

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

KEILA YUMI ISHII

Efeitos ecotoxicológicos de cetoconazol combinado a microplásticos virgens e  
envelhecidos em *Daphnia similis*

Lorena

2022

KEILA YUMI ISHII

Efeitos ecotoxicológicos de cetoconazol combinado a microplásticos virgens e  
envelhecidos em *Daphnia similis*

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

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina Brazil de  
Paiva

Versão Corrigida

Lorena

2022

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

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

Ishii, Keila Yumi  
Efeitos ecotoxicológicos de cetoconazol combinado  
a microplásticos virgens e envelhecidos em *Daphnia  
similis* / Keila Yumi Ishii; orientadora Teresa  
Cristina Brazil de Paiva - Versão Corrigida. -  
Lorena, 2022.  
52 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. 2022

1. Água doce. 2. Imidazol. 3. Redox. 4.  
Toxicidade. 5. Polímeros. I. Título. II. de Paiva,  
Teresa Cristina Brazil, orient.

## RESUMO

ISHII, K. Y. **Efeitos ecotoxicológicos de cetoconazol combinado a microplásticos virgens e envelhecidos em *Daphnia similis***. 2022. 52 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2022.

Atualmente muitos estudos buscam entendimento sobre a ação de agentes xenobióticos sobre organismos de ambientes aquáticos. Dentre os agentes xenobióticos estudados, os microplásticos são materiais frequentemente identificados em corpos d'água e que apresentam capacidade adsortiva e ação sinérgica toxicológica quando associados a outras espécies químicas. Os plásticos expostos às condições ambientais degradantes possuem suas propriedades físico-químicas alteradas, o que se chama de processo de envelhecimento, gerando modificações estruturais com efeitos nos fenômenos de adsorção e nos efeitos toxicológicos, conseqüentemente. Dessa forma, o presente estudo objetivou entender a relação dos efeitos toxicológicos que microplásticos de polietileno virgens (MPv) e envelhecidos (MPe) associados ou não ao fungicida cetoconazol (CTZ) podem representar para organismos aquáticos, utilizando o organismo *Daphnia similis* como modelo experimental. A composição química e morfologia superficiais dos microplásticos foram analisadas através das técnicas de FTIR-ATR e MEV, respectivamente, enquanto a toxicidade do MPv e MPe, isolados ou associados ao CTZ, foi determinada através dos biomarcadores de estresse oxidativo em *D. similis*. Foram observadas as mudanças físicas e químicas causadas pelo envelhecimento artificial do MP, obtendo-se evidências do envelhecimento do material visto o surgimento de grupos oxigenados e maior enrugamento superficial. A exposição dos MPs isolados não demonstrou danos em nenhum dos parâmetros medidos, enquanto o CTZ provocou aumento da mortalidade e mudança na resposta oxidativa. Os conjuntos de microplásticos com CTZ mostraram-se mais letais, reforçado pelas maiores atividades enzimáticas da superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) e malondialdeído (MDA). Na comparação entre o MPv e MPe associados ao CTZ, houve maior mortalidade pelo MPv + CTZ do que do MPe + CTZ, embora o segundo tenha causado maior dano oxidativo (MDA) e ativação da SOD. Foi visto que a associação entre os microplásticos e o fármaco foi mais tóxica ao organismo do que cada xenobiótico separadamente, sendo necessárias mais avaliações de comparação de danos entre os plásticos virgens e envelhecidos.

**Palavras-chave:** Água doce. Imidazol. Redox. Toxicidade. Polímeros.

## ABSTRACT

ISHII, K. Y. **Ecotoxicological effects of ketoconazole combined with virgin and aged microplastics in *Daphnia similis***. 2022. 52 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2022.

Currently, many studies seek to understand the action of xenobiotic agents on organisms in aquatic environments. Among the xenobiotic agents studied, microplastics are materials often identified in water bodies, which have adsorptive capacity and toxicological synergistic action when associated with other chemical species. Plastics exposed to degrading environmental conditions have altered physicochemical properties, which is called the aging process, generating structural changes with effects on adsorption phenomena and consequently on toxicological effects. Thus, the present study aimed to understand the relationship of toxicological effects that virgin (MPv) and aged (MPe) polyethylene microplastics, associated or not with ketoconazole (CTZ) fungicide, may represent for aquatic organisms, using the *Daphnia similis* organism as the experimental model. The chemical composition and surface morphology of the microplastics were analyzed using FTIR-ATR and SEM techniques, respectively, while the toxicity of MPv and MPe, isolated or associated with CTZ, was determined using oxidative stress biomarkers in *D. similis* under acute test. The physical and chemical changes caused by artificial aging of the MP were observed, obtaining evidence of the aging of the material, given the appearance of oxygenated groups and greater wrinkled surface. The exposition of isolated MP didn't show damage in any parameter, while CTZ induced increase of mortality and changed the oxidative response. Microplastics with CTZ were more lethal, reinforced by the higher enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) and malondialdehyde (MDA). Comparing MPv and MPe associated with CTZ, there was higher mortality by MPv + CTZ than MPe + CTZ, although the latter caused greater oxidative stress and SOD activation. It was seen that the association between microplastics and the drug was more toxic to the organism than each xenobiotic separately, requiring further evaluations to compare damage between virgin and aged plastics.

**Keywords:** Fresh water. Imidazole. Redox. Toxicity. Polymers.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Espectros de FTIR de polietilenos. ....	17
Figura 2. Iniciação da degradação de polímeros sem oxigênio. ....	19
Figura 3. Formação de grupos funcionais oxigenados. ....	19
Figura 4. Redução e beta decomposição de polímeros. ....	20
Figura 5. Representação de cross linking entre moléculas contendo ramificações. ....	20
Figura 6. Gráfico de distribuição de tamanho dos microplásticos. ....	32
Figura 7. Espectro dos microplásticos virgem e envelhecido. ....	33
Figura 8. Imagens superficiais de microplásticos por MEV. (a) e (b) PE virgem; (c) e (d) PE envelhecido. ....	34
Figura 9. Dados de mortalidade por teste agudo. . ....	35
Figura 10. Mortalidade dos tratamentos após teste agudo. ....	38
Figura 11. Atividade da superóxido dismutase (SOD). ....	40
Figura 12. Atividade da glutathione-S-transferase (GST). ....	40
Figura 13. Níveis de malondialdeído (MDA). ....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados métricos dos microplásticos. ....	31
Tabela 2. Agrupamento usando o método LSD de Fisher e confiança de 95%. ....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CE50	Concentração Efetiva: concentração da amostra que causa efeito em 50% da população amostral sob ensaio
CTZ	Cetoconazol
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FTIR-ATR	Fourier-Transform Infrared spectroscopy – Attenuated Total Reflectance
GPx	Glutathione Peroxidase
GST	Glutathione-S-transferase
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MPe	Microplástico Envelhecido
MPv	Microplástico Virgem
NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NBR	Norma Brasileira
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PE	Polietileno
PEAD	Polietileno de Alta Densidade
PEBD	Polietileno de Baixa Densidade
PELBD	Polietileno Linear de Baixa Densidade
PET	Polietileno Tereftalato
PVC	Policloreto de Vinila
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
SOD	Superóxido Dismutase
TAC	Total Antioxidant Capacity
TBA	Thiobarbituric acid
TEP	1,1,3,3-tetraetoxipropano
UV	(Radiação) Ultravioleta
UVA	(Radiação) Ultravioleta A





## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
2.1	Cetoconazol (CTZ).....	13
2.1.1	Ecotoxicidade do cetoconazol .....	14
2.2	Microplásticos (MPs).....	15
2.2.1	Microplásticos no meio ambiente .....	17
2.2.2	Mecanismos de envelhecimento dos MPs .....	19
2.2.3	Adsorção por MPv e MPe e o efeito sinérgico com xenobióticos.....	21
2.2.4	Toxicidade isolada e sinérgica de MPs.....	22
3	OBJETIVOS .....	25
3.1	Objetivo geral.....	25
3.2	Objetivos específicos .....	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
4.1	Obtenção dos MPs virgens e envelhecidos .....	26
4.2	Caracterização dos MPs .....	26
4.3	Testes toxicológicos .....	27
4.3.1	Cultivo do organismo <i>Daphnia similis</i> .....	27
4.3.2	Determinação da CE <sub>50</sub> .....	27
4.3.3	Exposição dos organismos aos xenobióticos .....	27
4.4	Análise de marcadores oxidativos.....	28
4.4.1	Superóxido dismutase (SOD) .....	28
4.4.2	Glutathione S-transferase (GST) .....	29
4.4.3	Malonaldeído (MDA) .....	30
4.5	Tratamento de dados .....	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1	Obtenção dos microplásticos virgens e envelhecidos .....	31
5.1.1	Análise de tamanho das partículas de microplástico .....	31
5.1.2	Análises em FTIR-ATR.....	32
5.1.3	Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	34
5.2	Análises toxicológicas.....	35
5.2.1	Determinação da CE <sub>50</sub> do CTZ .....	35
5.2.2	Taxa de mortalidade.....	37

5.2.3	Marcadores oxidativos .....	39
6	CONCLUSÕES .....	43
	REFERÊNCIAS .....	44

## 1 INTRODUÇÃO

O despejo indevido de materiais não reutilizáveis e substâncias químicas vem promovendo grande impacto sobre ecossistemas aquáticos, podendo implicar em efeitos adversos, como o desequilíbrio ecológico (de Carvalho et al., 2018). Sabe-se ainda que alguns desses poluentes, como fármacos, pesticidas, corantes, resíduos industriais e outros, apresentam características recalcitrantes, ou seja, são dificilmente degradados naturalmente ou não são removidos após passarem por estações de tratamento de água (Bharagava et al., 2018).

Dentre os poluentes, os micropoluentes são uma classificação daqueles encontrados na natureza em baixas concentrações ( $\text{pg.L}^{-1}$  a  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), e no entanto apresentam potencial ecotoxicológico para organismos aquáticos (Yan et al., 2018). Avaliações feitas no Rio Iguaçu, no sul do Brasil, buscaram por micropoluentes e encontraram pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e íons metálicos. A água deste rio foi testada quanto à sua toxicidade em peixe *Oreochromis niloticus* por 81 dias, e foram observadas evidências toxicológicas como lesões histopatológicas em guelra e fígado, e desregulação endócrina e reprodutiva dos peixes. Portanto, os pesquisadores apontam que a poluição orgânica e inorgânica encontrada leva à exposição de organismos locais e que tais poluentes, provenientes da região metropolitana, aumenta o risco toxicológico (Gemusse et al., 2021).

Além dos micropoluentes, outro objeto de interesse que tem recebido ênfase na área da pesquisa ambiental é o microplástico (MP) (Cera et al., 2020). A contaminação deste material é decorrente da ação residual de indústrias e produção do plástico, assim como o surgimento deste contaminante é em decorrência da degradação de plásticos maiores por razões físicas, químicas e biológicas. A fragmentação pode ocorrer por processos simples urbanos, como o desgaste de materiais utilizados diariamente, lavagem de roupas sintéticas, assim como pela ação natural da radiação UV, choques físicos e outros fatores (Shah et al., 2008; Wypych, 2020). As diversas concentrações de MPs encontradas em corpos de água doce eleva a preocupação sobre o potencial nocivo que estes apresentam sobre os organismos vivos (Adam et al., 2019). A avaliação da ingestão de MPs por organismos aquáticos mostra que o tamanho das partículas permite a permeação das partículas através dos tecidos, causando danos celulares, irregularidade reprodutiva e redução da biomassa (Bosker et al., 2019; Lehtiniemi et al., 2018).

O MP, ainda, possui a capacidade de sorção de outros poluentes concomitantes, orgânicos ou inorgânicos, e apresenta o risco de ação sinérgica toxicológica potencializada (Rainieri et al., 2018; Santos et al., 2020). O estudo de Zhang et al. (2019) mostrou que a exposição de MPs de poliestireno combinados à roxitromicina em *O. niloticus* aumentou a bioacumulação do antibiótico em vários tecidos, comparada à exposição isolada do fármaco, e provocou o aumento da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase após 14 dias.

Apesar dos MPs resistirem ao desaparecimento natural, a degradação lenta e consecutiva é irrefutável; são sujeitos ao processo de envelhecimento devido aos fatores ambientais como a exposição solar, temperaturas extremas, atividades químicas e microbiológicas (Cai et al., 2018). O envelhecimento do MP é evidenciado pelas modificações químicas e físicas superficiais, como a oxidação das cadeias poliméricas e surgimento de grupamentos oxigenados, assim como o enrugamento ou a formação de microfissuras (Ding et al., 2020; Liu et al., 2019). Tais modificações são relevantes ao processo de sorção pelo microplástico, visto que a presença de novos grupamentos químicos altera a hidrofobicidade superficial do plástico e pode aumentar ou diminuir a relação com o sorvato (Wang et al., 2020). A partir da modificação física, o enrugamento e a criação de fissuras proporcionam uma maior área superficial, a qual disponibiliza mais sítios de interação do sorvente com o sorvato (Lang et al., 2020).

A associação dos fatores de co-poluição, sorção e transporte por MPs, e envelhecimento destes, leva a investigações relacionadas à toxicidade em organismos aquáticos. Desta forma, o presente projeto buscou estabelecer a relação de toxicidade de microplásticos virgens (MPv) e microplásticos envelhecidos (MPe) isolados ou associados ao fungicida cetoconazol (CTZ) em microcrustáceos *Daphnia similis*. Foi realizada a caracterização dos MP e a determinação de biomarcadores de estresse oxidativo em *D. similis*. A adsorção do fármaco pelos MPs em ambas as condições é comparada e relacionada com as alterações químicas e físicas dos materiais. A toxicidade é observada através das atividades enzimáticas da superóxido dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST) e malondialdeído (MDA) do sistema de homeostase redox.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cetoconazol (CTZ)

A família azólica de compostos farmacêuticos possui um histórico de desenvolvimento ao longo dos anos para o tratamento de doenças fúngicas em humanos e animais, provocadas por organismos dos gêneros *Candida* e *Aspergillus*. Os azóis são classificados de acordo com características comuns de espectro de ação, características físico-químicas e efeitos observados. A primeira geração de azóis desenvolvida foi lançada no mercado entre 1969 e 1974, focando em tratamentos de aplicação tópica para doenças como dermatites, candidíases vaginais e infecções micóticas. A segunda geração é marcada pelas modificações moleculares dos azóis de primeira geração e em 1977 registrou-se o primeiro antifúngico de uso oral para infecções internas sistêmicas, o CTZ (CAS 65277-42-1). A formação da terceira geração é caracterizada pela adaptação do fluconazol e itraconazol, visando aumentar a segurança humana, espectro de ação e melhor desempenho farmacocinético. Já os azóis de quarta geração estão recentemente sendo desenvolvidos para a especificidade de ação e segurança de uso, principalmente para pacientes com condições paralelas de saúde que necessitam de vários medicamentos concomitantes (Shafiei et al., 2020).

