



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO (CTC)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL (PPGEA)

Vitor Pereira Vaz

Avaliação da Interação Toxicológica de Misturas: Nanoplástico de Poliestireno e
Hormônio 17α -Ethinilestradiol

Florianópolis
2020

Vitor Pereira Vaz

**Avaliação da Interação Toxicológica de Misturas: Nanoplástico de Poliestireno e
Hormônio 17 α -Ethinilestradiol**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Ambiental (PPGEA) da Universidade
Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. William Gerson Matias
Coorientadora: Dra. Denice Schulz Vicentini

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vaz, Vitor Pereira
Avaliação da Interação Toxicológica de Misturas :
Nanoplástico de Poliestireno e Hormônio 17 β -Ethinilestradiol
/ Vitor Pereira Vaz ; orientador, William Gerson Matias,
coorientadora, Denice Schuz Vicentini, 2020.
93 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Ambiental, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia Ambiental. 2. Toxicidade de misturas. 3.
Nanoplástico de poliestireno. 4. Ethinilestradiol. 5.
Daphnia magna. I. Matias, William Gerson. II. Vicentini,
Denice Schuz. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

Vitor Pereira Vaz

Avaliação da Interação Toxicológica de Misturas: Nanoplástico de Poliestireno e
Hormônio 17 α -Ethinilestradiol

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Silvia Pedroso Melegari, Dra.
Instituição Universidade Federal do Paraná

Profa. Maria Elisa Magri, Dra.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rodrigo de Almeida Mohedano, Dr.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de mestre em Engenharia Ambiental.

Profa. Maria Eliza Nagel Hassemer, Dra.
Coordenadora do Programa

Prof. William Gerson Matias, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2020.

Este trabalho é dedicado aos pesquisadores e pesquisadoras que apesar dos pesares colocam o Brasil em posição de destaque na ciência mundial.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho não seria possível sem a participação de diversas pessoas e entidades, direta ou indiretamente. Meus agradecimentos são direcionados:

À toda a população brasileira por ter custeado minha formação e permitido que eu exerça a função de pesquisador em tempo integral, função esta que tenho o privilégio de poder exercer como vocação;

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pelo custeio material da pesquisa, bem como à Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, e ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental pelo auxílio durante o processo;

Aos meus Professores da alfabetização à Pós Graduação que me inspiram a continuar na carreira acadêmica apesar das adversidades e percalços que a profissão oferece;

Aos meus orientadores Professor William Gerson Matias pelos conselhos, oportunidade de trabalho e orientação nestes últimos três anos e à coorientadora Denice Schulz Vicentini pelo apoio na elaboração do trabalho sem o qual este não seria possível;

À equipe LABTOX pelo auxílio e apoio durante a elaboração deste trabalho;

Às pesquisadoras Dra Raquel Moreira e Dra Adrislaine Mansano por fornecer condições para que a análise das misturas fosse elaborada e sanar dúvidas sobre o modelo quando necessário;

Aos meus amigos de diferentes grupos: Agnes, Maria Carolina, Marina, Paula, Giovanna, Ana Carolina, Natália, Kimberly, Ana Lucia, Aparecida, Arthur, Gabriel, Sofia e Ramon pela possibilidade de me expressar, desabafar, me divertir e aprender sobre as infinitas possibilidades de existência e que a principal característica que nos possibilita avançar enquanto humanidade é a diversidade;

À minha família estendida pelo suporte ao longo dos anos especialmente no custeio dos meus estudos em um bom colégio me possibilitando ingressar em uma ótima universidade e descobrir a carreira acadêmica como possibilidade;

Aos meu pais Alcides e Gilmar e avós Eliete, Ereni, Avelino e Maria, pelo incentivo, suporte e apoio a prosseguir no caminho da educação desde que me entendo por gente, pelos ensinamentos da tão falada “Faculdade da Vida” que só pode vir dos mais experientes (ou dos jovens a mais tempo) que me fizeram ser o homem que sou hoje;

Ao meu namorado e companheiro de vida, Leonardo Steiner, pela dedicação em me fazer feliz mesmo nos períodos mais difíceis, pelas palavras sempre certas e transformadoras, pelo exemplo de profissional e pessoal, se esforçando e mostrando que todos são capazes de evoluir a versões melhores de si mesmo. Obrigado por me permitir fazer parte da sua vida nesses últimos seis anos. Que venham os próximos!

“Learning from experience may lead to nothing more than learning to make the same mistakes with increased confidence” (SKRABANEK; MCCORMICK, 1989).

RESUMO

Os materiais plásticos são alguns dos principais poluentes atuais devido ao aumento exponencial no consumo somado ao seu descarte inadequado. Os micro (MP) e nanoplásticos (NP) em escala reduzida são utilizados principalmente como abrasivos em produtos de cuidados pessoais. Entretanto, aqueles oriundos da degradação físico-química e biológica dos plásticos no meio ambiente também formam MP e NP. Devido a suas características hidrofóbicas, MP e NP podem interagir com outros poluentes emergentes e possivelmente, causando efeito adverso na biota. O 17 α -Ethinilestradiol (EE2) é um dos principais poluentes emergentes em se tratando de desreguladores endócrinos tanto pelo elevado consumo quanto por seus efeitos. Dentre seus principais efeitos estão a alteração de características sexuais secundárias e a feminização da biota aquática. A remoção insuficiente do EE2 durante os processos de tratamento de efluentes torna seu lançamento nos corpos hídricos ou sua retenção no lodo preocupante. A toxicidade de misturas é a ferramenta através da qual é possível compreender os efeitos de dois ou mais compostos nos seres vivos. O presente trabalho visa caracterizar e avaliar o potencial toxicológico do NP de poliestireno (PS) e EE2 isolados e em misturas com os ensaios de ingestão, toxicidade aguda e crônica. A caracterização dos compostos foi realizada com os parâmetros: Potencial Zeta (PZ), Diâmetro Efetivo (DE), Índice de polidispersão (IPD), Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Como resultados o diâmetro médio do NPPS (85,13 \pm 11,08 nm) via MET e o PZ e IPD indicaram elevada estabilidade em água NPPS e partículas monodispersas, respectivamente. A mistura com o EE2 não aumentou significativamente o diâmetro efetivo do NPPS, porém reduziu o PZ. Essa redução não foi suficiente para torná-lo instável. Os ensaios toxicológicos foram realizados com os compostos isolados e em diferentes proporções da mistura NPPS + EE2. A ingestão do NPPS e mistura indicou que o EE2 reduziu a retenção do NPPS nos organismos teste. Os resultados de toxicidade aguda foram aplicados no método do isoblograma resultando em um efeito majoritariamente antagônico de baixa intensidade. Os ensaios de toxicidade crônica em concentrações ambientalmente relevantes demonstraram pouco ou nenhum efeito dos materiais isolados e em mistura. Esses resultados demonstram que para *Daphnia magna*, um organismo não-alvo do EE2 o poluente não causou efeitos em níveis preocupantes.

Palavras-chave: Toxicidade de misturas. Nanoplástico. 17 α -etinilestradiol. *Daphnia magna*. Concentrações ambientais.

ABSTRACT

Plastic materials are some of the main environmental pollutants due to its exponential growth in consumption and incorrect disposal. Micro (MP) and Nanoplastics (NP) are mainly used as abrasive particles in personal care products. However, the physical-chemical and biological degradation of plastics can also generate MP and NP. Due to its hydrophobic properties, MP and NP can interact with emerging pollutants present in the water and soil, causing adverse effect on the biota. 17 α -Ethinylestradiol (EE2) is one of the main emerging pollutants known as endocrine disruptor compounds because of both its high consumption and its effects. Amongst these effects the most preeminent are the altering of secondary sexual traits and the feminization process of the biota. The insufficient removal of EE2 during the effluent treatment process raises concern on its final disposal in water bodies and the sludge originated on the treatment. Mixture toxicity is the tool with which is possible to assess the effects of two or more compounds on the living organisms. The present dissertation aims to characterize the toxicological potential of the polystyrene (PS) NP and EE2 both isolated and in mixtures using the uptake, acute and chronic toxicity tests. The characterization of the compounds was performed to measure: Zeta Potential (PZ), Effective Diameter (DE), Polydispersity Index (IPD), Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Transmission Electron Microscopy (MET). As results, the MET calculated NPPS average diameter ($85,13 \pm 11,08$ nm) and the PZ and IPD indicated an elevated stability of the suspension and its monodispersity, respectively. When in the presence of EE2, the stability was not significantly changed to enlarge NPPS's DE, although it reduced the PZ, but still remaining stable. The toxicological assays were performed with different ratios between the compounds (NPPS-EE2). The ingestion of NPPS indicated that EE2 reduces the accumulation of NPPS on the tested organisms. The acute toxicity results were applied to the isobologram method resulting in a overall mild antagonist effect. The chronic toxicity results indicated that the environmentally relevant concentrations applied had little to no effect observed for neither the isolated compounds nor the mixture, indicating that for *Daphnia magna*, a non-target species for EE2, the pollutants have not caused these effects in concerning levels.

Keywords: Mixture Toxicity. Nanoplastics. 17 α -Ethinylestradiol. *Daphnia magna*. Environmental concentrations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Monômero estireno e polímero poliestireno.....	23
Figura 2 - Estrutura molecular do EE2.....	26
Figura 3 - <i>Daphnia magna</i>	30
Figura 4 – Representação das concepções para a escolha das proporções de mistura.	37
Figura 5 - Esquema representativo da caracterização dos compostos testados.....	39
Figura 6 - Esquema representativo dos ensaios toxicológicos realizados.....	40
Figura 7 - Micrografia da MET a) dos NPPS e b) da distribuição do tamanho das partículas.....	51
Figura 8 - Micrografia de MET a) do NPPS em mistura com EE2 na maior concentração do teste agudo e (b) distribuição do tamanho das partículas.	52
Figura 9 - Micrografia de MET a) do NPPS em mistura com EE2 na maior concentração do teste crônico e (b) distribuição do tamanho das partículas.....	53
Figura 10 - Espectros de FTIR dos NPPS, EE2 e NPPS-EE2.....	57
Figura 11 - Curvas dose-resposta do NPPS e EE2.....	59
Figura 12 - Isoblograma de dados brutos para misturas.....	60
Figura 13 - Isoblograma NPPS-EE2 do método AC e seu perfil equitóxico.	63
Figura 14 - Imagens microscópicas dos aglomerados formados pelo NPPS e EE2. a) Ponto 5 do isoblograma (3,35 mg L-1 de EE2 e 133,04 mg L-1 de NPPS). b) Ponto 23 do isoblograma (50,3 mg L-1 de EE2 e 66,52 mg L-1 de NPPS).	65
Figura 15 - Resultados dos ensaios crônicos dos compostos isolados.....	67
Figura 17 - Resultados do teste crônico compilados em gráficos.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Revisão das concentrações ambientais de PS.....	24
Tabela 2 – Revisão dos efeitos observados do NPPS na <i>Daphnia magna</i>	25
Tabela 3 - Resumo das principais interações toxicológicas.	31
Tabela 4 - Avaliação da interação toxicológica proposta por Jonker et al. (2005). ...	32
Tabela 5 - Resumo das técnicas físico-químicas utilizadas para a caracterização dos NPPS, EE2 e das misturas.	41
Tabela 6 - Pontos do Isoblograma.....	47
Tabela 7 – Isoblograma das concentrações utilizadas nos testes crônicos dos compostos.	49
Tabela 8 - PZ, DE,e IPD e pH dos NPPS e NPPS-EE2.	53
Tabela 9 - Quantificação Al total ingerido pela <i>D. Magna</i>	57
Tabela 10 - Resultados da modelagem realizada no MixTox.	60
Tabela 11 - PZ, DE, IPD e pH das amostras isoladas de NPAG e NPPS.....	63
Tabela 12 - Resumo dos ensaios crônicos com NPPS e EE2.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Adição de Concentração

AI – Ação Independente

CE50 – Concentração Efetiva em 50% dos organismos-teste

CENO – Concentração de Efeito Não Observado

CEO – Concentração de Efeito Observado

CI50 – Concentração de Imobilização de 50% dos organismos-teste

EE2 – Hormônio 17 α -Ethinilestradiol

MP – Microplásticos

NP – Nanoplásticos

NPPS – Nanoplástico de poliestireno

OR – Água de Osmose Reversa

UT – Unidade(s) Tóxica(s)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos Específicos	19
3	Revisão bibliográfica	21
3.1	Nanoplásticos.....	21
3.1.1	Nanoplástico de Poliestireno	23
3.1.2	Etinilestradiol	26
3.1.3	Mistura entre os poluentes	28
3.2	Toxicologia Ambiental	28
3.2.1.1	<i>Daphnia magna</i>	29
3.2.2	Toxicidade de Misturas	30
3.2.2.1	<i>Adição de Concentração</i>	33
3.2.2.2	<i>Ação Independente</i>	35
3.2.2.3	<i>Análise das Interações Toxicológicas</i>	35
3.2.2.3.1	Método do Isoblograma.....	36
4	METODOLOGIA	39
4.1	MATERIAIS.....	Erro! Indicador não definido.
4.2	MÉTODOS	41
4.2.1	Metodologia de Caracterização	41
4.2.1.1	<i>Morfologia e diâmetro</i>	41
4.2.1.2	<i>Estabilidade diâmetro efetivo e índice de polidispersão em suspensão</i>	42
4.2.1.3	<i>Estrutura química</i>	43
4.2.2	Ensaio Toxicológicos	43
4.2.2.1	<i>Ensaio de ingestão de NPPS</i>	44
4.2.2.2	<i>Ensaio de Toxicidade Aguda</i>	45

4.2.2.2.1	Ensaio agudos das misturas.....	46
4.2.2.3	<i>Ensaio de Toxicidade Crônica</i>	47
4.2.2.3.1	ENSAIOS DAS MISTURAS	Erro! Indicador não definido.
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1	Caracterização.....	51
5.1.1	Morfologia e Diâmetro	51
5.1.2	Estabilidade em Suspensão	53
5.1.3	Estrutura química.....	55
5.2	Ensaio toxicológicos	57
5.2.1	Quantificação indireta de NPPS.....	57
5.2.2	Ensaio de Toxicidade Aguda	58
5.2.2.1	<i>Compostos isolados</i>	58
5.2.2.2	<i>Mistura NPPS-EE2</i>	59
5.2.2.2.1	Imagens de estereomicroscópio dos aglomerados formados.....	64
5.2.3	Ensaio de Toxicidade Crônica	65
5.2.3.1	<i>Compostos isolados</i>	65
5.2.3.2	<i>Mistura NPPS e EE2</i>	67
6	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

A produção anual de polímeros, comumente chamada de plásticos, cresceu de 1,7 milhões de toneladas em 1954 para 359 milhões de toneladas em 2018 (PLASTICSEUROPE, 2019). De todo o volume já produzido, aproximadamente 4.900 milhões de toneladas (60%) encontra-se descartado em aterros ou no meio ambiente e apenas 600 milhões de toneladas (9%) dos plásticos foram reciclados (GEYER; JAMBECK; LAW, 2017). A poluição plástica, originada em terra, é carregada via drenagem pluvial até os corpos hídricos, podendo ser encontrada em ambientes terrestres e aquáticos, de águas doces, salobras ou salinas, incluindo ambientes onde não há presença humana (BESSELING et al., 2014; DRIS et al., 2015; JIANG et al., 2018).

