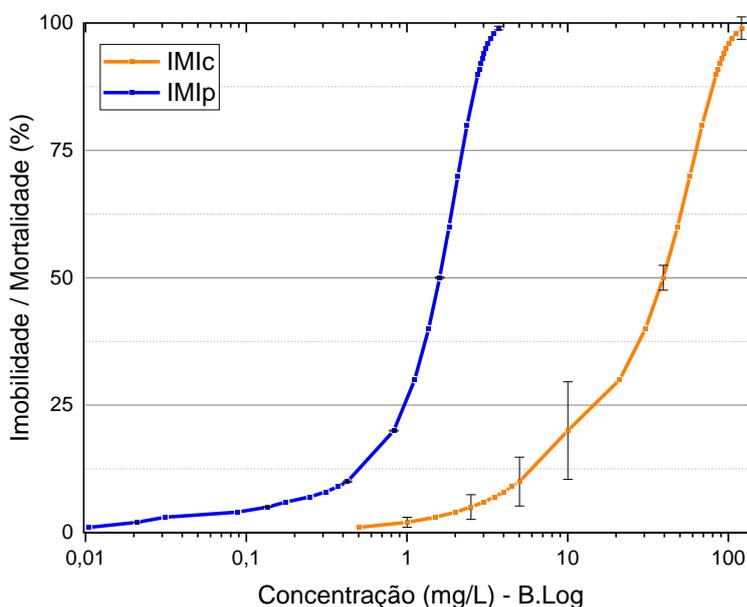
## 5.5.1 Teste Agudo

### 5.5.1.1 Imidacloprido (IMI)

A análise de Probit das concentrações utilizadas nos testes laboratoriais de IMIc e IMIp, permitiu determinar a concentração que causa efeito tóxico agudo em 50% dos organismos testados ( $CE_{50-48h}$ ), resultando em  $39,24 \pm 4,95 \text{ mg.L}^{-1}$  para IMIc e  $1,596 \pm 0,14 \text{ mg.L}^{-1}$  para IMIp, conforme ilustrado na Figura 21 que apresenta as curvas de dose-resposta das análises de toxicidade aguda em *Daphnia similis*.

A partir dos resultados das concentrações utilizadas nos experimentos, foi possível verificar uma diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Fisher ( $p < 0,05$ ) e a avaliação toxicológica pela análise de Probit ( $p < 0,05$ ).

**Figura 21 - Curva dose-resposta da análise de toxicidade aguda dos Compostos IMIc e IMIp em *Daphnia similis***



Fonte: Próprio autor.

As concentrações utilizadas nos testes pré-análise de Probit foram submetidas ao teste de médias por Fisher, que indicou efeito tóxico agudo em concentrações a partir de  $3,125$  a  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  para IMIc e de  $0,156$  a  $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$  para IMIp, após 48 horas de exposição aos compostos. Os resultados e concentrações utilizadas nos testes foram agrupados usando o método LSD de

Fisher com confiança de 95%, e as informações são apresentadas na Tabela 5. É possível observar a significância das médias experimentais, bem como suas correlações e diferenças estatisticamente agrupadas após 48 horas de exposição aos compostos.

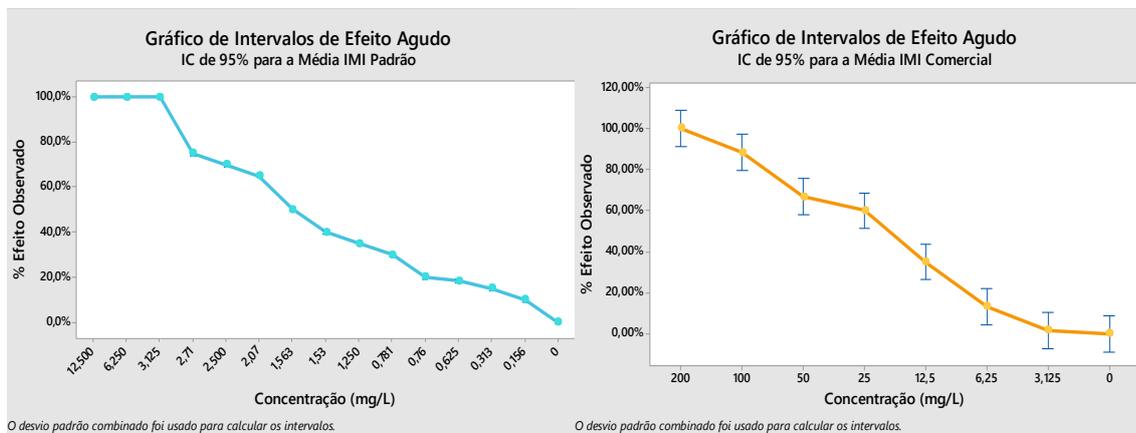
**Tabela 5 - Informações de agrupamento para IMIc e IMIp usando o método LSD de Fisher.**

Pesticidas							
IMIc				IMIp			
Fator	N	Média	Agrupamento	Fator	N	Média	Agrupamento
200	3	100%	A	12,5	3	100%	A
				6,25	3	100%	A
100	3	88%	A	3,125	3	100%	A
				2,71	3	75%	B
50	3	67%	B	2,5	3	70%	C
				2,07	3	65%	D
25	3	60%	B	1,563	3	50%	E
				1,53	3	40%	F
12,5	3	35%	C	1,25	3	35%	G
				0,781	3	30%	H
6,25	3	13%	D	0,76	3	20%	I
				0,625	3	18%	J
3,125	3	2%	D, E	0,313	3	15%	K
				0,156	3	10%	L
0	3	0%	E	0	3	0%	M

Fonte: Próprio autor.

A Figura 22 apresenta as curvas de efeito dos pesticidas IMIc e IMIp, obtidas pelo teste agudo com os neonatos de *D. similis*. Verificou-se um aumento da porcentagem de morte com o aumento da concentração de exposição para ambos os compostos. Para IMIc, foi observado um percentual mínimo de 1,7% a 100% de morte das concentrações utilizadas, com diferenças significativas em relação ao controle pelo teste de Fisher ( $p < 0,05$ ) e IC de 95% de Confiança dentre médias. Já para IMIp, o percentual mínimo foi de 10% a 100% de morte dos organismos, também com diferenças significativas em relação ao controle pelo teste de Fisher ( $p < 0,05$ ) e IC de 95% de Confiança dentre médias.

**Figura 22 - Curva dose-resposta da análise de toxicidade aguda de concentrações testadas em experimento de IMIc e IMIp em *Daphnia similis*.**



Fonte: Próprio autor.

O estudo de Queiroz *et al.* (2019) determinou uma concentração de efeito em 50% da população por 48 horas (CE50-48h) de 29,44 mg.L<sup>-1</sup> para o composto de IMI comercial, Galeão®. Além da mortalidade e imobilidade, também foram observadas alterações no comportamento de *D. similis*.

Alguns outros estudos verificaram a toxicidade de compostos comerciais em dafinídeos de mesmos grupo familiar, porém diferentes espécies, TIŠLER *et al.* (2009) com o composto Confidor® (IMI 20%) em *Daphnia magna* verificaram uma CE50-48h em 56,6 mg.L<sup>-1</sup> e Hayasaka *et al.* (2012), com o Admire® (IMI 20%) em *Daphnia magna* e em *Daphnia pulex*, verificaram uma CE50-48h de 43,27 mg.L<sup>-1</sup> e de 36,87 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

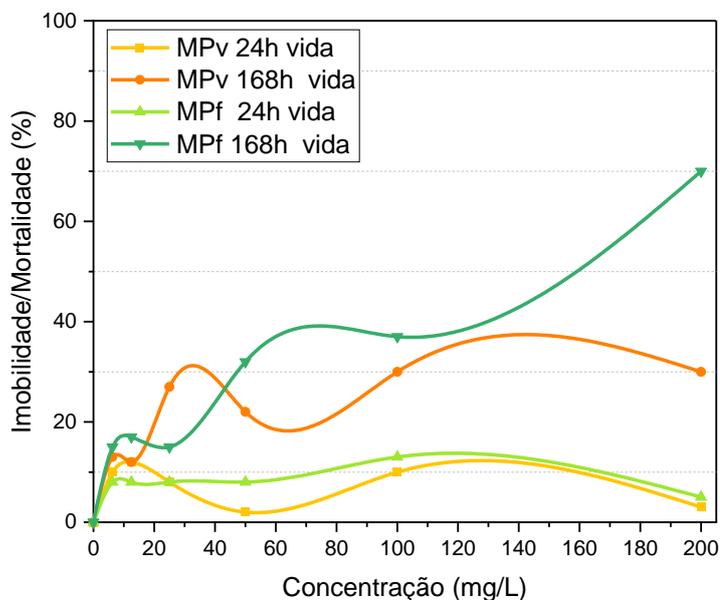
Estudos demonstraram a toxicidade do IMI (>99,5% de pureza) da Bayer CropScience KK em *Daphnia magna* foi relativamente baixa, com EC50 de 65 mg.L<sup>-1</sup> em 48 h de exposição sob um ciclo claro/escuro (QI *et al.*, 2018). Chevalier *et al.* (2015), verificaram em *Daphnia magna* o composto IMI (99% de pureza) com EC50exp(48h) de 93,88 mg.L<sup>-1</sup> e de 56,6 mg.L<sup>-1</sup>.

### 5.5.1.2 Microplásticos (MPs)

Wang *et al.* (2019) revisaram os efeitos ecotoxicológicos dos MPs na cadeia alimentar aquática, destacando a influência direta do diâmetro e conformação das partículas sobre os organismos e seu potencial ecotoxicológico, em função de seu tamanho e porte. Na Figura 23, são apresentados resultados

preliminares da análise de toxicidade aguda em organismos *D. similis* após 48 horas de exposição à MPs de diferentes tamanhos em organismos de diferentes idades (24 e 168 horas de vida).

**Figura 23 - Análise preliminar de exposição de toxicidade aguda de 48 horas de exposição à MPv e MPf em organismos *D. similis* de diferentes idades.**



Fonte: Próprio autor.

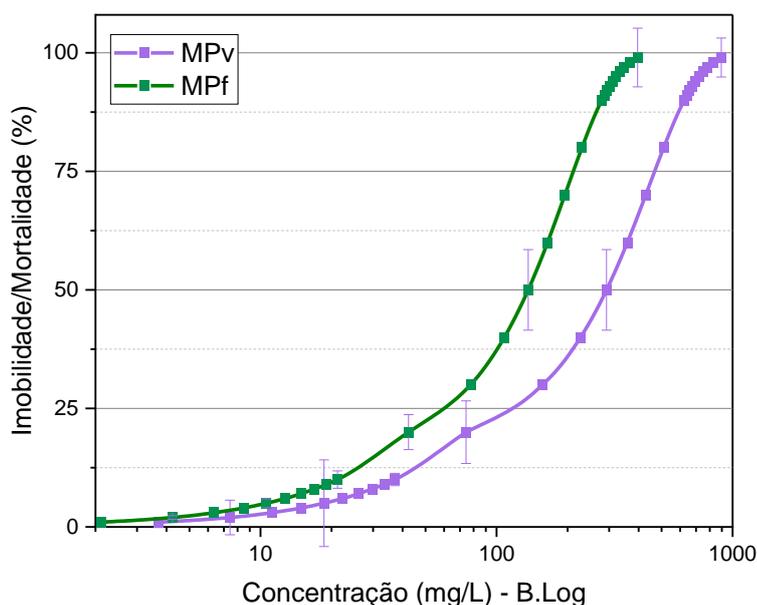
A partir dos resultados obtidos pela análise preliminar com diferentes concentrações de MPs em diferentes estágios de vida, foi possível verificar a determinação da concentração que causa efeito tóxico agudo nos organismos com 168 horas de vida (uma semana de cultivo). As concentrações utilizadas nos testes em organismos *D. similis*, com 06 a 24 horas de vida foram avaliadas por análise de Probit e se mostraram estatisticamente irreprodutíveis. Isso significa que os resultados obtidos nessas concentrações não foram consistentes e, portanto, não puderam ser reproduzidos.

#### 5.5.1.2.1 Microplástico organismo 168h

A concentração que causou efeito tóxico agudo em 50% dos organismos *Daphnia similis* testados (CE50-48h) de MPv foi de  $292,5 \pm 38,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , equivalente a  $1,08 \times 10^9$  partículas/m<sup>3</sup> e MPf,  $136,2 \pm 18,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , equivalente a  $5,3 \times 10^8$  partículas/m<sup>3</sup>. A curva de dose-resposta com diferença significativa em

relação ao controle pode ser observada na Figura 24, obtida através da extrapolação dos resultados obtidos nas concentrações utilizadas nos experimentos. Além disso, a Figura 24 apresenta a curva de dose-resposta pela análise de Probit, demonstrando diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Fisher ( $p < 0,05$ ) e permitindo a avaliação toxicológica dos resultados.

**Figura 24 - Curva dose-resposta da análise de toxicidade aguda de MPv e MPf em *Daphnia similis*.**



Fonte: Próprio autor.

A Tabela 6 apresenta os resultados do teste de exposição aos MPv e MPf em organismos de uma semana de vida, com concentrações variando de 6,25 a 200 mg.L<sup>-1</sup>. O método LSD de Fisher com confiança de 95% foi utilizado para agrupar os dados. Após 48 horas de exposição, foi observada a significância das médias experimentais e suas diferenças estatisticamente agrupadas.

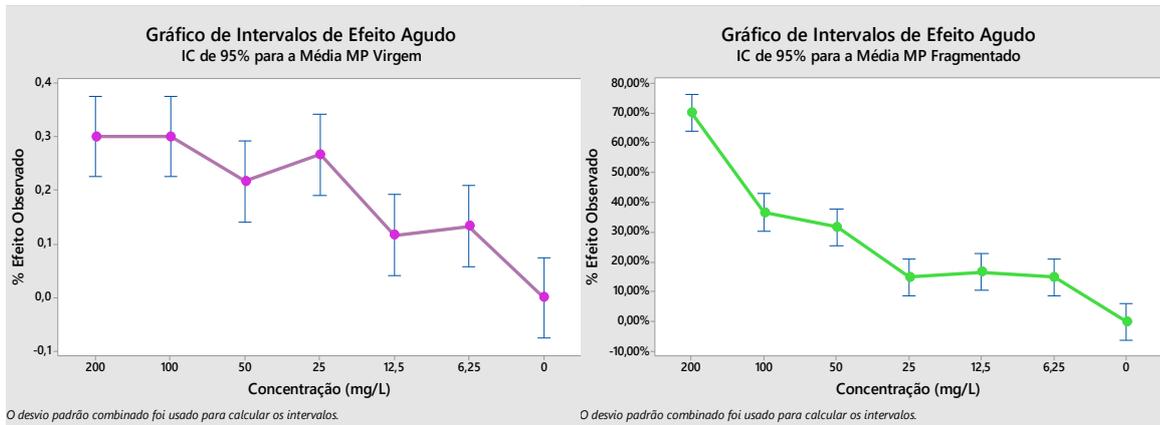
**Tabela 6 - Informações de agrupamento para MPv e MPf usando o método LSD de Fisher.**

Microplásticos							
MPv				MPf			
Fator	N	Média	Agrupamento	Fator	N	Média	Agrupamento
200	3	30%	A	200	3	70%	A
100	3	30%	A	100	3	37%	B
50	3	22%	A, B	50	3	32%	B
25	3	27%	A	25	3	15%	B, C
12,5	3	12%	B	12,5	3	17%	C
6,25	3	13%	B	6,25	3	15%	C
0	3	0%	B, C	0	3	0%	D

Fonte: Próprio autor.

Na Figura 25, estão apresentadas as concentrações de MPv e MPf utilizadas no teste agudo, com diferenças significativas em relação ao controle pelo teste de Fisher ( $p < 0,05$ ) e IC de 95% de confiança dentre médias. A curva de efeito do MPv demonstra um crescimento na porcentagem de mortalidade com o aumento da concentração de exposição, com um percentual mínimo de morte de 13% a 30% dos organismos. Já a curva de efeito do MPf apresenta uma tendência de percentual mínimo de morte de 15% a 70% dos organismos. As concentrações de exposição testadas foram delimitadas devido à irreprodutibilidade ambiental que se apresentaria em número de partículas no ambiente natural para causar 100% de morte em *Daphnia similis*. No entanto, para verificar o efeito de 100% de morte populacional, as concentrações de exposição estariam em irreprodutibilidade ambiental e não se apresentariam em número de partículas no ambiente natural.

**Figura 25 - Curva dose-resposta da análise de toxicidade aguda de concentrações testadas em experimento de MPv e MPf em *Daphnia similis*.**



Fonte: Próprio autor.

Zebrowski *et al.* (2022), no seu estudo exploram o efeito dos MPs na competição interespecífica de *Daphnia*. Mais especificamente, o estudo se concentra na toxicidade aguda dos MPs e seus efeitos sobre a mortalidade e o crescimento da espécie. Os resultados mostram que a exposição a altas concentrações de MPs pode aumentar significativamente a mortalidade e reduzir a taxa de crescimento das *Daphnia*, sugerindo um potencial impacto negativo desses materiais no ecossistema aquático.

Rehse, Kloas e Zarfl (2016), investigaram se os MPs de PE poderiam ser ingeridos e se a presença destes causaria efeitos adversos após exposição de curto prazo em dafinídeos. As partículas de PE estudadas estavam na faixa de 1  $\mu\text{m}$  e 100  $\mu\text{m}$  em concentrações entre 12,5 e 400  $\text{mg.L}^{-1}$ , onde a ingestão de partículas de 1  $\mu\text{m}$  levou a um CE50 de 57,43  $\text{mg.L}^{-1}$  após 96 h. Para partículas de 100  $\mu\text{m}$  que não podiam ser ingeridas pelos dafinídeos de até 24h de vida, estas não tiveram efeitos observados.