O mecanismo de ação do cetoconazol se deve à ligação da função imidazólica ao sítio ativo das enzimas da família P-450, inibindo a desmetilação do lanosterol e sua conversão a ergosterol. A limitação de ergosterol, molécula constituinte da membrana de células fúngicas, diminui a função seletiva da membrana, danifica o mecanismo de controle osmótico e a sobrevivência celular (Venkateswarlu et al., 1998). Por muito tempo o CTZ oral foi amplamente prescrito e considerado muito eficaz, fazendo parte da lista Modelo de Medicamentos Essenciais da OMS durante a sua geração (Gupta e Lyons, 2015).

Entretanto, a falta de seletividade da ação imidazólica sobre as enzimas do complexo P-450 foi associada a efeitos colaterais adversos, principalmente de ordem hepática e hormonal (Khoza et al., 2017). A metabolização de altas concentrações de CTZ pela arilacetamida desacetilase resulta no metabólito n-acetilcetoconazol, cujo acúmulo causa morte celular hepática e provoca hepatotoxicidade irreversível (Fukami et al., 2016; Khoza et al., 2017). A alta dosagem diária diminui a concentração de colesterol LDL em pacientes sob tratamento de câncer de próstata, com a drenagem de lanosterol através da bile e fezes (Miettinen, 1988).

Com isso, a forma oral de posologia foi banida em muitos países, com imposições estritas de prescrição em casos severos de infecções sistêmicas com risco de morte (Gupta e Lyons, 2015). Hoje, somente a utilização tópica é permitida já que não apresenta efeitos colaterais equivalentes e, portanto, apresenta-se segura. No Brasil o CTZ é disponível na formulação de cremes e xampus a 2% utilizados em pele e mucosa afetadas por micoses superficiais, comumente tratando dermatite seborreica, parasitoses, dermatofitoses, tinea versicolor, entre outras doenças (Souza e Nóbrega, 2018; Staub e Bergold, 2004).

### 2.1.1 Ecotoxicidade do cetoconazol

A utilização de medicamentos contendo CTZ permite a contaminação do meio ambiente pelos resíduos antifúngicos, onde são encontrados sob a concentração que os classifica como micropoluentes (Chen e Ying, 2015). Em estações de tratamento de esgoto a concentração do fármaco foi verificada a partir de 6,7 ng.L<sup>-1</sup> na África do Sul, uma média mensal de 348 ng.L<sup>-1</sup> na Alemanha, e 143 µg.L<sup>-1</sup> em efluentes de estações na Bélgica (Assress et al., 2020; Noth et al., 2018; Steene e Lambert, 2008). Um estudo realizado nos Emirados Árabes obteve a concentração de 109 ng.L<sup>-1</sup> em amostra de afluente, e apontou que após os tratamentos primário e secundário a eficiência de remoção de CTZ variou entre 30 a 70% somente (Maraqa et al., 2020).

Dentre as respostas fisiológicas dos testes de ecotoxicidade, a avaliação do estresse oxidativo é um fenômeno comumente verificado, que ocorre pelo desbalanço entre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os mecanismos de detoxificação e reparo do organismo (Pryor, 1976; Sparling, 2016). O sistema de defesa antioxidante conta com enzimas de primeira linha que se complementam nas fases de transformação molecular das EROs em espécies mais estáveis, podendo ressaltar as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx). A SOD atua na geração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a partir do radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•</sup>), enquanto as outras agem na eliminação do peróxido de hidrogênio, transformando-o em água (Barbosa et al., 2010).

Outras atividades enzimáticas comumente avaliadas são as da glutatona-S-transferase (GST), que participa da fase II de detoxificação e excreção de xenobióticos (Shigeoka et al., 2002; Trestrail et al., 2020). Em situações que o sistema de defesa antioxidante não elimina as EROs excessivas, ocorre o dano celular através da oxidação de biomoléculas como lipídeos, proteínas e ácido desoxirribonucleico, e a geração de subprodutos permite a

detecção de estresse oxidativo, como é o caso do malondialdeído (MDA) (Ohkawa et al., 1979). Assim, os biomarcadores de defesa antioxidante e estresse oxidativo permitem conduzir interpretações dos efeitos potenciais nocivos de um determinado poluente.

Em estudos realizados em *Carassius auratus* por 14 dias, foi observado o aumento da atividade de SOD e GST quando expostos a  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  de CTZ (Liu et al., 2016). Sob efeito associado, embriões de *Danio rerio* apresentaram o aumento de espécies reativas de oxigênio. As análises dos biomarcadores mostraram a maior atividade de CAT e, principalmente, a ação de MDA como indicação de estresse oxidativo do conjunto de xenobióticos. Juntamente com as observações de má formação e nutrição dos embriões de peixe, foi verificado que a toxicidade do CTZ é relevante (Bhagat et al., 2021).

Embora sejam escassos os trabalhos de toxicidade do CTZ em organismos da família Daphniidae, o estudo recente de Prado et al. (2021) investigaram a ação do medicamento contendo o ativo cetoconazol em *D. similis*. A exposição aguda dos organismos com 7 dias de vida, no intervalo de concentração  $0,36$  a  $3,12 \mu\text{g.L}^{-1}$ , mostrou a capacidade tóxica do medicamento com a alteração das atividades enzimáticas do sistema antioxidante. Foi observada a maior expressão de CAT quando o organismo foi exposto às maiores concentrações, enquanto houve redução da atividade da GST e APX como resultado do efeito inibidor da função imidazólica da molécula.

## 2.2 Microplásticos (MPs)

Plásticos são materiais poliméricos cujas moléculas são estruturas formadas pela ligação de unidades repetitivas (meros) em série. A classificação geral dos plásticos os define como termofixos ou termoplásticos. Na síntese do plástico termofixo há o processo de cura através de catalizadores e exposição à radiação, com o objetivo de criar uma rede de cadeias reticuladas por ligações cruzadas, o que caracteriza o material rígido e durável. O grande número de ligações cruzadas impede o livre deslizamento das cadeias, tornando o polímero insolúvel e infusível; os termofixos, portanto, não podem ser remodelados. Os termoplásticos, por outro lado, são materiais passíveis de serem reciclados; são maleáveis e fluidos quando sujeitos a aumento de pressão e temperatura, e após a fusão podem tomar outros formatos (Koltzenburg et al., 2017).

Os atributos dos polímeros dependem da unidade repetitiva, do tipo de ligação covalente (estérica, amídica, ligação de éter), composição relativa dos meros (no caso de copolímeros), entre outros fatores. As unidades repetitivas possuem grupamentos químicos



laterais que promovem relações intermoleculares relevantes para o dobramento sobre a própria molécula, cuja conformação respeita o equilíbrio termodinâmico de ligações e um estado de menor energia. Assim, porções da cadeia organizam-se para formarem estruturas cristalinas e amorfas, conferindo características físicas ao polímero de acordo com o grau de cristalinidade (Canevarolo Jr., 2002).

A produção dos plásticos possui grande importância industrial e comercial dada a aplicação vasta deste material. Suas características variam em elasticidade, resistência e maleabilidade, diversificando-os em praticidade, versatilidade e custo, o que permite a ampla utilização no dia a dia moderno. A alta demanda desta *commodity* permitiu sua produção massiva na escala de 359 milhões de toneladas em 2018 para utilização como: embalagens de alimentos, cosméticos e remédios, desenvolvimento de produtos tecnológicos, agropecuários e construção civil, vestimenta e biociência, entre outros usos (Statista e Garside, 2019). Dentre os vários plásticos, o polietileno (PE) é uma das espécies mais utilizados no mundo, e no Brasil a ordem de transformados plásticos é de 6,2 milhões de toneladas, sendo cerca de 25% PE (ABIPLAST, 2019). É empregado em materiais como sacolas plásticas, embalagens de alimentos e bebidas, brinquedos, revestimentos de cabos, e polietileno de alta densidade é aplicado em materiais de maior resistência como tanques, caixas d'água, revestimentos, tonéis plásticos, entre outros.

O PE, pertencente ao grupo das poliolefinas, é obtido a partir do processamento de gás eteno. Os dois tipos estruturais mais comuns são o de alta e baixa densidade, sendo que cada um apresenta suas propriedades características de acordo com a forma que são produzidos. A polimerização ocorre pelo alongamento da cadeia através de acoplamento dos meros ao grupo da extremidade, ao qual as moléculas de eteno ligam-se covalentemente. As variadas técnicas utilizam diferentes catalizadores sob respectivas condições de polimerização. Uma técnica de polimerização bastante comum e conhecida é pela utilização de catalizadores Ziegler-Natta, um conjunto de alquil-alumínio e um sal de Ti, Ni, Co ou Zr para produzir polietileno de alta densidade (PEAD ou HDPE – *high density polyethylene*), cuja vantagem é a reação sob condições amenas de temperatura e pressão. Comparado ao método de Ziegler-Natta tem-se o mecanismo radicalar de polimerização do eteno usado para a produção de polietileno de baixa densidade (PEBD ou LDPE – *low density polyethylene*), sob temperatura de até 300 °C e pressão acima de 2000 bar; tais condições resultam no estado supercrítico do eteno (Koltzenburg et al., 2017).

O PEAD contém maior porção linear (acima de 90%), o que permite o empacotamento da cadeia e formação de regiões organizadas por forças intermoleculares

de dipolo induzido. O empacotamento resulta em um material mais denso, cujas propriedades físicas são a maior rigidez e maior temperatura de fusão, quando comparado ao polietileno de baixa densidade. Este, caracteristicamente, possui maior grau de ramificação com predominância de regiões amorfas. A menor proporção organizada resulta em um material menos resistente e com menor temperatura de fusão (Coutinho et al., 2003).

Na análise de diferenciação por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do PEAD, PEBD e polietileno de baixa densidade linear (PELBD), os mesmos sinais de absorbância indicam a similar composição química, mas com ligeira diferença de intensidades na região entre 1400 e 1300  $\text{cm}^{-1}$ , em que os picos de absorbância são referentes aos grupos ligantes  $\text{CH}_2$  e terminais  $\text{CH}_3$  (

Figura 1). Nota-se que os sinais no espectro evidenciam as diferentes concentrações de grupos químicos devido ao número característico de ramificações e alongamento de cadeia de cada amostra. Os autores do trabalho atribuíram a identificação dos tipos de polietileno de acordo com a literatura prévia, baseando-se na intensidade de cada sinal (Gulmine et al., 2002).

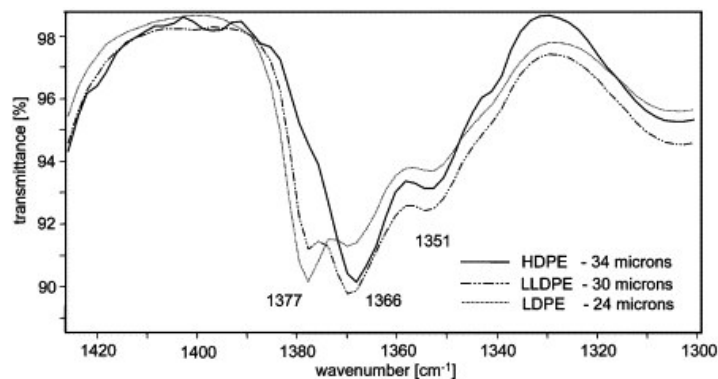


Figura 1. Espectros de FTIR de polietilenos.

### 2.2.1. Microplásticos no meio ambiente

O termo MP refere-se às pequenas partículas sólidas derivadas de polímeros sintéticos; estas variam entre 1  $\mu\text{m}$  a 5 mm, são de diversos formatos (fragmentos, fibras, filmes, microesferas, etc) e possuem origem primária ou secundária (Frias e Nash, 2019). Os MP primários são produzidos para a finalidade e utilização em tamanho micro, como as

microesferas de esfoliantes dermatológicos, e os secundários são oriundos da degradação de plásticos maiores (Cole et al., 2011). MP secundários formam-se através de atividades como: lavagem de roupas sintéticas, degradação de materiais de pesca envelhecidos, resíduos industriais e civis, e outras (Galafassi et al., 2019). A permanência e degradação dos dejetos plásticos em aterros sanitários são apontadas como uma fonte principal de surgimento a longo prazo dos particulados no solo e lixiviado, como foi relatada a presença de 17 tipos de polímeros em 12 amostras de lixiviado analisadas na China, sendo os mais abundantes o polietileno e o polipropileno (He et al., 2019). Além disso, a atuação dos microrganismos sobre os plásticos em meio ambiente contribui com a biodegradação, a qual envolve a ação de enzimas secretadas por fungos e bactérias (Ahmed et al., 2018).

Apesar de haver muita investigação sobre os MPs encontrados nos mares e oceanos, o número de pesquisas conduzidas sobre ambientes de água doce é relativamente menor (Wagner e Lambert, 2018; Yao et al., 2019). As avaliações de contaminação, entretanto, vêm gradualmente apontando a identificação dos MPs de várias composições poliméricas em amostras de água de rios, lagos, sedimentos e estações de tratamento (Baptista Neto et al., 2019; Windsor et al., 2019; Yu et al., 2019). Os tipos poliméricos mais encontrados nos ambientes aquáticos de água doce seguem a ordem polietileno/polipropileno (PE/PP) > poliestireno (PS) > cloreto de polivinila (PVC) > polietileno tereftalato (PET), o que pode ser justificado pela grande demanda, produção e consumo desses materiais globalmente (Fahrenfeld et al., 2019; Koelmans et al., 2019).

O mapeamento das fontes potenciais de MP e da contaminação de ambientes aquáticos revelou que a atividade antrópica, principalmente a urbanização e densidade populacional, estão relacionadas com as maiores concentrações relatadas (Kataoka et al., 2019). Assim, águas pluviais de áreas residenciais e industriais realizam o transporte deste contaminante através da água de precipitação para os corpos d'água (Liu et al., 2019). No caso das áreas industriais, os tipos poliméricos encontrados e concentrações dependem dos tipos de produção que circundam os leitos hídricos receptores de efluentes, como foi visto em uma avaliação de uma vasta área de produção têxtil na China, que apontou a fibra de poliéster com cerca de 95% do material identificado, visto que este é comum da produção de tecidos (Deng et al., 2020; Wong et al., 2020).