Os materiais plásticos lançados em ambientes terrestres e aquáticos sofrem degradação físico-química e biológica. A degradação físico-química é ocasionada e catalisada, principalmente, pelas intempéries e radiação UV. Os materiais plásticos são gradualmente fragmentados em detritos conhecidos como microplásticos (MP) e nanoplásticos (NP), dependendo de suas dimensões. Neste processo, os fragmentos plásticos liberam diversos compostos químicos adicionados como aditivos na produção dos polímeros, tais como retardantes de chama, plastificantes, estabilizantes, antiestáticos e pigmentos. A estimativa é de que os oceanos contenham 23 milhões de toneladas de aditivos que eventualmente contaminarão os ambientes marinhos (FÓRUM ECONÔMICO MUNDIAL, 2016; MATTSSON et al., 2015; JIANG et al., 2018). A degradação deste material em escala micro e nanométrica é conhecida como via secundária. As vias primárias compreendem os materiais plásticos produzidos originalmente em escalas micro ou nanométrica para o uso, principalmente como abrasivos, podendo permear através do processo de tratamento de efluentes e chegar até os corpos receptores. (JIANG et al., 2018).

Entre os polímeros produzidos em maior escala no mundo, o poliestireno (PS) foi classificado em sétimo lugar na União Europeia e a nível global, devido a sua elevada produção e relevância econômica, sua produção foi estimada em 6,4% do total mundial (PLASTICSEUROPE, 2019). Seus usos incluem desde copos plásticos descartáveis até o isolamento térmico/acústico na sua forma PS-expandido, popularmente conhecido como isopor (PLASTICSEUROPE; EPRO, 2017).

Os plásticos, como PS, no meio ambiente sofrem degradação, liberando detritos em forma de MP e NP. Devido suas características hidrofóbicas e as elevadas áreas superficiais, a adesão de poluentes na superfície dos seus detritos é favorecida. Assim, os MP e NP podem atuar como veículos transportadores para poluentes emergentes hidrofóbicos. Tal comportamento promove a dispersão, ingestão e possível penetração nas células, como observado em *Daphnia magna* (BESSELING et al., 2014; BOUWMEESTER; HOLLMAN; PETERS, 2015; MA et al., 2016). Dentre os poluentes emergentes lançados nos ambientes terrestres e aquáticos estão alguns fármacos (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014), pesticidas (VAN et al., 2012) e materiais em nanoescala (MCGILLICUDDY et al., 2017), que não são eficientemente removidos no processo de tratamento dos efluentes.

Com o aumento no adensamento urbano e o aumento no consumo de fármacos, estes compostos se fazem ainda mais presentes nos efluentes domésticos. O 17 α -etinilestradiol (EE2) merece destaque por ser um dos fármacos com uma potente ação como desregulador endócrino mesmo em concentrações da ordem de nanogramas por litro. O EE2 está presente em algumas formulações de medicamentos anticoncepcionais e de tratamentos hormonais, tendo como principais efeitos observados na biota a indução da síntese da vitelogenina (processo associado à feminização da biota aquática), declínio da reprodução e mortalidade dos organismos-teste (BILA; DEZOTTI, 2007; WEINAND; SAFER, 2015; VOISIN et al., 2016).

Neste contexto, surge a necessidade de se compreender os processos físico-químicos que ocorrem entre os poluentes em ambientes naturais. Sendo assim, a toxicidade de misturas atua como ferramenta valiosa para a avaliação da interação toxicológica destes compostos e pode ser utilizada para entender quais são os mecanismos de ação tóxica entre dois ou mais poluentes. Diante de diversos métodos de avaliação da interação toxicológica, o método do isoblograma se destaca por realizar uma varredura entre as combinações de concentrações dos compostos envolvidos (JONKER et al., 2005; GESTEL, 2012; RODEA-PALOMARES et al., 2015).

O presente trabalho tem como intuito estudar o potencial toxicológico do nanoplastico de poliestireno (NPPS) e do hormônio 17 α -etinilestradiol bem como de misturas desses dois compostos, utilizando como organismo-teste de água doce, *D. magna*. Os resultados dos testes de toxicidade aguda e crônica foram aplicados no método do isoblograma apontando

proporções de interesse entre os poluentes. A interpretação do isobograma forneceu ferramentas para entender os potenciais efeitos na biota das misturas destes poluentes emergentes em diferentes proporções. Os dados gerados neste trabalho poderão ser, portanto, aplicados a modelos de avaliação de risco para situações reais em concentrações ambientalmente relevantes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a o potencial toxicológico do nanoplástico de poliestireno, do hormônio 17 α -etinilestradiol e das misturas de ambos os compostos utilizando o organismo *D. magna*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os compostos isolados (NPPS e EE2) e misturas (NPPS-EE2);
- Avaliar a toxicidade aguda dos compostos isolados e das misturas com o organismo-teste *D. magna*, utilizando o método do isobograma;
- Identificar os efeitos de toxicidade crônica para ambos os compostos isolados e para as misturas sobre a *D. magna*, utilizando o método do isobograma.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Nanoplásticos

Os materiais poliméricos, comumente denominados de plásticos são utilizados nas mais diversas áreas, desde a indústria de embalagens à construção civil. Apesar do grande consumo, para a maioria dos plásticos sua destinação final não é a reciclagem. De toda quantidade de material plástico produzido mundialmente, apenas 9% foram reciclados e aqueles descartados em aterros sanitários encontram um ambiente propício para a fragmentação de detritos de MP e NP, resultantes da degradação no meio ácido dos aterros (BESSELING et al., 2014; DRIS et al., 2015; GEYER; JAMBECK; LAW, 2017; RIST et al., 2017; GIGAULT et al., 2018; JIANG et al., 2018).

Durante processo de produção dos plásticos são adicionados em suas composições diferentes aditivos com o intuito de melhorar suas propriedades como, por exemplo, retardadores de chamas, cargas, pigmentos, plastificantes, entre outros. Dentre os variados aditivos, alguns apresentam características de desreguladores endócrinos como o nonilfenol (WAGNER; LAMBERT, 2018). Nessa hipótese, a degradação dos plásticos pelas intempéries, desgaste pelo uso, radiação UV ou ataques químicos após descarte inadequado promovem a liberação gradual dos plastificantes, comprometendo a integridade e a funcionalidade do plástico. Dessa forma, são iniciados os processos de erosão superficial do plástico para a formação e liberação de detritos menores (HIRAI et al., 2011; MATTSSON et al., 2015; JIANG et al., 2018; WAGNER; LAMBERT, 2018)..

Os MP e NP podem ser classificados como primários ou secundários. Os MP e NP primários são aqueles produzidos inicialmente em escala micro ou nanométrica, amplamente utilizados como abrasivos em produtos de higiene pessoal, cosméticos, entre outros. Enquanto os secundários são aqueles oriundos da degradação de objetos plásticos maiores, estando associado à poluição plástica. Contudo, as dimensões e a densidade dos MP e NP influenciam no potencial de permeação através do processo de tratamento de efluentes, podendo chegar nos corpos receptores (JIANG et al., 2018). De acordo com sua densidade, o material plástico pode ser depositado nos sedimentos, como o policloreto de vinila (PVC), ou ser transportado superficialmente pelas águas fluviais até as correntes marítimas, como o polietileno de baixa densidade (PEBD), o polipropileno (PP) e o poliestireno (PS) (MORÉT-FERGUSON et al.,

2010). O transporte e o destino das partículas de MP e NP são difíceis de monitorar devido à variedade de tipos, formas e tamanhos desses materiais. Para identificar o destino de partículas esféricas de PS em escalas mili, micro e nanométricas nos ambientes aquáticos, Besseling et al. (2017) simularam o transporte das partículas do sistema fluvial para o ambiente marinho. O resultado mostrou que as partículas nano e milimétricas são mais propensas a acumular no sedimento ao longo do rio, enquanto as micropartículas são capazes de atingir o ambiente marinho. No entanto, Gigault et al. (2016) mostraram evidências da presença de NP em sistemas oceânicos devido à acelerada degradação físico-química dos plásticos de escala milimétrica para escala nanométrica, uma vez que, as condições de salinidade, radiação UV, atrito mecânico e biodegradação são adequadas para este processo.

A elevada área superficial dos detritos plásticos erodidos aliado às características hidrofóbicas dos MP e NP favorecem seu uso como veículos transportadores de outros poluentes emergente presentes no meio via processos de sorção e dessorção. Tais processos facilitam a dispersão, ingestão e possível penetração dos poluentes emergentes nas células (HIRAI et al., 2011; BESSELING et al., 2014; BOUWMEESTER; HOLLMAN; PETERS, 2015; MA et al., 2016; WAGNER; LAMBERT, 2018) As características importantes para o grau de sorção e dessorção de um poluentes emergentes em um NP são (TEUTEN et al., 2009; WAGNER; LAMBERT, 2018):

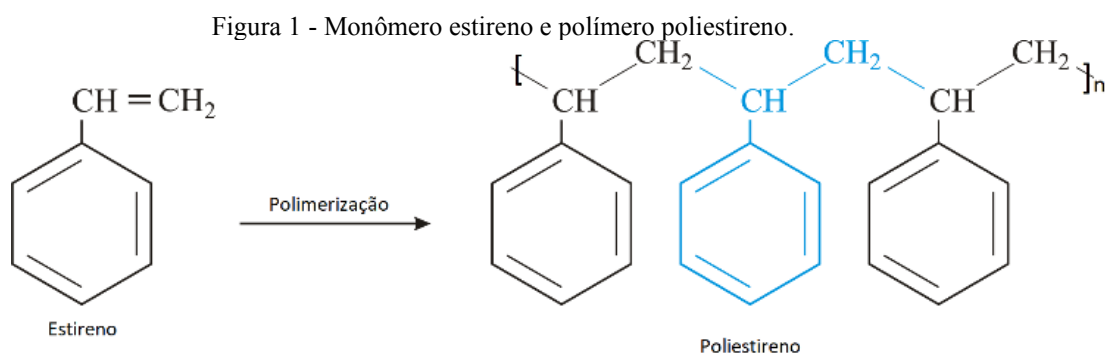
- Composição química: A existência ou não de afinidade química entre o NP e o poluente;
- Grau de cristalinidade do NP: Quanto mais amorfa maior a irregularidade na estrutura, permitindo a aderência de poluentes;
- Tamanho das partículas: Quanto maior a razão entre a área superficial e o volume de cada partícula maior o potencial carreador;
- Propriedades da superfície: O revestimento ou funcionalização superficial com ou sem a presença de cargas pode facilitar ou dificultar o papel de veículo transportador de poluentes.

Especificamente para o caso do NPPS, a sorção dos poluentes emergentes na superfície dos NPPS promove a permanência dos poluentes emergentes na coluna d'água por mais tempo, sendo dessorvidos gradualmente da superfície dos NPPS. Esse processo eleva a probabilidade de interação entre compostos presentes em baixas concentrações e a biota aquática (TEUTEN et al., 2009)

Neste sentido, os organismos aquáticos podem ingerir partículas MP e NP de vários tamanhos e formas, incluindo grânulos, fragmentos e fibras (BESSELING et al., 2014; JEMEC et al., 2016; RIST et al., 2017). Após a ingestão, estes permanecem no intestino dos organismos, reduzindo sua capacidade de alimentação e, conseqüentemente, afetando negativamente o seu desenvolvimento. Uma avaliação completa dos potenciais efeitos toxicológicos destes poluentes nos organismos é dificultada devido a composição do plástico ser basicamente hidrocarbonetos. Desta forma, existem limitações metodológicas para a identificação e quantificação do plástico ingerido, visto que, a presença de MP e NP podem ser confundidas com o próprio alimento no organismo e no sedimento ou água com a matéria orgânica e outros compostos hidrofóbicos presentes nos ambientes terrestres e aquosos. Sendo assim, a presença dos plásticos nos mais diversos ambientes pode causar efeitos deletérios à biota devido à ingestão de plásticos ou sua aderência em guelras incluindo os MP e NP (GREGORY, 2009).

3.1.1 Nanoplástico de Poliestireno

O PS é o polímero mais importante derivado do estireno (Figura 1), sendo amplamente empregado por seu baixo custo, facilidade de processamento e boas propriedades mecânicas (CANEVAROLO JR., 2006). Os principais produtos compostos de PS são armações de óculos, copos plásticos, bandejas de ovos plásticas, embalagens e o isolamento na construção civil (PS expandido) (PLASTICSEUROPE; EPRO, 2017).



Fonte: Adaptado de Canevarolo JR. (2006)

Devido a sua ampla utilização, a degradação deste polímero representa um importante aporte para os MPPS e NPPS. Sua estrutura amorfa confere uma característica mais irregular de sua superfície, permitindo a aderência física de outros compostos hidrofóbicos. Sua

densidade varia entre 0,96 e 1,05 g/cm³, estando próxima à da água, o que facilita o seu transporte através do fluxo hídrico (WAGNER; LAMBERT, 2018). Apesar da densidade indicar a flutuação, é importante destacar o papel que ambos o biofilme e a agitação dos cursos d'água fornecem para a chegada destes materiais em toda a coluna d'água (COLE et al., 2013).

A diferença de afinidade química, ou seja, a hidrofobicidade das NPPS dificulta a interação com a água, hidrofílica. No entanto, a elevada razão entre área superficial/volume de suas partículas promove estabilização dos NPPS nos meios aquosos. Os limites métricos para definir detritos plásticos como sendo MP ou NP foram reportados recentemente por Da Costa et al. (2016), que classificou MP como partículas de diâmetro inferior a 5 mm e NP com de diâmetro abaixo de 1 µm. De maneira similar, Gigault et al. (2018) determinaram que NP são as partículas isoladas ou conjunto de partículas (homoagregadas) com dimensões entre 1 nm e 1 µm.

Alguns estudos visam encontrar as concentrações ambientalmente relevantes dos MP e NP, porém as limitações metodológicas e técnicas para coleta, amostragem e identificação dos materiais em escalas micro e nanométricas ainda são barreiras a serem vencidas. As variações nas concentrações são verificadas em decorrência da maior ou menor presença de poluição plástica na região. As concentrações de relevância ambiental para o NPPS foram resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 – Revisão das concentrações ambientais de PS.

Tipos de amostras	Local	Polímeros encontrados	Concentrações	Referências
Água doce	Rio Mosa, Países Baixos Rio Reno, Países Baixos	PE, PS , PP	0,14 mg/m ³ ou 9,7 MP/m ³ 0,56 mg/m ³ ou 56 MP/m ³	Urgert (2015)
Água doce	20 Rios e lagos de Wuhuan, China	PET, PP, PE, poliamida e PS	De 1.660 ± 639 a 8.925 ± 1.591 partículas/m ³	Wang et al. (2017)
Sedimentos	Lago Sarikum, Turquia	PS	MP de 1 a 5 mm: 0,005-0,024 partículas/g MP inferiores a 1mm: 0,027-0,049 partículas/g	Visne e Bat (2016)
Sedimentos	Região Reno-Meno, Alemanha	PE, PP e PS	1 g/kg ou 4.000 partículas/kg	Klein, Worch e Knepper (2015)

Tipos de amostras	Local	Polímeros encontrados	Concentrações	Referências
Efluente de uma Estação de Tratamento de Esgoto	Região Metropolitana de Chicago, região nordeste de Indiana e região central de Illinois, Estados Unidos da América	PP, PE e PS	1.338.757 partículas/dia	McCormick et al. (2016)

Fonte: Adaptado de Wan et al. (2018).

Para compreender os reais efeitos que as MP e NP podem causar no meio ambiente, dada a contemporaneidade do estudo de MP e NP, ainda não há padronização quanto a quantificação das concentrações, havendo registros de “partículas/volume”, “massa/volume” ou “massa/massa”, dificultando assim a comparação entre diferentes estudos (WAN et al., 2018).