Em espécies de dafinídeos menores, o processo de interação com o particulado disperso no meio, em geral são aderidos e unidos pela tensão superficial do organismo junto ao particulado, Kiørboe *et al.* (2010), descreveram como a tensão superficial e a viscosidade da água podem afetar a interação de microcrustáceos copepods com partículas suspensas, e como as condições de

fluxo de água influenciam a eficiência de alimentação desses invertebrados aquáticos.

## 5.5.2 Teste Crônico

Os testes crônicos aplicados sobre os organismos se deram utilizando as concentrações de efeito observado a partir das concentrações de efeito abaixo de 20% da população afetada obtida pelas análises de Probit, para os Compostos IMIc, IMIf, MPv e MPf. Foram utilizadas cinco concentrações mais o controle para observação das menores concentrações de efeitos observáveis bem como sua mortalidade, crescimento e reprodução, nos níveis vitais, orgânicos e populacionais.

### 5.5.2.1 Imidacloprido comercial

A seguir, são apresentados os resultados da avaliação do efeito crônico do IMIc em *Daphnia similis* após 336 horas de exposição. Os dados referentes à porcentagem de mortalidade e de reprodução estão dispostos na Tabela 7, contemplando concentrações variando de 1,25 a 10,03 mg.L<sup>-1</sup>. A análise de variância foi realizada por meio da ANOVA one-way, tendo sido considerada significância estatística quando o valor de p foi inferior a 0,05 obtido pelo teste exato de Fisher.

**Tabela 7 - Dados de % mortalidade e reprodução de *Daphnia similis* referentes às concentrações de IMIc avaliadas, obtidos ao final do ensaio de exposição crônica 336 horas (14 dias).**

Concentração efeito	Fator mg.L <sup>-1</sup>	N	Média	DesvPad	IC de 95%	Agrupamento	Total de Neonatos produzidos	Média de neonatos/adulto
CONTROLE	0	3	15%	5%	(0,004; 0,295)	A	87	4,35 ± 0,22
CE 2,5	1,25	3	58%	19%	(0,438; 0,729)	B	4	0,2 ± 0,01
CE 5	2,51	3	62%	16%	(0,471; 0,761)	B	6	0,3 ± 0,02
CE 10	5,02	3	67%	13%	(0,521; 0,811)	B	1	0,0
CE 15	7,52	3	100%	0%	(0,855; 1,145)	C	0	0
CE 20	10,03	3	100%	0%	(0,855; 1,145)	C	0	0

Fonte: Próprio autor.

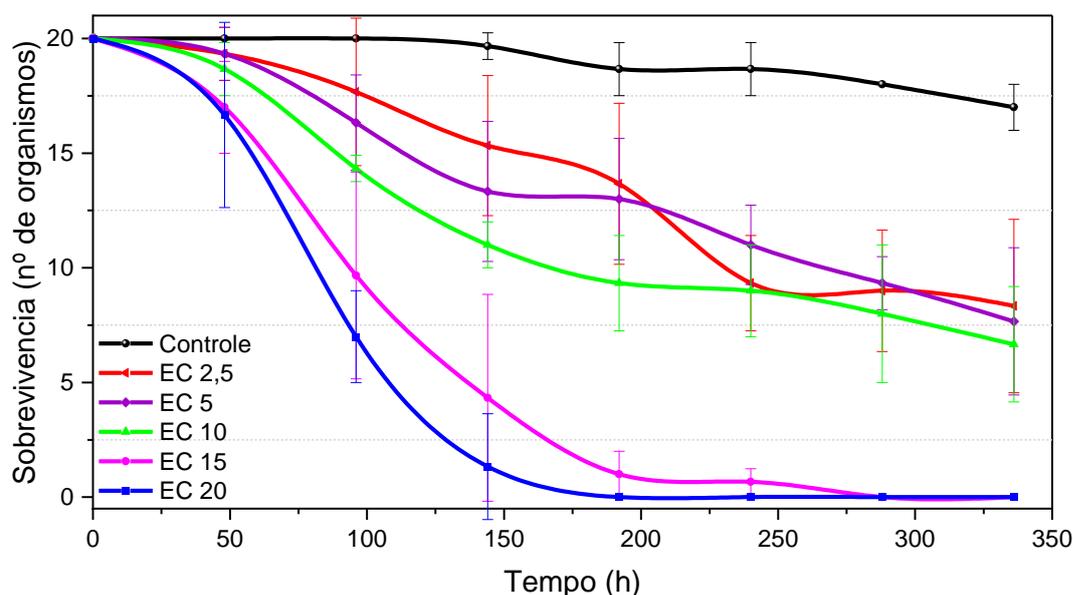
O composto promoveu alterações no ciclo reprodutivo das *Daphnias*, onde se observou uma redução significativa no processo de partenogênese dos

organismos expostos a concentrações acima de  $1,25 \text{ mg.L}^{-1}$ , que inibiram na taxa de reprodução e causaram morte precoce nas menores concentrações.

Ao final do experimento a média do controle de mortalidade foi de 15% com uma reprodução de  $4,3 \pm 0,22$  neonatos por adulto. Este valor foi considerado não tóxico e significativo por ser  $>20\%$  pela OCDE (N° 211).

Corroborando com os aspectos reprodutivos a Figura 26 apresenta a identificação e dinâmica de disposição da dose-resposta ao longo do tempo demonstrando o aumento do índice de toxicidade e dano acumulado, onde a partir de 48 horas de experimento foi possível verificar danos expressivos na sobrevivência dos organismos em todas as concentrações testadas. Em 192 horas as maiores concentrações, CE 15 e CE 20, atingem próximas a 100% de mortalidade e o grupo controle inicia o processo de partenogênese.

**Figura 26 - Diagrama de resposta e sobrevivência por concentração do teste crônico em *Daphnia similis* com exposição ao IMlc por 336 h.**



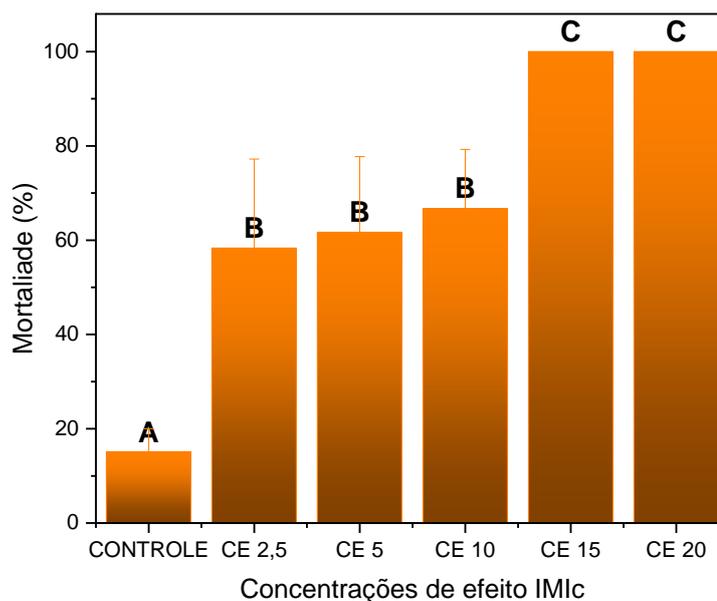
Fonte: Próprio autor.

O gradiente de sobrevivência demonstrou que mesmo a menor concentração utilizada ( $1,25 \text{ mg.L}^{-1}$ ) após 336 horas resultou em 58% das mortes seguido de 62% e 67% das concentrações  $2,51$  e  $5,02 \text{ mg.L}^{-1}$  (CE 5 e 10 respectivamente). Durante os testes crônicos, não houve a ocorrência de nenhum efípio.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar a toxicidade do IMlc em todos os tratamentos ao longo do tempo, conforme apresentado na

Figura 27 em comparação com o grupo controle. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA one-way e a significância estatística foi determinada pelo teste exato de Fisher, apresentando a média  $\pm$  desvio padrão ( $p < 0,05$ ). As médias que não compartilham o mesmo agrupamento foram consideradas estatisticamente diferentes.

**Figura 27 - Avaliação média da toxicidade crônica de IMIc por 336 h.**



Fonte: Próprio autor.

Queiroz *et al.* (2019), estimaram concentrações de 5,0 e 10,0 mg.L<sup>-1</sup> de IMIc Galeão, aplicados em um teste crônico de neonatos de *D. similis*, que mostraram 100% de mortalidade nos tempos 216 e 288 horas.

### 5.5.2.2 Imidacloprido padrão

Os dados de sobrevivência foram convertidos em porcentagem (%) de mortalidade e reprodução de *Daphnia similis* referentes às concentrações de IMIc avaliadas, obtidos ao final do ensaio de exposição crônica 336 horas. Os resultados obtidos foram apresentados na Tabela 8, onde as análises foram submetidas à análise de variância por meio de ANOVA one-way e a significância estatística foi avaliada pelo teste exato de Fisher. Os valores apresentados na tabela são médias  $\pm$  desvio padrão ( $p < 0,05$ ).

Os ensaios foram realizados utilizando seis concentrações (0,000; 0,068; 0,136; 0,427; 0,640; 0,828 mg.L<sup>-1</sup>) equivalente às (CE controle, 2,5; 5, 10, 15 e 20

respectivamente) conforme resultados da análise de Probit das concentrações do teste agudo.

**Tabela 8 - Dados de sobrevivência e reprodução de *Daphnia similis* referentes às concentrações de IMIp avaliadas, obtidos ao final do ensaio de exposição crônica 336 horas (14 dias).**

Concentração efeito	Fator mg.L <sup>-1</sup>	N	Média	DesvPad	IC de 95%	Agrupamento	Total de Neonatos produzidos	Media de neonatos/adulto
CONTROLE	0	3	15%	0%	(0,001; 0,299)	A	97	4,85 ± 0,24
CE 2,5	0,068	3	72%	8%	(0,568; 0,866)	B	75	3,75 ± 0,19
CE 5	0,136	3	97%	6%	(0,817; 1,115)	C	9	0,47 ± 0,02
CE 10	0,427	3	100%	0%	(0,851; 1,149)	C	9	0,47 ± 0,02
CE 15	0,640	3	100%	0%	(0,851; 1,149)	C	0	0,00
CE 20	0,828	3	100%	0%	(0,851; 1,149)	C	0	0,00

Fonte: Próprio autor.

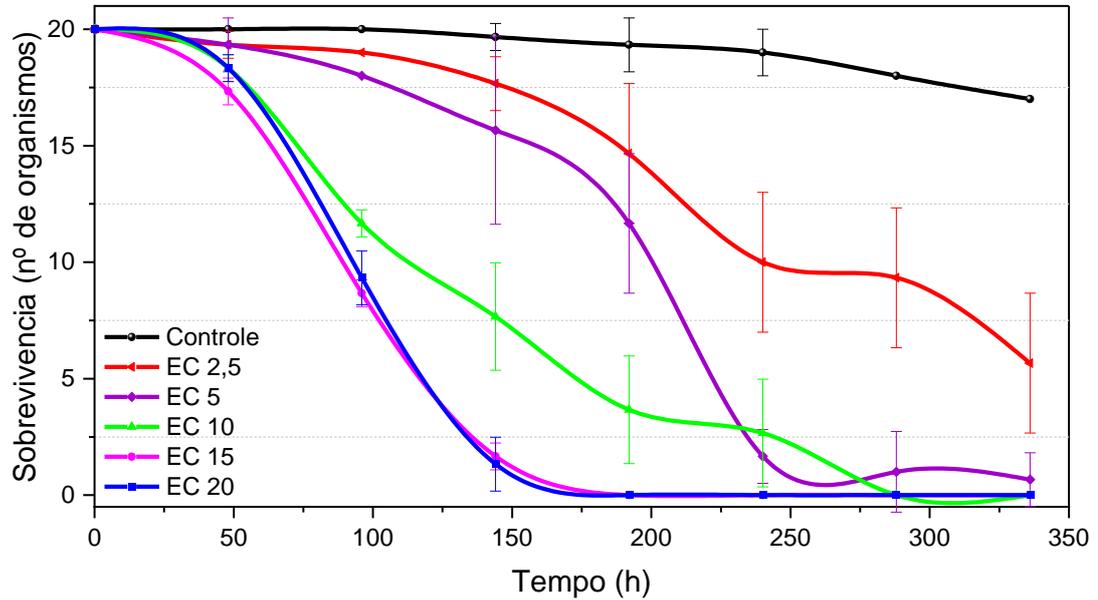
Finalizado às 336 horas de experimento foi possível verificar uma redução no processo de partenogênese onde a menor concentração (0,068 mg.L<sup>-1</sup>) obteve uma perda em torno de 22% em relação ao controle e as demais concentrações uma redução em torno de 90% para CE 5 e 10 (0,136 e 0,427 mg.L<sup>-1</sup>). Conforme Tabela 8.

Ao final do experimento a média de mortalidade do controle foi de 15% com uma reprodução de 4,85± 0,24 neonatos por adulto. Este valor foi considerado não tóxico por ser inferior a 20% pela OCDE (N° 211).

Verificado a dinâmica de dispersão da dose-resposta ao longo do tempo para as concentrações testadas, (Figura 28), se observa o aumento do índice de toxicidade e dano acumulado, com a curva de resposta e sobrevivência do teste crônico de IMI em *Daphnia similis* com exposição ao IMIp por 336 h.

A partir de hora 48 horas de experimento foi possível verificar danos expressivos na sobrevivência dos organismos em todas as concentrações testadas, exceto controle. Entre 144 e 192 horas as concentrações CE15 e CE 20, atingiram quase 100% de mortalidade e ocorreu uma redução significativa nas concentrações de CE 2,5 a CE10.

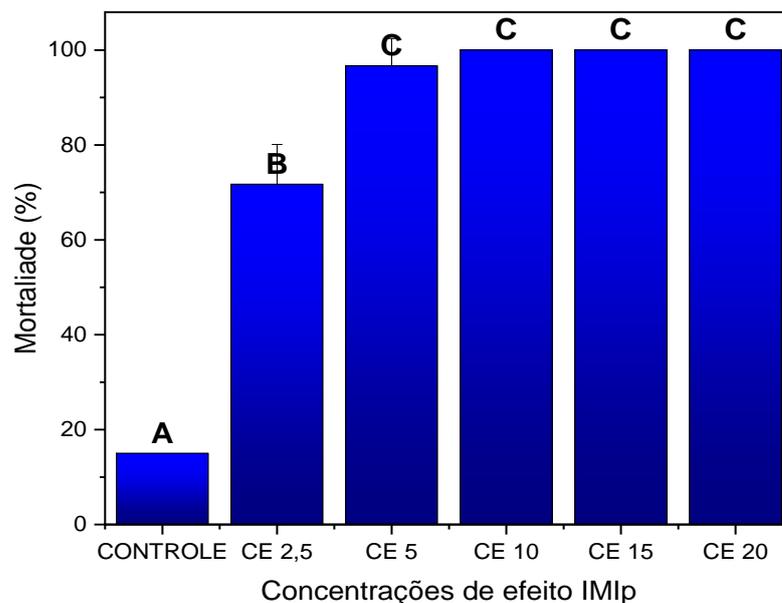
Figura 28- Curva de resposta e sobrevivência do teste crônico em *Daphnia similis* com exposição ao IMIp por 336 h.



Fonte: Próprio autor.

Durante a realização do teste crônico, não foi observada nenhuma ocorrência de efípio. O gráfico de distribuição da sobrevivência ao longo do tempo revelou que a concentração mais baixa testada ( $0,068 \text{ mg.L}^{-1}$ ) resultou em 72% de mortalidade após 336 horas, enquanto as demais concentrações causaram mortalidade entre 97% e 100%.

Figura 29 - Avaliação média da toxicidade crônica de IMIp por 336 h.



Fonte: Próprio autor.

Os resultados obtidos por meio da análise estatística utilizando ANOVA one-way e teste exato de Fisher, apresentaram média  $\pm$  desvio padrão ( $p < 0,05$ ), onde médias que não compartilharam o agrupamento são significativamente diferentes. Conforme observado nos testes, a análise estatística revelou a toxicidade média do IMI Padrão em todos os tratamentos submetidos ao longo do tempo, conforme demonstrado Figura 29 em relação ao grupo controle.

### 5.5.3 Microplástico virgem

Os resultados da avaliação crônica dos MPv são apresentados na Tabela 9, na qual estão listadas as concentrações testadas com base nos efeitos observados nas análises de Probit realizadas nos testes agudos. Os organismos foram expostos a concentrações que variaram de 9,29 a 74,29 mg.L<sup>-1</sup>, correspondentes a concentrações de partículas de  $3,43 \times 10^8$  a  $2,74 \times 10^9$  partículas/m<sup>3</sup>.

**Tabela 9 - Dados de sobrevivência e reprodução de *Daphnia similis* referentes às concentrações de MPv avaliadas, obtidos ao final do ensaio de exposição crônica 336 horas (14 dias).**

Concentração efeito	Fator	N	Média	DesvPad	IC de 95%	Agrupamento	Total de Neonatos produzidos	Media de neonatos/adulto
CONTROLE	0	3	15%	5%	(0,023; 0,323)	A	110	5,50 $\pm$ 0,27
CE 2,5	9,29	3	50%	3%	(0,326; 0,674)	A B	1	0,03 $\pm$ 0,01
CE 5	18,57	3	57%	8%	(0,393; 0,740)	B	1	0,03 $\pm$ 0,02
CE 10	37,15	3	65%	5%	(0,476; 0,823)	B	0	0,0
CE 15	55,72	3	53%	6%	(0,359; 0,706)	B	1	0,03 $\pm$ 0,01
CE 20	74,29	3	55%	9%	(0,376; 0,723)	B	1	0,03 $\pm$ 0,02

Fonte: Próprio autor.