Em avaliações ambientais, a identificação dos MPs é feita pela análise visual através da microscopia óptica ou eletrônico de varredura, fazendo-se uma relação dos tipos encontrados por formato e tamanho. Traça-se também a concentração de partículas por volume de água, sendo comum a notação de partículas por metro cúbico (Scherer et al.,

2020). A composição polimérica é confirmada pela técnica espectrofotométrica de FTIR-ATR, em que a composição é caracterizada pela presença de certos grupos químicos que são representados pelos sinais no espectro. No Brasil, um estudo feito por Ferraz et al. (2020) apontou a incidência de 330,2 partículas.L<sup>-1</sup>, equivalente a 3,3 x 10<sup>5</sup> partículas.m<sup>-3</sup>, em água não processada do Rio Sinos, no Rio Grande do Sul. Na mesma região do país, na Lagoa de Patos, foi registrado 0,0846 g de MPs, variando de 14 a 2000 µm, em 400 L d'água (Silva e de Sousa, 2021). Até o momento, as avaliações ambientais em rios e outras fontes de água doce pelo mundo informam que há um intervalo de concentração entre 1 x 10<sup>-2</sup> a 10<sup>8</sup> partículas.m<sup>-3</sup> (Koelmans et al., 2019; Scherer et al., 2020).

### 2.2.2 Mecanismos de envelhecimento dos MPs

Embora o plástico seja um material resistente, é sabido que este também é alvo da degradação lenta e está sujeito a fatores ambientais como: temperatura, radiação UV, oxidação, hidrólise, ação de microrganismos e estresses mecânicos (Hüffer et al., 2018; Liu et al., 2020). Tais fatores degradantes iniciam a despolimerização e cisão das cadeias através da formação de radicais, que pode ser na presença ou ausência de oxigênio (White e Turnbull, 1994). A degradação de polímeros compreende as etapas de iniciação, propagação e interação entre ramificações. A iniciação sem oxigênio ocorre na presença de um iniciador, como mostra a Figura 2. Na presença de oxigênio, há formação de peróxidos e hidroperóxidos orgânicos, que dão origem a outros radicais mais comuns como hidroxil, carboxil e anidridos (Figura 3). Os produtos formados seguirão a reação em cadeia, chamada fase de propagação, com a formação consecutiva de radicais e a despolimerização pela β-decomposição Figura 4. Ocorrem também as ligações cruzadas entre as porções da mesma molécula ou adjacentes, novamente, na presença ou ausência de oxigênio (Figura 5) (Koltzenburg et al., 2017; Wypych, 2020).

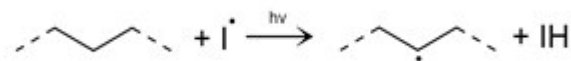


Figura 2. Iniciação da degradação de polímeros sem oxigênio.

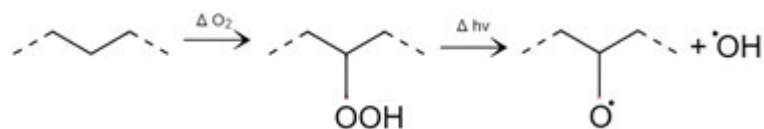


Figura 3. Formação de grupos funcionais oxigenados.

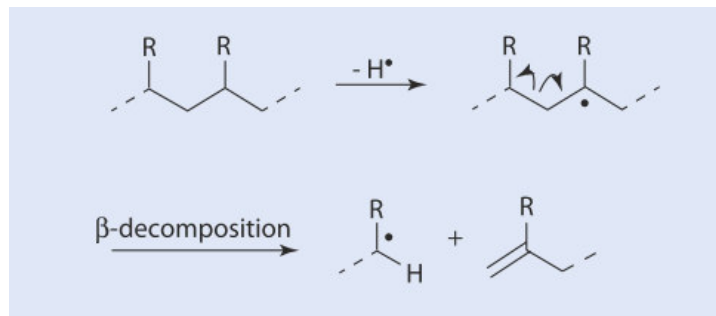


Figura 4. Redução e beta decomposição de polímeros.

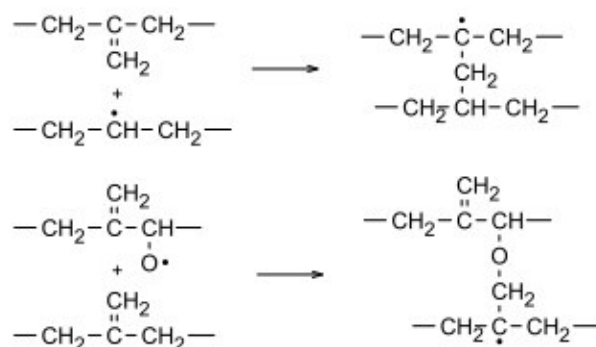


Figura 5. Representação de cross linking entre moléculas contendo ramificações.

Gulmine et al. (2003) estudaram o envelhecimento artificial de PE utilizando radiação de 340 nm e 313 nm por até 1600 h como fatores degradantes. O envelhecimento proporcionou maior densidade às amostras como consequência do aumento da cristalinidade e incorporação de oxigênio. Baseado no grau de cristalinidade, que é um parâmetro responsável por alguns aspectos físicos dos polímeros, a maior organização das cadeias de uma molécula resulta no aumento da temperatura de fusão, o que foi ressaltado pelo estudo como outro resultado da degradação. Os autores ainda observaram o aumento da dureza dos materiais tratados, justificados pelo empacotamento mais justo em escala macroscópica, sendo concomitante à aparição de microfissuras e aspecto frágil do material. Foram registradas a estabilidade térmica e resistência dos materiais contra o envelhecimento acelerado, em que PEAD > PELBD > PEBD para ambos os aspectos. O conteúdo de fase amorfa do PEBD é maior que nos outros tipos, sendo mais susceptível à degradação oxidativa e formação de ligações cruzadas, assim como a maior presença de carbonos terciários neste requer menor energia de ativação para a formação radicalar.

Muitas pesquisas na literatura abordam a degradação de diversos plásticos sob diversas condições. Um estudo feito por Arias-Villamizar e Vázquez-Morillas (2018) comparou a deterioração do polietileno de alta densidade quando exposto por seis meses à três ambientes diferentes. No estudo foi concluído que a degradação mais rápida foi em ambiente externo seco, seguido de água marinha e fluvial, a partir de evidências como formação dos grupos carbonila ( $1700\text{ cm}^{-1}$ ), evidência visual e diminuição do alongamento do material. O estudo de Cai et al. (2018) chegou à mesma conclusão, incluindo a justificativa de que o maior índice de refração da água salina modifica a intensidade da radiação que atinge a superfície dos MPs, além da disponibilidade de oxigênio no ar proporcionar a formação de grupos hidroxila ( $3300\text{ cm}^{-1}$ ) como resultado da degradação oxidativa.

No trabalho de Liu et al. (2019b) foram observados sinais de degradação em MP de poliestireno e cloreto de polivinila em apenas 96 horas de exposição à radiação UV (254 nm), novamente sendo observado o surgimento de sinais no espectro de FTIR-ATR para o grupo carbonila, hidroperóxidos e hidroxila. O tempo de degradação foi suficiente para apresentar mudança química e, conseqüentemente, mudança no padrão de comportamento referente à sorção de moléculas orgânicas.

### 2.2.3 Adsorção por MPv e MPe e o efeito sinérgico com xenobióticos

Sabe-se que os MPs possuem a capacidade de adsorver compostos orgânicos e inorgânicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, bifenilpoliclorados, ácidos perfluoroalquil, metais, produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal (Yu et al., 2020; Zhang et al., 2020). Com isso, há o risco dos particulados plásticos atuarem como vetor de transporte desses variados compostos poluentes aos organismos aquáticos através da ingestão, com a conseqüente potencialização dos efeitos tóxicos (Lee et al., 2019; Rainieri et al., 2018; Wu et al., 2016).

O fenômeno da adsorção ocorre por forças de atração químicas ou físicas, em que há o favorecimento das reações superficiais dependendo das substâncias que interagem, assim como as condições do sistema. O mecanismo de adsorção é influenciado pelas características do adsorvato (tamanho da partícula ou molécula, polaridade, solubilidade, acidez ou basicidade) e do adsorvente (área superficial, tamanho e quantidade de poro, grupos funcionais na superfície e hidrofobicidade) (Do Nascimento et al., 2014). Sendo assim, há uma forte interação entre moléculas apolares com MPs de característica

superficial apolar. Um estudo comparativo demonstrou que a sorção de carbazois polialogenados por PVC foi mais expressiva em relação ao PE e PP, já que a unidade repetitiva do PVC contém cloro, que é bastante eletronegativo, e exerce maior polaridade na molécula polimérica (Qiu et al., 2019).

O tamanho da partícula de MP, assim como a área superficial, são outras variáveis influentes no processo de adsorção e dizem respeito à disponibilidade de sítios de adsorção, para uma mesma massa de MP. A cristalinidade também atua na adsorção, em que o menor grau de cristalinidade do plástico favorece o fenômeno já que maiores porções amorfas possuem mais liberdade de movimentação e oferecem mais sítios de associação (Hüffer e Hofmann, 2016). Já a influência pela interação eletrostática se deve pela carga superficial do MP mudar de acordo com o pH da solução, causando atração ou repulsão a depender da carga do adsorvato (Guo et al., 2019).

A condição envelhecida dos MPs traz a série de propriedades dos plásticos modificada, e a comparação dos estados virgem e envelhecido mostra que tais alterações físicas e químicas afetam a taxa de adsorção (Liu et al., 2020). De acordo com Guo e Wang (2019), amostras envelhecidas de PE e PS que apresentaram o surgimento de grupos funcionais oxigenados, com bandas formadas em  $3300\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{OH}$ ) e  $1700\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ ), indicaram o aumento da polaridade superficial do plástico, e confirmaram a maior sorção de antibióticos polares. Junto a essa evidência, a clivagem de cadeia causou a formação de rachaduras, com o aumento da área superficial e maior disponibilidade de contato entre o sorbato e os plásticos. Liu et al. (2019b) realizaram a exposição de PS e PVC a radiação UV durante 96 h e relataram as bandas características de hidroxila, além da evidência visual do enrugamento da superfície e formação de microfissuras. O estudo cinético classificou a adsorção pelos envelhecidos sob o modelo de pseudo-segunda ordem, demonstrando maior capacidade de associação com o adsorvato hidrofílico.

#### 2.2.4 Toxicidade isolada e sinérgica de MPs

A toxicidade de MPs observada em organismos aquáticos possui uma ampla gama de causas, que concernem às características físicas, já que podem determinar sua biodisponibilidade e a probabilidade de serem capturados por predadores. O fator da coloração foi avaliado por Xiong et al. (2019), que observaram a maior captação de MPs pretos e verdes pelo peixe *C. auratus*, quando comparados aos de coloração vermelha, azul e branca. Adicionalmente, observaram uma preferência por MP em formato de filme em

vez de fragmentos ou filamentos. No trabalho de Lei et al. (2018), o diâmetro da partícula se mostrou um importante fator de interferência de toxicidade devido à assimilação tecidual se dar de forma relacionada ao tamanho da partícula xenobiótica e às características de absorção tecidual. No respectivo estudo houve a exposição de *D. rerio* adulto a poliestireno de diâmetros 0,1; 1,0 e 5,0  $\mu\text{m}$  durante 10 dias. Os resultados apontaram que houve maiores danos às vilosidades intestinais e quebra de enterócitos celulares com a ingestão de partículas de 1,0  $\mu\text{m}$ , comparado aos outros diâmetros. Isto se explica pela capacidade de permeação que o menor particulado possui para atravessar os tecidos e, assim, causar maiores danos.

A composição química da molécula polimérica (como as cadeias laterais com diferentes funções químicas), assim como as substâncias aditivas dos plásticos (como corantes, estabilizantes, UV protetores) são atores potenciais na geração de espécies reativas de oxigênio. A ingestão de MPs atua sobre as respostas fisiológicas de forma intra e extracelulares em espécies mamíferas e aquáticas. As reações intracelulares ocorrem quando o MP é fagocitado e a ativação do sistema imunológico acarreta a geração de espécies reativas como produto da NADPH oxidase e outras reações enzimáticas na tentativa de combater o corpo estranho. Enquanto isso, a reação extracelular conta com os danos físicos celulares, como a obstrução tecidual e ruptura de vilosidades do intestino (Hu e Palić, 2020; Trestrail et al., 2020).

Devido à capacidade adsortiva dos MPs os efeitos sinérgicos dos compostos poluentes associados são estudados considerando que há carreamento destes por MPs ao serem ingeridos por organismos (Liu et al., 2020). Na et al. (2021) utilizaram *Daphnia magna* de 4 dias de vida para a exposição aguda de dois tipos de MP: fragmentos irregulares e microesferas de PE, separados e associados ao componente filtro solar benzofenona. Os resultados de toxicidade foram expressos em valores da Concentração Efetiva Mediana ( $CE_{50}$ ) e em níveis biomoleculares como: expressões de espécies reativas de oxigênio (EROS), capacidade antioxidante total (TAC) e peroxidação lipídica por malondialdeído (LPO). Os autores constataram que a adição de benzofenona ao MP aumenta a toxicidade aguda do tratamento do que cada xenobiótico exposto separadamente. Os valores de  $CE_{50}$  dos fragmentos e da benzofenona foram 3,90 e 2,29  $\text{mg.L}^{-1}$  respectivamente, enquanto o valor de ambos, em conjunto, foi 0,99  $\text{mg.L}^{-1}$ . Os resultados subletais corroboraram com as observações da toxicidade aguda, mostrando que a concentração de MP e a presença da benzofenona aumentaram as expressões dos três parâmetros biológicos de estresse.