As pesquisas sobre a toxicidade de diferentes plásticos como PP, PE e poliéster têm-se intensificado originando diversos ensaios de toxicidade utilizando os MP e NP. Destes, Wan et al. (2018) fazem uma compilação dos resultados toxicológicos encontrados para alguns organismos-teste bem como variados plásticos. A Tabela 2 apresenta uma compilação dos efeitos observados somente pelas NPPS com os detalhes relevantes para a análise. Importante salientar, que os principais efeitos encontrados não foram a imobilização, sendo este o efeito comumente avaliado para *D. magna*, pois os testes não atingiram imobilização suficiente para calcular o valor. Entretanto, os efeitos observados foram bioquímicos e alterações de comportamento nos organismos-teste (WAN et al., 2018).

Tabela 2 – Revisão dos efeitos observados do NPPS na *Daphnia magna*.

Dimensões das partículas	Concentrações	Exposição	CE ₅₀ /CI ₅₀	Efeitos	Referência
20 – 1000 nm	2 µm	24h	N/A	Retenção de MP no trato gastrointestinal e translocação de MP para depósitos de gordura.	Rosenkranz et al. (2009)
~70 nm	0,22 – 150 mg/L	21 dias	27%	Redução de crescimento e grandes alterações reprodutivas: Reduzidos número e tamanho de neonatos, aumento nos casos de malformação de neonatos.	Besseling et al. (2014)

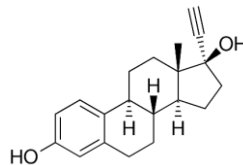
Fonte: Adaptado de Wan et al. (2018).

3.1.2 Etinilestradiol

Dentre os poluentes emergentes hidrofóbicos lançados estão alguns fármacos que não são eficientemente removidos no processo de tratamento dos efluentes. Com o aumento no adensamento urbano e o aumento no consumo de fármacos, estes compostos se fazem ainda mais presentes nos efluentes domésticos. O 17 α -etinilestradiol (EE2) (Figura 2) vem ganhando destaque por sua potente ação como desregulador endócrino. Tal fármaco é classificado como hormônio sintético e está presente na maioria dos medicamentos anticoncepcionais e de tratamentos hormonais (WEINAND; SAFER, 2015; VOISIN et al., 2016).

O EE2 apresenta duas hidroxilas, uma ligação tripla entre carbonos, um anel aromático, dois cicloexanos e um ciclopentano. As principais propriedades físico-químicas do EE2 são o coeficiente de partição (Log K_{ow} = 4,15), que caracteriza um composto hidrofóbico, e tempo de meia vida de 17 dias. Apesar de seu tempo de meia vida ser reduzido quando comparado com outros poluentes como agrotóxicos, os hormônios são continuamente lançados no meio ambiente e tendem a acumular nos sedimentos, concentrar na biota e adsorver na matéria orgânica, representando um caráter de persistência (JURGENS et al., 2002; REIS FILHO; DE ARAÚJO; VIEIRA, 2006; ROH, 2009; WIT et al., 2010).

Figura 2 - Estrutura molecular do EE2.



Fonte: Bernardelli (2014).

Entre os usos do EE2 estão a reposição hormonal para pacientes na menopausa, pós menopausa, deficiência hormonal, readequação de gênero para mulheres transexuais e tratamento para osteoporose (WEINAND; SAFER, 2015; VOISIN et al., 2016). Sua dosagem típica diária administrada por mulheres cisgênero é de 20 a 50 μ g, durante o período de 21 dias, enquanto as dosagens utilizadas por mulheres transgênero são consideravelmente variáveis

(SUIDAN et al., 2005). Após a administração, aproximadamente 25% do EE2 conjugado é excretado, representando em média 35 µg/dia (JOHNSON; BELFROID; DI CORCIA, 2000).

Apesar de não constituir como foco principal nos tratamentos de efluentes, os fármacos apresentam concentrações residuais até mesmo após o processo de tratamento convencional (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014). Contudo, mesmo quando estão a nível de concentrações traço (nanogramas por litro ou nanogramas por grama de sedimento) apresentam efeitos toxicológicos de magnitude significativa. A concentração ambiental prevista de efeito não observado (PNEC do inglês *predictive non-effect concentration*) para o EE2 foi de 0,002 ng/L através de uma série de cálculos probabilísticos considerando testes toxicológicos previamente realizados na literatura. Porém as concentrações ambientais encontram-se em sua maioria superiores a esse valor (LI et al., 2013). O maior valor encontrado em toda a literatura foi equivalente a 133,64 ng/g de sedimento seco no Mangue do Itacorubi, em Florianópolis, na mesma bacia hidrográfica que se encontra a Universidade Federal de Santa Catarina (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014; WEINAND; SAFER, 2015).

A capacidade de ligação do EE2 com os receptores de estrogênio humanos é duas vezes maior do que o hormônio natural 17β-estradiol, possuindo assim uma ação mais potente. Na biota essa ampliação de potência pode ser ainda maior, sendo observada que em algumas espécies de peixes a potência é multiplicada por um fator de cinco. Tal dado salienta a importância de se estudar em concentrações de relevância ambiental, ou seja, baixas concentrações que possuem um efeito significativo (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014).

Sobretudo, entre os principais efeitos do EE2 estão a feminização da biota aquática, maturidade sexual tardia e a redução de características sexuais secundárias (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014). Investigações *in vivo* mostraram que exposição de peixes a concentrações de 1 ng/L de E2 ou 0,1 ng/L de EE2 provocaram feminização de algumas espécies como a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e a espécie *Rutilus rutilus* (PURDOM et al., 1994; ROUTLEDGE et al., 1998; ZUEHLKE et al., 2006). Adicionalmente, devido a seu caráter hidrofóbico, é possível observar a bioacumulação do EE2 nos tecidos adiposos da biota, bem como a biomagnificação de seu efeito à medida que a cadeia trófica evolui (MATOZZO et al., 2008).

3.1.3 Mistura entre os poluentes

Em se tratando de misturas entre poluentes, um ponto importante a ser avaliado durante a escolha dos objetos de estudo é a possível interação química entre os compostos envolvidos (WAGNER; LAMBERT, 2018). No presente trabalho, ambos os poluentes apresentam potencialidades de interação devido a suas características hidrofóbicas. A superfície dos materiais plásticos pode servir como substrato para a adesão de diversos poluentes também hidrofóbicos e, portanto, dar início ao processo de carreamento, demonstrando a importância da área superficial como parâmetro para a avaliação do potencial tóxico dos materiais plásticos (WAGNER; LAMBERT, 2018).

Os NP possuem uma elevada área superficial devido à redução do diâmetro de suas partículas, potencializando não somente a interação com os demais poluentes do meio como também o possível efeito tóxico causado por essa mistura. Um fragmento macroscópico de material plástico descartado incorretamente no meio ambiente pode causar efeitos adversos também através da sua ingestão. Todavia, com a presença de poluentes aderidos em sua superfície os efeitos podem ser não somente causados pelo plástico ou pelo poluente aderido, mas pelo sistema formado plástico-poluente. Além disso, somando-se a essa problemática a redução do diâmetro das partículas plásticas e conseqüente aumento na área superficial, os NP compõem elementos de elevada importância para a compreensão dos possíveis efeitos observados no meio ambiente.

3.2 Toxicologia Ambiental

A toxicologia enquanto área do conhecimento pode ser definida como “o estudo dos efeitos de fármacos, complexos químicos, metais pesados, grandes moléculas orgânicas e misturas químicas nos seres vivos” (TIMBRELL, 2002; ZAKRZEWSKI, 2002). O aumento da exposição da biota a compostos provenientes da ação humana, tanto doméstica quanto industrial fez com que surgisse um novo ramo da toxicologia, denominado Toxicologia Ambiental, área que estuda essas interações entre os compostos despejados no meio ambiente provenientes da atividade humana, denominados toxinas ambientais com a biota (TIMBRELL, 2002; YU,

2005). Nos últimos 30 anos, a toxicologia ambiental teve sua dimensão ampliada, tomando maior consciência de que a continuidade da existência humana está associada à sobrevivência de outros seres vivos (ZAKRZEWSKI, 2002; YU, 2005).

A toxicologia ambiental é amparada pelos conceitos da toxicologia clássica como a relação entre a concentração (dose), com um efeito observado (resposta). Porém, com o aumento da demanda de uso dos materiais em nanoescala foi possível observar que um mesmo material poderia apresentar efeitos diferentes, dependendo das dimensões de suas partículas. Assim, a toxicologia de materiais em nanoescala busca entender as interações para melhor representar os efeitos que ocorrerão no meio ambiente.

Os efeitos tóxicos são observados a partir dos ensaios toxicológicos. O primeiro estágio dos ensaios toxicológicos é a caracterização dos poluentes, de maneira que se possa estimar seu modo de ação nos organismos vivos e o processo de degradação natural antes da realização dos ensaios (ADEMA, 1978). As análises compreendem-se da exposição dos seres vivos ao composto, no caso da biota aquática, e a dispersão do xenobiótico em uma solução contendo a espécie química a ser avaliada. Em seguida, é observado o organismo-teste a nível microscópico e, assim, verificada a possível alteração em alguma estrutura fisiológica, na reprodução, no crescimento ou na imobilidade. No caso dos hormônios sexuais são avaliadas as características sexuais dos organismos como, por exemplo, avaliar a possível alteração de alguma estrutura ou nas taxas de reprodução (COSTA et al., 2008).

As espécies com a características biológicas bem definidas, ou seja, conhecidas de maneira tal que possam ser utilizados como indicadores de toxicidade, são denominados organismos-teste. Alguns fatores que determinam um bom indicador são a sensibilidade ao composto em questão, a facilidade de reprodução e cultivo, velocidade de crescimento e desenvolvimento, disponibilidade no mercado e a facilidade de manipulação (COSTA et al., 2008).

3.2.1.1 *Daphnia magna*

A *D. magna* (Figura 3) é um microcrustáceo planctônico da subordem dos Cladocera e da família dos *Daphnídeos*, que geralmente reside em águas frescas e limpas. Conhecidas como pulgas d'água, as *D. magna* são seres frágeis a agentes externos. Medem entre 2 e 6 mm de comprimento e possuem um tempo de gestação de 1 a 4 dias, gerando uma prole de 1 a 100

filhotes que estarão maduros sexualmente de 6 a 10 dias. Quando as condições ambientais são favoráveis, sua reprodução é partenogênica, gerando apenas filhotes fêmeas. Os organismos machos surgem apenas em condições de estresse e são visivelmente menores (COSTA et al., 2008; KNIE;LOPES, 2004).

Figura 3 - *D. magna*.



Fonte: Arquivo LABTOX.

A relevância desses organismos para os testes de toxicidade se deve à sua grande disseminação nos corpos hídricos das zonas temperadas; sua posição na cadeia trófica, na qual atuam como consumidores primários consumindo material orgânico particulado por filtração de partículas com diâmetro inferior a 50 μm , sem distinção; e sua similaridade entre o organismo materno e seus filhotes quando a reprodução é partenogênica. Desta forma, o organismo-teste *D. magna* pode ser classificado como um organismo chave para a detecção de alterações ambientais, sendo reconhecido internacionalmente como um modelo toxicológico importante bem como um indicador de toxicidade aquática (COSTA et al., 2008; KNIE;LOPES, 2004).

3.2.2 Toxicidade de Misturas

A alteração no efeito causado por um primeiro composto, devido a presença de um segundo em algum ser vivo, é denominada interação toxicológica, logo é a manifestação de um efeito observado e não depende, necessariamente, da interação química entre os compostos. Essas relações toxicológicas podem ser classificadas de acordo com seus resultados enquanto mistura, em comparação com os efeitos de cada substância isoladamente. Ao iniciar uma análise destes fatores devem-se considerar as dificuldades associadas com qualquer hipótese, tais como as diferentes camadas de complexidade que as interações entre os compostos podem resultar, a imprevisibilidade de algumas reações químicas e a importância de se conhecer quais dados

foram encontrados para a elaboração dos cálculos (FOUCQUIER; GUEDJ, 2015; RODEA-PALOMARES et al., 2015). Segue, portanto, um breve resumo das principais interações toxicológicas descritas por Rodea-Palomares et al. (2015).

- Efeito aditivo: quando o efeito final é equivalente à soma algébrica dos efeitos dos diferentes agentes envolvidos;
- Efeito sinérgico ou sinérgico: quando o efeito final é maior que a soma algébrica dos efeitos de cada agente isolado;
- Potencialização: quando um agente não apresenta efeito tóxico, porém, aumenta o efeito de um segundo composto quando estes entram em contato;
- Antagonismo: quando o efeito de um dos agentes é diminuído, inativado ou eliminado através do contato com outro composto.

A Tabela 3 resume o tema, na qual a coluna “Equação representativa” indica uma equação simbólica em que os valores no primeiro termo da equação representam o efeito de cada um dos agentes químicos, Ef_1 corresponde ao efeito do composto 1, Ef_2 corresponde ao efeito do composto 2 e Ef_{mix} representa o efeito da mistura dos dois compostos ($Ef_1 + Ef_2 \rightarrow Ef_{mix}$).

Tabela 3 - Resumo das principais interações toxicológicas.

Tipo de interação Toxicológica	Equação representativa
Sem efeito aparente	$0 + 1 \rightarrow 1$
Aditividade	$1 + 1 \rightarrow 2$
Sinergismo	$1 + 1 \rightarrow 10$
Antagonismo	$1 + 1 \rightarrow 1$
Potenciação	$0 + 1 \rightarrow 2$
Inibição (AC)	$1 + 1 \rightarrow 0$
Masking (AI)	$1 + 1 \rightarrow 0$

Fonte: Adaptado de Rodea-Palomares et al. (2015).

A toxicidade de misturas se preocupa em compreender tais interações e descrever os mecanismos de ação tóxica, que resultam no efeito observado, com o intuito de se aproximar da situação real de exposição, na qual o meio encontra-se com diversos poluentes simultaneamente. O presente trabalho visa avaliar a toxicidade da mistura a partir das informações sobre as características físico-químicas e toxicidade dos compostos isoladamente, denominado método ascendente (*bottom-up approach*) (SILVA et al., 2018).

Para a compreensão das interações, são utilizados dois princípios, sendo eles o da Ação Independente (AI) e o da Adição de Concentração (AC), tais tópicos serão discutidos a seguir. Caso os mecanismos de ação tóxica ainda não sejam evidentes para os compostos avaliados, não é possível saber exatamente quais os efeitos da mistura e por qual mecanismo os dois estão agindo, utilizando somente os dados obtidos nos ensaios. Nesse sentido, a melhor maneira de interpretar os dados sem realizar ensaios adicionais para entender o modo de ação é aplicando os dois modelos de interação para os mesmos dados e avaliando o ajuste da curva à AI e a AC (JONKER et al., 2005). Para a avaliação dos resultados uma ferramenta que tem sido utilizada eficientemente é o MixTox, criada por Jonker et al. (2005). A ferramenta realiza a análise estatística dos gráficos construídos e permite avaliar os tipos de interação que ocorreram além de quais as suas especificidades.

Tabela 4 - Avaliação da interação toxicológica proposta por Jonker et al. (2005).