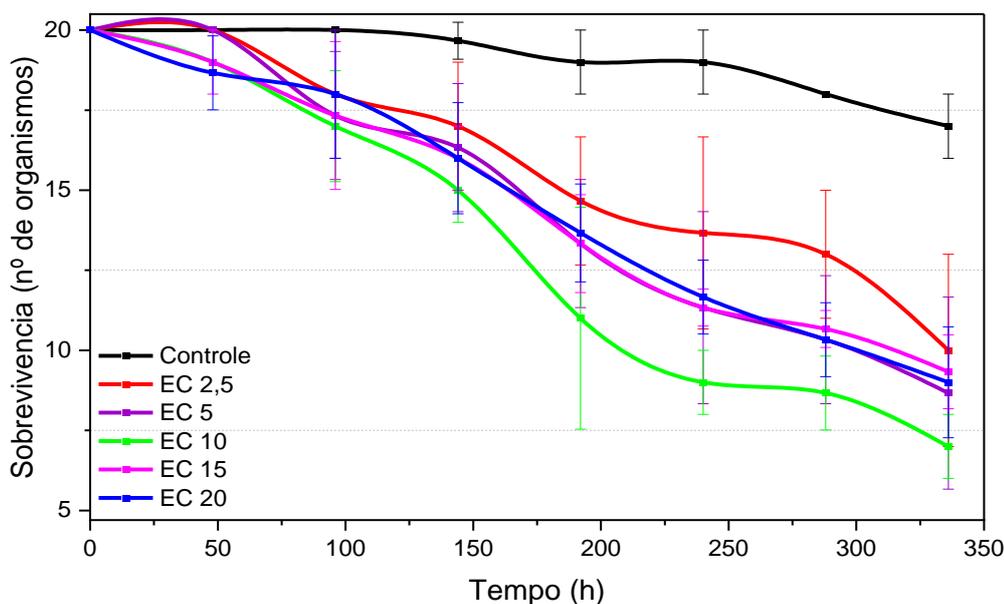
As *Daphnias* expostas a MPv, apresentaram alterações significativas no ciclo reprodutivo, com redução no processo de desenvolvimento e partenogênese em todas as concentrações testadas. Além disso, houve inibição na taxa de reprodução e mortalidade acima de 50% em todas as concentrações, sem ultrapassar 65% durante as 336 horas de exposição.

A inibição da capacidade de partenogênese se deu em relação à observação do grupo controle que ao final do experimento a média do controle de mortalidade foi de 15% com uma reprodução de  $5,5 \pm 0,27$ , neonatos por adulto.

Este valor foi considerado significativo em relação a OCDE (N° 211) por ser a mortalidade do grupo controle inferior a 20% da população.

O diagrama da curva de resposta e sobrevivência do teste crônico em *Daphnia similis* com exposição ao MPv por 336 horas, é mostrado na Figura 30, apresenta a distribuição das médias ao longo do experimento.

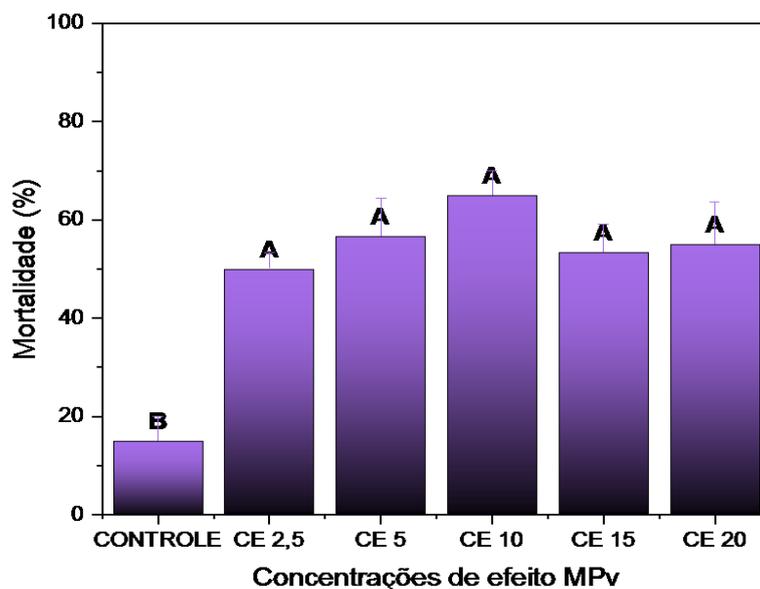
**Figura 30 - Curva de resposta e sobrevivência do teste crônico em *Daphnia similis* com exposição ao MPv por 336 h.**



Fonte: Próprio autor.

As concentrações apresentam comportamentos similares com poucos destaques de efeito ao longo do tempo de exposição, em que a mortalidade vem se dando de maneira gradual e linear. A CE 10 ( $37,15 \text{ mg.L}^{-1}$ ) apresentou 65% de mortalidade com um desvio padrão 5% em relação às médias da triplicata.

A menor concentração CE2,5, ( $9,29 \text{ mg.L}^{-1}$ ) ocasionou efeito em 50% da população testada no final das 336 horas com um desvio padrão de apenas 3%, se classificando como o menor efeito das concentrações testadas garantindo assim uma distribuição dentro da normalidade experimental.

**Figura 31 - Avaliação média da toxicidade crônica de MPv em *Daphnia similis* por 336 h.**

Fonte: Próprio autor.

Avaliação das médias amostrais da toxicidade crônica de MPv em *Daphnia similis* por 336 h estão comparadas na Figura 31. As médias que não compartilharam o agrupamento foram significativamente diferentes conforme diferença significativa entre as concentrações em relação ao controle.

### 5.5.3.1 Microplástico fragmentado

Os efeitos da verificação do potencial tóxico crônico dos MPf obtidos ao final do ensaio de exposição em 336 horas, são apresentados na Tabela 10, mostrando os dados de sobrevivência em percentual (%) de mortalidade e reprodução de *Daphnia similis* referentes às concentrações avaliadas, e os desvios padrões com IC de 95% sobre os agrupamentos.

**Tabela 10 - Dados de sobrevivência e reprodução de *Daphnia similis* referentes às concentrações de MPf avaliadas, obtidos ao final do ensaio de exposição crônica 336 horas (14 dias).**

Concentração efeito	Fator	N	Média	DesvPad	IC de 95%	Agrupamento	Total de Neonatos produzidos	Media de neonatos/adulto
CONTROLE	0	3	5%	5%	(0,161; 0,261)	A	109	5,5 ± 0,27
CE 2,5	5,3	3	27%	12%	(0,055; 0,477)	AB	25	1,3 ± 0,06
CE 5	10,6	3	40%	17%	(0,189; 0,611)	AB	20	1,0 ± 0,05
CE 10	21,19	3	50%	27%	(0,289; 0,711)	BC	19	1,0 ± 0,04
CE 15	31,79	3	43%	12%	(0,222; 0,644)	BC	15	0,8 ± 0,03
CE 20	42,38	3	70%	20%	(0,489; 0,911)	C	16	0,8 ± 0,04

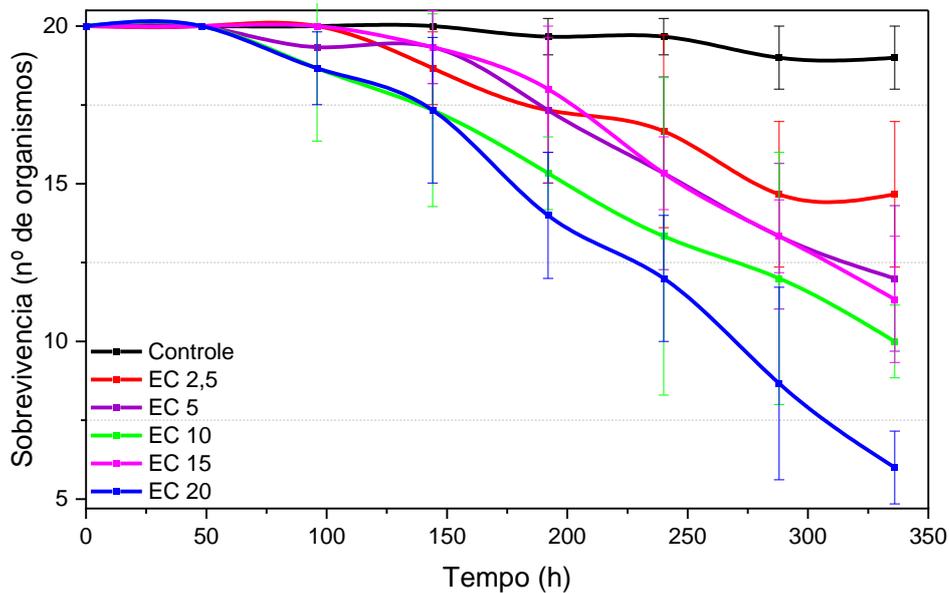
Fonte: Próprio autor.

As concentrações testadas no teste crônico a partir da análise de Probito determinada no teste agudo, com os MPf se deram no intervalo de concentrações abaixo da concentração de efeito em 20% da população representadas como CE 20, 15, 10, 5, 2.5 e controle, variando de 5,3 a 42,38 mg.L<sup>-1</sup> equivalendo em 2,1 x10<sup>8</sup> a 1,6 x10<sup>9</sup> partículas/m<sup>3</sup>.

O processo de partenogênese foi inibido em todas as concentrações observadas com uma inibição média de 82% no índice total de neonatos produzidos por concentração em relação ao controle. Desse modo, evidencia um grande impacto na população visto que o controle apresentou uma média de 5,5 ± 0,27 neonatos por adulto e apresentou um percentual (%) de mortalidade abaixo de 5% com um desvio padrão de 5% em relação à triplicata. Sendo assim, o valor foi considerado significativo em relação a OCDE (N° 211).

A Figura 32 apresenta o diagrama de distribuição e resposta e sobrevivência do teste crônico de MPf em *Daphnia similis* com exposição por 336 horas. Observando os aspectos reprodutivos, correlacionando identificação e dinâmica de disposição da dose-resposta ao longo do tempo demonstrando o aumento do índice de toxicidade e dano acumulado de forma mais significativa, onde a partir de 144 horas de experimento foi possível verificar danos expressivos na sobrevivência dos organismos em todas as concentrações testadas. Em 336 horas as concentrações atingem percentuais (%) de mortalidade em relação ao grupo controle em 27%, 40%, 50%, 43% e 70% de maneira linear e significativa.

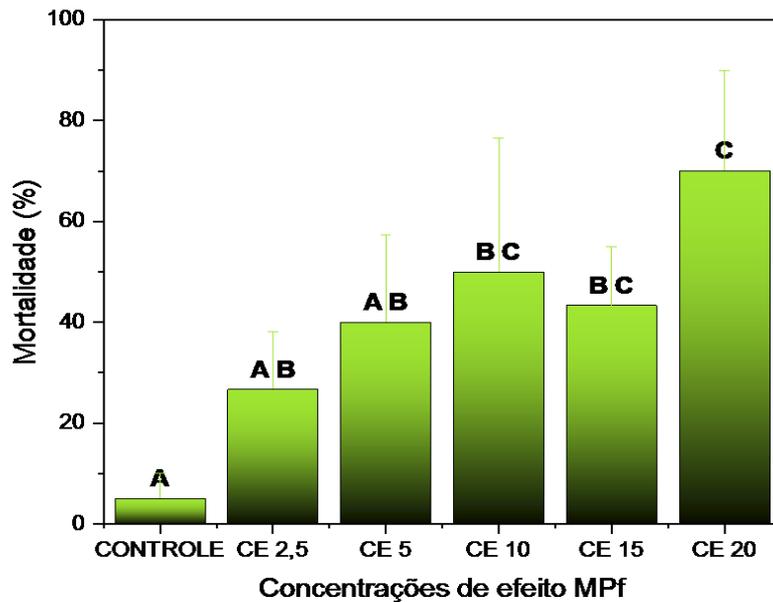
**Figura 32 - Curva de resposta e sobrevivência do teste crônico em *Daphnia similis* com exposição ao MPf por 336 h.**



Fonte: Próprio autor.

Os resultados da avaliação da toxicidade crônica são apresentados na Figura 33, onde é evidenciada a análise de variância das médias. O qual as concentrações apresentaram relações estatisticamente relevantes com alta relação significativamente diferente.

**Figura 33 - Avaliação média da toxicidade crônica de MPf em *Daphnia similis* por 336 h.**



Fonte: Próprio autor.

O estudo realizado por Zebrowski *et al.* (2022) analisou os efeitos crônicos dos MPs na competição interespecífica de Dafnídeos, utilizando espécies de *D. pulex*, *D. magna* e *D. galeata* em tratamentos experimentais que incluíram um grupo controle e tratamentos com PS, PE e PHB. A presença de PE, em especial, resultou em uma diminuição da densidade populacional dos competidores superiores nos três pares estudados, possivelmente devido à redução no número de fêmeas grávidas.

Durante o teste de toxicidade crônica de 21 dias, Sonmez, Ercan e Sivri (2022) obtiveram valores de PC, PET e PBT de EC<sub>50</sub> de 371,0; 90,0 e 551,0 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, para Daphnídeos da família *D. magna*. A diferença entre os resultados de toxicidade crônica pôde ser atribuída ao aumento progressivo do número de organismos imobilizados ou mortos à medida que o tempo de exposição ao contaminante aumenta.

#### **5.5.4 Atividade do sistema antioxidante**

A partir das concentrações de efeito subletal conhecidas como efeito tóxico agudo e crônico, foram selecionadas as concentrações dos compostos correspondentes às CE 20, 10, 5 e controle para a análise da toxicidade pelos bioindicadores enzimáticos. Foram avaliadas as atividades de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e a peroxidação lipídica pela mensuração do malondialdeído (MDA).

As condições para as misturas foram baseadas nas concentrações das atividades dos compostos isoladamente. Foram selecionadas as concentrações CE 10, 5 e controle dos compostos IMIc (2,51 e 5,02 mg.L<sup>-1</sup>), IMIp (0,136 e 0,427 mg.L<sup>-1</sup>), MPf (10,60 e 21,19 mg.L<sup>-1</sup>) e MPv (18,57 e 37,15 mg.L<sup>-1</sup>) para análise e avaliação da toxicidade dos tratamentos combinados em misturas pelos bioindicadores enzimáticos. A quantificação dos marcadores oxidativos foi utilizada como parâmetro toxicológico indicativo da ativação ou inibição do sistema de proteção redox do organismo contra a ação das misturas de xenobióticos combinados, comparando com as respostas do grupo controle como controle positivo e com as respostas das análises dos compostos isolados na CE 20 como controle negativo.

### 5.5.4.1 Atividade de superóxido dismutase (SOD)

As concentrações de efeito subletal dos compostos IMIc, IMIp, MPv e MPf, foram utilizadas isoladamente para determinar as atividades enzimáticas de SOD em *D. similis*. A Tabela 11 apresenta uma análise detalhada da atividade enzimática na espécie, incluindo informações sobre agrupamentos por meio do método de Tukey, LSD de Fisher e um índice de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 11 - Análise de atividade enzimática de SOD em *D. similis* para compostos IMIc, IMIp, MPv e MPf, isoladamente.**

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey, LSD de Fisher e Confiança de 95%								
ATIVIDADE DE SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) Médias expressas em: $\mu\text{g.mL}^{-1} \text{ mg.Protein. min}^{-1}$								
	Fator	Concentração ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	N	Média	DesvPad	IC de 95%	Agrupamento	% Atividade
	<b>Controle</b>	<b>0,00</b>	<b>7</b>	<b>0,48</b>	<b>0,09</b>	<b>(0,398; 0,555)</b>	<b>A</b>	<b>100%</b>
IMIc	CE 5	2,51	3	0,22	0,13	(0,095; 0,335)	B	45%
	CE 10	5,02	3	0,14	0,08	(0,015; 0,255)	B	28%
	CE 20	10,03	3	0,16	0,09	(0,035; 0,275)	B	33%
IMIp	CE 5	0,136	3	0,18	0,11	(0,074; 0,294)	B	39%
	CE 10	0,427	3	0,15	0,10	(0,038; 0,258)	B	38%
	CE 20	0,828	3	0,15	0,04	(0,035; 0,256)	B	31%
MPv	CE 5	10,60	3	0,15	0,03	(0,049; 0,241)	B	31%
	CE 10	21,19	3	0,15	0,08	(0,056; 0,248)	B	32%
	CE 20	42,38	3	0,20	0,07	(0,099; 0,291)	B	41%
MPf	CE 5	18,57	3	0,29	0,07	(0,181; 0,396)	A, B	61%
	CE 10	37,15	3	0,33	0,13	(0,226; 0,441)	A, B	70%
	CE 20	74,29	3	0,31	0,03	(0,201; 0,416)	B	65%

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

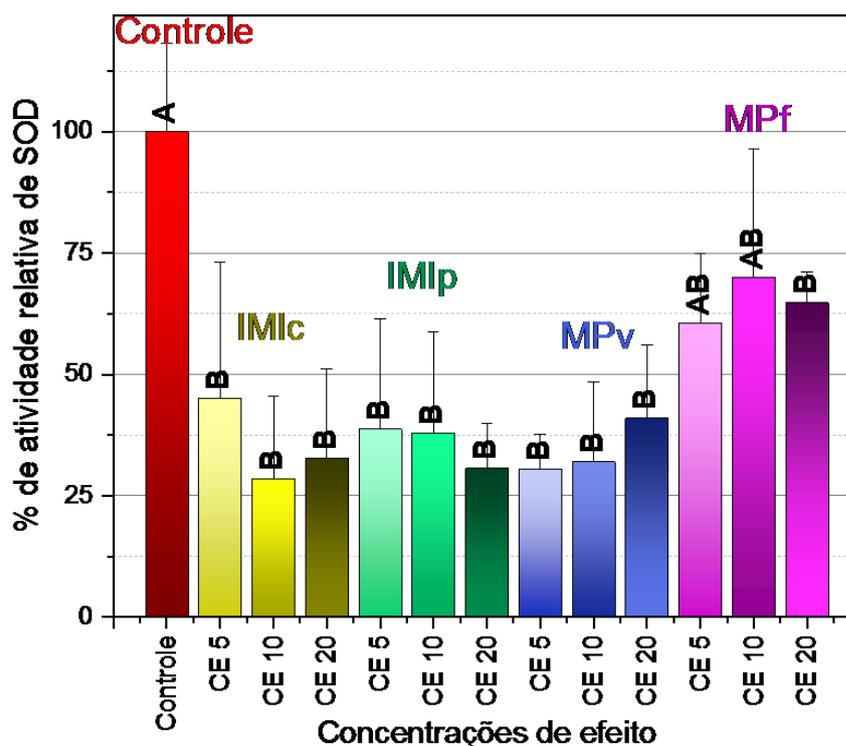
Fonte: Próprio autor.