Um estudo sobre adsorção de fenantreno por micro e nanoplásticos observou a ingestão das partículas plásticas e o bioacúmulo do fenantreno adsorvido em *D. magna* de diferentes idades. Em termos de mortalidade e imobilidade, somente o nanoplástico de 50 nm foi capaz de apresentar uma curva significativa de mortalidade aguda, enquanto os outros plásticos (5, 10 e 15  $\mu\text{m}$ ) não apresentaram resultados devido à não ingestão pelos organismos. Pode-se destacar que a  $CE_{50}$  do nanoplástico partiu de 5,0 para 0,35  $\text{mg.L}^{-1}$  do tratamento contendo fenantreno adsorvido, e em contraste com o fenantreno adsorvido em MP, a toxicidade deste diminuiu devido à menor biodisponibilidade (Ma et al., 2016).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é verificar a toxicidade dos MPs, considerando o papel da degradação e da interação com outro contaminante, para o microcrustáceo *Daphnia similis*, a partir de respostas letais e subletais.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar e comparar as condições físicas e químicas dos MPv e MPe.
- Avaliar a toxicidade aguda do CTZ em neonatos de *D. similis*.
- Verificar a mortalidade dos tratamentos de cada xenobiótico, dos conjuntos MPv + CTZ e MPe + CTZ.
- Avaliar a atividade do sistema antioxidante do organismo *D. similis* através dos biomarcadores oxidativos SOD, GST e MDA para cada tratamento.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção dos MPs virgens e envelhecidos

Os MPs de polietileno linear de baixa densidade, doados pela empresa Valmaster – Lorena/SP, foram separados por tamisação em peneiras graduais, sendo selecionado o material retido na peneira de 170 mesh e malha anterior de 150 mesh. A amostra foi lavada três vezes utilizando água destilada, seguido por filtração a vácuo (filtro qualitativo) e secagem em estufa a 60 °C por 24 horas.

Parte da amostra foi separada para o processo de envelhecimento, baseado no trabalho de Liu et al. (2019 b). O pó de MP foi disposto em refratário de vidro e permaneceu sob radiação UV artificial (lâmpadas UVC 4 x 15 W,  $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$ ) em câmara customizada por até 456 horas. A amostra foi manipulada a cada 48 horas para garantir a exposição homogênea da radiação.

### 4.2 Caracterização dos MPs

A distribuição de tamanho de partícula foi verificada pelo analisador de partículas por difração laser Malvern Mastersizer 3000, utilizando etanol como dispersante. Para garantir a composição pura do PE e as mudanças químicas do MPE, ambas as amostras foram analisadas em equipamento FTIR-ATR Perkin Elmer Spectrum 100.

A aquisição de imagens superficiais das partículas foi feita por microscopia eletrônica de varredura (MEV – Hitachi TM3000), utilizando o recobrimento da amostra com prata, 5kV de voltagem e detector de elétrons retroespalhados.

A concentração de MPs em suspensão foi estimada com a contagem do número de partículas em uma determinada massa em determinado volume: pesou-se 0,059 g da amostra de MP e foi preparada solução de Tween 80 a 10% (v/v) em volume final de 10 mL de água destilada. Em seguida, foi adicionado 1 mL da solução em câmara de contagem Sedgewick para quantificação em microscópio óptico. O procedimento foi realizado dez vezes para a determinação do número de partículas por volume de solução, e calculou-se a concentração média em partículas por  $\text{m}^3$  (Vroom et al., 2017).

### 4.3 Testes toxicológicos

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

Os organismos foram cultivados no Laboratório de Ecotoxicidade da Escola de Engenharia de Lorena – USP. Os protocolos da norma NBR 12713/11 foram utilizados para o preparo de água reconstituída com o pH variando de 7,0 – 7,6, dureza entre 40 e 48 mg L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> e fotoperíodo de 16/8 horas de luz e escuridão, respectivamente (ABNT, 2016). Diariamente, os organismos *D. similis* foram alimentados com microalgas *Raphidocelis subcapitata* (1x10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup>) e alimento composto fermentado (1 mL L<sup>-1</sup>), este preparado com ração para trutas Tetramin® (5 g L<sup>-1</sup>) e extrato de levedura *Saccharomyces cereviseae* (1 g L<sup>-1</sup>).

#### 4.3.2 Determinação da CE<sub>50</sub>

A solução estoque de cetoconazol de padrão analítico (Sigma-Aldrich, CAS: 65277-42-1) foi preparada em metanol (99,9%, grade HPLC, J.T. Baker, Fisher Scientific) na concentração de 20 mg mL<sup>-1</sup>. Vistos os resultados preliminares de toxicidade, a concentração da solução estoque foi determinada para que a concentração de metanol nos ensaios finais não ultrapassasse 0,1 mL L<sup>-1</sup> de acordo com a OECD n° 211 (OECD, 2012).

Para determinar a CE<sub>50</sub>, seguindo as diretrizes da NBR 12713/11, foram realizados os ensaios toxicológicos utilizando neonatos de 6 a 24 horas de vida, expostos 20 organismos por tratamento, divididos em quatro repetições por 48 h, sob temperatura controlada (22±1 °C) e fotoperíodo ajustado (16 h claro/8 h escuro). As concentrações de cetoconazol usadas foram 100; 250; 500; 1000 e 2000 µg.L<sup>-1</sup>, sendo a solução estoque diluída 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.

#### 4.3.3 Exposição dos organismos aos xenobióticos

A exposição do microcrustáceo aos xenobióticos seguiu os seguintes tratamentos: cetoconazol, MP virgem, MP envelhecido, CTZ + MP virgem, CTZ + MP envelhecido e grupo controle (apenas água reconstituída). Utilizou-se a concentração CE<sub>20</sub> para o CTZ,

determinada a partir do teste agudo, e a concentração de microplástico foi de  $10^9$  partículas.m<sup>-3</sup> (0,02706 g do material), baseando-se em concentrações encontradas em avaliações ambientais (Scherer et al., 2020).

De acordo com a metodologia de Prado et al. (2021), foram isolados cerca de 300 neonatos para cada tratamento, alocados em recipiente de 1,5 L contendo água reconstituída, e alimentados diariamente até completarem 7 dias de vida. Em triplicata, 40 indivíduos foram expostos aos tratamentos e mantidos até 48 horas de experimento. Ao final, os organismos foram transferidos para tubos cônicos com tampa e levados à eutanásia em banho frio ( $2\pm 2$  °C) por 40 min. Os tubos foram centrifugados a 2.000 rpm durante 10 min a 4 °C para remoção do sobrenadante. Adicionou-se 0,6 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,4) para maceração dos organismos com o auxílio de um bastão de vidro. Os tubos foram centrifugados 4 vezes a 3.000 rpm por 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para as reações dos biomarcadores.

A concentração de proteína foi determinada de acordo com o ensaio de Bradford (1976): utilizou-se albumina de soro bovino (BSA) em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5 de 100 mg.mL<sup>-1</sup> e diluiu-se para obter as concentrações em µg.mL<sup>-1</sup> (0; 0,195; 0,781 ; 1,562; 3,125; 6,25; 12,5; 25,0) no volume de 10 µL para construção da curva padrão. Dissolveu-se 100 mg de corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de metanol a 95% adicionado a 100 ml de ácido fosfórico a 85% (p/v), completado para volume final de 1 L. O ensaio de proteína das amostras levou 990 µL do reagente de Bradford e 10 µL do homogenato e, aguardados 5 minutos para estabilização da solução, foi feita a leitura da absorbância em 595 nm em espectrofotômetro Kasvi K37-UVVIS. As concentrações de proteína foram utilizadas como referência para os cálculos das análises enzimáticas oxidativas.

#### 4.4 Análise de marcadores oxidativos

##### 4.4.1 Superóxido dismutase (SOD)

A avaliação da atividade da SOD será feita através do método descrito por S. Marklund e G. Marklund (1974). Em microtubo de 2 mL foram acrescentados 60 µL da amostra (homogenato) e 1327 µL de tampão tris-EDTA, passando por homogeneização durante 30 segundos. Foram adicionados 75 µL da solução de pirogalol (0,039 g em 20 mL de água destilada) e homogeneizados por mais 30 segundos. As amostras passaram por

incubação no escuro por 30 minutos e a reação foi interrompida com adição de 37  $\mu\text{L}$  de HCl 1M. As alíquotas foram retiradas (700  $\mu\text{L}$ ) para leitura em espectrofotômetro a 420 nm, em cubetas de quartzo. A solução de branco foi preparada seguindo a descrição anterior, porém o homogenato foi substituído pelo tampão fosfato de potássio. O controle foi preparado passando por todas as etapas descritas, menos o processo de incubação por 30 min.

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

$$\text{Atividade de SOD} = ((\text{Abs } a \times 100 / \text{Abs controle}) / 50) \times 1000 / \text{proteína} \quad (1)$$

Onde: Abs a é a absorvância da amostra; 100 é o fator de porcentagem; 50 fator de inibição de 50% de atividade enzimática; 1000 é o fator de conversão ( $\mu\text{g}$  para mg); proteína a concentração de proteína em  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

#### 4.4.2 Glutathione S-transferase (GST)

A determinação da atividade da GST ocorreu através da metodologia adaptada por Prado et al. (2021). O ensaio foi preparado utilizando a solução mix constituída de glutathione reduzida (GSH, Sigma-Aldrich) (9,5 mM em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,5) e substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, Sigma-Aldrich) (1 mM diluído em metanol). A solução mix foi preparada apenas no momento da realização das análises, com período de ação de apenas 2 h. O tampão fosfato de potássio 100 mM foi preparado 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), com adição de EDTA (1 mM) e avolumados para 1 L de água destilada. Os ensaios foram conduzidos pela utilização do tampão e solução mix, na proporção 1:1 (v/v) e adição de 10  $\mu\text{L}$  do homogenato. A mesma proporção da amostra branco foi seguida, com a adição de 10  $\mu\text{L}$  do homogenato ao invés da água destilada. O mix de soluções foi preparado até 2 horas antes da reação e todo o processo foi realizado em ambiente climatizado a 18 °C no escuro.

A leitura da reação foi medida em espectrofotômetro a 340 nm, e a atividade da GST foi calculada de acordo com a Equação 2, através do aumento da absorvância pelo consumo da solução CDBN-GSH e formação do conjugado S-2,4-dinitrofenil.

$$\text{Atividade de GST} = \{[(A) / (C \times 9.6)] \times 100\} / (\text{proteína} \times C) \times 1000 \quad (2)$$

Onde: A representa a variação da absorvância dividida pelo tempo de análise (min); C é o caminho óptico ( $\text{cm}^{-1}$ ); 9,6 o fator de extinção molar ( $\text{mM cm}^{-1}$ ); 100 o fator de diluição da amostra; proteína a

concentração da proteína ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); C é a concentração de proteína adicionada ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); 1000 é o fator equivalente a  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

#### 4.4.3 Malonaldeído (MDA)

A atividade de MDA foi determinada pela reação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um índice de peroxidação lipídica, avaliado pelo método de reação do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) como definido por Campos et al. (2014). A mistura de reação foi preparada a partir da adição de 0,5 mL de homogenato e 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,4% mM (diluído em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 2,5). As amostras foram aquecidas a 96 °C durante 40 min em banho-maria. Em seguida, as amostras passaram por resfriamento em banho de gelo e então centrifugadas a 3.000 rpm durante 5 min. Os sobrenadantes foram lidos a 532 nm em espectrofotômetro para quantificação das concentrações de MDA. Para o branco, foram preparados tubos contendo 1 mL TBA e 0,5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,4. O mesmo processo foi realizado para o controle padrão, sendo adicionado 0,5 mL de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) 4,57 mM e 1 mL de TBA 0,4%. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de MDA formado ao longo de 30 min de reação, calculada pela Equação 3.

$$\text{Atividade de MDA} = \text{Abs } a \times (4,57 \times \text{MM} / \text{Abs padrão}) \quad (3)$$

Onde: Abs a é a absorvância da amostra; 20 é a concentração em mM de MDA padrão; MM é a massa molecular do MDA e Abs padrão é a absorvância do padrão MDA.

#### 4.5 Tratamento de dados

Os testes toxicológicos foram analisados através do programa estatístico Minitab® 19, empregando delineamento das curvas para teste ecotoxicológicos. As diferenças estatísticas foram realizadas pela análise one-way ANOVA seguida por teste de Dunnett. Os parâmetros toxicológicos foram obtidos utilizando análise de Probit e teste de Fisher, adicionando o desvio padrão, com confiabilidade de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção dos microplásticos virgens e envelhecidos

A contagem do número de partículas resultou em uma concentração de  $2,18 \times 10^9$  partículas. $m^{-3}$ . A massa aproximada de 0,0059 g em 10 mL levou à relação de  $3,6949 \times 10^6$  partículas por grama de amostra.

#### 5.1.1 Análise de tamanho das partículas de microplástico

Os resultados métricos dados pela análise em equipamento Mastersizer 3000 são apresentados em um compilado de acordo com a Tabela 1. A uniformidade é uma medida do desvio absoluto da mediana, a área superficial específica é a área total das partículas dividida pela massa da amostra, os parâmetros D[3;2] e D[4;3] são a média ponderada do volume e da superfície, respectivamente. Já Dx (10), Dx (50) e Dx (90) representam 10, 50 e 90% da amostra que se encontra abaixo dos respectivos valores resultantes. As amostras virgem e envelhecida apresentaram o Dx (90) com valores muito próximos, com um leve aumento de diâmetro do particulado envelhecido. De acordo com o gráfico de distribuição de tamanho, cerca de 53% do MPv possui entre 67 a 86  $\mu m$  de diâmetro, enquanto 54% do MPe encontra-se entre 67 e 98  $\mu m$ .

Considerando que a porção de MPe pertence à mesma população que MPv, é possível considerar que a mudança química do MPe, com a formação superficial de grupamentos oxigenados, aumentou a afinidade pelo líquido dispersor (etanol), e causou uma leve alteração na análise de tamanho.

Tabela 1. Resultados métricos dos microplásticos.