Definição	Conceito	Referência
Sem desvio (ND)	Os dados se adequam aos modelos de AC ou AI	Bliss (BLISS, 1939) Hewlett e Plackett (1959)
Sinergismo ou antagonismo (S/A)	Todas as combinações de mistura apresentaram uma toxicidade mais severa (sinergismo) ou menos severa (antagonismo) do que o modelo de referência	Bliss (BLISS, 1939) Hewlett e Plackett (1959)
Desvio dependente do nível da dose (DL)	Os desvios do modelo em baixas doses são diferentes do desvio do modelo em altas doses (antagonismo em baixas doses e sinergismo em altas doses, por exemplo)	van der Geest et al. (2000) Haas et al. (1996) Gennings et al. (GENNINGS et al., 2002)
Desvio dependente da razão entre as doses (DR)	Os desvios do modelo apresentam comportamentos distintos quanto maior a prevalência de um dos compostos. Por exemplo, apresentando sinergismo em um composto e antagonismo em outro.	Haas et al. (1996) Carter e Gennings (1994)

Adaptado de Jonker et al. (2005)

As concentrações dos poluentes no meio ambiente são variáveis, como as condições ambientais, portanto, é importante descrever quais os efeitos que ocorrem em diferentes proporções de misturas (JONKER et al., 2005). Ao se avaliar uma gama maior de combinações

entre os poluentes, é possível avaliar o risco para situações específicas. Assim sendo, alguns métodos de análise foram elaborados para diferentes finalidades.

3.2.2.1 Adição de Concentração

O conceito da AC, também chamado de “Ação Similar” ou Princípio da Aditividade de Loewe, parte do pressuposto que um composto pode ser substituído parcial ou integralmente por outro, desde que em uma fração equitóxica, sem comprometer o efeito final da mistura (GESTEL, 2012) desde que sempre sejam observados compostos que atuam nos mesmos sítios de ação e/ou apresentam os mesmos efeitos.

Caso esta simplificação seja aplicável, torna-se possível parametrizar as concentrações para Unidades Tóxicas (UT). As UT são úteis como frações dos efeitos equitóxicos para realizar operações entre os diferentes compostos envolvidos como a soma das concentrações. A Equação 1 mostra esta conversão, dividindo as concentrações por suas respectivas Concentrações Efetivas. Uma maneira prática de verificar se AC adere bem aos dados consiste em somar a razão entre a concentração do composto i (ou dose c_i) e sua respectiva Concentração Efetiva que causa efeito em $x\%$ dos organismos testes (CEX_i) como descrito na Equação 2. Ainda na Equação 2, pode-se também utilizar p como a parcela do composto i que contribui para a toxicidade total, representando neste caso que a soma de todas as parcelas de efeito deve ser igual a 1 como demonstra a Equação 3.

$$UT = \frac{c_i}{CE_{50}} \quad (1)$$

Fonte: Rodea-Palomares et al. (2015).

$$CEX_{Mix} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{p}{CEX_i} \right)^{-1} \quad (2)$$

Fonte: Gestel (2012).

$$\sum_{i=1}^n p_i = 1 \quad (3)$$

Fonte: Gestel (2012).

A necessidade de verificação da adequação do modelo à situação ideal é um dos principais parâmetros para observar a representatividade do modelo. No caso da AC, a verificação é feita através da soma das frações. Quanto mais próxima do valor unitário, mais representativa é a adequação dos dados ao modelo (Equação 4) (GESTEL, 2012).

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{CEX_i} = 1 \quad (4)$$

Fonte: Gestel (2012).

A escolha da AC implica considerar todos os compostos presentes na mistura como contribuintes para a toxicidade total independente da sua concentração. Portanto, incluindo-se compostos em baixas concentrações nas quais não existe efeito observado isoladamente, desde que, sejam adicionados compostos suficientes para que a soma dos efeitos seja expressiva (GESTEL, 2012).

Enquanto para um único composto é possível calcular uma curva dose-resposta, delimitando pontos suficientes em uma mistura é possível que seja calculada uma função da resposta da mistura com $i + 1$ dimensões, onde i é o número de compostos presentes. Essa função não pode ser descrita exclusivamente pelas equações dos compostos isolados, portanto sabe-se que a resposta será função do vetor α dos parâmetros do modelo e também das concentrações dos compostos presentes c_i (Equação 5) (GESTEL, 2012).

As concentrações dos diversos compostos presentes devem ser convertidas para frações de um único composto como sugere o modelo AC. O fator de potência g_i é responsável por essa conversão, assumindo que todas as curvas dose-resposta são paralelas e corrigindo suas concentrações em termos de um único composto. Logo, o fator de potência transforma todas as concentrações em diluições de um único composto, demonstrado na Equação 5 (GESTEL, 2012).

$$E(c_{mix}) = f(\alpha, c_i + \sum_{i=1}^n g_i c_i) \quad (5)$$

Fonte: Gestel (2012).

3.2.2.2 Ação Independente

Em contraponto à AC, o conceito da AI entende que o efeito (E) conjunto de diferentes compostos pode ser calculado a partir da resposta individual. Um dos sinônimos para a AI é o Princípio da Independência de Bliss, remetendo à ideia de que cada composto envolvido é independente em seu efeito (GESTEL, 2012). A AI assume que concentrações de um composto (c_i) que não possuem efeito quando isoladas continuarão não causando efeito quando em mistura (c_{mix}) com demais compostos independentemente da quantidade de substâncias. Este modelo possui como premissa básica a não interação toxicológica dos compostos, ou seja, seus sítios de ação são distintos. A Equação 6 descreve o efeito da mistura como um produtório, satisfazendo estatisticamente a condição inicial da independência de cada composto.

$$E(c_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E(c_i)] \quad (6)$$

Fonte: Gestel (2012).

A concentração da mistura, neste contexto, deve ser vista como a soma algébrica das concentrações dos compostos isolados e não mais convertendo-as a Unidades Tóxicas (Equação 7).

$$c_{mix} = \sum_{i=1}^n c_i \quad (7)$$

Fonte: Gestel (2012).

3.2.2.3 Análise das Interações Toxicológicas

As especificidades dos conceitos AC e AI são essenciais para a avaliação das misturas. O principal fator limitante para a escolha entre um dos conceitos consiste no efeito observado em cada um dos compostos bem como os sítios de ação envolvidos. Existem algumas tentativas de centralizar tais informações em bancos de dados *online* gratuitas como a ECOTOX® da Agência de Proteção Ambiental Americana (Environmental Protection Agency – EPA) (EPA, 2019), porém a obtenção inicial dos dados em laboratório é consideravelmente complexa, extensa e dispendiosa, atrasando, assim, a entrada das informações nos bancos de dados.

Devido a indisponibilidade dos dados no nível de detalhamento necessário para optar entre os princípios, faz-se necessária a aplicação de ambos os modelos e posterior comparação de seus parâmetros estatísticos e avaliando a adequação dos dados quantificados com os

modelos calculados (GESTEL, 2012). Elaborada a importância de calcular as misturas em ambos os modelos, deve-se escolher os métodos de avaliação da interação toxicológica entre os compostos envolvidos, definindo tanto o planejamento do experimento quanto a metodologia empregada.

Dentre os diversos métodos para avaliação de misturas destacam-se o da Equipotência/Equitoxicidade e o Método do Isoblograma. O princípio básico da Equitoxicidade consiste em testar os dois ou mais xenobióticos em concentrações que apresentem o mesmo efeito como, por exemplo, utilizando as CE50 dos dois compostos como guia e realizar testes e mantendo a mesma proporção entre os xenobióticos (GESTEL, 2012; RODEA-PALOMARES et al., 2015). No entanto, este método apresenta como fragilidade a representação limitada do espaço amostral e das possibilidades de interações entre os compostos no meio ambiente.

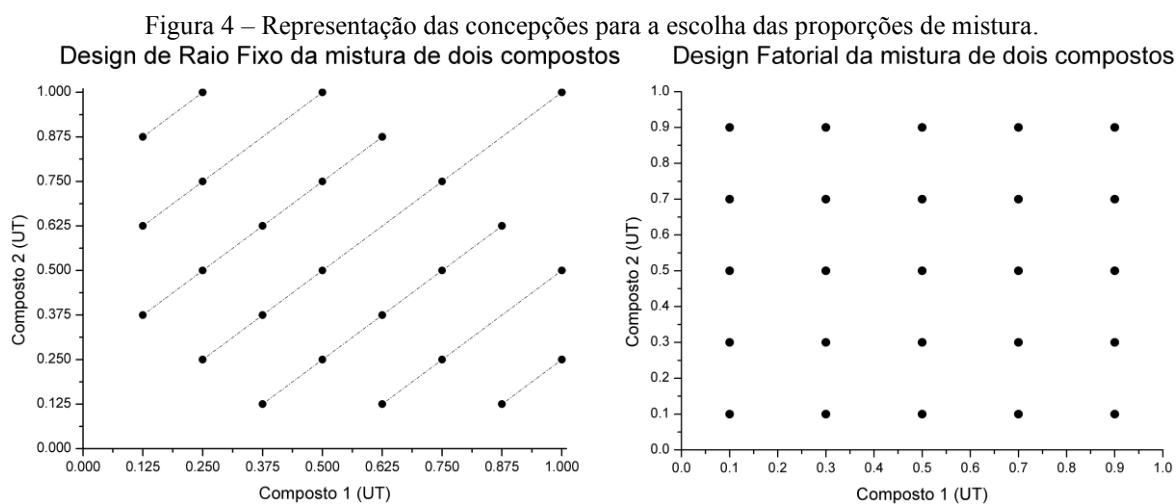
Por outro lado, o Método do Isoblograma consiste em utilizar diferentes combinações de concentrações dos compostos testados a fim de compreender as interações toxicológicas em diferentes proporções (GESTEL, 2012; RODEA-PALOMARES et al., 2015). Este foi o método selecionado para a realização do presente trabalho, pois proporciona maior entendimento do comportamento das interações toxicológicas e fornece uma visão gráfica mais detalhada, facilitando a compreensão da toxicidade.

3.2.2.3.1 Método do Isoblograma

O Método do Isoblograma consiste em realizar uma varredura no maior número possível de combinações de concentrações entre os dois compostos envolvidos, representando graficamente tais interações. O gráfico corresponde às concentrações dos solutos analisados nos eixos X e Y, e o eixo Z representado pelos efeitos observados. Este gráfico é denominado isoblograma (RODEA-PALOMARES et al., 2015).

Durante a elaboração das misturas entre duas substâncias em solução é importante que as proporções da mistura sejam otimizadas para melhor abranger as possibilidades assertivas na região de maior efeito. Durante a escolha dessas proporções, há a aplicação de uma entre duas concepções importantes: o design de raio fixo ou o design fatorial, como disposto na

Figura 4. É possível observar que os dois modelos possuem o mesmo número de pontos de análise, porém são rearranjados de acordo com as premissas de cada conceito (FOUCQUIER; GUEDJ, 2015).



Fonte: Vaz, 2017.

O design de raio fixo considera que a interação entre as duas substâncias agirá como um terceiro composto diferente dos anteriores e com efeitos próprios. Por isso, a proporção da mistura projeta linhas com a mesma inclinação, garantindo a mesma razão entre todos os pontos de cada reta (FOUCQUIER; GUEDJ, 2015). Quanto ao design fatorial, tem-se como conceito principal a varredura completa de uma grande gama de possibilidades de interação, porém com pontos equidistantes, não representando potenciais alterações nos efeitos intermediários (FOUCQUIER; GUEDJ, 2015).

Uma maneira eficiente de se analisar as interações entre dois compostos, que possuem curvas dose-resposta não lineares, é a análise das concentrações de cada um dos componentes que causa um mesmo efeito E , conceito denominado equitoxicidade e amplamente utilizado em ensaios toxicológicos de misturas (CAO et al., 2007; ISWARYA et al., 2016; AZEVEDO et al., 2017; DENG et al., 2017; NYS; JANSSEN; DE SCHAMPHELAERE, 2017).

As linhas que causam o mesmo efeito são denominadas isoboles (γ). Para descrevê-las no isobolograma, do método da Aditividade de Loewe, utiliza-se a Equação 8, sendo a a concentração e $CE_{a,x}$ o efeito x do fármaco a , enquanto b e $CE_{b,x}$ os mesmos equivalentes do composto b (CHOU et al., 2010).

$$\gamma = \frac{a}{CE_{a,x}} + \frac{b}{CE_{b,x}} \quad (8)$$

Fonte: Chou et al. (2010).

Quando $CE_x = CE_{50}$, deduz-se, então, que o somatório das unidades tóxicas dos compostos a e b são equivalentes às unidades tóxicas da mistura (UT_{mix}), como consta na Equação 9 (CHOU et al., 2010).

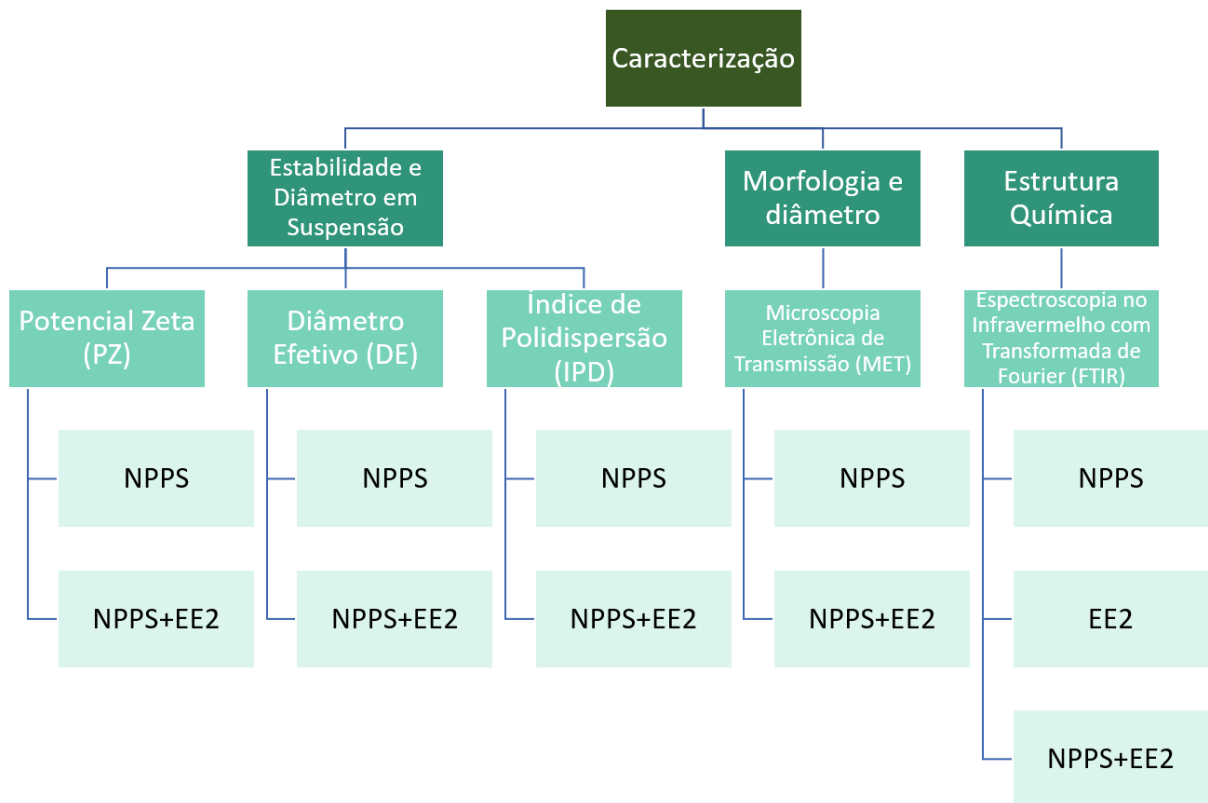
$$\gamma = \frac{a}{CE_{50,a}} + \frac{b}{CE_{50,b}} = UT_a + UT_b = UT_{mix} \quad (9)$$

Fonte: Chou et al. (2010).