A enzima SOD é um importante componente do sistema antioxidante do organismo, que tem como função proteger as células contra os danos causados por espécies reativas de oxigênio (EROs) (BAI *et al.*, 2021).

Com base nas análises dos biomarcadores, foi constatado que a exposição dos organismos a concentrações mais baixas foi suficiente para causar alterações na homeostase neste sistema. Como demonstrado na Figura 34, foi observada uma redução percentual na atividade enzimática em relação ao controle,

considerando que 100% representa o equilíbrio e a homeostase do processo de detoxificação do complexo citocromo P450, onde a SOD catalisa a conversão do superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em oxigênio molecular ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), impedindo a formação de espécies altamente reativas, como o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), que pode causar danos irreversíveis ao DNA, lipídeos e proteínas celulares (BAI *et al.*, 2021; WHALEY-CONNELL *et al.*, 2011).

Figura 34 – Análise comparativa do percentual (%) de atividade em relação ao controle, da enzima SOD em *D. similis*, com exposição ao IMIc, IMIp, MPv e MPf, isoladamente.



Fonte: Próprio autor.

O estudo mediu a atividade da enzima SOD em IMIc, IMIp, MPv e MPf como apresentado na Figura 34. No IMIc, houve diminuição significativa da atividade da SOD em todas as concentrações testadas, com redução de mais de 50% em relação ao controle. O controle apresentou 100% de atividade, enquanto as concentrações de 2,51, 5,02 e 10,03  $mg.L^{-1}$  apresentaram 45%, 28% e 33% de atividade, respectivamente. No IMIp, houve mais de 60% de inibição da atividade da SOD em todas as concentrações em relação ao controle, que apresentou 100% de atividade. As concentrações de 5%, 10% e 20% da população apresentaram 39%, 38% e 31% de atividade, respectivamente. No MPv, a SOD apresentou redução de atividade de 35% em relação ao controle, com reduções

de 61%, 70% e 65% para as concentrações de 18,57, 37,15 e 74,29 mg.L<sup>-1</sup>. Finalmente, em MPf, a atividade SOD apresentou uma redução geral de 66%, com reduções de 31%, 32% e 41% para as concentrações testadas.

Os resultados indicaram que a exposição aos compostos testados levou a uma redução significativa na atividade da enzima SOD em todas as concentrações testadas. A atividade de SOD por MPf apresentou a menor queda com mais de 50% de atividade em relação ao controle em todas as concentrações, enquanto as atividades de SOD por IMIp, MPv e IMIc apresentaram uma inibição ainda mais significativa, com redução média geral das exposições de 60% a 66%. Esses resultados sugerem que as exposições aos compostos levaram a alterações no equilíbrio redox e à redução da capacidade conversão destas enzimas.

Os resultados da atividade enzimática biomarcador SOD para os testes de toxicidade de misturas, avaliando o potencial ecotoxicológico dos MPs associados aos pesticidas, estão apresentados na Tabela 12. As condições de exposição em misturas binárias foram CE10 e CE5 para os compostos IMIc, IMIp, MPf e MPv, em concentrações específicas. As análises de informações de agrupamento foram realizadas por meio dos métodos de Tukey, LSD de Fisher e Índice de Confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), com as médias expressas em  $\mu\text{g.mL}^{-1} \mu\text{g.Protein. min}^{-1}$ .

Foram utilizadas misturas binárias CE10 e CE5, nas quais foram adicionados (5% IMI e 5% MP), (5% IMI e 10% MP), (10% IMI e 5% MP) e (10% IMI e 10% MP), para avaliar as condições de exposição dos compostos IMIc, IMIp, MPf e MPv.

**Tabela 12 - Atividade enzimática de SOD em *D. Similis*, dos compostos IMIc, IMIp, MPv e MPf, teste de toxicidade em misturas binárias das CE10 e CE5.**

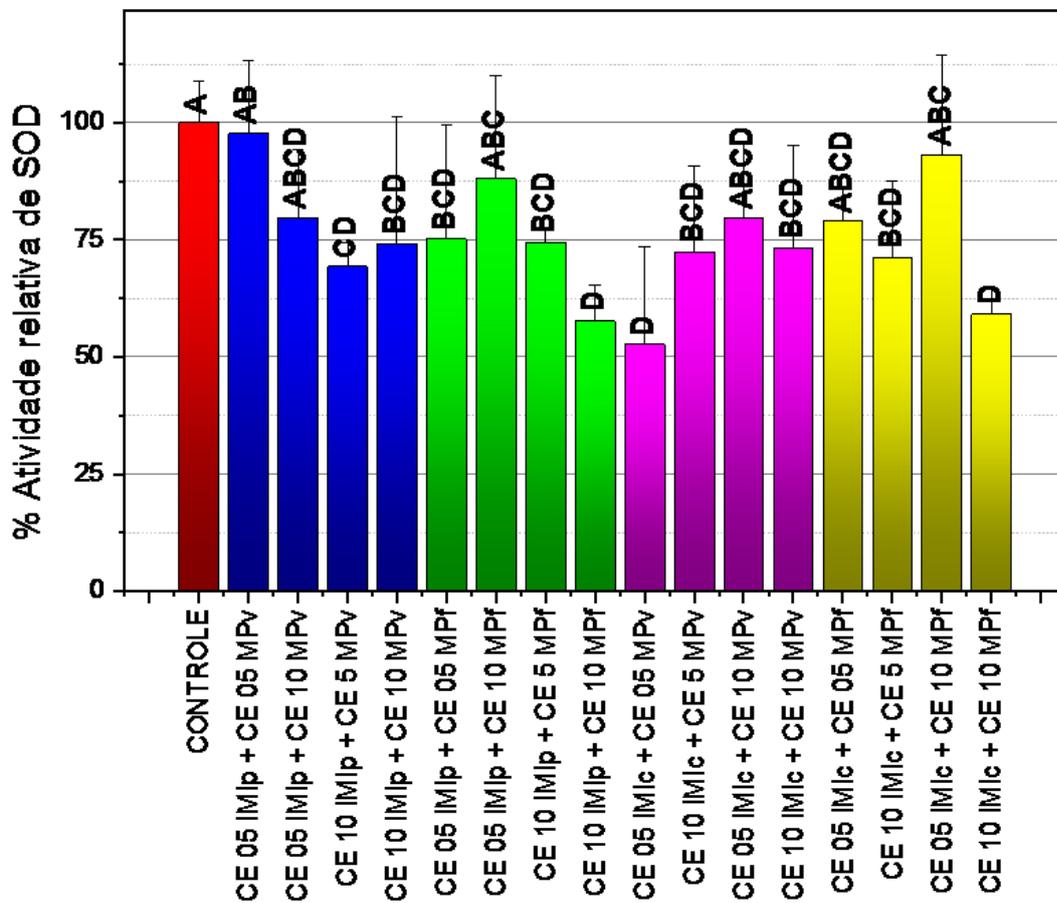
Informações de Agrupamento Usando o Método LSD de Fisher e Confiança de 95%					
Fator	N	Média	DesvPad	% Atividade	Agrupamento
CONTROLE	5	0,485	0,04	100%	A
CE 05 IMIp + CE 05 MPv	3	0,474	0,08	98%	A, B
CE 05 IMIp + CE 10 MPv	3	0,386	0,07	80%	A, B, C, D
CE 10 IMIp + CE 5 MPv	3	0,336	0,02	69%	C, D
CE 10 IMIp + CE 10 MPv	3	0,360	0,13	74%	B, C, D
CE 05 IMIp + CE 05 MPf	3	0,365	0,12	75%	B, C, D
CE 05 IMIp + CE 10 MPf	3	0,427	0,11	88%	A,B,C
CE 10 IMIp + CE 5 MPf	3	0,361	0,02	74%	B, C, D
CE 10 IMIp + CE 10 MPf	3	0,280	0,04	58%	D
CE 05 IMIc + CE 05 MPv	3	0,255	0,10	53%	D
CE 10 IMIc + CE 5 MPv	3	0,351	0,09	72%	B, C, D
CE 05 IMIc + CE 10 MPv	3	0,386	0,08	80%	A, B, C, D
CE 10 IMIc + CE 10 MPv	3	0,355	0,11	73%	B, C, D
CE 05 IMIc + CE 05 MPf	3	0,383	0,03	79%	A,B,C, D
CE 10 IMIc + CE 5 MPf	3	0,345	0,08	71%	B, C, D
CE 05 IMIc + CE 10 MPf	3	0,452	0,10	93%	A, B,C
CE 10 IMIc + CE 10 MPf	3	0,287	0,03	59%	D

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Fonte: Próprio autor.

A Análise do percentual (%) atividade enzimática de SOD para as combinações de misturas apresentadas na Figura 35, mostrou o % de resposta em relação ao controle, com a exposição ao IMIc, IMIp, MPf e MPv, em *D. similis*, onde as diferença significativa em relação ao controle estão avaliadas pelo Método LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ).

Figura 35 - Análise comparativa do percentual (%) de atividade enzimática SOD em relação ao controle, em *D. similis*, com exposição ao IMlc, IMlp, MPv e MPf, teste de toxicidade em misturas binárias das CE10 e CE5.



Fonte: Próprio autor.

As exposições testadas resultaram em uma redução na atividade para todas as condições. No entanto, a redução na atividade foi maior nas exposições de CE10 em comparação com as exposições de CE5, exceto na exposição de IMlc + MPv, na qual a dinâmica de atividade foi inversa às demais. As médias dos percentuais de atividade apresentaram significância tanto em relação ao controle quanto à maior inibição, evidenciando uma correlação entre as avaliações. Além disso, a análise de percentual de atividade de SOD apresentada na Figura 35 demonstrou a significância das diferenças em relação ao controle e a similaridade de faixa de apresentação entre todas as médias, conforme evidenciado pelo Método LSD de Fisher ( $p > 0,05$ ). As misturas apresentaram uma similaridade comportamental de resposta orgânica, onde as composições com maiores concentrações de MPs, sejam eles virgens ou fragmentados, exibiram menores inibições no desbalanceamento redox, em relação às demais condições testadas.

O teste LSD de Fisher demonstra que a diferença entre as médias de grupos é maior do que os valores críticos estabelecidos para o nível de significância escolhido comparativamente dentre os tipos de tratamentos isolados em combinados em mistura. Assim, essas médias são consideradas estatisticamente diferentes umas das outras.

Enquanto controle negativo as concentrações de efeito em 20% da população para as exposições dos compostos isoladamente, obtemos os percentuais (%) de inibição dos organismos de CE 20 IMIp em 69%, CE 20 IMIc em 67%, CE 20 MPf em 59% e CE 20 MPv em 35%, o que mostra relações de impactos ecológicos e ambientais significativas para os efeitos dos MPs associados aos demais poluentes.

#### **5.5.4.2 Atividade de catalase (CAT)**

As concentrações de subletalidade utilizadas para determinação das atividades enzimáticas de CAT para o IMIc, IMIp, MPv e MPf, estão apresentadas na Tabela 13 que mostra detalhadamente os resultados de atividade enzimática de em *D. similis*. Análise de informações de agrupamento usando Método de Tukey, LSD de Fisher e Índice de Confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

A enzima CAT é uma importante ferramenta em análises toxicológicas, já que é uma das principais enzimas antioxidantes que protege as células contra os danos causados pelos radicais livres. O estresse oxidativo surge quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade do organismo de neutralizá-los com antioxidantes, o que pode levar a danos celulares e teciduais. Dessa forma, a catalase desempenha um papel crucial no combate ao estresse oxidativo, pois converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, neutralizando os radicais livres e prevenindo danos às células (ABOONABI; RAHMAT; OTHMAN, 2014).

**Tabela 13 - Análise de atividade enzimática de CAT em *D. similis* para compostos IMIc, IMIp, MPv e MPf, isoladamente.**

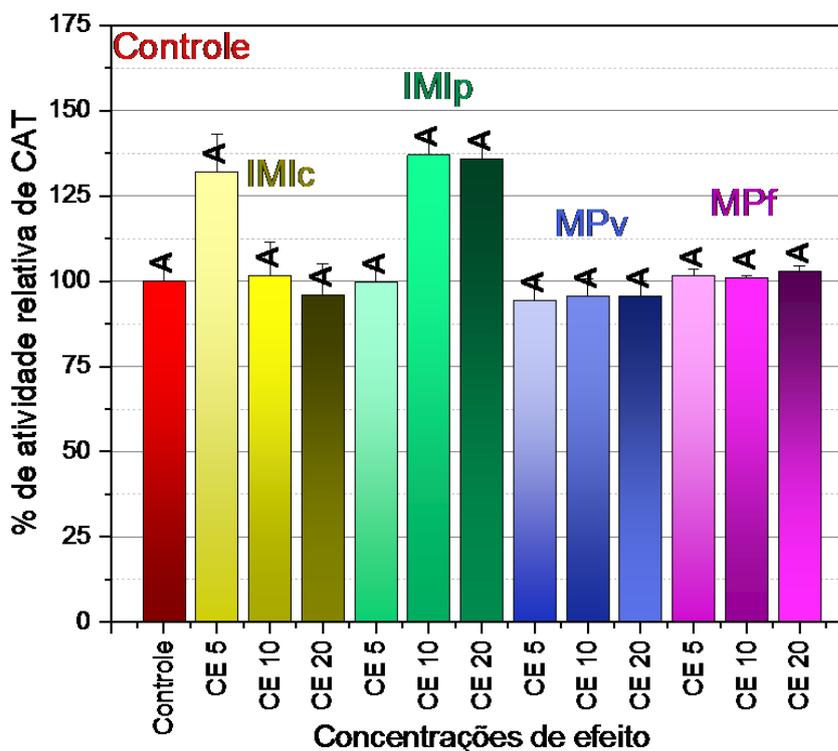
Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey, LSD de Fisher e Confiança de 95%								
ATIVIDADE DE CATALASE (CAT) Médias expressas em: nmol.min <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .mg <sup>-1</sup> Protein								
	Fator	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	N	Média	DesvPad	IC de 95%	Agrupamento	% Atividade
	<b>Controle</b>	<b>0,00</b>	<b>5</b>	<b>86,7</b>	<b>5,48</b>	<b>(63,71; 109,68)</b>	<b>A</b>	<b>100%</b>
IMIc	CE 5	2,51	3	114,6	9,6	(84,9; 144,3)	A	132%
	CE 10	5,02	3	88,16	8,41	(58,49; 117,83)	A	102%
	CE 20	10,03	3	83,11	8,14	(53,44; 112,78)	A	96%
IMIp	CE 5	0,136	3	86,55	3,15	(48,02; 125,07)	A	100%
	CE 10	0,427	3	118,8	4,7	(80,3; 117,4)	A	137%
	CE 20	0,828	3	117,8	4,7	(79,3; 116,3)	A	136%
MPv	CE 5	10,60	3	81,9	5,15	(75,59; 88,21)	A	94%
	CE 10	21,19	3	82,91	4,24	(76,60; 89,22)	A	96%
	CE 20	42,38	3	82,91	3,97	(76,60; 89,22)	A	96%
MPf	CE 5	18,57	3	88,162	1,525	(83,51; 92,80)	A	102%
	CE 10	37,15	3	87,556	0,7	(82,91; 92,19)	A	101%
	CE 20	74,29	3	89,172	1,525	(84,52; 93,81)	A	103%

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Fonte: Próprio autor.

A CAT é uma enzima importante na decomposição do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), um subproduto natural do metabolismo celular e uma das principais fontes de radicais livres que podem causar danos ao DNA, proteínas e lipídios celulares. A acumulação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode levar ao desbalanço redox.

Figura 36 – Análise comparativa do percentual (%) de atividade em relação ao controle, da enzima CAT em *D. similis*, com exposição ao IMIc, IMIp, MPv e MPf, isoladamente.



Fonte: Próprio autor.

Os resultados da análise da CAT expressos na Figura 36 em diferentes condições de exposição, mostraram que a CE 5 de IMIc apresentou um aumento significativo de 32% em relação ao controle, enquanto a exposição a IMIp apresentou um aumento de até 37% em relação ao mesmo. Por outro lado, a exposição a MPv não apresentou diferença significativa em relação ao controle, enquanto a exposição a MPf resultou em uma redução média geral de 5% na atividade da enzima.

Esses resultados destacam a importância da CAT na proteção contra o estresse oxidativo, principalmente em condições de exposição a substâncias que podem gerar radicais livres e danos celulares. Além disso, os resultados indicaram que diferentes tipos de MPs podem ter efeitos diferentes na atividade da CAT, o que pode ter implicações importantes para a saúde humana e ambiental (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Os dados apresentados na Tabela 14 e Figura 37, apresentam os resultados dos testes de atividade enzimática da enzima CAT, usada como biomarcador, para avaliar o potencial toxicológico de misturas binárias de MPs e

IMI. As combinações testadas de CE 10 e CE 5 para os compostos IMIc, IMIp, MPf e MPv. As análises foram realizadas usando o método de Tukey, LSD de Fisher e Índice de Confiança de 95%, com as médias expressas em  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{H}_2\text{O}_2\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína.