Parâmetros	Amostras	
	MP virgem	MP envelhecido
Uniformidade	0,218	0,208
Área superficial específica ( $m^2/kg$ )	58,84	55,85
D [3;2] ( $\mu m$ )	102	107
D [4;3] ( $\mu m$ )	109	115
Dx (10) ( $\mu m$ )	62	67
Dx (50) ( $\mu m$ )	84,3	90,5



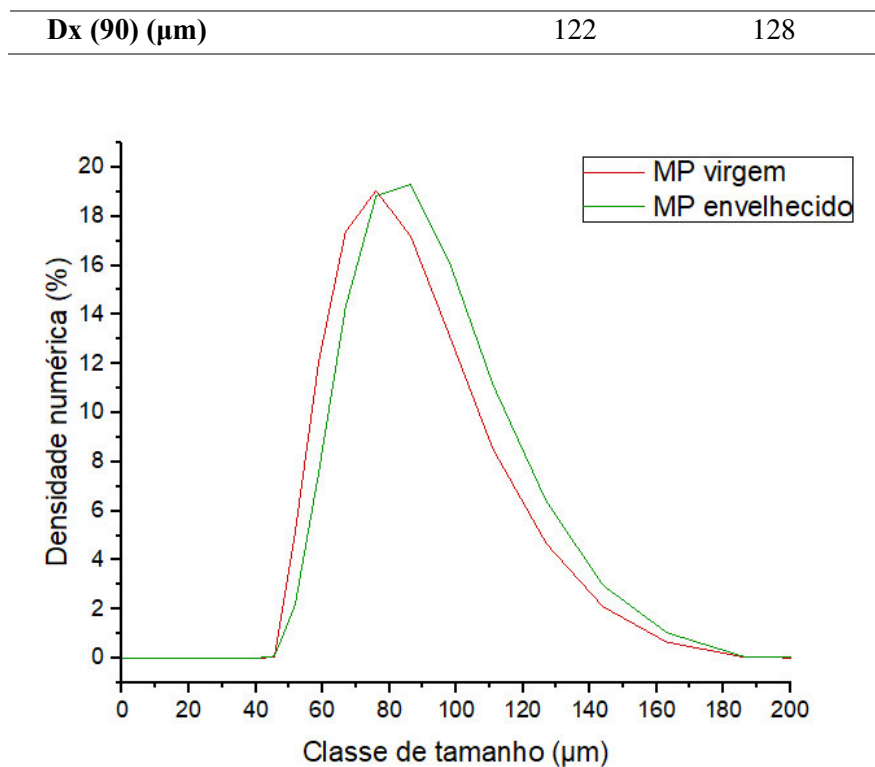


Figura 6. Gráfico de distribuição de tamanho dos microplásticos.

### 5.1.2 Análises em FTIR-ATR

A partir das análises por FTIR-ATR, buscou-se os sinais típicos do polietileno linear de baixa densidade, assim como foi verificada a ausência de impurezas e outros constituintes químicos. Foram encontrados os sinais típicos para uma amostra de polietileno, como os fortes sinais em 2916 e 2849  $\text{cm}^{-1}$ , que representam a alta expressão dos estiramentos de  $\text{CH}_2$  simétrico e assimétrico, e indicam a predominância da cadeia simples saturada. Da mesma forma, o sinal forte em 1463  $\text{cm}^{-1}$  representa o dobramento tesoura e o sinal em 718  $\text{cm}^{-1}$  representa o padrão de vibração de balanço do grupo  $\text{CH}_2$ , e suas altas expressões condizem com a composição métrica do polietileno (Gulmine et al., 2002).

A Figura 7 mostra os espectros das amostras nas condições virgem e envelhecida, em que é possível verificar os sinais típicos de polietileno citados previamente. A comparação das amostras mostra o surgimento de sinais nas regiões de 3697, 1713 e 1099 a 1009  $\text{cm}^{-1}$  no espectro da amostra envelhecida. De acordo com a literatura, após o tratamento do microplástico com radiação UV, é comum a formação de grupos oxigenados superficiais, como muitos trabalhos citam a formação de carbonila e o surgimento ou aumento do sinal

por volta de  $1700\text{ cm}^{-1}$  (Cai et al., 2018; Gulmine et al., 2003). As espécies de carbonila podem ser formadas variadamente como  $\gamma$ -lactonas ( $1780\text{ cm}^{-1}$ ), ésteres e/ou aldeídos ( $1733\text{ cm}^{-1}$ ), cetonas ( $1714\text{ cm}^{-1}$ ) e ácidos carboxílicos ( $1700\text{ cm}^{-1}$ ), e nesta avaliação o sinal de carbonila em  $1713\text{ cm}^{-1}$  pode indicar a formação de grupos funcionais cetona, assim como já mencionado por outros autores (Almond et al., 2020; Wypych, 2020).

A identificação dos sinais por volta de  $1100\text{ cm}^{-1}$  leva à suposição de incorporação de moléculas de oxigênio na cadeia principal do polietileno, já que essa região de absorbância no espectro representa as vibrações de C-O, e podem estas terem sido agregadas durante o tratamento pelas ligações cruzadas (Abdul Majeed et al., 2006; Baruah et al., 2019). Já o sinal em  $3697\text{ cm}^{-1}$  poderia ser associado à presença de hidroxila na amostra envelhecida, entretanto, o baixo sinal não corresponde à característica de um sinal largo e forte, como ocorre com referências em que é sabido a presença do grupo. De forma simplificada, o espectro do MPE mostra modificações químicas evidentes da formação de grupos oxigenados superficiais ao ser comparado com o MPv.

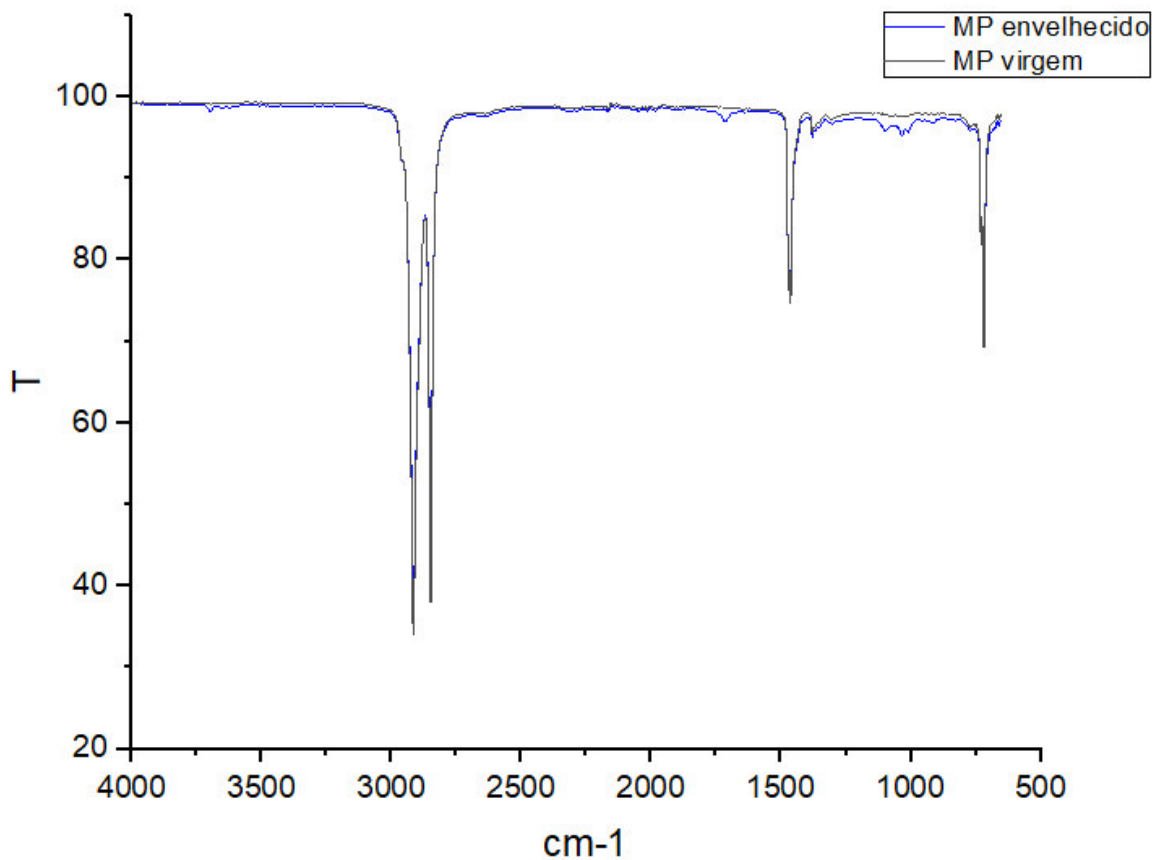


Figura 7. Espectro dos microplásticos virgem e envelhecido.

### 5.1.3 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens obtidas da superfície do MPv e MPe são apresentadas na Figura 8. Ao comparar o material tratado com o não tratado, é possível observar o maior enrugamento no particulado envelhecido, após 456 horas de exposição à radiação UV, assim como muitos outros trabalhos com polímeros sob tratamento com radiação (Liu et al., 2019). O mesmo resultado foi encontrado por vários pesquisadores que investigaram a condição degradada por radiação, às vezes encontrando, inclusive, microfissuras que se formam com a maior rigidez do plástico e despolimerização (Ding et al., 2020; Liu et al., 2019; Wang et al., 2020). Como consequência da formação superficial de rugas e fissuras em PET, tratados por até 500 horas com radiação UVA (313nm), foi verificada a contribuição para a maior adsorção de íons metálicos de cobre e zinco, já que houve promoção de maior área superficial (Wang et al., 2020).

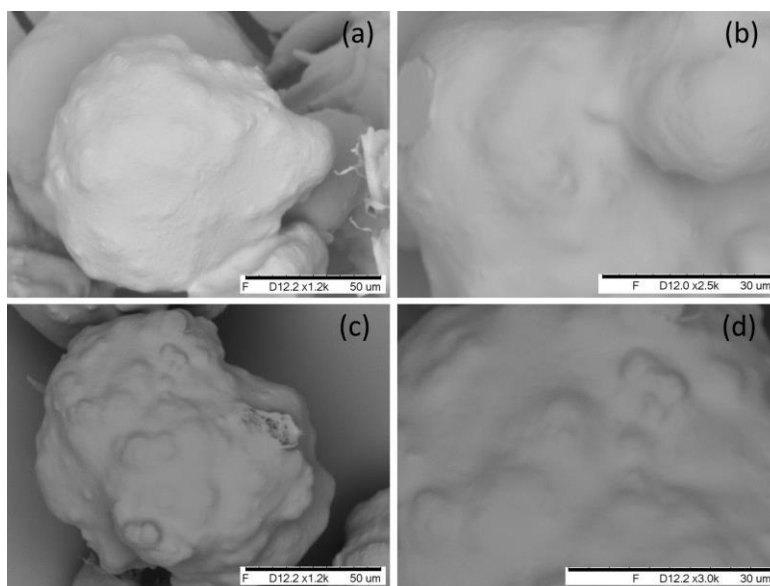


Figura 8. Imagens superficiais de microplásticos por MEV. (a) e (b) PE virgem; (c) e (d) PE envelhecido.

Embora as imagens de MEV indiquem um aumento da área superficial, os dados do analisador de partículas mostraram menor área superficial específica do envelhecido. Entretanto, é possível aferir que a degradação oxidativa do plástico, ao promover a incorporação de grupos oxigenados, alterou levemente a interação com o líquido dispersor do analisador de partículas, levando a uma pequena distorção numérica dos resultados. Outra possibilidade de explicação seria o tipo de enrugamento formado na superfície do

plástico e associar essas irregularidades com o aumento aparente do diâmetro médio da partícula, o que afeta diretamente a área específica deste.

## 5.2 Análises toxicológicas

### 5.2.1 Determinação da $CE_{50}$ do CTZ

Os valores das concentrações efetivas para cada porção da população foram determinados a partir do cálculo estatístico por Probit. A concentração do solvente utilizado para a solução de CTZ foi até o limite determinado pela OECD (2012) de  $0,1 \text{ mL.L}^{-1}$ . A  $CE_{50}$  do CTZ em neonatos de *D. similis* foi calculada em  $1910 \mu\text{g.L}^{-1}$ , enquanto o resultado de  $CE_{20}$  foi de  $985,514 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

A curva de efeito do CTZ, obtida pelo teste agudo com os neonatos de *D. similis*, é mostrada na Figura 9 em que se nota a tendência de crescimento da porcentagem de morte com o aumento da concentração de exposição e, no entanto, não foi possível realizar a exposição em que houve 100% de morte. A comparação de médias por teste de Fisher resultou que apenas o tratamento de  $2000 \mu\text{g.L}^{-1}$  é estatisticamente diferente do controle (Tabela 2).

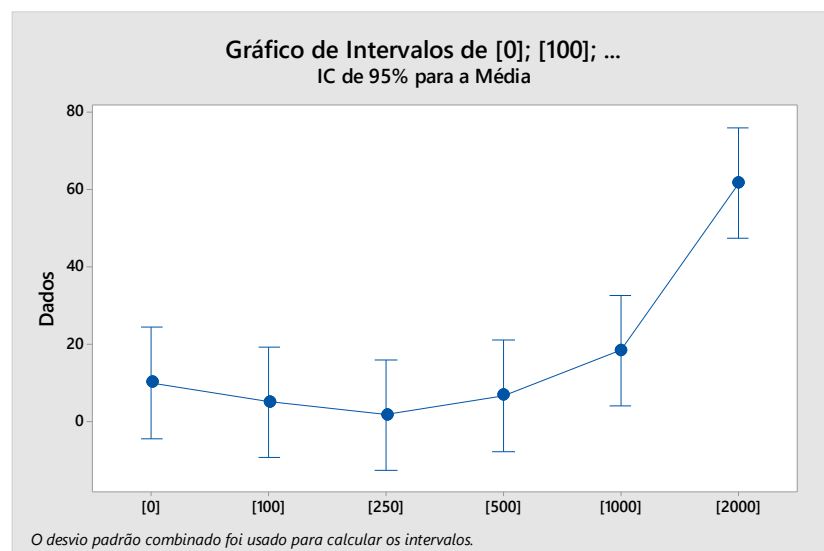


Figura 9. Dados de mortalidade por teste agudo.

Tabela 2. Agrupamento usando o método LSD de Fisher e confiança de 95%.

<b>Concentração (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Agrupamento</b>
<b>0</b>	3	10,00	B
<b>100</b>	3	5,00	B
<b>250</b>	3	1,67	B
<b>500</b>	3	6,67	B
<b>1000</b>	3	18,33	B
<b>2000</b>	3	61,7	A

O valor da  $CE_{20}$  obtido foi escolhido como concentração de exposição aguda pois propõe-se em não causar decaimento da população e perda dos organismos como amostra para análise enzimática dos bioindicadores oxidativos. Visto a utilização das  $CE_{10}$  e  $CE_{20}$  para a realização de avaliações de risco, estes valores são considerados apropriados. Em testes crônicos, essas concentrações são altas o suficiente para causar efeitos consideráveis, enquanto são baixas o suficiente para proteger a população (Beasley et al., 2015).