4 METODOLOGIA

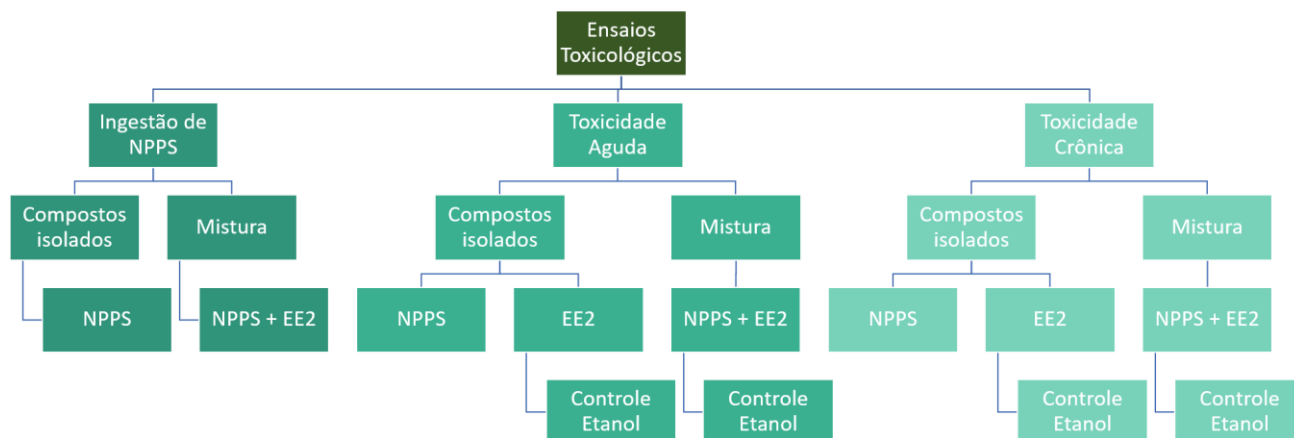
Para facilitar a compreensão da metodologia de trabalho utilizada do presente estudo foram elaborados dois esquemas: um apresentando as técnicas empregadas na caracterização dos compostos testados (Figura 5) e outro apresentando os testes toxicológicos realizados para os compostos puros e as misturas (Figura 6). Nas sessões a seguir, será feito um detalhamento de cada uma das etapas apresentadas nestes esquemas.

Figura 5 - Esquema representativo da caracterização dos compostos testados.



Fonte: O autor.

Figura 6 - Esquema representativo dos ensaios toxicológicos realizados.



Fonte: O autor.

4.1 COMPOSTOS TESTADOS

O NPPS foi sintetizado no LABTOX pela Dra. Denice Schulz Vicentini, conforme metodologia descrita em Vicentini *et al.* (VICENTINI *et al.*, 2019) com apenas uma modificação, que consistiu em reduzir a quantidade do emulsificante (dodecil sulfato sódico (SDS)) adicionado de 0,49 mmol para 0,35 mmol, visando minimizar excesso do emulsificante no meio reacional. Resumidamente, o monômero estireno foi polimerizado pelo método de emulsão convencional na presença de sementes de nucleação de nanopartículas de óxido de alumínio (Al₂O₃), do emulsificante SDS e do iniciador persulfato de potássio (KPS) (VICENTINI *et al.* 2019).

O hormônio EE2 (pureza 98%) foi adquirido pela Sigma-Aldrich. O etanol (Synth, 98%) foi usado para a solubilização do EE2 em pó. Para todos os testes foi utilizada água de osmose reversa (OR) com condutividade de 0,1 µS cm⁻¹.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Metodologia de Caracterização

A Tabela 5 apresenta o resumo das amostras caracterizadas, as propriedades físico-químicas que foram avaliadas, as técnicas físico-químicas utilizadas para a caracterização dos compostos, a marca e modelo dos equipamentos utilizado e a respectiva localização dos equipamentos nos laboratórios da UFSC.

Tabela 5 - Resumo das técnicas físico-químicas utilizadas para a caracterização dos NPPS, EE2 e das misturas.

Amostra	Caracterização	Técnica	Aparelho	Local/UFSC
NPPS NPPS-EE2	Estabilidade em suspensão	Mobilidade eletroforética	Nanobrook 90Plus Brookhaven	LABTOX/ENS
NPPS NPPS-EE2	Diâmetro Efetivo e Índice de Polidispersão	DLS	Nanobrook 90Plus Brookhaven	LABTOX/ENS
NPPS EE2 NPPS-EE2	Grupos funcionais	FTIR	Espectrofotômetro Cary 600 Series FTIR	Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos/EQA
NPPS NPPS-EE2	Morfologia e diâmetro	MET	TEM - JEM 1011(JEOL Ltd., Tokyo, Japan), usando 100 kV	LCME
NPPS NPPS-EE2	Quantificação de alumínio total	ICP-MS	ICP-MS Perkin Elmer Sciex, modelo Elan 6000 (Toronto, Canadá)	Laboratório de Espectrometria Atômica/Dpto de química

Elaborado pelo autor.

4.2.1.1 Morfologia e diâmetro

Nas micrografias obtidas pelas técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foram avaliados a morfologia, diâmetro médio de partículas e o potencial de aglomeração das NPPS e misturas (Tabela 6). A preparação das amostras consistiu na diluição dos compostos nas concentrações de 140 mg/L para o NPPS puro e para a mistura foram feitas imagens com concentrações maiores, sendo as elas as aplicadas no teste agudo (133,04 mg/L de NPPS e 6,70 mg/L de EE2) e no teste crônico (530,00 µg/L de NPPS e 100 µg/L de EE2). Em seguida, as suspensões foram gotejadas em uma grade de cobre recoberta por um filme de carbono. A gota permaneceu 5 min sobre a grade para a decantação das partículas sobre a

superfície da grade. Por fim, o excesso de suspensão foi removido com um papel absorvente (MELEGARI et al., 2019 ; DENG et al., 2017). As imagens foram tratadas com o *software* ImageJ para a contagem e determinação do diâmetro médio das partículas. Os resultados foram plotados e os diâmetros calculados com o *software* OriginPro 8[®], podendo identificar aglomerados de partículas bem como um cálculo do diâmetro médio.

4.2.1.2 Estabilidade diâmetro efetivo e índice de polidispersão em suspensão

O PZ avalia a estabilidade de partículas sólidas em suspensão via técnica de mobilidade eletroforética. A estabilidade do sólido aumenta proporcionalmente com o aumento em valor absoluto do valor de PZ medido em mV (MURDOCK et al., 2008). De acordo com Murdock *et al.* (2007), uma amostra é considerada estável quando seu PZ é igual ou superior a 30 mV em módulo. Sendo assim, quanto menor seu valor absoluto, maior a instabilidade, logo, maior probabilidade de floculação dos sólidos suspensos e, conseqüentemente, da sedimentação no líquido. O resultado é parametrizado em relação ao valor do PZ em mV. Foi avaliada a variação quanto a estabilidade da suspensão de NPPS (1,4 g L⁻¹) e na mistura com o hormônio EE2 (1,4 g L⁻¹ de NPPS e 5 mg L⁻¹ de EE2). Retirou-se uma alíquota de 5 mL de cada amostra e utilizada uma cubeta polimérica acoplado o eletrodo para a leitura no equipamento. Utilizando a mesma cubeta da medição do PZ, retirou-se o eletrodo e foi efetuada as leituras de DE e IPD.

O DE significa a dimensão das partículas em suspensão obtida a partir da técnica de DLS, que consiste na análise das flutuações de intensidade da luz espalhada em um determinado ângulo. Essa análise fornece informações sobre o movimento da partícula, sendo que o movimento é a causa das flutuações da intensidade.

O IPD representa a distribuição do tamanho das partículas e seus valores , quando menores ou iguais a 0,3, são considerados uma suspensão monodispersos, apresentando uma faixa estreita de tamanhos, ou seja, um baixo desvio padrão (JIANG; OBERDÖRSTER; BISWAS, 2009; KÜLKAMP et al., 2009).

Os resultados foram estatisticamente tratados utilizando o a análise *one-way* ANOVA no *software* GraphPad Prism 6[®]. As medidas de PZ, DE e IPD foram realizadas a partir das

suspensões das NPPS em OR e nos meios aquosos ISO e M4 no equipamento Nanobrook Haven 90Plus PALS. Tais análises foram realizadas de acordo com o limite de detecção do equipamento, sendo testadas diversas concentrações até ser possível obter um resultado. Assim, foram utilizadas as concentrações de 1,4 g L⁻¹ de NPPS isolado e em mistura utilizou-se 1,4 g L⁻¹ de NPPS e 5 mg L⁻¹. A solubilidade máxima conseguida com o hormônio foi equivalente a 10 mg L⁻¹, porém devido aos limites de leitura do equipamento foi utilizada a concentração de 5 mg L⁻¹.

As concentrações que foram aplicadas nos testes não puderam ser lidas pelo equipamento, sendo necessário utilizar concentrações cada vez maiores de NPPS, tornando impossível manter a proporção das concentrações das respectivas CE50, por exemplo.

4.2.1.3 Estrutura química

A avaliação das estruturas químicas dos compostos estudados pela técnica FTIR teve como objetivo a identificação de possíveis alterações nos grupos funcionais dos compostos puros após a mistura, isto é, interações químicas entre os compostos. Caso haja interação química, as bandas dos grupos funcionais podem ser deslocadas. Os espectros de FTIR foram registrados entre 4000 a 650 cm⁻¹ (Tabela 6).

Os espectros foram obtidos no Espectrofotômetro Cary 600 Series FTIR pertencente à Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos/UFSC. Para obter os espectros do NPPS e NPPS-EE2 foram utilizadas as concentrações 1 µg L⁻¹ e 1 µg L⁻¹ + 1 µg L⁻¹, respectivamente. Todas as amostras foram depositadas no leitor de seleneto de zinco. O espectro do EE2 foi obtido a partir do material sólido, enquanto os espectros do NPPS e do NPPS-EE2 a leitura foi feita através de uma solução com 1 µg L⁻¹ de cada composto.

4.2.2 Ensaios Toxicológicos

Os ensaios toxicológicos de toxicidade aguda e crônica foram realizados utilizando o microcrustáceo *D. magna*. Os organismos-teste foram cultivados continuamente no LABTOX de acordo com a ABNT NBR 12.713/2016. O cultivo dos organismos deu-se em béqueres de vidro de 2 L cada, acondicionados em incubadora com temperatura controlada de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h de luz a cada 24 h. Cada béquer foi preenchido com aproximadamente 1.200 mL de meio de cultura M4 (NBR 12.713, 2016), onde foram mantidos em média 30

organismos progenitores. A renovação do meio M4 foi realizada três vezes por semana, ocorrendo a transferência dos organismos progenitores para um novo meio no qual foram alimentados e o meio anterior é descartado. A alga *Desodermus subspicatus* foi utilizada como fonte de alimento no momento da troca do meio, sendo esta cultivada no LABTOX em conformidade com a NBR12.713/2016

Na troca do meio somente os organismos adultos foram transferidos para o novo recipiente, enquanto os filhotes foram reservados para utilização em testes toxicológicos ou, no caso de não serem utilizados, foram descartados em um galão de hipoclorito de sódio (NaClO).

Além dos ensaios de toxicidade aguda e crônica, foi realizado um teste de ingestão dos NPPS com e sem a presença do EE2 com o intuito de comparar a ingestão do poluente.

4.2.2.1 Ensaio de ingestão de NPPS

A principal rota de exposição sugerida por Bakir *et al.* (2016) ocorre pela da ingestão dos poluentes com o alimento, tornando esta via de maior preocupação em relação aos problemas ambientais. A ingestão do NPPS pôde ser mensurada pela quantificação dos NPPS presentes no trato intestinal dos organismos teste. A metodologia aplicada para esta quantificação foi a reportada por Vicentini *et al.* (VICENTINI et al., 2019), que se utiliza da quantificação das nanopartículas Al_2O_3 formadoras dos núcleos dos NPPS como forma indireta de quantificar os NPPS ingeridos ou internalizados no organismo. A técnica de Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP- MS) foi usada para quantificar o Al total.

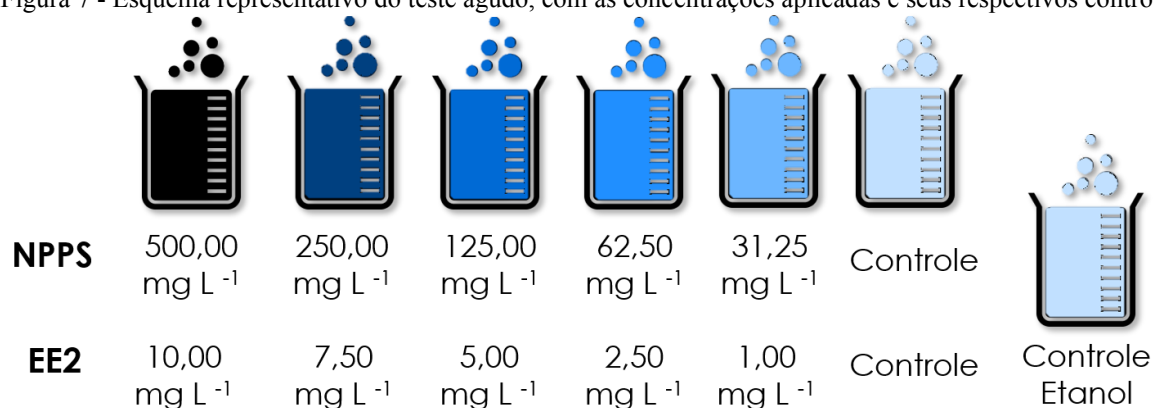
Foram expostos 20 neonatos à CE10 do NPPS ($53,09 \text{ mg L}^{-1}$) e outros 20 à mistura entre a CE10 do NPPS e a CE10 do EE2 ($0,57 \text{ mg L}^{-1}$). Os organismos foram expostos por 48 h, em seguida, lavados com água de OR para remover as NPPS que possam ter aderido na carapaça e antenas. Depois, os organismos foram secos em estufa por 24 h e encaminhados ao Laboratório de Espectrometria Atômica, que realizou a digestão das amostras e analisou as amostras utilizando a técnica ICP-MS com introdução da amostra por nebulizador pneumático, no ICP-MS Perkin Elmer Sciex, modelo Elan 6000 (Toronto, Canadá). Previamente, as amostras foram digeridas com a adição de ácido nítrico (HNO_3) e peróxido de hidrogênio

(H₂O₂) com assistência do Micro-Ondas Provecto, modelo DGT 100 Plus (São Paulo, Brasil). O volume final das amostras foi aferido para 50 mL com água deionizada.

4.2.2.2 Ensaios de Toxicidade Aguda

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado para a avaliação dos efeitos da exposição de um xenobiótico a um organismo-teste durante um curto período de tempo e em altas concentrações. O objetivo do teste agudo consistiu em observar efeitos em situações extremas do contato com o composto, estando geralmente associado com a mortalidade ou imobilização dos organismos-teste (ABNT, 2016). Os ensaios foram realizados de acordo com a NBR 12.713/2016.

Figura 7 - Esquema representativo do teste agudo, com as concentrações aplicadas e seus respectivos controles.



Fonte: O autor.

Foram expostos 10 indivíduos por béquer e, então, adicionado o componente a ser testado no meio líquido, após 48 h foram contados quantos organismos encontraram-se imóveis. Os resultados foram trabalhados estatisticamente através do método Trimmed Spearman-Kärber no software *GraphPad Prism 6®*, tendo como resultado a Concentração Efetiva que causa imobilidade a 50% da população exposta (CE50), e respectivos parâmetros de melhor ajuste à curva dose-resposta. Para fins de confiabilidade de ambos os contaminantes, os testes foram repetidos 6 vezes, descartando-se o valor com maior discrepância, mantendo-se assim um número amostral (n) de 5.