**Tabela 14 - Atividade enzimática de CAT em *D. Similis*, dos compostos IMIc, IMIp, MPv e MPf, teste de toxicidade misturas binárias das CE10 e CE5.**

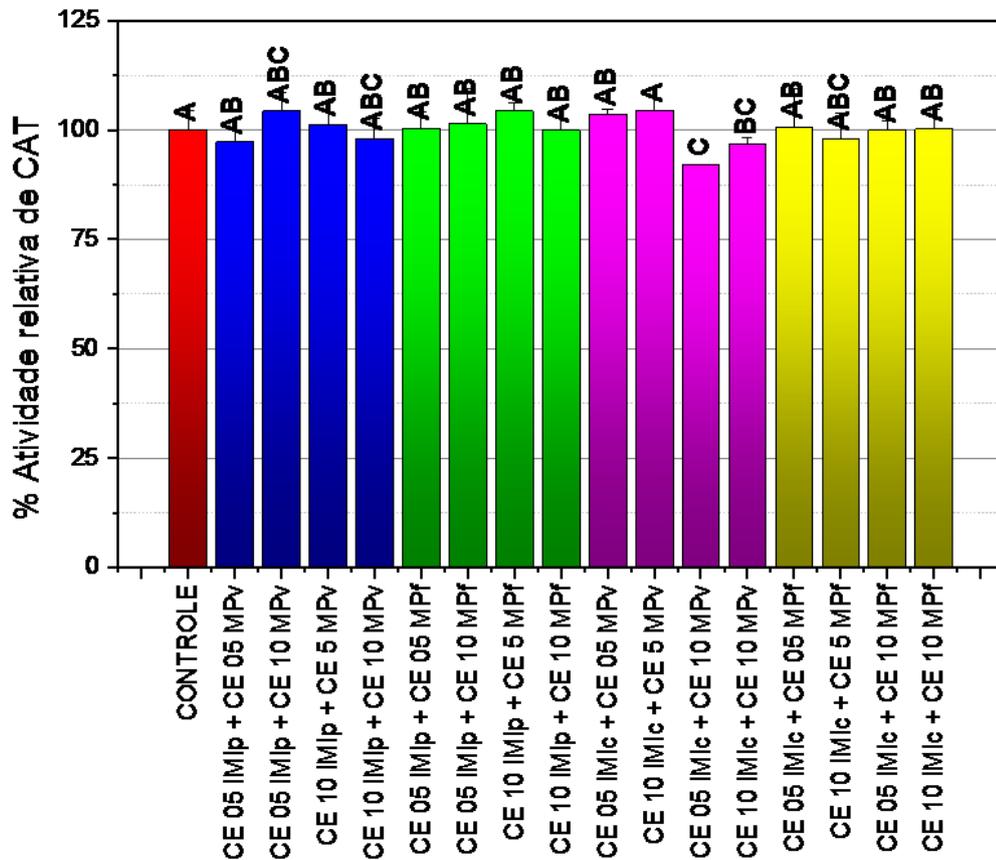
Informações de Agrupamento Usando o Método LSD de Fisher e Confiança de 95%					
Fator	N	Média	DesvPad	% Atividade	Agrupamento
CONTROLE	5	82,760	3,79	100%	A
CE 05 IMIp + CE 05 MPv	3	80,480	4,37	97%	A,B
CE 05 IMIp + CE 10 MPv	3	86,340	3,50	104%	A, B, C
CE 10 IMIp + CE 5 MPv	3	83,720	4,13	101%	A,B
CE 10 IMIp + CE 10 MPv	3	81,090	3,78	98%	A, B, C
CE 05 IMIp + CE 05 MPf	3	83,110	3,11	100%	A, B
CE 05 IMIp + CE 10 MPf	3	83,920	6,76	101%	A, B
CE 10 IMIp + CE 5 MPf	3	86,343	1,53	104%	A, B
CE 10 IMIp + CE 10 MPf	3	82,710	3,90	100%	A, B
CE 05 IMIc + CE 05 MPv	3	85,737	0,93	104%	A, B
CE 10 IMIc + CE 5 MPv	3	86,550	2,19	105%	A
CE 05 IMIc + CE 10 MPv	3	76,242	0,00	92%	C
CE 10 IMIc + CE 10 MPv	3	80,081	1,26	97%	B, C
CE 05 IMIc + CE 05 MPf	3	83,310	7,33	101%	A, B
CE 10 IMIc + CE 5 MPf	3	81,090	4,81	98%	A, B, C
CE 05 IMIc + CE 10 MPf	3	82,710	1,85	100%	A, B
CE 10 IMIc + CE 10 MPf	3	82,910	3,69	100%	A, B

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Fonte: Próprio autor.

A Figura 37 apresenta a análise do percentual (%) de atividade enzimática do biomarcador CAT, para os testes toxicológicos em condição de mistura. Os resultados do método de Tukey e do LSD de Fisher mostraram que as médias que não compartilharam uma letra foram significativamente diferentes. Além disso, as médias apresentaram pouca variação em relação ao controle, o que foi confirmado pelo teste de Fisher, indicando pouca variância e alta significância na similaridade das respostas orgânicas deste biomarcador em relação às exposições. Esses resultados indicaram que houve pouca variação na expressão enzimática de resposta da CAT.

Figura 37 - Análise comparativa do percentual (%) de atividade em relação ao controle, da enzima CAT em *D. similis*, com exposição ao IMIc, IMIp, MPv e MPf, teste de toxicidade em misturas binárias das CE10 e CE5.



Fonte: Próprio autor.

As médias apresentaram a mesma significância que o grupo controle devido análise de agrupamento, demonstrando que as exposições não causaram grandes variações no balanço redox do sistema antioxidante dos organismos, tendo obtido nestas exposições uma variação média geral de 0,15% em relação ao controle com um intervalo de confiança de -5% a 8% mínimo e máximo de estimulação e perda de atividade para Catalase.

O desempenho de interação comparativo com os demais biomarcadores em relação à variabilidade de CAT demonstrou que a SOD é responsável por converter o superóxido em peróxido de hidrogênio, que é neutralizado pela CAT, desempenhando um papel importante na defesa antioxidante das células. Quando a SOD é inibida, pode ocorrer um acúmulo de radicais livres e estresse oxidativo.

No entanto, a relação entre a inibição da SOD e a estabilização da CAT em um estudo específico pode variar. Por exemplo, enquanto um estudo pode mostrar que a inibição da SOD leva a uma diminuição na atividade da CAT, outro estudo pode mostrar que a inibição da SOD leva à estabilização da CAT. Sendo assim, a relação exata entre a inibição da SOD e a estabilização ou estimulação da CAT depende das condições específicas de interação dos subprodutos dos compostos com o sistema redox dos organismos (ABOONABI; RAHMAT; OTHMAN, 2014; BAI *et al.*, 2021; WHALEY-CONNELL *et al.*, 2011).

#### **5.5.4.3 Atividade de glutatona s-transferase (GST)**

A atividade enzimática do biomarcador GST foi avaliada em *Daphnia Similis* expostas aos compostos em concentrações subletais de efeito observado no teste agudo e crônico. Os resultados são apresentados na Tabela 15, com informações detalhadas sobre o agrupamento por meio do método de Tukey, LSD de Fisher e índice de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Essas análises permitiram determinar as médias das concentrações de cada grupo e identificar se há diferenças significativas entre elas. Dessa forma, é possível avaliar o impacto dos compostos sobre a atividade enzimática do biomarcador GST em *Daphnia Similis*.

A enzima GST é importante em estudos toxicológicos de estresse oxidativo porque é uma enzima chave na segunda fase da detoxificação de xenobióticos. Essa enzima catalisa a conjugação do tripeptídeo antioxidante glutatona (GSH) com compostos xenobióticos, tornando-os solúveis em água e mais facilmente eliminados do corpo. Além disso, a GST também pode reduzir o estresse oxidativo, neutralizando os radicais livres e espécies reativas de oxigênio geradas durante a detoxificação (HELLOU; ROSS; MOON, 2012).

**Tabela 15 - Análise de atividade enzimática de GST em *D. similis* para compostos IMIc, IMIp, MPv e MPf, isoladamente.**

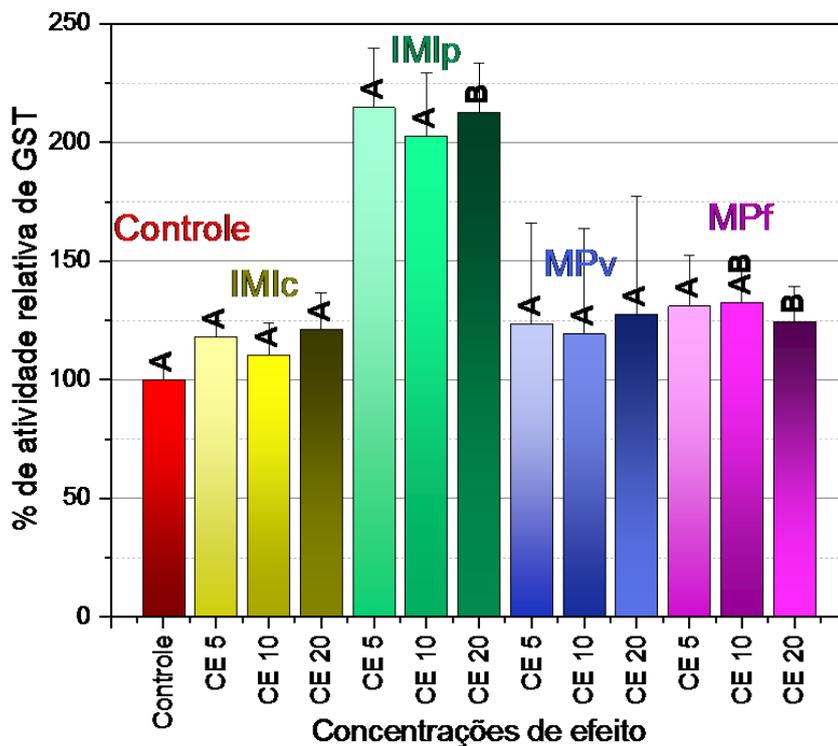
Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey, LSD de Fisher e Confiança de 95%								
ATIVIDADE DE GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST) Médias expressas em: nmol.min <sup>-1</sup> CNDB-GSH.mg <sup>-1</sup>								
	Fator	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	N	Média	DesvPad	IC de 95%	Agrupamento	% Atividade
	<b>Controle</b>	<b>0,00</b>	<b>7</b>	<b>27,109</b>	<b>2,52</b>	<b>(24,66; 29,55)</b>	<b>A</b>	<b>100%</b>
IMIc	CE 5	2,51	3	32,05	1,81	(28,30; 35,79)	A	118%
	CE 10	5,02	3	29,9	3,74	(26,16; 33,64)	A	110%
	CE 20	10,03	3	32,88	4,09	(29,14; 36,62)	A	121%
IMIp	CE 5	0,136	3	58,19	6,77	(46,85; 69,53)	A	215%
	CE 10	0,427	3	54,98	15,28	(43,64; 66,32)	A	203%
	CE 20	0,828	3	57,63	13,74	(46,30; 68,97)	B	213%
MPv	CE 5	10,60	3	33,46	11,57	(22,23; 44,69)	A	123%
	CE 10	21,19	3	32,31	12,04	(21,08; 43,55)	A	119%
	CE 20	42,38	3	34,63	13,43	(23,39; 45,86)	A	128%
MPf	CE 5	18,57	3	35,51	5,76	(30,61; 40,41)	A	131%
	CE 10	37,15	3	35,97	4,74	(31,07; 40,87)	A, B	133%
	CE 20	74,29	3	33,71	4,05	(28,81; 38,61)	B	124%

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Fonte: Próprio autor.

Em estudos toxicológicos, a atividade da GST é frequentemente utilizada como um biomarcador de exposição à xenobióticos, uma vez que a atividade enzimática pode ser induzida pela exposição a compostos químicos, incluindo agentes carcinogênicos e tóxicos. A determinação da atividade da GST em tecidos biológicos pode, portanto, fornecer informações valiosas sobre o efeito de agentes tóxicos e o grau de estresse oxidativo. Além disso, estudos têm mostrado que polimorfismos genéticos que afetam a atividade da GST podem estar relacionados ao risco de desbalanço redox e ao estresse oxidativo, como patogenos neurodegenerativos (ALLOCATI *et al.*, 2018).

Figura 38 – Análise comparativa do percentual (%) de atividade em relação ao controle, da enzima GST em *D. similis*, com exposição ao IMlc, IMlp, MPv e MPf, isoladamente.



Fonte: Próprio autor.

A Figura 38 apresenta os resultados da atividade de GST em diversas condições experimentais. No caso do IMlc, as médias de atividade em  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\text{CNDB-GSH}\cdot\text{mg}^{-1}\text{Protein}$  foram de 32,05; 29,9 e 32,88, representando um aumento de 118%, 110% e 121% em relação ao controle de  $27,1 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\text{CNDB-GSH}\cdot\text{mg}^{-1}\text{Protein}$ . Já para IMlp, houve um aumento médio de 110% na produtividade enzimática em relação ao controle, com valores de 58,2; 55,0 e 57,  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\text{CNDB-GSH}\cdot\text{mg}^{-1}\text{Protein}$  (CE 5, 10 e 20). A atividade de GST para MPv apresentou um aumento médio de 29% em relação ao controle, com valores de 35,51; 35,97 e 33,71 para as CE 5, 10 e 20, respectivamente. Por fim, a exposição de MPf resultou em um aumento médio de 23% na atividade de GST em relação ao controle, com valores de 27,109  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\text{CNDB-GSH}\cdot\text{mg}^{-1}\text{Protein}$  em 100% de atividade.

A atividade enzimática do biomarcador GST foi mensurada para avaliar o potencial efeito toxicológico dos MPs associados aos pesticidas em diferentes concentrações. Os resultados foram expressos em  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\text{CNDB-GSH}\cdot\text{mg}^{-1}$

<sup>1</sup>Protein e apresentados na Tabela 16. Foram testadas diferentes combinações de misturas, incluindo 10% de MP, 10% de IMI, 5% de MP e 5% em combinações binárias. A tabela apresenta os dados dos testes de toxicidade de misturas para avaliar o potencial ecotoxicológico dos MPs associados aos pesticidas nessas condições.

**Tabela 16 - Atividade enzimática de SOD em *D. Similis*, dos compostos IMIc, IMIp, MPv e MPf, teste de toxicidade misturas binárias das CE10 e CE5.**

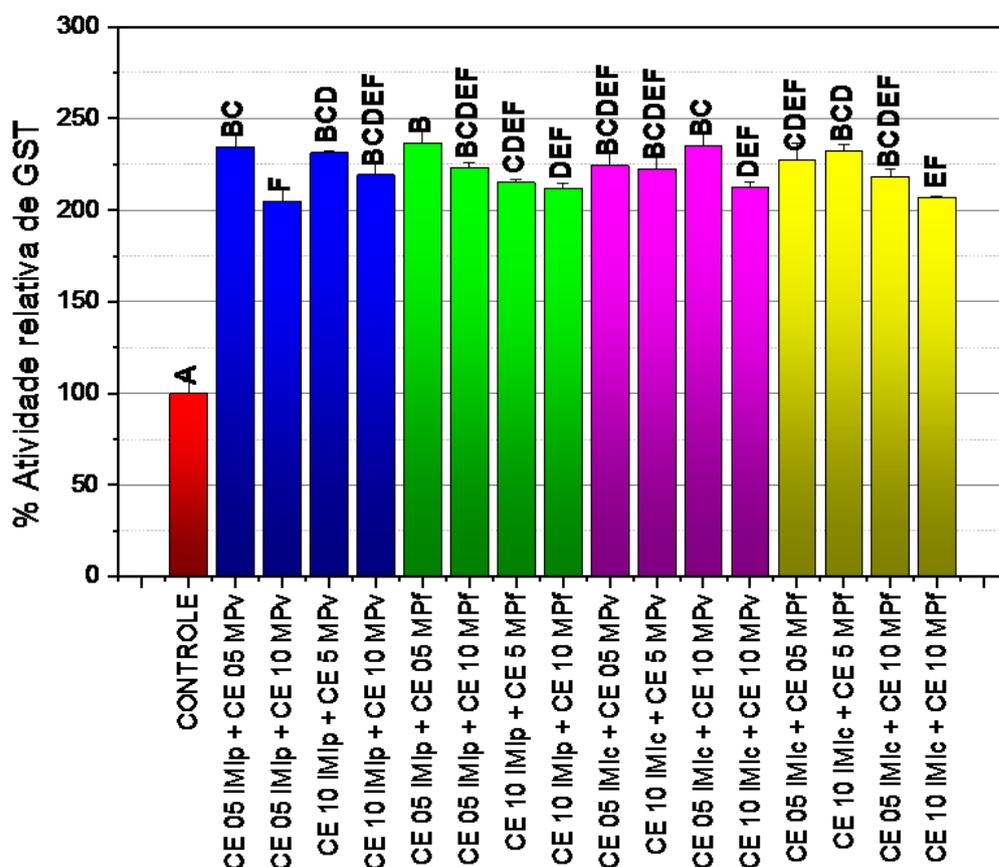
Informações de Agrupamento Usando o Método LSD de Fisher e Confiança de 95%					
Fator	N	Média	DesvPad	% Atividade	Agrupamento
CONTROLE	4	26,71	1,68	100%	A
CE 05 IMIp + CE 05 MPv	3	62,72	4,65	235%	B, C
CE 05 IMIp + CE 10 MPv	3	54,71	3,64	205%	F
CE 10 IMIp + CE 5 MPv	3	61,81	0,45	231%	B, C, D
CE 10 IMIp + CE 10 MPv	3	58,62	3,37	219%	B, C, D, E, F
CE 05 IMIp + CE 05 MPf	3	63,19	4,84	237%	B
CE 05 IMIp + CE 10 MPf	3	59,59	1,62	223%	B, C, D, E, F
CE 10 IMIp + CE 5 MPf	3	57,49	0,84	215%	C, D, E, F
CE 10 IMIp + CE 10 MPf	3	56,66	1,24	212%	D, E, F
CE 05 IMIc + CE 05 MPv	3	59,96	4,78	224%	B, C, D, E, F
CE 10 IMIc + CE 5 MPv	3	59,44	4,97	223%	B, C, D, E, F
CE 05 IMIc + CE 10 MPv	3	62,85	4,93	235%	B, C
CE 10 IMIc + CE 10 MPv	3	56,81	1,52	213%	D, E, F
CE 05 IMIc + CE 05 MPf	3	60,70	5,51	227%	C, D, E, F
CE 10 IMIc + CE 5 MPf	3	62,13	2,15	233%	B, C, D
CE 05 IMIc + CE 10 MPf	3	58,36	2,41	218%	B, C, D, E, F
CE 10 IMIc + CE 10 MPf	3	55,29	0,34	207%	E, F

*Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.*

Fonte: Próprio autor.