A determinação da  $CE_{50}$  de um contaminante é um parâmetro toxicológico relevante a ser obtido, já que reflete em efeito danoso efetivo sobre uma parcela da população de um determinado organismo. Para cada substância danosa a ser estudada, tal indicador de toxicologia aguda varia em função do organismo, da fase de vida em que é feita a exposição, do tempo de ensaio, assim como das condições do meio, como as propriedades físicas e químicas do cultivo, ou a presença de outras substâncias nocivas. Sabe-se que quanto menor o valor deste, maior é a capacidade tóxica da substância para o organismo. Assim, a partir da comparação da  $CE_{50}$ , é possível determinar as condições que tornam o composto xenobiótico nocivo e quais parâmetros são mais influentes durante o teste (Costa et al., 2008).

O trabalho de do Prado et al. (2021) determina a  $CE_{50}$  do produto farmacêutico que contém CTZ em  $4,33 \mu\text{g.L}^{-1}$ . A maior solubilidade do composto comercial, proporcionada pela presença de excipientes na sua formulação, torna o fármaco mais biodisponível e, conseqüentemente, mais tóxico. De acordo com o resultado obtido por este trabalho, o fármaco puro mostrou-se menos tóxico que o ativo contido em formulações comerciais para *D. similis*, sendo possível considerar que ativos muito hidrofóbicos podem ter maior tempo para atingir a capacidade tóxica real, visto a dependência do alcance do equilíbrio da concentração da substância dentro e fora do organismo (Vaal et al., 1997). Resultados semelhantes foram observados com o ativo inseticida imidacloprido puro em comparação

com a sua versão comercial, sendo a formulação comercial mais tóxica para *D. magna* (Jemec et al., 2007).

No estudo de Haeba et al. (2008), em que foi feita a exposição de CTZ em *D. magna*, encontrou-se a CE<sub>50</sub> a 1,51 mg.L<sup>-1</sup>, resultado próximo ao encontrado neste trabalho. Os mesmos autores relataram que até a concentração de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> não houve efeitos significativos para os outros parâmetros de toxicidade medidos (maturação, reprodução, muda, tamanho dos organismos). Outros ativos azólicos foram testados para a *D. magna*, sendo relatadas as CE<sub>50</sub> em 5,143 mg.L<sup>-1</sup> para clotrimazol e 1,168 mg.L<sup>-1</sup> para oxfendazol (Oh et al., 2006; Vieira et al., 2019a). É possível relacionar a toxicidade de outros ativos azólicos puros, que se aproximam à do CTZ, considerando o mecanismo de ação dos antifúngicos sobre as enzimas do complexo P-450 e a inibição da conversão do lanosterol em ergosterol.

### 5.2.2 Taxa de mortalidade

A mortalidade dos organismos de 7 dias de vida, após a exposição de 48 horas a todos os tratamentos, foi registrada e é apresentada na Figura 11. Pode-se observar que a taxa de ambos os MPs, expostos separadamente, comparam-se ao controle, não apresentando, portanto, efeito letal para os organismos. O mesmo resultado foi visto em outros estudos, em que a ingestão de partículas de até 75 µm por *D. magna* adultos não apresentam sinais claros de letalidade, e que neonatos são cerca de 50% mais sensíveis do que adultos (Canniff e Hoang, 2018; De Felice et al., 2019; Sayed e Bøhn, 2019).

O trabalho de Rehse et al. (2016) compara os efeitos de MP de polietileno de duas classes de diâmetro em *D. magna* e conclui que os neonatos não são capazes de ingerir as partículas de intervalo de 100 µm, sendo razão da falta de efeito observável. Em contrapartida, as partículas dentro do intervalo de 1 µm são internalizadas e há uma relação entre o tempo de exposição com a taxa de imobilização. Foi visto que até 48 horas de exposição não houve imobilização que excedesse 10% da população, que apenas com 72 horas de teste obtiveram resultados significativos, e que apenas com 96 horas foi possível obter a CE<sub>50</sub>.

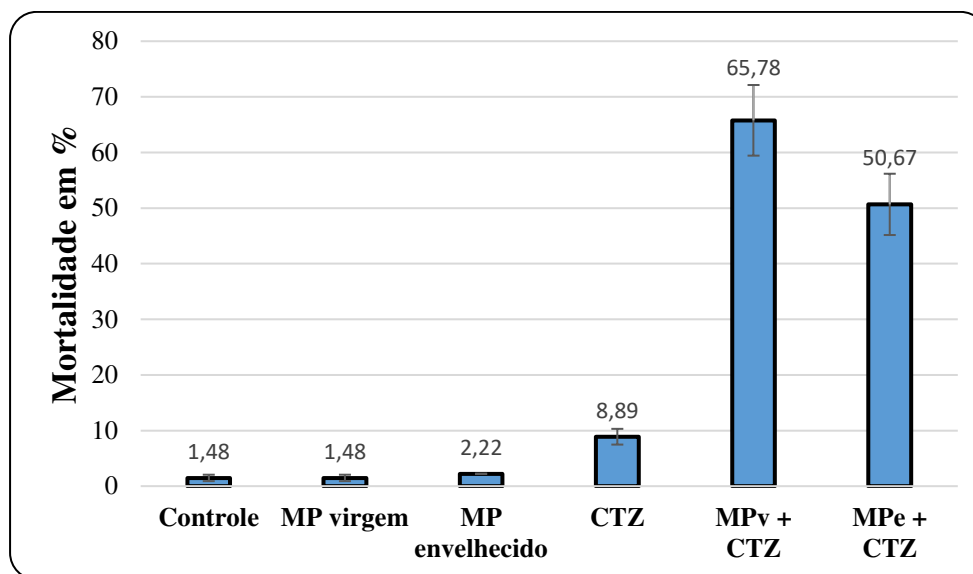


Figura 10. Mortalidade dos tratamentos após teste agudo.

O CTZ, no entanto, apresentou maior mortalidade da população, sendo estatisticamente diferente do controle. O efeito deste, porém, não ultrapassa a marca de 20%, que é a porção estimada de mortalidade pela concentração utilizada de  $985,514 \mu\text{g.L}^{-1}$  referente à  $\text{CE}_{20}$  obtida nos testes agudos com os neonatos da espécie. Esta observação é válida a ser confirmada, uma vez que os efeitos causados por uma substância dependem de fatores pertinentes ao organismo, como a fase de vida durante os ensaios toxicológicos (Costa et al., 2008). Vários trabalhos utilizaram o organismo *D. magna* com 4 a 9 dias de vida para a exposição aguda de xenobióticos por diversos motivos, tanto pelo ciclo de vida, quanto pela biomassa, ou pela identificação facilitada dos danos toxicológicos (Colomer et al., 2019; Sayed e Bøhn, 2019; Silva et al., 2015).

A mortalidade dos tratamentos conjuntos de microplásticos com CTZ foram significativamente maiores do que o controle negativo e os tratamentos isolados para cada xenobiótico. Esta evidência salienta a ação sinérgica provocada pela interação das partículas poliméricas e o fármaco devido à relação de adsorção pelos plásticos. Kokalj et al. (2018) constataram a presença de microplásticos no intestino de neonatos de *D. magna*, quando expostos a partículas de intervalo de 20 a 250  $\mu\text{m}$ , trazendo a evidência de que é possível inferir a ingestão dos microplásticos com cetoconazol pela *D. similis*. Desta forma, a maior mortalidade observada por estes tratamentos, é uma evidência do carreamento do fármaco para dentro do organismo a partir dos microplásticos.

Estudos de cinética e isoterma de diversos compostos orgânicos e inorgânicos confirmam a associação a microplásticos, enquanto estudos biológicos apontam a bioacumulação nos tecidos de organismos aquáticos, promovida pela ingestão dos microplásticos contaminados (Qiu et al., 2019; Wu et al., 2016; Zhang et al., 2019). Foi visto por Yuan et al. (2020) que maiores concentrações de microplásticos menores (3 a 12  $\mu\text{m}$ ) associados a íons metálicos causaram maiores danos em *D. magna* do que as mesmas concentrações de microplásticos maiores (35 a 65  $\mu\text{m}$ ) com os mesmos metais, enquanto baixas concentrações dos microplásticos contaminados diminuiram a toxicidade. Este trabalho elucidou como a adsorção dos co-poluentes podem afetar a toxicidade da exposição combinada, em que a associação pode ser uma via de menor biodisponibilidade do xenobiótico adsorvido, mas que quando a ingestão das partículas é favorecida, pode elevar o carreamento, e conseqüentemente elevar a toxicidade.

### 5.2.3 Marcadores oxidativos

Na avaliação da toxicidade dos tratamentos pelos bioindicadores enzimáticos, os dados mostrados nas Figuras 11, 12 e 13 são referentes aos resultados da SOD, GST e MDA, respectivamente. Os marcadores oxidativos são parâmetros toxicológicos que indicam a ativação do sistema de proteção redox do organismo contra a ação de um xenobiótico. Sendo assim, na análise dos marcadores para o MPv, pode-se observar que não houve mudança significativa na expressão de SOD, GST ou MDA. Como visto anteriormente, de acordo com os demais trabalhos citados, os danos não observados na exposição de microplásticos aos microcrustáceos são relacionáveis à falta de efeitos observados no presente trabalho, em que os níveis de GST e MDA também se igualaram ao controle. Foi constatado que a exposição de MP  $\mu\text{m}$  causou o aumento da CAT e GST, mas manutenção da SOD e MDA, ou seja, não houve estresse oxidativo efetivo, já que não afetou os níveis de MDA (Zhang et al. 2019).



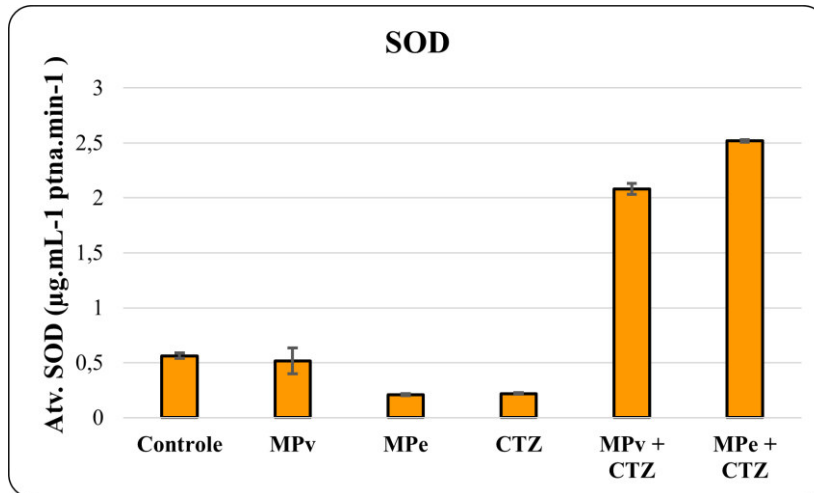


Figura 11. Atividade da superóxido dismutase (SOD).

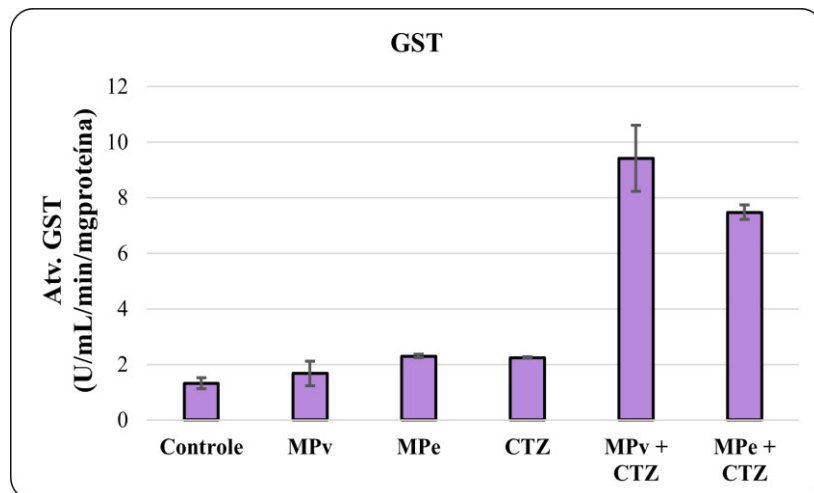


Figura 12. Atividade da glutatona-S-transferase (GST).

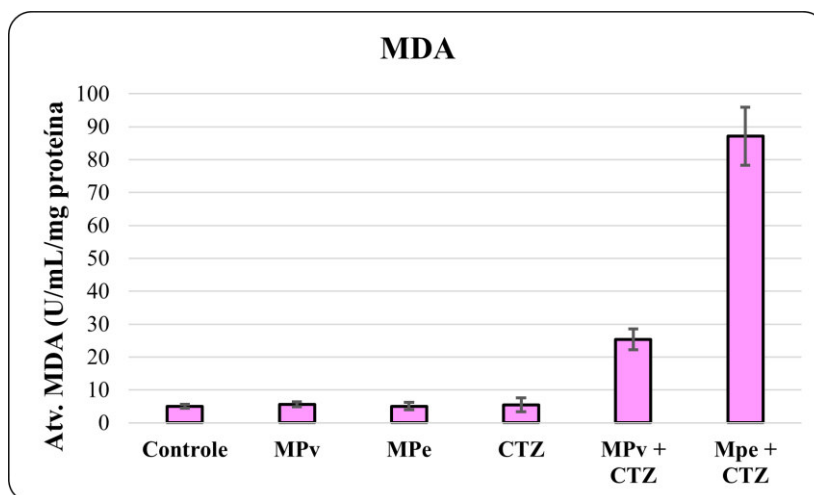


Figura 13. Níveis de malondialdeído (MDA).

O efeito causado pelo MPe, no entanto, diminuiu a concentração de SOD, enquanto manteve a GST e o MDA. A ligeira mudança na demanda da SOD pode ser relacionada à presença de grupos oxigenados e radicais na superfície do MPe, como verificado neste mesmo trabalho. Considerando a ingestão das partículas, esta característica envelhecida superficial pode estar induzindo a formação de espécies radicalares e a ativação de defesa para a homeostase redox, embora não tenha ocorrido danos celulares ou alteração na mortalidade de forma efetiva (Trestrail et al., 2020).

A exposição do cetoconazol ocasionou menor atividade da SOD, em conjunto com o aumento da mortalidade. Conforme a revisão de literatura, poucos trabalhos abordam o estresse oxidativo pelo CTZ em dafinídeos, sendo possível relacionar os presentes resultados com trabalhos envolvendo outros compostos azólicos, visto a similaridade química e o mesmo mecanismo de ação antifúngica. Prado et al. (2021) expuseram *D. similis* ao CTZ comercial e constataram menor atividade da GST e APX, e aumento da CAT, enquanto Vieira et al. (2019b) verificaram que a ação de clotrimazol em *D. magna* causou o aumento da CAT e GST. Estes estudos ajudam a entender o potencial efeito nocivo de ativos azólicos sobre organismos dafinídeos, sendo ainda sustentados pelas evidências de danos em outros aspectos (reprodutivos, nutritivos e de expressão gênica) pela modificação da atividade das isoenzimas do complexo P-450 (Ferreira et al., 2022).