A capacidade total de cada béquer é de 50 mL, sendo que, desses, somente 25 mL foram utilizados no ensaio, logo, sem a alimentação dos organismos ou a troca do meio durante as 48 h do teste. Os ensaios foram realizados em duplicata e, simultaneamente, um controle

positivo com diluição de etanol na maior concentração aplicada no teste e outro negativo com o meio ISO. Caso houvesse a mortalidade de mais de 10% no controle negativo, o teste seria invalidado.

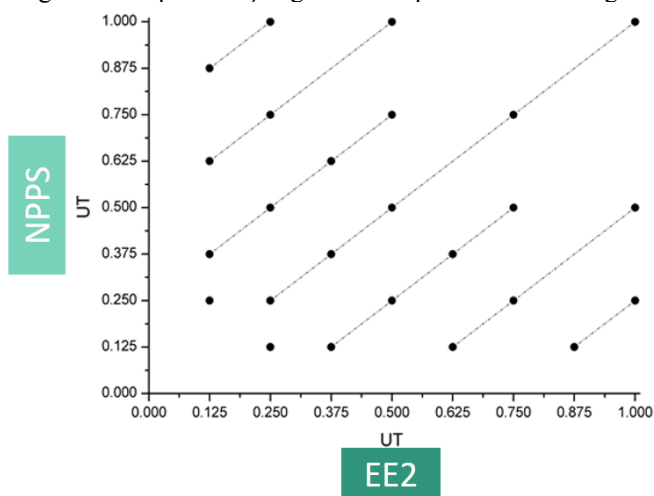
Devido à utilização do etanol como solvente do EE2, é essencial salientar que as *D. magna* possuem uma CE50 de etanol equivalente a 98,85 mg/L (SILVA et al., 2016).

4.2.2.2.1 Ensaio agudos das misturas

Para a elaboração das misturas optou-se pelo design de raio fixo. A metodologia proposta por Gestel et al. (2012) indicou, pelo menos, 20 pontos amostrais. O presente estudo adotou 25 pontos descritos em função das unidades tóxicas dos compostos, conforme apresentado na Tabela 6 com suas devidas conversões para concentração em mg L⁻¹ e em µM.

Os pontos foram escolhidos de acordo com o design de raio fixo. Assume-se que os dois poluentes poderiam interagir de alguma maneira e agir como um terceiro composto diferente dos anteriores, premissa básica do design. Visando a validade estatística dos resultados, os testes foram realizados em 4 repetições, assim, é possível aplicá-los na planilha MixTox supracitada e obter uma análise mais detalhada dos desvios dos dados em comparação aos modelos AC e AI.

Figura 8 - Representação gráfica dos pontos do isoblograma



Fonte: O autor.

Tabela 6 - Pontos do Isoblograma.

#	EE2	NPPS	EE2	NPPS	EE2	NPPS
	UT	UT	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	µM	µM
1	0,625	0,875	4,19	116,41	14,13	1117,71
2	0,125	0,375	0,84	49,89	2,83	479,02
3	0,125	0,625	0,84	83,15	2,83	798,37
4	0,125	0,875	0,84	116,41	2,83	1117,71
5	0,500	1,000	3,35	133,04	11,31	1277,39
6	1,000	1,000	6,70	133,04	22,61	1277,39
7	0,875	0,625	5,86	83,15	19,79	798,37
8	0,250	0,250	1,68	33,26	5,65	319,35
9	0,250	0,500	1,68	66,52	5,65	638,69
10	0,250	0,750	1,68	99,78	5,65	958,04
11	0,750	0,750	5,03	99,78	16,96	958,04
12	0,375	0,125	2,51	16,63	8,48	159,67
13	0,375	0,375	2,51	49,89	8,48	479,02
14	0,375	0,625	2,51	83,15	8,48	798,37
15	1,000	0,500	6,70	66,52	22,61	638,69
16	0,500	0,250	3,35	33,26	11,31	319,35
17	0,500	0,500	3,35	66,52	11,31	638,69
18	0,625	0,125	4,19	16,63	14,13	159,67
19	0,625	0,375	4,19	49,89	14,13	479,02
20	0,875	0,125	5,86	16,63	19,79	159,67
21	0,750	0,250	5,03	33,26	16,96	319,35
22	0,500	0,750	3,35	99,78	11,31	958,04
23	0,750	0,500	5,03	66,52	16,96	638,69
24	1,000	0,250	6,70	33,26	22,61	319,35
25	0,250	1,000	1,68	133,04	5,65	1277,39

Fonte: o autor.

4.2.2.3 Ensaios de Toxicidade Crônica dos compostos isolados

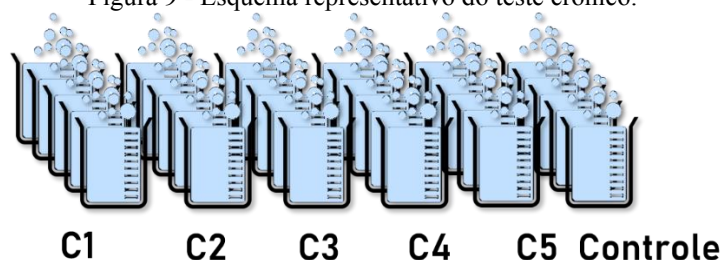
A avaliação dos efeitos crônicos, ou subletais, de um composto é realizada com concentrações inferiores à referida CE50 em um período que compreende a maior parte do ciclo de vida do organismo teste. Para *D. magna*, os testes crônicos ocorrem em um período de 21 dias.

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente no software *GraphPad Prism 6®*, usualmente tendo como resultado a Concentração de Efeito Não-Observado (CENO), a Concentração de Efeito Observado (CEO) e respectivos parâmetros de melhor ajuste à curva

dose-resposta. Para cada teste foram dispostos 10 béqueres por diluição, um teste controle e um organismo recém-nascido por béquer. Ocorre, então, a troca do meio e alimentação dos organismos 3 vezes por semana. O teste com *D. magna* é uma adaptação da ISO 10.706/2000 e da NBR 13.373/2010.

O teste de toxicidade crônica com *D. magna* avalia principalmente reprodução, longevidade e crescimento, porém também é possível observar alterações morfológicas. A avaliação da reprodução consiste na contagem do número de filhotes gerado por cada organismo ao longo do teste, ao fim do qual a média de filhotes por réplica é resultado da razão entre o número de filhotes e o número de posturas para cada organismo *D. magna* exposto. A quantificação da longevidade se dá através da contagem de organismos adultos sobreviventes após 21 dias, enquanto o crescimento é avaliado com a aferição do comprimento de cada organismo através da utilização do estereomicroscópio do Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB) para o registro das imagens com posterior aferição do tamanho dos organismos utilizando o *software* ImageJ®. Os valores dos 3 parâmetros são então comparados com os do teste controle utilizando a análise estatística ANOVA.

Figura 9 - Esquema representativo do teste crônico.



4.2.2.3.1 Ensaios de Toxicidade Crônica das misturas

Quanto aos testes crônicos das misturas, o presente estudo visou testar concentrações ambientalmente relevantes para o teste crônico. Portanto, não foram obtidos valores para a CEO ou CENO. A metodologia para a definição de concentrações ambientalmente relevantes foi obtida a partir de uma revisão bibliográfica, na qual foram obtidas as concentrações presentes em ambientes naturais. Porém para o NPPS e demais micro e nanoplásticos em geral, não existe

consenso sobre a representação da quantidade de plásticos presentes no meio ambiente. Nesse sentido, o presente trabalho optou por utilizar uma fração da CE10 do NPPS, obtida nos testes agudos. Definiu-se que as concentrações de NPPS deveriam pertencer à mesma ordem de grandeza daquelas aplicadas utilizando o EE2. Como a literatura apresenta concentrações ambientalmente quantificadas na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ para o EE2 (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014), a CE10 ($53,09 \text{ mg L}^{-1}$) foi então dividida por um fator de 100 obtendo-se o valor de $530 \mu\text{g L}^{-1}$ e cada concentração subsequente foi reduzida em fator de 10. Para o EE2 foram escolhidas concentrações a partir de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e também reduzidas em fator de 10.

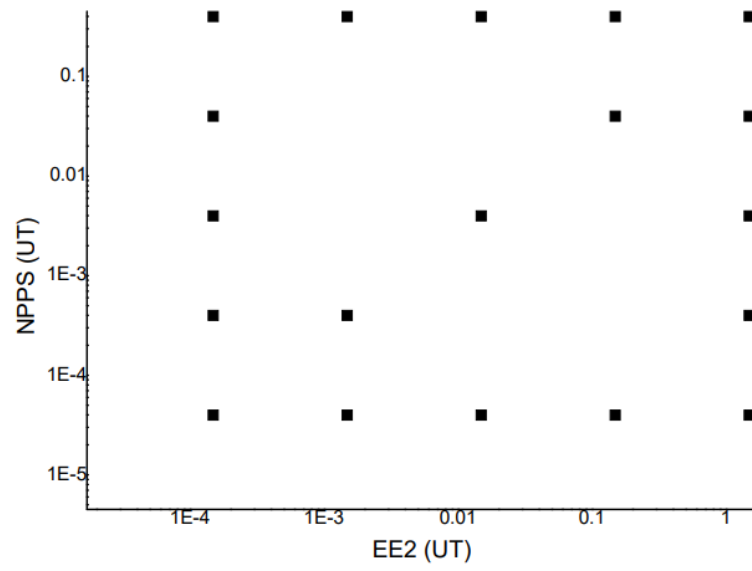
As concentrações utilizadas correspondem àqueles presentes na Tabela 7, utilizando três unidades: $\mu\text{g L}^{-1}$, UT e μM e na.

Tabela 7 – Isoblograma das concentrações utilizadas nos testes crônicos dos compostos.

#	NPPS	EE2	NPPS	EE2	NPPS	EE2
	$\mu\text{g L}^{-1}$	$\mu\text{g L}^{-1}$	UT	UT	μM	μM
1	0,053	0,01	3.98E-07	1.49E-06	5.09E-04	3.37E-08
2	0,53	0,10	3.98E-06	1.49E-05	5.09E-03	3.37E-07
3	5,30	1,00	3.98E-05	1.49E-04	5.09E-02	3.37E-06
4	53,00	10,00	3.98E-04	1.49E-03	5.09E-01	3.37E-05
5	530,00	100,00	3.98E-03	1.49E-02	5.09E+00	3.37E-04
6	53,00	100,00	3.98E-04	1.49E-02	5.09E-01	3.37E-04
7	5,30	100,00	3.98E-05	1.49E-02	5.09E-02	3.37E-04
8	0,53	100,00	3.98E-06	1.49E-02	5.09E-03	3.37E-04
9	0,053	100,00	3.98E-07	1.49E-02	5.09E-04	3.37E-04
10	0,053	10,00	3.98E-07	1.49E-03	5.09E-04	3.37E-05
11	0,053	1,00	3.98E-07	1.49E-04	5.09E-04	3.37E-06
12	0,053	0,10	3.98E-07	1.49E-05	5.09E-04	3.37E-07
13	0,53	0,01	3.98E-06	1.49E-06	5.09E-03	3.37E-08
14	5,30	0,01	3.98E-05	1.49E-06	5.09E-02	3.37E-08
15	53,00	0,01	3.98E-04	1.49E-06	5.09E-01	3.37E-08
16	530,00	0,01	3.98E-03	1.49E-06	5.09E+00	3.37E-08
17	530,00	0,10	3.98E-03	1.49E-05	5.09E+00	3.37E-07
18	530,00	1,00	3.98E-03	1.49E-04	5.09E+00	3.37E-06
19	530,00	10,00	3.98E-03	1.49E-03	5.09E+00	3.37E-05

Fonte: o autor.

Figura 10 - Representação gráfica dos pontos do isoblograma aplicado no teste crônico



Fonte: O autor.

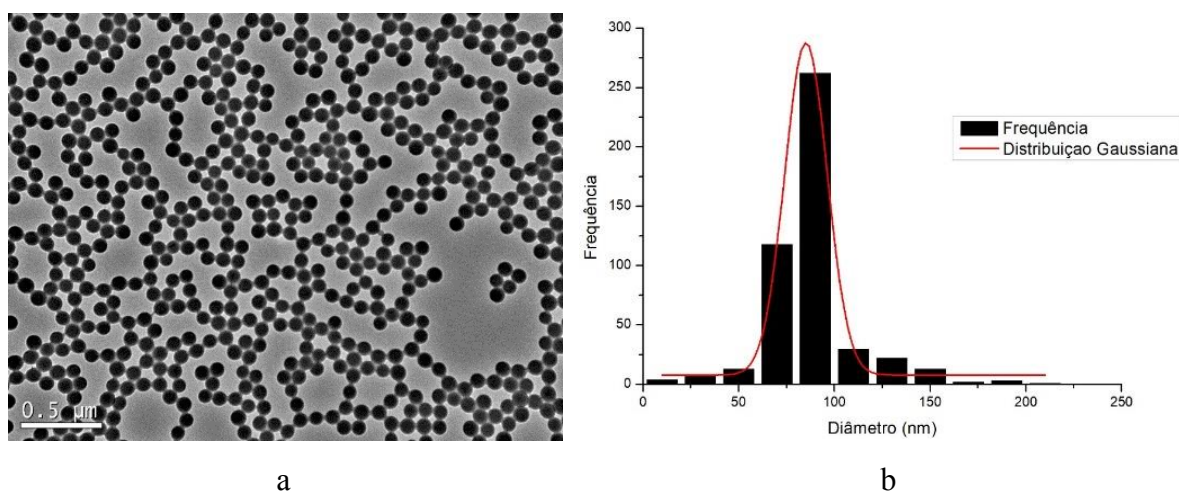
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO

5.1.1 Morfologia e Diâmetro

A imagem de MET do NPPS mostrou morfologia esférica, homogênea e diâmetro médio calculado de $85,13 \pm 11,08$ nm (Figura 11a), confirmando, portanto, a escala nanométrica. Além disso, a imagem revelou que as esferas dos NPPS estão conectadas umas com as outras por pequenos fios, ou seja, teias poliméricas. Na Figura 11b foi plotado o gráfico da distribuição de tamanho das partículas, no qual a curva Gaussiana confirmou a predominância de esferas com diâmetros menores que 100 nm.

Figura 11 - Micrografia da MET a) dos NPPS e b) da distribuição do tamanho das partículas.