As médias de atividade de GST em porcentagem (%) relativa foram calculadas em relação ao controle, considerando-o como 100% de atividade. As exposições foram comparadas a este controle para avaliar seu efeito na atividade enzimática. O controle apresentou uma média de 26,71 nmol.min<sup>-1</sup>CNDB-GSH.mg<sup>-1</sup>Protein, com desvio padrão de 1,682, valor similar aos controles dos tratamentos dos compostos avaliados isoladamente, que tiveram uma atividade plena de 27,109 nmol.min<sup>-1</sup>CNDB-GSH.mg<sup>-1</sup>Protein.

Figura 39 - Análise comparativa do percentual (%) de atividade em relação ao controle, da enzima GST em *D. similis*, com exposição ao IMIc, IMIp, MPv e MPf, teste de toxicidade em misturas binárias das CE10 e CE5.



Fonte: Próprio autor.

Na Figura 39, as médias das condições de exposição apresentaram um expressivo aumento na atividade de resposta de GST, para todos os tratamentos observados, em comparação ao controle em homeostase redox, que obteve uma média de  $26,713 \pm 1,68 \text{ nmol.min}^{-1}\text{CNDB-GSH.mg}^{-1} \text{ Protein}$ . Os tratamentos apresentaram médias de resposta que compartilharam uma mesma letra de agrupamento, indicando serem significativamente diferentes do grupo controle, mas sem grande variabilidade entre os grupos de exposição. A média geral de atividade de GST foi de  $59,54 \pm 1,68 \text{ nmol.min}^{-1}\text{CNDB-GSH.mg}^{-1} \text{ Protein}$ , representando uma atividade de 223%, o que significa um aumento de 123% em relação ao grupo controle em equilíbrio. A análise da atividade enzimática de GST em percentual (%) de atividade em resposta às exposições de IMIc, IMIp, MPf e

MPv, em combinações de misturas em relação ao grupo controle, com diferenças significativas detectadas pelo Método LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ).

Ao considerarmos as concentrações de efeito em 20% da população como controle negativo pode observar os percentuais de GST apresentados pelos organismos expostos individualmente a cada composto: CE 20 IMlp com 113%, CE 20 IMlc com 21%, CE 20 MPf com 28% e CE 20 MPv com 24%. Esses resultados evidenciam relações significativas de impactos ecológicos e ambientais para os efeitos dos MPs em associação com outros poluentes.

As avaliações dos biomarcadores apresentaram uma dinâmica expressiva de diminuição de SOD, estabilização de CAT e aumento da GST. Onde em estudos de estresse oxidativo, pode haver uma relação inversa entre a atividade da glutathione S-transferase (GST) e a superóxido dismutase (SOD), ou seja, quando há um aumento na atividade da GST, pode haver uma redução na atividade da SOD e, portanto, um aumento do potencial oxidativo. Isso ocorre porque a GST tem a função de catalisar a conjugação do glutathione com compostos oxidantes, resultando em sua eliminação do organismo, enquanto a SOD é responsável pela conversão do superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, reduzindo o potencial oxidativo no organismo. No entanto, essa relação não é linear e pode ser influenciada por outros fatores, como a presença de outros antioxidantes no organismo e a intensidade e duração do estresse oxidativo (MANDUZIO *et al.*, 2004).

#### **5.5.4.4 Mensuração do biomarcador malondialdeído (MDA)**

As concentrações de subletalidade utilizadas para determinação das atividades enzimáticas para determinação das atividades de MDA. A Tabela 17 apresenta detalhadamente análise de atividade enzimática de em *D. similis*, análise informações de agrupamento usando método de Tukey, LSD de Fisher e índice de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 17 - Análise de atividade de MDA em *D. similis* para compostos IMIc, IMIp, MPv e MPf, isoladamente.**

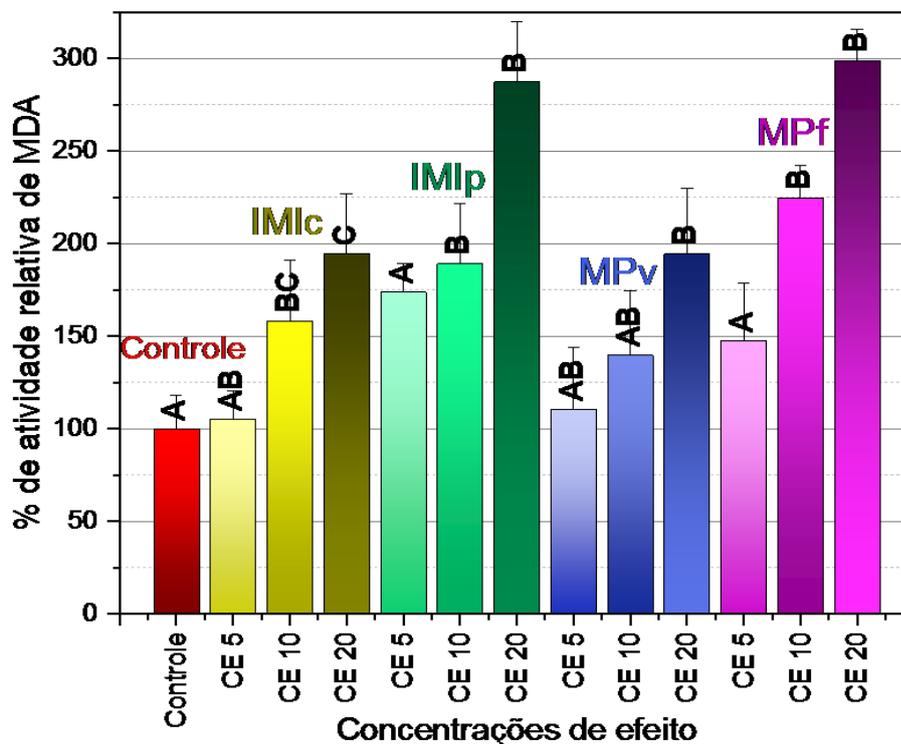
Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey, LSD de Fisher e Confiança de 95%								
MENSURAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO (MDA) Médias expressas em: U MDA /mL.mg <sup>-1</sup> protein								
	Fator	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	N	Média	DesvPad	IC de 95%	Agrupamento	% Atividade
	<b>Controle</b>	<b>0,00</b>	<b>6</b>	<b>110</b>	<b>19,93</b>	<b>(86,28; 133,73)</b>	<b>A</b>	<b>100%</b>
IMIc	CE 5	2,51	3	115,83	17	(82,28; 149,38)	A, B	105%
	CE 10	5,02	3	174,2	35,8	(140,7; 207,8)	B, C	158%
	CE 20	10,03	3	213,8	35,6	(180,3; 247,4)	C	194%
IMIp	CE 5	0,14	3	115,83	17	(82,28; 149,38)	A	174%
	CE 10	0,43	3	174,2	35,8	(140,7; 207,8)	B	189%
	CE 20	0,83	3	213,8	35,6	(180,3; 247,4)	B	287%
MPv	CE 5	10,60	3	121,5	37,1	(65,3; 177,8)	A, B	110%
	CE 10	21,19	3	153,6	38,3	(97,4; 209,9)	A, B	140%
	CE 20	42,38	3	213,8	33,3	(177,5; 250,0)	B	194%
MPf	CE 5	18,57	3	162,4	34	(118,9; 205,9)	A	148%
	CE 10	37,15	3	247,1	19,6	(203,6; 290,6)	B	225%
	CE 20	74,29	3	328,8	12,5	(285,3; 332,3)	B	299%

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Fonte: Próprio autor.

A mensuração do biomarcador MDA é uma técnica essencial para avaliar o estresse oxidativo em estudos toxicológicos, que podem identificar danos celulares e mapear o desenvolvimento de vários impactos. A concentração de MDA pode ser medida em diversos tecidos biológicos, e um aumento nessa medida pode indicar um nível mais elevado de estresse oxidativo. Por outro lado, uma redução na concentração de MDA pode indicar a eficácia do uso de antioxidantes no combate ao estresse oxidativo. Assim, a mensuração de MDA é importante em análises de estresse oxidativo, pois fornece informações valiosas sobre a extensão da peroxidação lipídica e o grau de estresse oxidativo. Além disso, o MDA pode ser usado como um biomarcador para avaliar a eficácia de intervenções antioxidantes no tratamento ou prevenção de danos relacionados ao estresse oxidativo (DEAVALL *et al.*, 2012).

Figura 40 – Análise comparativa do percentual (%) de atividade em relação ao controle, do biomarcador MDA em *D. similis*, com exposição ao IMIc, IMIp, MPv e MPf, isoladamente.



Fonte: Próprio autor.

A Figura 40 apresenta resultados de mensuração de MDA em diferentes amostras. Para IMIc, as concentrações testadas (CE 5, 10 e 20) apresentaram um aumento significativo de atividade em relação ao controle, correspondendo a 105%, 158% e 194% de atividade, respectivamente. Em IMIp, as concentrações testadas também apresentaram um aumento significativo de atividade em relação ao controle, correspondendo a 174%, 189% e 287% de atividade, respectivamente. Em MPv, houve um aumento médio de 124% na atividade em relação ao controle. Já em MPf, a resposta foi ainda mais expressiva, com um aumento significativo na atividade em relação ao controle para as exposições de 10,60; 21,19 e 42,38 mg.L<sup>-1</sup> de MPf, correspondendo a 110%, 140% e 194% de atividade, respectivamente. Esses resultados sugerem um aumento significativo no estresse oxidativo nessas amostras em resposta à exposição.

A Tabela 18, compila a avaliação do potencial toxicológico dos MPs associados aos pesticidas que foi realizada por meio da mensuração do biomarcador MDA em testes de toxicidade de misturas binárias. Os tratamentos foram aplicados sobre as médias e os dados foram analisados por meio do

método de Tukey combinado ao LSD de Fisher e índice de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), cujos resultados estão apresentados. A mensuração de MDA para a avaliação das combinações de misturas dos componentes foi realizada para as combinações CE10 IMI, CE 5 IMI, CE5 MP e CE10 MP, com variação nas concentrações de efeito observado, utilizando o mesmo método estatístico.

**Tabela 18 - Atividade do biomarcador MDA em *D. Similis*, dos compostos IMIc, IMIp, MPv e MPf, teste de toxicidade misturas binárias das CE10 e CE5.**

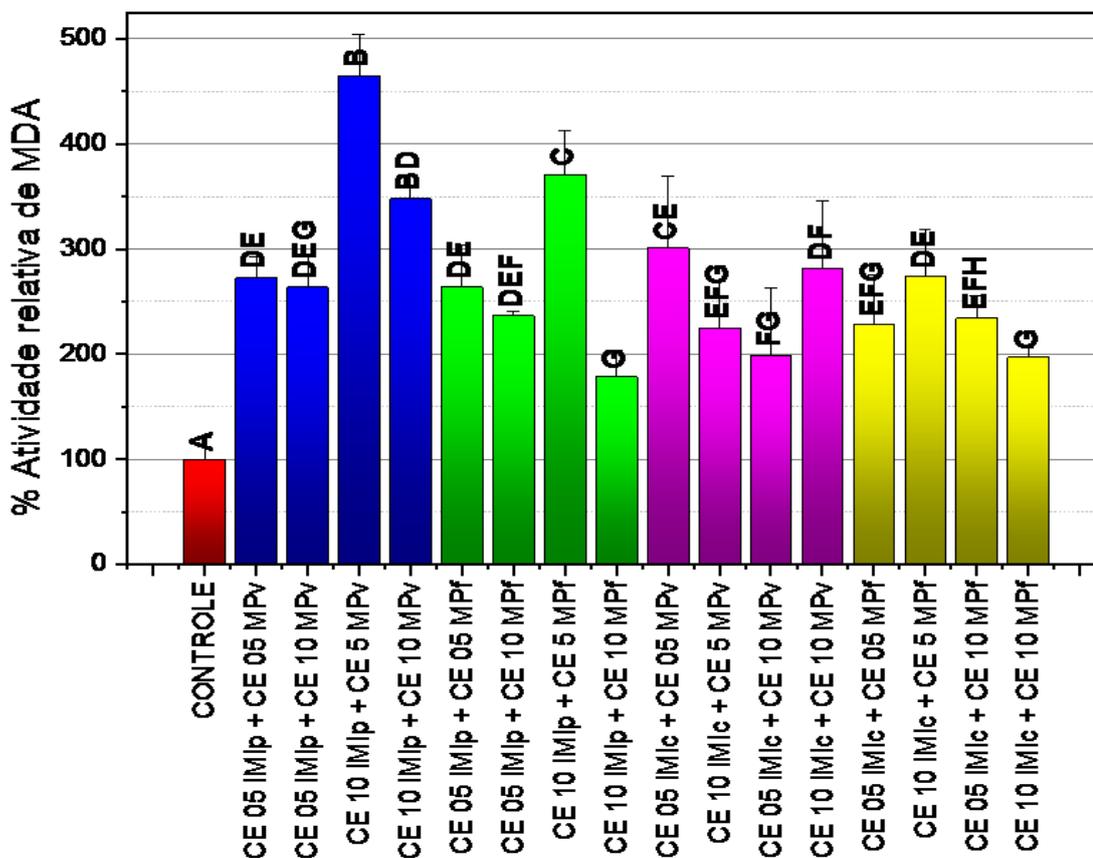
Informações de Agrupamento Usando o Método LSD de Fisher e Confiança de 95%					
Fator	N	Média	DesvPad	% Atividade	Agrupamento
CONTROLE	5	108,40	23,10	100%	A
CE 05 IMIp + CE 05 MPv	3	295,50	21,60	273%	D, E
CE 05 IMIp + CE 10 MPv	3	286,00	34,50	264%	D, E, G
CE 10 IMIp + CE 5 MPv	3	503,90	42,80	465%	B
CE 10 IMIp + CE 10 MPv	3	377,30	24,70	348%	B, D
CE 05 IMIp + CE 05 MPf	3	286,20	43,30	264%	D, E
CE 05 IMIp + CE 10 MPf	3	256,46	4,91	237%	D, E, F
CE 10 IMIp + CE 5 MPf	3	402,20	45,40	371%	C
CE 10 IMIp + CE 10 MPf	3	193,30	27,10	178%	G
CE 05 IMIc + CE 05 MPv	3	326,20	73,70	301%	C, E
CE 10 IMIc + CE 5 MPv	3	244,10	48,00	225%	E, F, G
CE 05 IMIc + CE 10 MPv	3	215,10	70,60	198%	F, G
CE 10 IMIc + CE 10 MPv	3	304,80	69,70	281%	D, F
CE 05 IMIc + CE 05 MPf	3	247,00	51,00	228%	E, F, G
CE 10 IMIc + CE 5 MPf	3	296,70	48,70	274%	D, E
CE 05 IMIc + CE 10 MPf	3	253,90	23,20	234%	E, F, H
CE 10 IMIc + CE 10 MPf	3	213,61	9,50	197%	G

*Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.*

Fonte: Próprio autor.

A Figura 41, apresenta a análise do percentual relativo (%) de MDA das combinações de misturas em relação ao controle, para as exposições ao IMIc, IMIp, MPf e MPv, utilizando concentrações de efeito de 10% de MP e 10% de IMI, 5% de MP e 5% de IMI. Os resultados mostram diferenças significativas entre as médias das condições testadas pelo método LSD de Fisher, evidenciando correlações importantes.

Figura 41 - Análise comparativa do percentual (%) de atividade em relação ao controle, do biomarcador MDA em *D. similis*, com exposição ao IMlc, IMlp, MPv e MPf, teste de toxicidade em misturas binárias das CE10 e CE5.



Fonte: Próprio autor.

Os tratamentos apresentaram diferenças significativas em relação ao controle e grande variabilidade na análise de significância de comparação. O tratamento CE 10 IMlp + CE 10 MPv obteve a maior expressão de resposta, sendo 377,3 U MDA /mL.mg<sup>-1</sup> protein, o que correspondeu a uma apresentação em torno de 250% a mais que a atividade do controle. Por outro lado, o tratamento CE 10 IMlp + CE 10 MPf apresentou a menor expressão, com 193,3 U MDA /mL.mg<sup>-1</sup> protein, correspondendo a 78% a mais que a atividade do controle. Esses extremos apresentam um intervalo de confiança para a média geral dos tratamentos que foi de 259%, representando um aumento de 159% de resposta orgânica de MDA nos organismos.

A análise de Fisher demonstrou que todos os tratamentos obtiveram expressão de MDA acima do controle, sendo o tratamento CE 10 IMlp + CE 5 MPv o que apresentou o ponto mais alto de atividade, com 503,9 U MDA /mL.mg<sup>-1</sup>

protein e 465% de atividade, uma atividade 365% maior que o grupo controle. A menor atividade foi observada no tratamento CE 05 IMIc + CE 10 MPv, com 215,1 U MDA /mL.mg<sup>-1</sup> protein, uma atividade 98% maior que o grupo controle. As exposições para as combinações com alteração da concentração do grupo de efeito apresentaram uma média geral de 183% a mais que o grupo controle, com desvio padrão de 90% dentro do índice de confiança experimentado.

Sendo possível verificar enquanto controle negativo as concentrações de efeito em 20% da população para as exposições dos compostos isoladamente, foi obtido os % de apresentação de MDA dos organismos de CE 20 IMIp 187%, CE 20 IMIc 94%, CE 20 MPf 94% e CE 20 MPv 199%, o que evidencia relações de impactos ecológicas e ambientais significativas para os efeitos dos MPs associados aos demais poluentes.