A partir dos dados obtidos, foi observado o aumento da toxicidade dos MPs expostos em conjunto com o CTZ em *D. similis*, visto às maiores expressões de biomarcadores aliado à maior mortalidade dos tratamentos. O sinergismo, tanto do MPv quanto do MPe com o CTZ, foi altamente expresso pelos parâmetros de danos e pode ser relacionado à associação dos MPs com o fármaco pela adsorção. Considerando a ingestão dos particulados, a evidência toxicológica informa que houve o carreamento do fármaco para dentro dos organismos. A concentração de MP foi favorável para a internalização e a ingestão de maiores concentrações de CTZ, ao invés de haver a retirada do meio e minimizar a toxicidade, como já foi relatado por outros autores (Horton et al., 2018).

Ao comparar os resultados dos conjuntos entre o MPv e o MPe, foi considerada a caracterização física e química, e o surgimento de grupamentos oxigenados superficiais no MPe. A partir deste dado, é possível assumir a menor hidrofobicidade relativa do MPe, provocada pela ligeira mudança de carga da superfície, e resulta em menor compatibilidade com o CTZ (Llorca et al., 2018). Visto à distinta configuração das expressões enzimáticas

dos conjuntos, em que houve menor SOD, maior GST e menor MDA pelo MPv, pode-se supor menor carreamento de CTZ para o organismo pelo conjunto MPv + CTZ.

De forma similar, Zhang et al. (2019) realizaram o estudo de roxitromicina e MP em *D. magna*, utilizando concentrações subletais dos xenobióticos, isoladamente e em conjunto. Resultados similares foram encontrados, em que houve maior toxicidade dos tratamentos conjuntos, representados pela maior expressão dos biomarcadores oxidativos, com o aumento da SOD e CAT, principalmente. Os autores propõem o maior acúmulo do antibiótico pela adsorção no MP.

## 6 CONCLUSÕES

Foi possível verificar que o envelhecimento artificial através da radiação UV durante 456 horas foi suficiente para provocar as mudanças físicas e químicas nos microplásticos. A evidência da modificação química foi observada pela diferença na intensidade de absorção em alguns sinais do espectro de FTIR, principalmente na região de 1700 a 1730  $\text{cm}^{-1}$ , que indica a presença de grupamentos oxigenados de carbonila. Os resultados visuais da superfície das partículas também foram satisfatórios para corroborar com o envelhecimento dos microplásticos, sendo observado maior rugosidade na amostra tratada.

A exposição aguda em organismos de 7 dias mostrou que os xenobióticos isoladamente não provocam reações de dano a nível enzimático ou de mortalidade, enquanto a  $\text{CE}_{20}$  de cetoconazol induziu leve aumento da mortalidade. Já os xenobióticos combinados apresentaram níveis tóxicos elevados e foi observada a diferença dos resultados da exposição do MPv + CTZ e MPE + CTZ. Este efeito é explicado pelo envelhecimento dos microplásticos, que acarretou mudanças físicas e químicas superficiais suficientes para alterar a relação com o CTZ e, conseqüentemente, resultou na toxicidade distinta dos tratamentos.

## REFERÊNCIAS

- Abdul Majeed, R.M., Purohit, V.S., Bhoraskar, S. V., Mandale, A.B., Bhoraskar, V.N., 2006. Irradiation effects of 12 eV oxygen ions on polyimide and fluorinated ethylene propylene. *Radiat. Eff. Defects Solids* 161, 495–503. <https://doi.org/10.1080/10420150600810224>
- ABIPLAST, 2019. Indústria Brasileira de Transformação e Reciclagem de Material Plástico - Perfil 2018. Abiplast 45.
- ABNT, 2016. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Assoc. Bras. Normas Técnicas 27.
- Adam, V., Yang, T., Nowack, B., 2019. Toward an ecotoxicological risk assessment of microplastics: Comparison of available hazard and exposure data in freshwaters. *Environ. Toxicol. Chem.* 38, 436–447. <https://doi.org/10.1002/etc.4323>
- Ahmed, T., Shahid, M., Azeem, F., Rasul, I., Shah, A.A., Noman, M., Hameed, A., Manzoor, N., Manzoor, I., Muhammad, S., 2018. Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 7287–7298. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1234-9>
- Almond, J., Sugumaar, P., Wenzel, M.N., Hill, G., Wallis, C., 2020. Determination of the carbonyl index of polyethylene and polypropylene using specified area under band methodology with ATR-FTIR spectroscopy. *E-Polymers* 20, 369–381. <https://doi.org/10.1515/epoly-2020-0041>
- Arias-Villamizar, C.A., Vázquez-Morillas, A., 2018. Degradation of conventional and oxodegradable high density polyethylene in tropical aqueous and outdoor environments. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 34, 137–141. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.01.12>
- Assress, H.A., Nyoni, H., Mamba, B.B., Msagati, T.A.M., 2020. Occurrence and risk assessment of azole antifungal drugs in water and wastewater. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 187, 109868. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109868>
- Baptista Neto, J.A., Gaylarde, C., Beech, I., Bastos, A.C., da Silva Quaresma, V., de Carvalho, D.G., 2019. Microplastics and attached microorganisms in sediments of the Vitória bay estuarine system in SE Brazil. *Ocean Coast. Manag.* 169, 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2018.12.030>
- Barbosa, K.B.F., Costa, N.M.B., Alfenas, R. de C.G., De Paula, S.O., Minim, V.P.R., Bressan, J., 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.* 23, 629–643. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
- Baruah, J.M., Kalita, S., Narayan, J., 2019. Green chemistry synthesis of biocompatible ZnS quantum dots (QDs): their application as potential thin films and antibacterial agent. *Int. Nano Lett.* 9, 149–159. <https://doi.org/10.1007/s40089-019-0270-x>
- Beasley, A., Belanger, S.E., Brill, J.L., Otter, R.R., 2015. Evaluation and comparison of the relationship between NOEC and EC10 or EC20 values in chronic *Daphnia* toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 2378–2384. <https://doi.org/10.1002/etc.3086>
- Bhagat, J., Zang, L., Nakayama, H., Nishimura, N., Shimada, Y., 2021. Effects of nanoplastic on toxicity of azole fungicides (ketoconazole and fluconazole) in zebrafish embryos. *Sci. Total Environ.* 800, 149463.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149463>

- Bharagava, R.N., Saxena, G., Mulla, S.I., Patel, D.K., 2018. Characterization and Identification of Recalcitrant Organic Pollutants (ROPs) in Tannery Wastewater and Its Phytotoxicity Evaluation for Environmental Safety. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 259–272. <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0490-x>
- Bosker, T., Olthof, G., Vijver, M.G., Baas, J., Barmantlo, S.H., 2019. Significant decline of *Daphnia magna* population biomass due to microplastic exposure. *Environ. Pollut.* 250, 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.067>
- Cai, L., Wang, J., Peng, J., Wu, Z., Tan, X., 2018. Observation of the degradation of three types of plastic pellets exposed to UV irradiation in three different environments. *Sci. Total Environ.* 628–629, 740–747. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.079>
- Campos, J.F., dos Santos, U.P., Macorini, L.F.B., de Melo, A.M.M.F., Balestieri, J.B.P., Paredes-Gamero, E.J., Cardoso, C.A.L., de Picoli Souza, K., Dos Santos, E.L., 2014. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food Chem. Toxicol.* 65, 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.008>
- Canevarolo Jr., S.V., 2002. *Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros*, 2nd ed. Artliber Editora Ltda., São Paulo.
- Canniff, P.M., Hoang, T.C., 2018. Microplastic ingestion by *Daphnia magna* and its enhancement on algal growth. *Sci. Total Environ.* 633, 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.176>
- Cera, A., Cesarini, G., Scalici, M., 2020. Microplastics in freshwater: What is the news from the world? *Diversity* 12. <https://doi.org/10.3390/d12070276>
- Chen, Z.F., Ying, G.G., 2015. Occurrence, fate and ecological risk of five typical azole fungicides as therapeutic and personal care products in the environment: A review. *Environ. Int.* 84, 142–153. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.07.022>
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2588–2597. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>
- Colomer, J., Müller, M.F., Barcelona, A., Serra, T., 2019. Mediated food and hydrodynamics on the ingestion of microplastics by *Daphnia magna*. *Environ. Pollut.* 251, 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.034>
- Costa, C.R., Olivi, P., Botta, C.M.R., Espindola, E.L.G., 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. *Quim. Nova* 31, 1820–1830. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>
- Coutinho, F.M.B., Mello, I.L., de Santa Maria, L.C., 2003. Polietileno: principais tipos, propriedades e aplicações. *Polímeros Ciência e Tecnol.* 13, 1–13.
- de Carvalho, J.A.A.F., de Albuquerque, T.B.V., Silva, N.B. do N., Freitas, J.B. de A., de Paiva, A.L.R., 2018. Gestão de resíduos farmacêuticos, descarte inadequado e suas consequências nas matrizes aquáticas. *Rev. Bras. Meio Ambient.* 4, 228–240.
- De Felice, B., Sabatini, V., Antenucci, S., Gattoni, G., Santo, N., Bacchetta, R., Ortenzi, M.A., Parolini, M., 2019. Polystyrene microplastics ingestion induced behavioral

- effects to the cladoceran *Daphnia magna*. *Chemosphere* 231, 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.115>
- Deng, H., Wei, R., Luo, W., Hu, L., Li, B., Di, Y., Shi, H., 2020. Microplastic pollution in water and sediment in a textile industrial area. *Environ. Pollut.* 258, 113658. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113658>
- Ding, L., Mao, R., Ma, S., Guo, X., Zhu, L., 2020. High temperature depended on the ageing mechanism of microplastics under different environmental conditions and its effect on the distribution of organic pollutants. *Water Res.* 174, 115634. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115634>
- Do Nascimento, R.F., De Lima, A.C.A., Vidal, C.B., Melo, D. de Q., Raulino, G.S.C., 2014. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. Fortaleza: Imprensa Universitária, Fortaleza. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4340.1041>
- do Prado, C.C.A., Queiroz, L.G., da Silva, F.T., de Paiva, T.C.B., 2021. Ecotoxicological effect of ketoconazole on the antioxidant system of *Daphnia similis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 246, 109080. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109080>
- e Silva, P.H.S., de Sousa, F.D.B., 2021. Microplastic pollution of Patos Lagoon, south of Brazil. *Environ. Challenges* 4, 100076. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2021.100076>
- Fahrenfeld, N.L., Arbuckle-Keil, G., Naderi Beni, N., Bartelt-Hunt, S.L., 2019. Source tracking microplastics in the freshwater environment. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 112, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.030>
- Ferraz, M., Bauer, A.L., Valiati, V.H., Schulz, U.H., 2020. Microplastic concentrations in raw and drinking water in the sinos river, southern brazil. *Water (Switzerland)* 12, 1–10. <https://doi.org/10.3390/w12113115>
- Ferreira, D., Alkimin, G.D. de, Neves, B., Conde, T., Domingues, M.R., Nunes, B., 2022. Evaluation of parental and transgenerational effects of clotrimazole in *Daphnia magna* — A multi-parametric approach. *Sci. Total Environ.* 831, 154677. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154677>
- Frias, J.P.G.L., Nash, R., 2019. Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Mar. Pollut. Bull.* 138, 145–147. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.11.022>
- Fukami, T., Iida, A., Konishi, K., Nakajima, M., 2016. Human arylacetamide deacetylase hydrolyzes ketoconazole to trigger hepatocellular toxicity. *Biochem. Pharmacol.* 116, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.07.007>
- Galafassi, S., Nizzetto, L., Volta, P., 2019. Plastic sources: A survey across scientific and grey literature for their inventory and relative contribution to microplastics pollution in natural environments, with an emphasis on surface water. *Sci. Total Environ.* 693, 133499. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.305>
- Gemusse, S.L., Turcatti Folle, N.M., Souza, A.T. da C., Azevedo-Linhares, M., Neto, F.F., Ortolani-Machado, C.F., Esquivel Garcia, J.R., Esquivel, L., da Silva, C.P., de Campos, S.X., Martins, C. de C., de Oliveira Ribeiro, C.A., 2021. Micropollutants impair the survival of *Oreochromis niloticus* and threat local species from Iguaçú River, Southern of Brazil. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 83. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103596>

- Gulmine, J. V., Janissek, P.R., Heise, H.M., Akcelrud, L., 2003. Degradation profile of polyethylene after artificial accelerated weathering. *Polym. Degrad. Stab.* 79, 385–397. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(02\)00338-5](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(02)00338-5)
- Gulmine, J. V., Janissek, P.R., Heise, H.M., Akcelrud, L., 2002. Polyethylene characterization by FTIR. *Polym. Test.* 21, 557–563. [https://doi.org/10.1016/S0142-9418\(01\)00124-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9418(01)00124-6)
- Guo, X., Liu, Y., Wang, J., 2019. Sorption of sulfamethazine onto different types of microplastics : A combined experimental and molecular dynamics simulation study. *Mar. Pollut. Bull.* 145, 547–554. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.06.063>
- Guo, X., Wang, J., 2019. Sorption of antibiotics onto aged microplastics in freshwater and seawater. *Mar. Pollut. Bull.* 149, 110511. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110511>
- Gupta, A.K., Lyons, D.C.A., 2015. The rise and fall of oral ketoconazole. *J. Cutan. Med. Surg.* 19, 352–357. <https://doi.org/10.1177/1203475415574970>
- Haeba, M.H., Hilscherová, K., Mazurová, E., Bláha, L., 2008. Selected Endocrine Disrupting Compounds ( Vinclozolin , Flutamide , Ketoconazole and Dicofol ): Effects on Survival , Occurrence of Males , Growth , Molting and Reproduction of *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 15, 222–227.
- He, P., Chen, L., Shao, L., Zhang, H., Lü, F., 2019. Municipal solid waste (MSW) landfill: A source of microplastics? - Evidence of microplastics in landfill leachate. *Water Res.* 159, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.04.060>
- Horton, A.A., Vijver, M.G., Lahive, E., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Heutink, R., Bodegom, P.M. Van, Baas, J., Ecology, C., Building, M., Lane, B., Ox, W.O., 2018. Ecotoxicology and Environmental Safety Acute toxicity of organic pesticides to *Daphnia magna* is unchanged by co-exposure to polystyrene microplastics. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 166, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.052>
- Hu, M., Palić, D., 2020. Micro- and nano-plastics activation of oxidative and inflammatory adverse outcome pathways. *Redox Biol.* 37. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101620>
- Hüffer, T., Hofmann, T., 2016. Sorption of non-polar organic compounds by micro-sized plastic particles in aqueous solution. *Environ. Pollut.* 214, 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.018>
- Hüffer, T., Weniger, A.K., Hofmann, T., 2018. Data on sorption of organic compounds by aged polystyrene microplastic particles. *Data Br.* 18, 474–479. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.03.053>
- Jemec, A., Tišler, T., Drobne, D., Sepčić, K., Fournier, D., Trebše, P., 2007. Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. *Chemosphere* 68, 1408–1418. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.015>
- Kataoka, T., Nihei, Y., Kudou, K., Hinata, H., 2019. Assessment of the sources and inflow processes of microplastics in the river environments of Japan. *Environ. Pollut.* 244, 958–965. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.111>
- Khoza, S., Moyo, I., Ncube, D., 2017. Comparative Hepatotoxicity of Fluconazole,