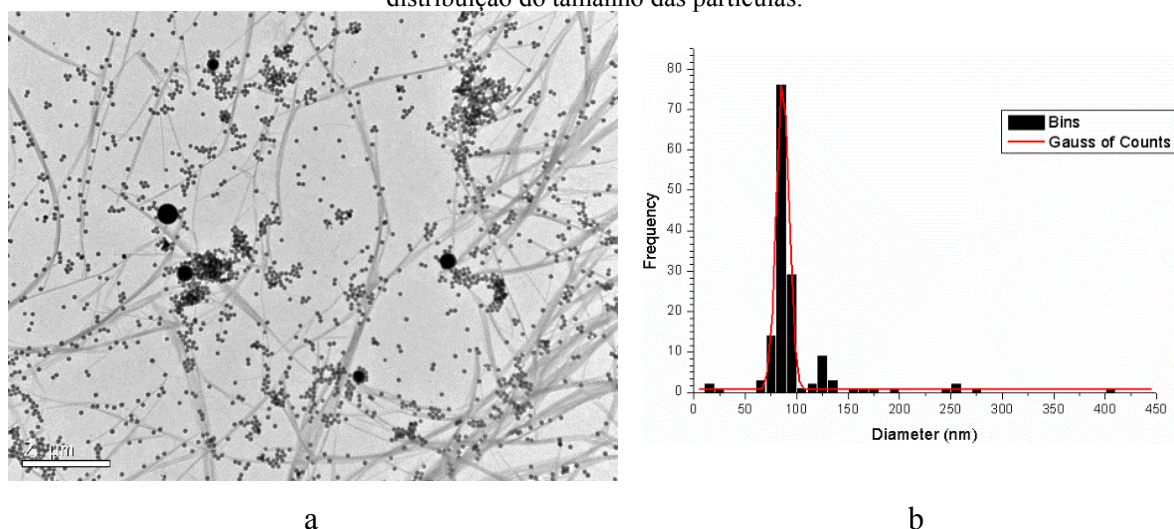


Quanto às micrografias das concentrações utilizadas nos testes agudo e crônico da mistura, foi possível observar que a presença do EE2 e dos meios ISO e M4 utilizados ocasionaram a alteração no padrão de dispersão. Ambas a complexidade de íons presentes nos meios de cultura somada à afinidade entre os compostos hidrofóbicos EE2 e NPPS aumentam o potencial de aglomeração do NPPS. Na imagem obtida da concentração do teste agudo, o hormônio solidificou-se, formando redes interconectadas (Figura 12) em cinza claro. O NPPS

demonstrou afinidade para depositar-se sobre a rede de EE2, possivelmente devido ao processo de secagem da amostra no *grid* para a realização das micrografias.

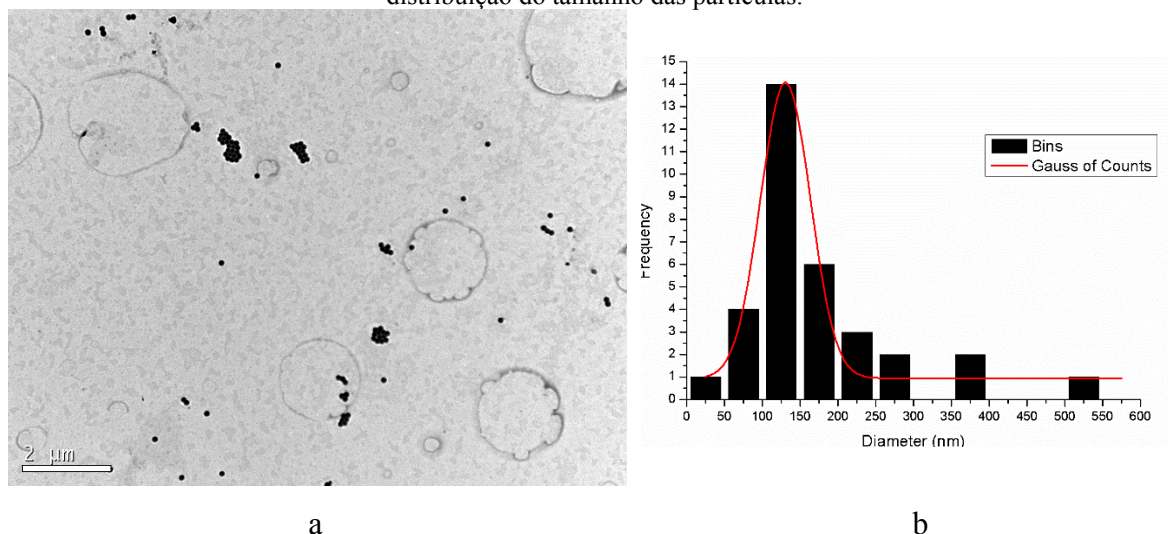
O diâmetro médio das partículas na concentração máxima do teste agudo das misturas (6,70 mg L⁻¹ de EE2 e 133,04 mg L⁻¹ de NPPS) foi de 86,38 ± 0,20 nm (Figura 12b), logo, não apresentando nenhuma diferença estatística (p>0,05) quando comparado com o NPPS. A análise do PZ, DE e IPD complementarão as informações sobre aglomeração.

Figura 12 - Micrografia de MET a) do NPPS em mistura com EE2 na maior concentração do teste agudo e (b) distribuição do tamanho das partículas.



A micrografia foi realizada para a amostra com maior concentração do teste crônico (100 µg L⁻¹ de EE2 e 530 µg L⁻¹ de NPPS). É possível observar o EE2 em cinza-claro, comportamento conhecido dos compostos orgânicos com baixa massa molar quando visualizados no microscópio eletrônico, como demonstrado por Vicentini et al. (2017). A redução da concentração em comparação às imagens anteriores pode ser observada através da redução considerável do número de partículas presentes na imagem da amostra do teste crônico devido à redução da concentração aplicada. O diâmetro médio calculado foi igual a 130,51 ± 3,95 nm devido ao aumento na aglomeração das partículas. Portanto, este diâmetro não representa somente as partículas isoladamente, mas também os aglomerados foram considerados pelo programa como um conjunto de diâmetro maior.

Figura 13 - Micrografia de MET a) do NPPS em mistura com EE2 na maior concentração do teste crônico e (b) distribuição do tamanho das partículas.



5.1.2 Estabilidade em Suspensão

A medida de PZ tanto do NPPS quanto da mistura resultou em elevada estabilidade das partículas em OR, ISO e M4, em pH corrigido para 7,0 (Tabela 8). De acordo com a análise de variância (ANOVA) *one-way*, houve diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) entre os dados de PZ, quando comparados dois a dois. Sendo assim, foi possível notar uma redução na estabilidade do NPPS e EE2 em água de OR quando comparadas aos meios de cultura (Tabela 8). Tal comportamento era esperado, tendo em vista a força iônica do meio de cultura (sais com diferentes polaridades), podem resultar na redução da estabilidade dos compostos em suspensão (MURDOCK et al., 2007). Apesar de tal redução, as partículas de NPPS tanto isoladamente quanto em mistura continuaram sendo significativamente estáveis ($PZ > 30,0$ mV).

Tabela 8 - PZ, DE, e IPD e pH dos NPPS e NPPS-EE2.

Amostras	Meios	pH	PZ	DE	IPD
		--	mV	nm	nm
NPPS	OR	7,02	-83,52 ± 2,43	132,99 ± 5,53	0,268 ± 0,018
	ISO	7,03	-40,04 ± 1,36	129,84 ± 6,09	0,272 ± 0,037
	M4	7,00	-46,46 ± 0,20	127,11 ± 7,92	0,286 ± 0,029
NPPS-EE2	OR	7,03	-73,89 ± 0,69	126,41 ± 7,98	0,281 ± 0,017
	ISO	7,01	-47,38 ± 1,09	123,4 ± 7,82	0,277 ± 0,033
	M4	7,02	-46,96 ± 1,36	121,75 ± 7,23	0,285 ± 0,038

Quanto maior a estabilidade em suspensão, maior a permanência do sólido na coluna d'água, indicando uma maior probabilidade de interação entre o NPPS e outros poluentes, bem como os organismos aquáticos. A presença do EE2 em solução alterou a estabilidade do NPPS significativamente ($p < 0,05$), mas não suficiente para torná-lo instável. Esse comportamento foi descrito por Ma *et al.* (2016), que observaram a sedimentação de MP na presença de outros poluentes, enquanto os NP tenderam à continuar em suspensão. As semelhanças sugerem, que as partículas da NPPS-EE2, permanecerão mais tempo estáveis na coluna d'água que as partículas de MP, evidenciando a importância dos estudos com os NP além dos já realizados com MP.

A comparação da estabilidade no meio utilizado para os testes agudos (meio ISO) apresentou um aumento estatisticamente significativo com a presença do EE2 na mistura. Esse aumento pode ser atribuído à elevada relação entre área superficial e volume de NPPS, permitindo que os íons do meio neutralizem sua superfície diminuindo a disponibilidade destes íons no meio e assim aumentando a estabilidade (FADARE *et al.*, 2019). Portanto, aumenta-se a probabilidade de interação entre o NPPS e o EE2 devido ao maior tempo de permanência na coluna d'água.

Embora a presença dos íons no meio, os valores de DE foram equivalentes aos calculados pela a técnica de MET. As medidas de DE não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$). Este comportamento também foi observado Fadare *et al.* (2019), que justificaram o comportamento à neutralização da superfície do NP com os íons do meio. Assim, utilizando o DE como parâmetro, não foi possível afirmar se houve a aglomeração do EE2 na superfície devido à falta de alteração significativa neste diâmetro. Isso não significa que esta interação não ocorreu, apenas que não foi significativa o suficiente para ser detectada através desta medida.

Quanto à dispersão das partículas, o IPD não apresentou diferença estatística entre suas medidas. Todas as medidas demonstram que as amostras são monodispersas ($IPD < 0,3$), portanto as partículas em suspensão não apresentam tendências à formação de aglomerados. Não é possível descartar a formação de aglomerados durante o teste, tendo em vista que foram utilizadas diversas proporções entre as concentrações. As concentrações utilizadas nos testes não eram altas o suficiente para apresentar medidas confiáveis no aparelho.

Em conclusão, as partículas de NPPS são estáveis em solução e mantêm sua dimensão nanométrica, mesmo na presença de EE2, e não apresentam alteração significativa em DE ou IPD mesmo variando o meio de cultura e a presença do EE2. Portanto, pode-se sugerir pelos dados obtidos que os NPPS foram os principais causadores dos efeitos entre os compostos isolados e misturas.

5.1.3 Estrutura química

Nas análises de FTIR foram identificadas as bandas dos principais grupos funcionais que compõem as estruturas químicas dos NPPS e EE2, e também foram investigadas possíveis interações químicas entre esses compostos na mistura NPPS-EE2 ($1\mu\text{g L}^{-1}$ de NPPS + $1\mu\text{g L}^{-1}$ de EE2), conforme é apresentado na Figura 14. O espectro do NPPS mostrou bandas características de hidrocarbonetos, visto que, a estrutura polimérica é composta somente por C-H aromático e alifático. A banda larga de absorção vibracional na região entre 3100 e 3000 cm^{-1} foi atribuída à deformação axial (alongamento) do C-H aromático e, ainda, na mesma banda larga foram observados ombros em 2900 e 2824 cm^{-1} referentes à deformação axial do C-H alifático. A presença do anel aromático foi identificada pelas bandas características em 1604 cm^{-1} (deformação axial de ligação C=C no anel) e 1490 e 1450 cm^{-1} (absorção vibracional do alongamento C=C aromático). Na região de 1090 cm^{-1} identificou-se a deformação angular C-H no plano. As bandas que normalmente fornecem informações específicas sobre possíveis substituições do anel aromático aparecem na faixa compreendida entre 900 e 675 cm^{-1} , região com pouca resolução neste espectro. Contudo, o benzeno do poliestireno não possui grupos substituintes, o que corrobora com as informações obtidas neste espectro (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979; FANG; XUANG; LI, 2010).

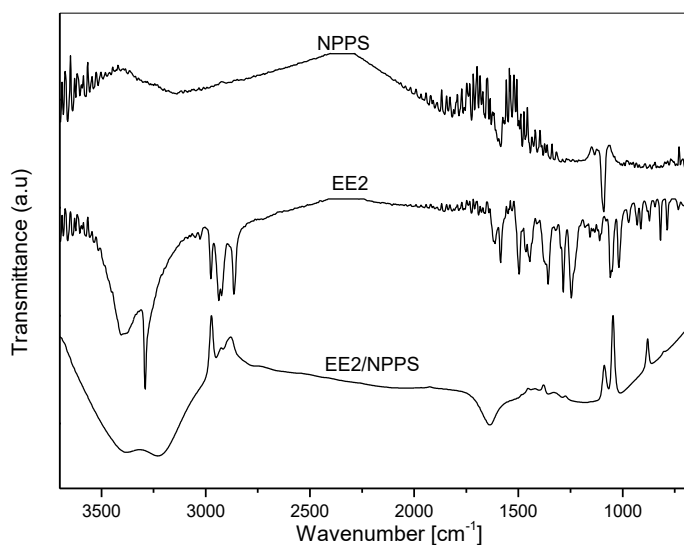
O espectro do EE2 mostrou as bandas características de fenol, álcoois e etinil, que corroboram com a estrutura química do hormônio. A banda larga com picos em 3398 e 3287 cm^{-1} resultam das vibrações do alongamento das ligações do O-H (a intensidade da banda depende da concentração). Além disso, a banda da absorção da deformação axial do etinil ($\equiv\text{C-H}$), que aparece na região de 3268 cm^{-1} , pode estar sobreposta pelas bandas do O-H. As bandas em 3028 e 2980 cm^{-1} referem-se à deformação axial do C-H do aromático e as bandas em 2955 e 2862 cm^{-1} à deformação axial do CH_2 alifático. Outras bandas fracas foram observadas: em 1616 , 1581 e 1494 cm^{-1} (associadas à deformação axial da ligações C=C do aromático); em

1453 cm^{-1} (deformação angular simétrica do CH_2); em 1356 cm^{-1} (deformação angular no plano do O-H); em 1274 cm^{-1} (deformação axial do C-O); em 1239 cm^{-1} (vibração harmônica de deformação angular simétrica de $\equiv\text{C-H}$); e em 1053 cm^{-1} (deformação axial assimétrica do C-O-C ou, ainda, deformação angular no plano) (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979; VERONEZ *et al.*, 2015).

As principais bandas identificadas no espectro da NPPS-EE2 foram em aproximadamente 3396 e 1637 cm^{-1} referentes às absorções das vibrações do estiramento e deformação angular do H-O da molécula de água, respectivamente (VICENTINI *et al.* 2017), que confirmaram a hidratação da amostra. Adicionalmente, em 3222 cm^{-1} , o pico na mesma banda larga e intensa, é devido aos grupos O-H. Na região menos intensa, em 2940 e 2856 cm^{-1} aparecem as bandas de deformação axial do CH_2 e na região de 1260 e 1016 cm^{-1} verificou-se vibrações de deformação axial de C-O (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979).

A baixa resolução dos picos situados nas bandas largas do espectro da mistura NPPS-EE2 decorreu da elevada hidratação da amostra, que dificultou a identificação de possíveis deslocamentos das principais bandas. Dessa forma, verificou-se a possibilidade da presença das bandas dos dois compostos, porém sem condições de identificar a ocorrência de interações químicas, sendo sugerido apenas a mistura dos compostos. Isso corrobora com as imagens de MET dos testes agudo e crônico (Figura 12 e Figura 13), nas quais foram observadas fases distintas para os compostos (redes sólidas de EE2 e as partículas esféricas dos NPPS). As esferas de NPPS apresentaram-se distribuídas aleatoriamente em contato com a superfície da rede de EE2, livres sobre o *grid* ou aglomeradas umas com as outras, mas não inseridas na massa sólida da rede, evidenciando pouco afinidade entre os compostos.

Figura 14 - Espectros de FTIR dos NPPS, EE2 e NPPS-EE2.



5.2 ENSAIOS TOXICOLÓGICOS

5.2.1 Quantificação indireta de NPPS

A comparação entre a quantificação do Al total ingerido pelos organismos expostos aos NPPS e a mistura NPPS-EE2 indicou uma redução significativa ($p < 0,05$; Teste T) na ingestão de plásticos para a mistura em relação aos NPPS (Tabela 9). Isso sugere que a presença do EE2 pode ter restringido o acesso dos NPPS durante a alimentação devido a rede interconectada formada ou, ainda, que o organismo ingeriu também o EE2 e, portanto, a soma das massas ingeridas resultou em menor quantidade de NPPS, ou seja, de Al.

Tabela 9 - Quantificação Al total ingerido pela *D. Magna*.