Combinar os biomarcadores MDA, SOD, CAT e GST podem fornecer informações valiosas sobre os efeitos toxicológicos dos xenobióticos, especialmente em relação ao estresse oxidativo. O MDA é um indicador de peroxidação lipídica, enquanto SOD, CAT e GST são enzimas antioxidantes importantes que ajudam a combater o estresse oxidativo (ZHANG *et al.*, 2019).

Ao avaliar os níveis desses biomarcadores em conjunto, é possível obter uma visão mais completa dos efeitos dos xenobióticos no organismo. Por exemplo, níveis elevados de MDA indicam peroxidação lipídica e estresse oxidativo, enquanto níveis reduzidos de SOD, CAT e GST podem indicar que as defesas antioxidantes do organismo foram comprometidas. A combinação desses biomarcadores pode fornecer informações cruciais para avaliar a toxicidade dos xenobióticos e desenvolver estratégias para proteger a saúde humana e ambiental (PROKIC *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2016).

## 6 CONCLUSÕES

A fragmentação plástica resultou em mudanças físicas e estruturais na morfologia microplástica, mas as características químicas dos materiais foram preservadas. Esta verificação foi alcançada por meio de análises FTIR e MEV, que permitiram a diferenciação entre MPv e MPf com base em seus espectros e superfícies. Portanto, os resultados indicaram que é possível distinguir diferentes tipos de MPs com base em suas características químicas, mesmo após a fragmentação.

A análise de varredura dos compostos de IMI permitiu a validação da composição do IMIc, que foi confirmado como 70:30 de acordo com as especificações do fabricante. A validação foi realizada comparando o composto comercial com um padrão de alta pureza de 99,9% em HPLC (IMIp), utilizando a técnica de espectrofotometria.

O estudo realizado demonstrou a capacidade de adsorção dos IMIc e IMIp em MPv e MPf ao longo do tempo de tratamento, variando de 5 a 48 horas. Foi observado que a adsorção dos compostos foi similar nas primeiras 5 horas, seguida de aumento em 19-27 h, equilíbrio de interação em 28-42 h e diminuição em 44-48 h.

A adsorção física foi a principal força para a adsorção dos pesticidas em MPs, e a relação entre a capacidade de adsorção e o percentual adsortivo de remoção foi inversamente proporcional, devido à característica apolar e de dissolução dos compostos.

A cinética de pseudo-primeira ordem foi a mais adequada para descrever o processo de adsorção. A dinâmica de apresentação da cinética de pseudo-primeira ordem dos compostos em diferentes concentrações em água de cultivo para *D. similis*, revelou que o composto padrão apresentou maior afinidade no sítio ativo de adsorção que o composto comercial, tanto no MPv quanto no MPf. Isso ressalta a necessidade de mais pesquisas para entender o impacto dos pesticidas em MPs e desenvolver estratégias para minimizar seus efeitos negativos no ambiente.

Considerando a sensibilidade aguda e crônica dos biomarcadores no organismo não alvo *D. similis*, os ensaios realizados demonstraram que as concentrações dos compostos IMIp, IMIc, MPf e MPv podem causar efeitos

deletérios responsáveis por alterações na sobrevivência, manutenção do organismo e população.

Os resultados dos testes de toxicidade indicaram que os compostos IMIp, IMIc, MPf e MPv apresentaram diferentes níveis de toxicidade, sendo que o IMIp foi o mais tóxico, seguido pelo IMIc, MPf e MPv, respectivamente. Esses resultados são importantes para avaliar os riscos ambientais dos compostos em questão, já que a exposição a essas substâncias pode levar a efeitos deletérios sobre os organismos aquáticos e, conseqüentemente, sobre a cadeia alimentar.

O uso dos biomarcadores SOD, CAT, GST e MDA se mostrou uma excelente ferramenta para avaliar os efeitos subletais dos MPs, especialmente quando combinados com outros poluentes. Essa abordagem pode contribuir para a regulamentação e classificação desses compostos, bem como fornecer informações valiosas sobre os impactos nos ecossistemas aquáticos. É importante enfatizar que a compreensão dos efeitos tóxicos desses compostos na biota aquática é crucial para o desenvolvimento de medidas de proteção e mitigação dos impactos ambientais.

Nesse sentido, os resultados deste estudo forneceu importantes contribuições para a área de pesquisa, especialmente na identificação dos mecanismos de toxicidade dos xenobióticos e na avaliação dos efeitos adversos dessas substâncias nos organismos aquáticos. Portanto, a combinação dos biomarcadores MDA, SOD, CAT e GST podem ser uma ferramenta valiosa para a avaliação dos riscos ambientais associados aos MPs e pesticidas.

## REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHDOKHT, Danial *et al.* Conventional agrochemicals towards nano-biopesticides: An overview on recent advances. **Chemical and biological technologies in agriculture**, v. 9, n. 1, p. 1-19, 2022.
- ABOONABI, Anahita; RAHMAT, Asmah; OTHMAN, Fauziah. Antioxidant effect of pomegranate against streptozotocin-nicotinamide generated oxidative stress induced diabetic rats. **Toxicology reports**, v. 1, p. 915-922, 2014.
- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12713: Sistemas de proteção contra descargas atmosféricas – **Procedimentos**. Rio de Janeiro, 2022.
- ADETORO, F. A.; IKUABE, B. O.; LAWAL, R. A. Toxicological response of *Poecilia reticulata*, *Hyla* species and *Culex* species to leachates from Olusosun landfill, Lagos state, Nigeria. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 22, n. 5, p. 817-823, 2018.
- ADYARI, Bob *et al.* Strong impact of micropollutants on prokaryotic communities at the horizontal but not vertical scales in a subtropical reservoir, China. **Science of the Total Environment**, v. 721, p. 137767, 2020.
- AMORIM, Leiliane Coelho André. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, p. 158-170, 2003.
- AN, Lihui *et al.* Sources of microplastic in the environment. **Microplastics in terrestrial environments: Emerging contaminants and major challenges**, In: HE, D.; LUO, Y. (eds) *Microplastics in Terrestrial Environments. The Handbook of Environmental Chemistry*. Cham : Springer, 2020. v.95, p.143-159.
- ALHAZMI, Hatem; ALMANSOUR, Faris H.; ALDHAFEERI, Zaid. Plastic waste management: A review of existing life cycle assessment studies. **Sustainability**, v. 13, n. 10, p. 5340, 2021.
- ALLOCATI, Nerino *et al.* Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. **Oncogenesis**, v. 7, n. 1, p. 8, 2018.
- ALSAFRAN, Mohammed *et al.* Neonicotinoid insecticides in the environment: A critical review of their distribution, transport, fate, and toxic effects. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 5, p. 108485, 2022.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Anvisa. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). **Associação Brasileira de Normas Técnicas**, [S. l.], p. 27, 2022.

BAI, He *et al.* Molybdenum and cadmium co-induce mitophagy and mitochondrial dysfunction via ROS-mediated PINK1/Parkin pathway in Hepa1-6 cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 224, p. 112618, 2021.

BAIA, Beatriz Gallegos Farias *et al.* Plástico e seus impactos ambientais. **International Studies Coepta**, p. 3-4, 2020.

BAPTISTA NETO, José Antonio *et al.* Microplastics and attached microorganisms in sediments of the Vitória bay estuarine system in SE Brazil. **Ocean; Coastal Management**, v. 169, p. 247-253, 2019.

BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. **São Carlos: Rima**, 2006.

BISWAS, Jayanta Kumar; SARKAR, Dibyendu. Nanopollution in the aquatic environment and ecotoxicity: No nano issue!. **Current Pollution Reports**, v. 5, p. 4-7, 2019.

BOELEEE, Eline *et al.* Water and health: From environmental pressures to integrated responses. **Acta tropica**, v. 193, p. 217-226, 2019.

BONMATIN, J.-M. *et al.* Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental science and pollution research**, v. 22, p. 35-67, 2015.

BORRETT, Stuart R.; MOODY, James; EDELMANN, Achim. The rise of network ecology: maps of the topic diversity and scientific collaboration. **Ecological Modelling**, v. 293, p. 111-127, 2014.

BOWNIK, Adam. Daphnia swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: a review. **Science of the total environment**, v. 601, p. 194-205, 2017.

BRACK, Werner *et al.* The SOLUTIONS project: challenges and responses for present and future emerging pollutants in land and water resources management. **Science of the total environment**, v. 503, p. 22-31, 2015.

BRAZEL, Christopher S.; ROSEN, Stephen L. **Fundamental principles of polymeric materials**. John Wiley & Sons, 2012.

BRILHANTE, Ogenis Magno; CALDAS, Luiz Querino de A. **Gestão e avaliação de risco em saúde ambiental**. Editora FIOCRUZ, 1999.

BROWNE, Mark Anthony *et al.* Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks. **Environmental science & technology**, v. 45, n. 21, p. 9175-9179, 2011.

BRUCKER, Natália *et al.* Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility in occupational exposure to traffic-related air pollution: A review. **Journal of Applied Toxicology**, v. 40, n. 6, p. 722-736, 2020.

BUENO, M. J. M. *et al.* Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: two years pilot survey monitoring. **Environmental Pollution**, v. 164, p. 267-273, 2012.

BURATINI, S. V.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A. Evaluation of *Daphnia similis* as a test species in ecotoxicological assays. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 73, n. 5, p. 878-882, 2004.

BURNS, Emily E.; BOXALL, Alistair BA. Microplastics in the aquatic environment: Evidence for or against adverse impacts and major knowledge gaps. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 37, n. 11, p. 2776-2796, 2018.

CALLISTER JR., W. D. **Ciência dos materiais**. 8.ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2019.

CALLISTER JR., W. D. **Ciência e engenharia de materiais**. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2008.

CAMPANA, Olivia; WLODKOWIC, Donald. Ecotoxicology goes on a chip: embracing miniaturized bioanalysis in aquatic risk assessment. **Environmental science & technology**, v. 52, n. 3, p. 932-946, 2018.

CAMPOS, Jaqueline Ferreira *et al.* Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 374-380, 2014.

CASSEREAU, Julien *et al.* Neurotoxicity of insecticides. **Current medicinal chemistry**, v. 24, n. 27, p. 2988-3001, 2017.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental **Ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos: Atendimento à legislação Ambiental - Orientações para realização de ensaios e apresentação dos resultados nos documentos encaminhados à CETESB**. São Paulo: CETESB, 2017 .Relatório Técnico, 9p.

CHAPMAN, Peter M. Emerging substances-emerging problems?. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1445, 2006.

CHEN, Yalan *et al.* Catchment-wide flooding significantly altered microplastics organization in the hydro-fluctuation belt of the reservoir. **Iscience**, v. 25, n. 6, p. 104401, 2022.

CHENG, Yali *et al.* Combined effects of mulch film-derived microplastics and atrazine on oxidative stress and gene expression in earthworm (*Eisenia fetida*). **Science of the Total Environment**, v. 746, p. 141280, 2020.

CHEVALIER, Julie *et al.* Exploration of *Daphnia* behavioral effect profiles induced by a broad range of toxicants with different modes of action. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 34, n. 8, p. 1760-1769, 2015.

- CHIN, Tiffany A.; CRISTESCU, Melania E. Speciation in *Daphnia*. **Molecular Ecology**, v. 30, n. 6, p. 1398-1418, 2021.
- COOK, Sarah *et al.* Longitudinal dispersion of microplastics in aquatic flows using fluorometric techniques. **Water Research**, v. 170, p. 115337, 2020.
- COORS, Anja; DE MEESTER, Luc. Synergistic, antagonistic and additive effects of multiple stressors: predation threat, parasitism and pesticide exposure in *Daphnia magna*. **Journal of Applied Ecology**, v. 45, n. 6, p. 1820-1828, 2008.
- DA SILVA, Daniel José; WIEBECK, Hélio. Using PLS, iPLS and siPLS linear regressions to determine the composition of LDPE/HDPE blends: a comparison between confocal Raman and ATR-FTIR spectroscopies. **Vibrational Spectroscopy**, v. 92, p. 259-266, 2017.
- DAS, Jyoti; KARMAKER, Nanda; KHAN, Ruhul A. Reasons and consequences of river water pollution and their remediation: In context of Bangladesh. **GSC Advanced Research and Reviews**, v. 7, n. 1, p. 023-034, 2021.
- DE MORAES, R. F. Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória. Texto para Discussão, n. 2432, **Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada**, 2019.
- DEAVALL, Damian G. *et al.* Drug-induced oxidative stress and toxicity. **Journal of toxicology**, v. 2012, p. 645460, 2012.
- Do Prado *et al.* Ecotoxicological effect of ketoconazole on the antioxidant system of *Daphnia similis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology; Pharmacology*, v. 246, p. 109080, 2021.
- EL-KAMMAH, Mai *et al.* Enhanced removal of Thiamethoxam from wastewater using waste-derived nanoparticles: Adsorption performance and mechanisms. **Environmental Technology; Innovation** v. 28, p. 102713, 2022.
- ENYOH, Christian Ebere *et al.* An overview of emerging pollutants in air: Method of analysis and potential public health concern from human environmental exposure. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 28, p. e00107, 2020.
- ESKENAZI, B.; BRADMAN, A.; CASTORINA, R. Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. **Environmental health perspectives**, v. 107, p. 409–419, 1999.
- FAURE, Florian *et al.* Plastic pollution in Swiss surface waters: nature and concentrations, interaction with pollutants. **Environmental chemistry**, v. 12, n. 5, p. 582-591, 2015.

FEITO, Raquel; VALCÁRCEL, Yolanda; CATALÁ, Myriam. Biomarker assessment of toxicity with miniaturised bioassays: diclofenac as a case study. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 1, p. 289-296, 2012.

FENGA, Concettina; GIUSI, Briguglio; COSTA, Chiara. Immunotoxicity of pesticides: current knowledge and perspectives. **Toxicological Risk Assessment and Multi-System Health Impacts from Exposure**, p. 557-568, 2021.

FERRAZ, Marlon *et al.* Microplastic concentrations in raw and drinking water in the Sinos River, Southern Brazil. **Water**, v. 12, n. 11, p. 3115, 2020.

FERRÃO FILHO, Aloysio da S. *et al.* Efeitos de uma cepa produtora de saxitoxina de *Cylindrospermopsis raciborskii* (cianobactéria) nos movimentos de natação de cladóceros. **Toxicologia Ambiental: An International Journal**, v. 23, n. 2, p. 161-168, 2008.

FRIAS, João PGL; NASH, Roisin. Microplastics: Finding a consensus on the definition. **Marine pollution bulletin**, v. 138, p. 145-147, 2019.

GALL, Sarah C.; THOMPSON, Richard C. The impact of debris on marine life. **Marine pollution bulletin**, v. 92, n. 1-2, p. 170-179, 2015..

GAVRILESCU, Maria *et al.* Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. **New biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 147-156, 2015.

GEISSEN, Violette *et al.* Emerging pollutants in the environment: a challenge for water resource management. **International soil and water conservation research**, v. 3, n. 1, p. 57-65, 2015.

GEYER, Roland; JAMBECK, Jenna R.; LAW, Kara Lavender. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science advances**, v. 3, n. 7, p. e1700782, 2017.

GEYER, Roland. Production, use, and fate of synthetic polymers. In: Plastic waste and recycling. **Academic Press**, p. 13-32, 2020.

GESSNER, Mark O.; TLILI, Ahmed. Fostering integration of freshwater ecology with ecotoxicology. **Freshwater Biology**, v. 61, n. 12, p. 1991-2001, 2016.

GOMES, Ana R. *et al.* Review of the ecotoxicological effects of emerging contaminants to soil biota. **Journal of environmental science and health**, v. 52, n. 10, p. 992-1007, 2017. part a.

GOULSON, Dave. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, n. 4, p. 977-987, 2013.

GROSS, Elisabeth M. Aquatic chemical ecology meets ecotoxicology. **Aquatic Ecology**, v. 56, n. 2, p. 493-511, 2022.

GRUE, Christian E.; GARDNER, Susan C.; GIBERT, Peter L. On the significance of pollutant-induced alterations in the behaviour of fish and wildlife. **Behavioural ecotoxicology**, v.1 n.1, p. 1, 2002.

GULMINE, J. V. *et al.* Polyethylene characterization by FTIR. **Polymer testing**, v. 21, n. 5, p. 557-563, 2002.

GUPTA, Ramesh C. *et al.* Biomarkers in toxicology. Academic Press, Insecticides. **Biomarkers in Toxicology**, v.2 n.1, p. 455–475. 2019.

HAHN, Annette *et al.* Using FTIRS as pre-screening method for detection of microplastic in bulk sediment samples. **Science of the total environment**, v. 689, p. 341-346, 2019.

HAHN, Mark E. Mechanistic research in aquatic toxicology: perspectives and future directions. **Aquatic toxicology**, v. 105, n. 3-4, p. 67-71, 2011.

HANSON, M. L. *et al.* How we can make ecotoxicology more valuable to environmental protection. **Science of the Total Environment**, v. 578, p. 228-235, 2017.

HALSTEAD, Neal T. *et al.* Community ecology theory predicts the effects of agrochemical mixtures on aquatic biodiversity and ecosystem properties. **Ecology Letters**, v. 17, n. 8, p. 932-941, 2014.

HAYASAKA, D. *et al.* Differences in susceptibility of five cladoceran species to two systemic insecticides, imidacloprid and fipronil. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 421–427, 2012.

HELLOU, Jocelyne; ROSS, Neil W.; MOON, Thomas W. Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 2007-2023, 2012.

HERNÁNDEZ, Antonio F.; GIL, Fernando; LACASAÑA, Marina. Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. **Archives of toxicology**, v. 91, p. 3211-3223, 2017.

HOLMSTRUP, Martin *et al.* Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 18, p. 3746-3762, 2010.

HOOK, Sharon E.; GALLAGHER, Evan P.; BATLEY, Graeme E. The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. **Integrated environmental assessment and management**, v. 10, n. 3, p. 327-341, 2014.