- Ketoconazole, Itraconazole, Terbinafine, and Griseofulvin in Rats. *J. Toxicol.* 2017, 9. <https://doi.org/10.1155/2017/6746989>
- Koelmans, A.A., Mohamed Nor, N.H., Hermesen, E., Kooi, M., Mintenig, S.M., De France, J., 2019. Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality. *Water Res.* 155, 410–422. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.02.054>
- Kokalj, A.J., Kunej, U., Skalar, T., 2018. Chemosphere Screening study of four environmentally relevant microplastic pollutants: Uptake and effects on *Daphnia magna* and *Artemia franciscana*. *Chemosphere* 208, 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.172>
- Koltzenburg, S., Maskos, M., Nuyken, O., 2017. *Polymer Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-49279-6>
- Lang, M., Yu, X., Liu, J., Xia, T., Wang, T., Jia, H., Guo, X., 2020. Fenton aging significantly affects the heavy metal adsorption capacity of polystyrene microplastics. *Sci. Total Environ.* 722, 137762. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137762>
- Lee, H., Lee, H.J., Kwon, J.H., 2019. Estimating microplastic-bound intake of hydrophobic organic chemicals by fish using measured desorption rates to artificial gut fluid. *Sci. Total Environ.* 651, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.068>
- Lehtiniemi, M., Hartikainen, S., Näkki, P., Engström-Öst, J., Koistinen, A., Setälä, O., 2018. Size matters more than shape: Ingestion of primary and secondary microplastics by small predators. *Food Webs* 17, e00097. <https://doi.org/10.1016/j.fooweb.2018.e00097>
- Lei, L., Wu, S., Lu, S., Liu, M., Song, Y., Fu, Z., Shi, H., Raley-Susman, K.M., He, D., 2018. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *Sci. Total Environ.* 619–620, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.103>
- Liu, F., Olesen, K.B., Borregaard, A.R., Vollertsen, J., 2019. Microplastics in urban and highway stormwater retention ponds. *Sci. Total Environ.* 671, 992–1000. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.416>
- Liu, G., Zhu, Z., Yang, Y., Sun, Y., Yu, F., Ma, J., 2019. Sorption behavior and mechanism of hydrophilic organic chemicals to virgin and aged microplastics in freshwater and seawater. *Environ. Pollut.* 246, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.100>
- Liu, J., Lu, G., Yang, H., Yan, Z., Wang, Y., Wang, P., 2016. Bioconcentration and metabolism of ketoconazole and effects on multi-biomarkers in crucian carp (*Carassius auratus*). *Chemosphere* 150, 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.033>
- Liu, P., Zhan, X., Wu, X., Li, J., Wang, H., Gao, S., 2020. Effect of weathering on environmental behavior of microplastics: Properties, sorption and potential risks. *Chemosphere* 242, 125193. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125193>
- Llorca, M., Schirinzi, G., Martínez, M., Barceló, D., Farré, M., 2018. Adsorption of perfluoroalkyl substances on microplastics under environmental conditions. *Environ. Pollut.* 235, 680–691. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.075>

- Ma, Y., Huang, A., Cao, S., Sun, F., Wang, L., Guo, H., Ji, R., 2016. Effects of nanoplastics and microplastics on toxicity, bioaccumulation, and environmental fate of phenanthrene in fresh water. *Environ. Pollut.* 219, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.061>
- Maraqqa, M.A., Meetani, M., Alhalabi, A.M., 2020. Effectiveness of conventional wastewater treatment processes in removing pharmaceutically active compounds. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* <https://doi.org/10.1088/1755-1315/424/1/012014>
- MARKLUND, S., MARKLUND, G., 1974. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469–474. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>
- Miettinen, T.A., 1988. Cholesterol metabolism during ketoconazole treatment in man. *J. Lipid Res.* 29, 43–51. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)38566-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)38566-7)
- Na, J., Song, J., Achar, J.C., Jung, J., 2021. Synergistic effect of microplastic fragments and benzophenone-3 additives on lethal and sublethal *Daphnia magna* toxicity. *J. Hazard. Mater.* 402, 123845. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123845>
- Noth, H.K., Hme, S.I., Ertel, R.O., Atthes, A.M., Itter, C.R., 2018. Determination of the contamination by azole antimycotics in hospital and house sewage - a pilot project for the city of Dresden 73, 260–263. <https://doi.org/10.1691/ph.2018.8364>
- OECD, 2012. Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, in: *Effects on Biotic Systems*. <https://doi.org/10.1787/9789264070127-en>
- Oh, S.J., Park, J., Lee, M.J., Park, S.Y., Lee, J.H., Choi, K., 2006. Ecological hazard assessment of major veterinary benzimidazoles: Acute and chronic toxicities to aquatic microbes and invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2221–2226. <https://doi.org/10.1897/05-493R.1>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Pryor, W.A., 1976. *The Role of Free Radical Reactions in Biological Systems, Free Radicals in Biology*. ACADEMIC PRESS, INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-566501-8.50008-0>
- Qiu, Y., Zheng, M., Wang, L., Zhao, Q., Lou, Y., Shi, L., Qu, L., 2019. Sorption of polyhalogenated carbazoles (PHCs) to microplastics. *Mar. Pollut. Bull.* 146, 718–728. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.07.034>
- Rainieri, S., Conlledo, N., Larsen, B.K., Granby, K., Barranco, A., 2018. Combined effects of microplastics and chemical contaminants on the organ toxicity of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Res.* 162, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.12.019>
- Rehse, S., Kloas, W., Zarfl, C., 2016. Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*. *Chemosphere* 153, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.133>
- Santos, D., Félix, L., Luzio, A., Parra, S., Cabecinha, E., Bellas, J., Monteiro, S.M., 2020. Toxicological effects induced on early life stages of zebrafish (*Danio rerio*) after an acute exposure to microplastics alone or co-exposed with copper. *Chemosphere* 261. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127748>

- Sayed, Y., Bøhn, T., 2019. Acute and chronic effects of polystyrene microplastics on juvenile and adult *Daphnia magna*. *Environ. Pollut.* 254, 112919. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.087>
- Scherer, C., Weber, A., Stock, F., Vurusic, S., Egerci, H., Kochleus, C., Arendt, N., Foeldi, C., Dierkes, G., Wagner, M., Brennholt, N., Reifferscheid, G., 2020. Comparative assessment of microplastics in water and sediment of a large European river. *Sci. Total Environ.* 738, 139866. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139866>
- Shafiei, M., Peyton, L., Hashemzadeh, M., Foroumadi, A., 2020. History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. *Bioorg. Chem.* 104, 104240. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104240>
- Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S., 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 26, 246–265. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K., 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes, in: *Journal of Experimental Botany*. pp. 1305–1319. <https://doi.org/10.1093/jxb/53.372.1305>
- Silva, A.R.R., Cardoso, D.N., Cruz, A., Lourenço, J., Mendo, S., Soares, A.M.V.M., Loureiro, S., 2015. Ecotoxicity and genotoxicity of a binary combination of triclosan and carbendazim to *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 115, 279–290. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.022>
- Souza, J.B.P. de, Nóbrega, R.S. da, 2018. Avaliação De Parâmetros Físico-Químicos E Eficácia De Formulações Comerciais de Xampus de Cetoconazol. *Rev. Saúde e Ciência Online* 7, 45–64.
- Sparling, D.W., 2016. Bioindicators of Contaminant Exposure. *Ecotoxicol. Essentials* 45–66. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801947-4.00003-2>
- Statista, Garside, M., 2019. Global plastic production statistics [WWW Document]. URL <https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/>
- Staub, I., Bergold, A.M., 2004. Determination of ketoconazole in shampoo by high performance liquid chromatography. *Acta Farm. Bonaer.* 23, 387–390.
- Steene, J.C. Van De, Lambert, W.E., 2008. Validation of a solid-phase extraction and liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometric method for the determination of nine basic pharmaceuticals in wastewater and surface water samples. *J. Chromatogr. A* 1182, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.012>
- Trestrail, C., Nugegoda, D., Shimeta, J., 2020. Invertebrate responses to microplastic ingestion: Reviewing the role of the antioxidant system. *Sci. Total Environ.* 734, 138559. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138559>
- Vaal, M., Van de Wal, J.T., Hermens, J., Hoekstra, J., 1997. Pattern Analysis of the Variation in the Sensitivity of Aquatic Species to Toxicants. *Chemosphere* 35, 1291–1309.
- Venkateswarlu, K., Kelly, D.E., Manning, N.J., Kelly, S.L., 1998. NADPH cytochrome P-450 oxidoreductase and susceptibility to ketoconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1756–1761. <https://doi.org/10.1128/aac.42.7.1756>

- Vieira, M., Soares, A.M.V.M., Nunes, B., 2019a. Biomarker-based assessment of the toxicity of the antifungal clotrimazol to the microcrustacean *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 71, 103210. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103210>
- Vieira, M., Soares, A.M.V.M., Nunes, B., 2019b. Biomarker-based assessment of the toxicity of the antifungal clotrimazol to the microcrustacean *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 71, 103210. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103210>
- Vroom, R.J.E., Koelmans, A.A., Besseling, E., Halsband, C., 2017. Aging of microplastics promotes their ingestion by marine zooplankton. *Environ. Pollut.* 231, 987–996. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.088>
- Wagner, M., Lambert, S., 2018. *Freshwater Microplastics - The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer Open. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61615-5>
- Wang, Q., Zhang, Y., Wangjin, X., Wang, Y., Meng, G., Chen, Y., 2020. The adsorption behavior of metals in aqueous solution by microplastics effected by UV radiation. *J. Environ. Sci. (China)* 87, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.07.006>
- White, J.R., Turnbull, A., 1994. Weathering of polymers: mechanisms of degradation and stabilization, testing strategies and modelling. *J. Mater. Sci.* 29, 584–613. <https://doi.org/10.1007/BF00445969>
- Windsor, F.M., Tilley, R.M., Tyler, C.R., Ormerod, S.J., 2019. Microplastic ingestion by riverine macroinvertebrates. *Sci. Total Environ.* 646, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.271>
- Wong, G., Löwemark, L., Kunz, A., 2020. Microplastic pollution of the Tamsui River and its tributaries in northern Taiwan: Spatial heterogeneity and correlation with precipitation. *Environ. Pollut.* 260, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113935>
- Wu, C., Zhang, K., Huang, X., Liu, J., 2016. Sorption of pharmaceuticals and personal care products to polyethylene debris. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 8819–8826. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6121-7>
- Wypych, G., 2020. UV DEGRADATION & STABILIZATION OF POLYMERS & RUBBERS, in: Wypych, G. (Ed.), *Handbook of UV Degradation and Stabilization*. ChemTec Publishing, Toronto, pp. 187–321. <https://doi.org/10.1016/b978-1-927885-57-4.50010-3>
- Xiong, X., Tu, Y., Chen, X., Jiang, X., Shi, H., Wu, C., Elser, J.J., 2019. Ingestion and egestion of polyethylene microplastics by goldfish (*Carassius auratus*): influence of color and morphological features. *Heliyon* 5, e03063. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03063>
- Yan, Z., Yang, H., Dong, H., Ma, B., Sun, H., Pan, T., Jiang, R., Zhou, R., Shen, J., Liu, J., Lu, G., 2018. Occurrence and ecological risk assessment of organic micropollutants in the lower reaches of the Yangtze River, China: A case study of water diversion. *Environ. Pollut.* 239, 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.023>
- Yao, L., Hui, L., Yang, Z., Chen, X., Xiao, A., 2019. Freshwater Microplastics Pollution : Detecting and Visualizing Emerging trends Based on Citespace II. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125627>
- Yu, F., Li, Y., Huang, G., Yang, C., Chen, C., Zhou, T., Zhao, Y., Ma, J., 2020. Adsorption

behavior of the antibiotic levofloxacin on microplastics in the presence of different heavy metals in an aqueous solution. *Chemosphere* 260. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127650>

Yu, J., Wang, P., Ni, F., Cizdziel, J., Wu, D., Zhao, Q., Zhou, Y., 2019. Characterization of microplastics in environment by thermal gravimetric analysis coupled with Fourier transform infrared spectroscopy. *Mar. Pollut. Bull.* 145, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.05.037>

Yuan, W., Zhou, Y., Chen, Y., Liu, X., Wang, J., 2020. Toxicological effects of microplastics and heavy metals on the *Daphnia magna*. *Sci. Total Environ.* 746, 141254. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141254>

Zhang, P., Yan, Z., Lu, G., Ji, Y., 2019. Single and combined effects of microplastics and roxithromycin on *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 17010–17020. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05031-2>

Zhang, S., Ding, J., Razanajatovo, R.M., Jiang, H., Zou, H., Zhu, W., 2019. Interactive effects of polystyrene microplastics and roxithromycin on bioaccumulation and biochemical status in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Sci. Total Environ.* 648, 1431–1439. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.266>

Zhang, W., Zhang, L., Hua, T., Li, Y., Zhou, X., Wang, W., You, Z., Wang, H., Li, M., 2020. The mechanism for adsorption of Cr(VI) ions by PE microplastics in ternary system of natural water environment. *Environ. Pollut.* 257, 113440. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113440>