HOSSEINI, Hamed; JAFARI, Seid Mahdi. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy of nanoencapsulated food ingredients .In: JAFARI, Seid Mahdi (ed.) **Nanoencapsulation in the Food Industry, Characterization of**

**Nanoencapsulated Food Ingredients**, Academic Press, 2020. v. 4, p. 347-41. Chapter 11.

HUANG, Zike; HU, Bo; WANG, Hui. Analytical methods for microplastics in the environment: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 21, n. 1, p. 383-401, 2023.

HUMANN-GUILLEMINOT, Ségolène *et al.* A nation-wide survey of neonicotinoid insecticides in agricultural land with implications for agri-environment schemes. **Journal of Applied Ecology**, v. 56, n. 7, p. 1502-1514, 2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Gabinete da Presidência; **Comitê Interfederativo**. Boletim de Vendas de Agrotóxicos. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Exposição no trabalho e no ambiente. Agrotóxico. **Rio de Janeiro: INCA**, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Ambiente, trabalho e câncer: aspectos epidemiológicos, toxicológicos e regulatórios / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – **Rio de Janeiro: INCA**, 2021.

JAESCHKE, Hartmut; MCGILL, Mitchell R. Derivados do citocromo P450 versus estresse oxidativo mitocondrial na hepatotoxicidade do paracetamol. **Cartas de toxicologia**, v. 235, n. 3, p. 216-217, 2015.

JACTEL, Hervé *et al.* Alternatives to neonicotinoids. **Environment international**, v. 129, p. 423-429, 2019.

JESCHKE, Peter *et al.* Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 7, p. 216-217, 2011.

JESCHKE, Peter; NAUEN, Ralf. Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 64, n. 11, p. 1084-1098, 2008.

KATAOKA, Tomoya *et al.* Assessment of the sources and inflow processes of microplastics in the river environments of Japan. **Environmental pollution**, v. 244, p. 958-965, 2019.

KAUSHIK, Usha. Chapter-7 Plastic Industry Waste: Sources, Management and Recycling. **Multidisciplinary**, v. 47, p. 137, 2019.

KARIMI, Battle *et al.* A meta-analysis of the ecotoxicological impact of viticultural practices on soil biodiversity. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, p. 1947-1966, 2020.

- KIM, Dokyung; CHAE, Yooeun; AN, Youn-Joo. Mixture toxicity of nickel and microplastics with different functional groups on *Daphnia magna*. **Environmental science; technology**, v. 51, n. 21, p. 12852-12858, 2017.
- KIØRBOE, Thomas; JØRGENSEN, Bo Barker; HUNTER, Ewan. The role of the feeding current for copepods exposed to extreme concentrations of small particles. **Journal of Plankton Research**, v. 32, n. 10, p. 1433-1444, 2010.
- KOELMANS, Albert A. *et al.* Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality. **Water research**, v. 155, p. 410-422, 2019.
- LARSSON, D. G. J. Pollution from drug manufacturing: review and perspectives. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1656, p. 20130571, 2014.
- LEBRETON, Laurent *et al.* River plastic emissions to the world's oceans. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2017.
- LEIST, Marcel; HARTUNG, Thomas; NICOTERA, Pierluigi. The dawning of a new age of toxicology. **Altex: Alternatives to Animal Experimentation**, v. 25, n. 2, p. 103-114, 2008.
- LI, Hui *et al.* Adsorption of three pesticides on polyethylene microplastics in aqueous solutions: Kinetics, isotherms, thermodynamics, and molecular dynamics simulation. **Chemosphere**, v. 264, p. 128556, 2021.
- LI, Mei-fang *et al.* Tetracycline absorbed onto nitrilotriacetic acid-functionalized magnetic graphene oxide: influencing factors and uptake mechanism. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 485, p. 269-279, 2017.
- LI, Xuwen *et al.* Evaluation of DNA damage, biomarkers of oxidative stress, and status of antioxidant enzymes in freshwater fish (*Labeo rohita*) exposed to pyriproxyfen. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, 2022.
- LING, S. D. *et al.* Ubiquity of microplastics in coastal seafloor sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 121, n. 1-2, p. 104-110, 2017.
- MACKEVICA, Aiga *et al.* Chronic toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna* under different feeding conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 161, p. 10-16, 2015.
- MAGALHÃES, Danielly de Paiva; FERRÃO FILHO, Aloysio da Silva. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecol. Bras.**, v.12, n.3, p.355-381, 2008.
- MAHMOOD, Isra *et al.* Effects of pesticides on environment. **Plant, soil and microbes: volume 1: implications in crop science**, p. 253-269, 2016.
- MANDUZIO, H el ene *et al.* Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of

an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. **Aquatic Toxicology**, v. 70, n. 1, p. 83-93, 2004.

MANISALIDIS, Ioannis *et al.* Environmental and health impacts of air pollution: a review. **Frontiers in public health**, v. 8, p. 14, 2020.

MARKLUND, Stefan; MARKLUND, Gudrun. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European journal of biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MARTIN, Olwenn V. *et al.* Melhorando as avaliações de risco ambiental de produtos químicos: Passos para a ecotoxicologia baseada em evidências. **Environment International**, v. 128, p. 210-217, 2019.

MARTINS, Marta Filipa Santos. Poluição por plástico. A crise ambiental e as políticas europeias e nacionais. 2020. Tese de Doutorado. **Universidade de Lisboa, Faculdade de Letras**, Lisboa. 2020.

MARTINS, Thaís Fabiane Gomes *et al.* Bioindicadores para avaliação do impacto ambiental em ecossistemas aquáticos e os efeitos dos contaminantes sobre os organismos aquáticos. **Aspectos da ecotoxicidade em ambientes aquáticos**, v. 1, p. 24-43, 2022.

MASON, Rosemary *et al.* Immune suppression by neonicotinoid insecticides at the root of global wildlife declines. **Journal of environmental immunology and toxicology**, v. 1, n. 1, p. 3-12, 2013.

MIRANDA, Rosiane Aparecida *et al.* Pesticides as endocrine disruptors: programming for obesity and diabetes. **Endocrine**, v. 79, n. 3, p. 437-447, 2023.

MOISEENKO, T. I. Aquatic ecotoxicology: theoretical principles and practical application. **Water Resources**, v. 35, n. 5, p. 530-541, 2008.

MORRISSEY, Christy A. *et al.* Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. **Environment international**, v. 74, p. 291-303, 2015.

NAUEN, Ralf; JESCHKE, Peter; COPPING, Len. Em foco: editorial de inseticidas neonicotinóides. **Ciência de Manejo de Pragas**, v. 64, n. 11, p. 1081-1081, 2008.

NEWMAN, M. Ecotoxicology, 2021. Disponível em: [https://www.vims.edu/research/departments/eaah/programs/legacy\\_programs/ecotox/index.php](https://www.vims.edu/research/departments/eaah/programs/legacy_programs/ecotox/index.php) Acesso em: 22 jul. 2021.

NEWMAN, Michael C. Fundamentals of ecotoxicology. **Boca Raton: CRC press**, 1989.

NIKIEMA, Josiane; ASIEDU, Zipporah. A review of the cost and effectiveness of solutions to address plastic pollution. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 17, p. 24547-24573, 2022.

NIU, Y. H. *et al.* High-frequency monitoring of neonicotinoids dynamics in soil-water systems during hydrological processes. **Environmental Pollution**, v. 292, p. 118219, 2022.

NUGNES, Roberta *et al.* Polystyrene microplastic particles in combination with pesticides and antiviral drugs: Toxicity and genotoxicity in *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Pollution**, v. 313, p. 120088, 2022.

OBEREMOK, Volodymyr V. *et al.* The need for the application of modern chemical insecticides and environmental consequences of their use: a mini review. **Journal of Plant Protection Research**, v. 57, n. 4, 2017.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Test. 211: *Daphnia magna* reproduction test. In: **OECD Guidelines For The Testing Of Chemicals**, v. 2, 2012.

OLIVEIRA, Patrícia *et al.* Effects of microplastics and mercury in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774): filtration rate, biochemical biomarkers and mercury bioconcentration. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 164, p. 155-163, 2018.

PAKHOMOVA, Svetlana; ZHDANOV, Igor; VAN BAVEL, Bert. Polymer type identification of marine plastic litter using a miniature near-infrared spectrometer (MicroNIR). **Applied Sciences**, v. 10, n. 23, p. 8707, 2020.

PAN, Zhongli; ZHANG, Ruihong; ZICARI, Steven (Ed.). **Integrated processing technologies for food and agricultural by-products**. Academic Press, 2019.

PELLER, Julie R. *et al.* The Reactivity of Polyethylene Microplastics in Water under Low Oxygen Conditions Using Radiation Chemistry. **Water**, v. 13, n. 21, p. 3120, 2021.

POSTHUMA, Leo *et al.* A poluição química impõe limitações ao estado ecológico das águas superficiais europeias. **Relatórios científicos**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.

PRATA, Joana C. *et al.* Influence of microplastics on the toxicity of the pharmaceuticals procainamide and doxycycline on the marine microalgae *Tetraselmis chuii*. **Aquatic toxicology**, v. 197, p. 143-152, 2018.

PRINA MELLO, Adriele *et al.* Measuring particle size distribution and mass concentration of nanoplastics and microplastics: addressing some analytical challenges in the sub-micron size range. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 588, p. 401-417, 2021.

PROKIC, Marko D. *et al.* Ecotoxicological effects of microplastics: Examination of biomarkers, current state and future perspectives. **TrAC Trends in analytical chemistry**, v. 111, p. 37-46, 2019.

QI, Suzhen *et al.* Neonicotinoid insecticides imidacloprid, guadipyr, and cycloxaprid induce acute oxidative stress in *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 148, p. 352-358, 2018.

QUEIROZ, L. G. **Efeitos tóxicos do inseticida neonicotinóide imidacloprido em organismos aquáticos não-alvo**. 2019. 99p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

QUEIROZ, Lucas Gonçalves *et al.* Ecological risk of imidacloprid on the Brazilian non-target freshwater organisms *Chironomus sancticaroli* and *Poecilia reticulata*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 194, n. 10, p. 1-14, 2022.

RADWAN, M. A.; EL-GENDY, K. S.; GAD, A. F. Biomarkers of oxidative stress in the land snail, *Theba pisana* for assessing ecotoxicological effects of urban metal pollution. **Chemosphere**, v. 79, n. 1, p. 40-46, 2010.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. Introdução à toxicologia aquática. In: Fundamentos de toxicologia aquática. São Paulo, Universidade Estadual Paulista; Boca Raton: **CRC Press**, 2020. p. 3-67.

RELYEA, Rick; HOVERMAN, Jason. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. **Ecology Letters**, v. 9, n. 10, p. 1157-1171, 2006.

REHSE, Saskia; KLOAS, Werner; ZARFL, Christiane. Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 153, p. 91-99, 2016.

RICKLEFS, R. E. *et al.* Ecology: the economy of nature. New York: WH Freeman, 2014. Tradução de A Economia da Natureza. 5. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2014. 503 p.

RODRIGUES, M. O. *et al.* Spatial and temporal distribution of microplastics in water and sediments of a freshwater system (Antuã River, Portugal). **Science of the total environment**, v. 633, p. 1549-1559, 2018.

RODRIGUEZ, Y. A. **Potencial tóxico e genotóxico do inseticida Imidacloprido em organismos não alvos**. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2016. 107p.

RONCA, Sara. Polyethylene In: GILBERT, Marianne (ed.) **Brydson's Plastics Materials**. 8th ed. Butterworth-Heinemann, 2017. p. 247-278 Chapter 10.

SANTOS, Dércia *et al.* Toxicological effects induced on early life stages of zebrafish (*Danio rerio*) after an acute exposure to microplastics alone or co-exposed with copper. **Chemosphere**, v. 261, p. 127748, 2020.

SCHERER, Christian *et al.* Comparative assessment of microplastics in water and sediment of a large European river. **Science of the Total Environment**, v. 738, p. 139866, 2020.

SCHÜR, Christoph *et al.* Microplastics but not natural particles induce multigenerational effects in *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, v. 260, p. 113904, 2020.

SHIM, Won Joon *et al.* Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. **Marine pollution bulletin**, v. 113, n. 1-2, p. 469-476, 2016.

SHRIVASTAVA, Anshuman Introduction to Plastics Engineering, In: Shrivastava Anshuman, **Plastics Design Library LLC Chadds Ford**, PA: William Andrew Publishing, 2018. p. 1-16.

SKALDINA, Oksana; SORVARI, Jouni. Biomarcadores de efeitos ecotoxicológicos em insetos sociais. **Perspectivas em toxicologia ambiental** , v. 2, n. 2, p. 203-214, 2017.

SONMEZ, Vildan Zulal; ERCAN, Nevra; SIVRI, Nuket. Toxic effects of ester based polymers on *Daphnia magna*: a laboratory microcosm study. **Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences**, v. 17, n. 1, p. 35-47, 2022.

STEVE Ensley, Imidacloprid In: RAMESH, C.; GUPTA (eds) **Veterinary Toxicology**. Academic Press, 2007. p. 505-507. Chapter 44.

SUCHAIL, Séverine; GUEZ, David; BELZUNCES, Luc P. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 20, n. 11, p. 2482-2486, 2001.

SYBERG, Kristian *et al.* Microplastics: addressing ecological risk through lessons learned. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 34, n. 5, p. 945-953, 2015.

TAYLOR, A. M. W. A; MAHER, L. M.; PUOPOLO K. New Oceanography research developments: marine chemistry, ocean floor analyses, and marine phytoplankton. **Nova Science Publishers**, v. 1, p. 318, 2010.

TIMBRELL, John; BARILE, Frank A. Introduction to toxicology. Boca Raton: **CRC Press**, 2023.

TIŠLER, T. *et al.* Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. **Chemosphere**, v. 76, n. 7, p. 907–914, 2009.

TOMIZAWA, Motohiro; MILLAR, Neil S.; CASIDA, John E. Pharmacological profiles of recombinant and native insect nicotinic acetylcholine receptors. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 35, n. 12, p. 1347-1355, 2005.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME- UNEP, 2019. Evidence rising: the emerging pollutants poisoning our environment. Disponível em: <https://www.unep.org/news-and-stories/story/evidence-rising-emergingpollutants-poisoning-our-environment>. Acesso em: 12 dez. 2021.

VASSEUR, Paule; MASFARAUD, Jean-François; BLAISE, Christian. Ecotoxicology, revisiting its pioneers. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 3852-3857, 2021.

VÖRÖSMARTY, Charles J. *et al.* Ameaças globais à segurança hídrica humana e à biodiversidade fluvial. **Natureza**, v. 467, n. 7315, p. 555-561, 2010.

VROOM, Renske JE *et al.* Aging of microplastics promotes their ingestion by marine zooplankton. **Environmental pollution**, v. 231, p. 987-996, 2017.

WAGNER, Martin; LAMBERT, Scott. Freshwater microplastics: emerging environmental contaminants?. **Cham: Springer**, 2018. v. 58.

WALKER, Colin Harold; SIBLY, R. M.; PEAKALL, David B. Principles of Ecotoxicology. 3rd ed. Boca Raton: **CRC Press**, 2005. 344 p.2006.

WANG, Juan *et al.* DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in the earthworm *Eisenia fetida*. **Chemosphere**, v. 144, p. 510-517, 2016.

WANG, Ting *et al.* Adsorption behavior and mechanism of five pesticides on microplastics from agricultural polyethylene films. **Chemosphere**, v. 244, p. 125491, 2020.

WANG, Wenfeng *et al.* The ecotoxicological effects of microplastics on aquatic food web, from primary producer to human: A review. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 173, p. 110-117, 2019.

WANG, Xu *et al.* Risk assessment for and microbial community changes in Farmland soil contaminated with heavy metals and metalloids. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 185, p. 109685, 2019.

WARDROP, Peter *et al.* Chemical pollutants sorbed to ingested microbeads from personal care products accumulate in fish. **Environmental science; technology**, v. 50, n. 7, p. 4037-4044, 2016.

WELBOURN, P. M.; HODSON, P. V. The History and Emergence of Ecotoxicology as a Science. In: CAMPBELL, P. G. C. *et al.* (org.). **Ecotoxicology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2022.

WHALEY-CONNELL, Adam; MCCULLOUGH, Peter A.; SOWERS, James R. The role of oxidative stress in the metabolic syndrome. **Reviews in cardiovascular medicine**, v. 12, n. 1, p. 21-29, 2011.

WILKINSON, John *et al.* Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 954-970, 2017.

- WU, Donglei *et al.* Molecular characterisation of cytochrome P450 enzymes in waterflea (*Daphnia pulex*) and their expression regulation by polystyrene nanoplastics. **Aquatic Toxicology**, v. 217, p. 105350, 2019.
- WU, Xiaowei *et al.* Adsorption of triclosan onto different aged polypropylene microplastics: critical effect of cations. **Science of the Total Environment**, v. 717, p. 137033, 2020.
- YAN, Muting *et al.* Microplastic abundance, distribution and composition in the Pearl River along Guangzhou city and Pearl River estuary, China. **Chemosphere**, v. 217, p. 879-886, 2019.
- YAO, Liming *et al.* Freshwater microplastics pollution: Detecting and visualizing emerging trends based on Citespace II. **Chemosphere**, v. 245, p. 125627, 2020.
- ZHAO, Shiye *et al.* Suspended microplastics in the surface water of the Yangtze Estuary System, China: first observations on occurrence, distribution. **Marine pollution bulletin**, v. 86, n. 1-2, p. 562-568, 2014.
- ZAGATTO, Pedro Antonio *et al.* Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. **São Carlos: RiMa**, 2008.
- ZEBROWSKI, Marcin Lukasz *et al.* The effect of microplastics on the interspecific competition of *Daphnia*. **Environmental Pollution**, v. 313, p. 120121, 2022.
- ZHANG, Peng *et al.* Single and combined effects of microplastics and roxithromycin on *Daphnia magna*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 17010-17020, 2019.
- ZHOU, Jie *et al.* A review on the ecotoxicological effect of sulphonamides on aquatic organisms. **Toxicology Reports**, v. 9, p. 534-540, 2022.