Amostras	NPPS	EE2	Al total
	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	µg L ⁻¹
NPPS	53,09		6,34 ± 0,32
NPPS-EE2	53,09	0,57	5,24 ± 0,16

Conforme descrito na seção 3.1.3 Mistura entre os poluentes, a possibilidade de interação entre os compostos é existente. Porém, o que os resultados obtidos no presente trabalho apontam, é uma fraca interação entre o NPPS e o EE2 não havendo um revestimento,

mas uma segregação de fases dos materiais. Este fato pode ser explicado pela estrutura molecular do EE2, que apesar de possuir anel aromático, possui duas hidroxilas ligadas a ciclos de carbono e uma ligada no anel aromático. Como as hidroxilas são hidrofílicas e o meio apresentando uma complexidade formada por íons e outros compostos que podem vir a neutralizar essas ligações OH ou até mesmo hidrolisá-las, as chances de aderência no NPPS como revestimento fica bastante reduzida. Caso o EE2 possuísse afinidade com o NPPS haveria uma preferência por revesti-lo ao invés de formar a rede.

Corroborando com a hipótese, recentemente foi quantificada a adsorção de fenantreno, composto hidrofóbico formado por três anéis aromáticos em MP de polietileno (FRYDKJÆR; IVERSEN; ROSLEV, 2017). A adsorção do composto foi bastante intensa, tendo em vista a afinidade entre os dois compostos. Assim, é possível entender que a presença dos grupos funcionais e o número inferior de anéis aromáticos reduziu a interação entre os dois compostos.

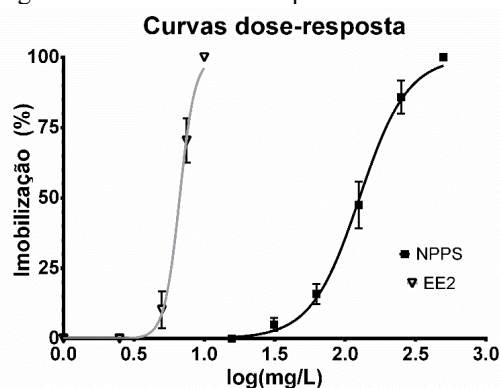
5.2.2 Ensaio de Toxicidade Aguda

5.2.2.1 Compostos isolados

Os resultados dos ensaios agudos foram compilados e a CE50 para o NPPS foi equivalente a uma CE50 de $133,04 \pm 17,42 \text{ mg L}^{-1}$ ($n = 5$) e para o EE2 a EC50 foi de $6,70 \pm 0,45 \text{ mg L}^{-1}$ ($n = 5$). Os coeficientes de correlação (r^2) de todos os ensaios utilizados para a análise são superiores a 0,9, sugerindo uma adequação ideal dos dados às respectivas curvas dose-resposta. Os resultados compilados foram plotados na Figura 15, sendo que a curva do NPPS apresentou um $r^2 = 0,9913$ enquanto a do EE2 um $r^2 = 0,9919$, indicando alta confiabilidade nos dados.

Em comparação, o EE2 apresentou uma maior toxicidade quanto aos efeitos agudos, possuindo uma EC50 quase 20 vezes menor que a do NPPS. A inclinação das duas curvas diverge suficientemente para entender que em uma faixa estreita de concentrações é possível obter uma alta variação de efeitos na imobilização. Os valores para a inclinação da curva serão utilizados para o cálculo das misturas, portanto, fatores relevantes para a presente análise.

Figura 15 - Curvas dose-resposta do NPPS e EE2.

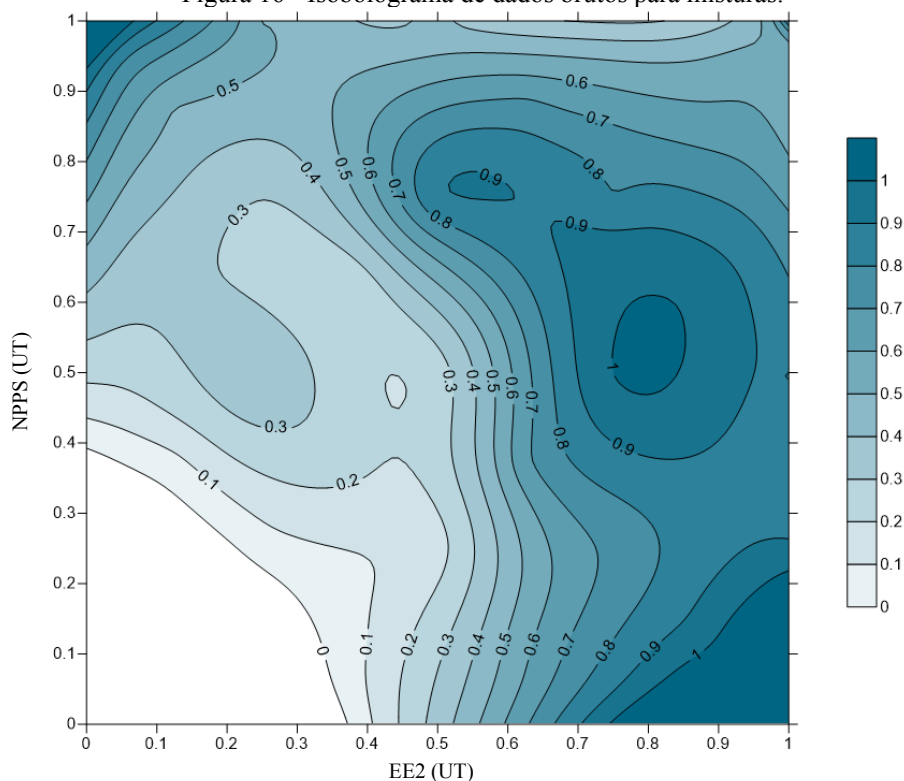


As concentrações utilizadas para obter os resultados de imobilização são associadas à grandes acidentes ambientais e não a concentrações que são comumente encontradas. Os efeitos que são relatados a partir dessas concentrações elevadas para as NPPS, atribuem um aspecto leitoso à solução. Altíssima turbidez e são algumas ordens de grandeza superiores àquelas apresentadas no meio ambiente (FRYDKJÆR; IVERSEN; ROSLEV, 2017)

5.2.2.2 Mistura NPPS-EE2

Os ensaios dos compostos em mistura foram realizados para os 25 pontos propostos, obtendo o isoblograma bruto com os dados de mortalidade, a seguir exposto na Figura 16. Foi possível notar que os maiores efeitos foram atingidos em concentrações anteriores à maior concentração da mistura. Ao se comparar com o esperado para as misturas de acordo com a soma das unidades tóxicas, encontrou-se um cenário equilibrado entre possível sinergismo (14 pontos) e possível antagonismo (11 pontos).

Figura 16 - Isobograma de dados brutos para misturas.



A fim de confirmar o efeito, os dados foram analisados na ferramenta MixTox, que consistiu em adicionar os dados de cada composto na planilha: toxicidade, curvatura da curva dose-resposta e CE50. Em seguida, foi calculado a adequação dos dados aos modelos AC e AI. Depois, os dados calibrados para AC e AI foram transferidos para avaliar a existência de sinergismo ou antagonismo (S/A) com o auxílio do parâmetro da função (a). Caso tenha-se obtido r^2 significativo, copia-se os dados para a coluna da avaliação do Desvio Dependente da Razão dos compostos (DR), que se utiliza do parâmetro da função (b) para ajustar. Por fim, os dados da coluna DR foram transferidos para a coluna do Desvio Dependente do Nível da Dose (DL).

Os parâmetros de saída do modelo bem como os resultados dos testes estatísticos estão apresentados na Tabela 10 **Erro! Autoreferência de indicador não válida.** O objetivo do modelo foi obter a menor soma dos quadrados dos resíduos (SS), na qual obteve-se 867,49 para a AC. Este valor foi, pelo menos, uma ordem de grandeza superior aos demais resultados encontrados na literatura (LOPES et al., 2016; MANSANO, 2016). Altos valores de resíduos podem indicar uma menor adequação dos dados aos modelos apresentados, o que é corroborado

com os valores dos coeficientes de correlação (r^2). O r^2 no caso deste cálculo significa qual a porcentagem do dados que foi explicada pelo modelo (JONKER et al., 2005). O maior valor para o r^2 corresponde ao DR em ambos os modelos AC ou AI, ou seja, a mistura entre NPPS e EE2 adequa melhor ao modelo que considera a razão entre os poluentes o fator mais importante. Entretanto, esta diferença não é significativa o suficiente, tendo em vista que todos os valores de r^2 não foram significativamente maiores que o usual valor de 0,65 para o parâmetro. A análise do p-valor também corrobora com os resultados apresentados acima, demonstrando que o DR possui os menores valores em ambos os modelos.

Avaliando os parâmetros “a” e “b” referentes ao DR, o modelo indica que houve antagonismo em baixas concentrações de ambos os compostos e o efeito sinérgico é observado com mais destaque a medida que a concentração de EE2 aumenta. Assim, avaliando os parâmetros “a” e “b” o modelo atesta que a principal interação toxicológica da mistura entre o NPPS e o EE2 foi o sinergismo e que tal efeito é causado principalmente pelo EE2.

Tabela 10 - Resultados da modelagem realizada no MixTox.

	Adição de Concentração				Ação Independente			
	AC	S/A	DR	DL	AI	S/A	DR	DL
max	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
β_{EE2}	7,88	7,79	9,72	8,08	4,79	5,30	6,62	4,57
β_{NPPS}	2,41	2,45	2,64	2,53	2,28	2,99	3,05	2,25
CE50_{EE2}	5,79	5,73	6,61	5,75	4,52	5,12	6,12	5,01
CE50_{NPPS}	149,24	146,97	113,99	147,08	117,43	144,17	114,67	140,86
a	--	0,08	3,15	-0,20	--	-2,78	4,39	0,03
b_{DR/DL}	--	--	-5,70	1,20	--	--	-15,90	165,58
SS	867,49	867,09	728,36	866,50	936,27	879,03	771,27	876,11
r²	0,69	0,69	0,74	0,69	0,67	0,69	0,72	0,69
χ^2 ou teste F	0,4	0,4	138,73	0,59	1878,62	57,24	107,76	2,92
df	--	1	1	1	--	1	1	1
p (χ^2/F)	0	0,52	5,04E-32	0,44	0	3,85E-14	3,04E-25	0,09

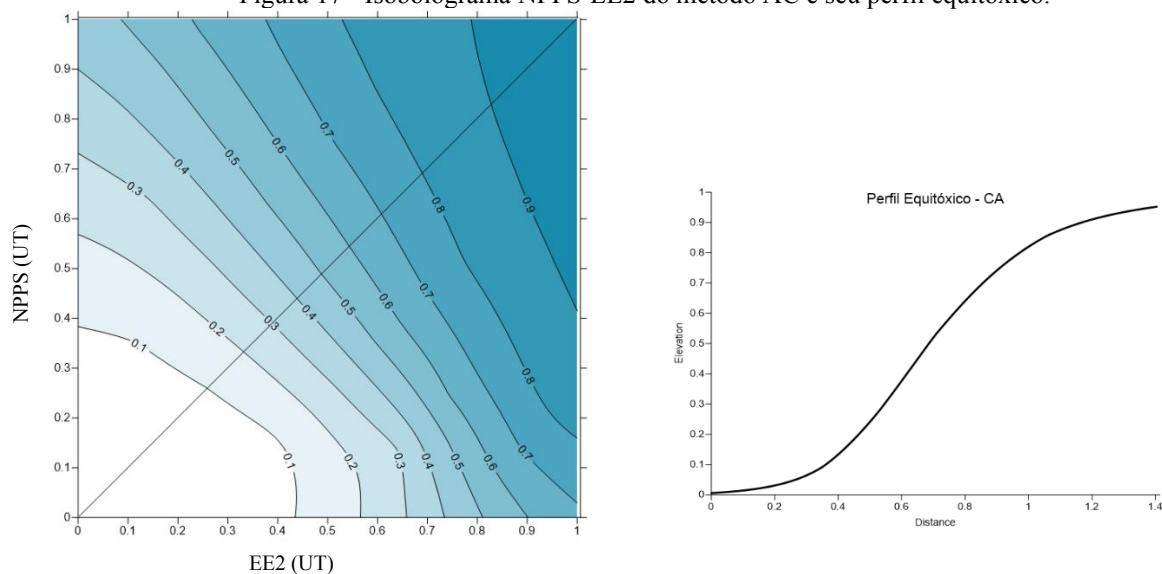
Layout adaptado de Mansano (2016).

Onde:

- max**: Valor máximo da resposta;
- β** : Hillslope da curva de resposta à dose individual;
- CE50**: Concentração mediana de imobilização;
- a, b_{DR} e b_{DL}**: Parâmetros da função;
- SS**: Soma dos quadrados dos resíduos;
- r²**: Coeficiente de correlação;
- Teste χ^2 ou F**: Teste estatístico;
- df**: Grau de liberdade;
- p (χ^2 / F)**: Nível de significância do teste estatístico,

Calculados os modelos AC e AI, utilizou-se o *software* Surfer 11 ®, para plotar a interpolação realizada. Diversos foram os métodos de interpolação utilizados e todos encontram-se no Material Suplementar. O método escolhido para representar a mistura foi a Krigagem que reduz os picos em prol da suavidade da superfície. Assim, foi possível obter-se uma superfície dose-resposta (Figura 17).

Figura 17 - Isoblograma NPPS-EE2 do método AC e seu perfil equitóxico.



Com o isoblograma das misturas foi feita uma seção do gráfico 3D, encontrando a curva dose-resposta calculada para a mistura. Elaborou-se um gráfico desse perfil equitóxico, exportados os dados dos pontos e calculados utilizando GraphPad Prism 6 ® para encontrar uma CE50 dessa situação. Assim, foram convertidas as distâncias para medidas entre 0 e 1 para encontrar os pontos, em UT onde a curva se cruza. O valor de 0,8020 foi encontrado para a distância na diagonal em que o perfil equitóxico atinge 50%. Convertendo para UT foi encontrado 0,5671 UT, como este perfil é pertencente à reta $X=Y$, o valor encontrado foi a CE50 de ambos os compostos em mesma proporção tóxica, resultando em 3,80 mg/L para o EE2 e 75,45 mg/L para o NPPS.

Foi possível observar que para o caso da AC o efeito mediano apresentou uma concentração inferior à calculada para os compostos isolados, enquanto para o caso da AI apresentou uma superior àquela encontrada nos isolados. Sendo assim, demonstrado o que a teoria afirma: o método da AC é mais conservador/otimista que o método AI em se tratando de efeitos esperados.

Tabela 11 – Comparação entre os métodos da AC e AI.

Métodos	Efeito mediano	EE2		NPPS	
	UT	mg/L	CE X%	mg/L	CE X%
AC	0,47	3,17	33,95	62,83	14,55
AI	0,57	3,80	37,67	75,45	21,30

A partir da curva dose-resposta dos compostos, individualmente foi possível converter tais concentrações na porcentagem de organismos afetados. Assim, pode-se encontrar a parcela que efetivamente seria afetada por esses compostos isolados nessas concentrações. Aplicando-se, respectivamente, as equações (5) e (6) às parcelas de organismos-teste afetadas pelas concentrações foi obtido para AC o valor de 48,5% e para AI o valor de 58,97%.

Portanto, após explicitados todos os dados estatísticos e realizada uma análise minuciosa dos dados foi possível afirmar que o modelo da AC representou melhor os dados quando comparado com o modelo da AI.

5.2.2.2.1 Imagens de estereomicroscópio dos aglomerados formados

Especificamente nos ensaios agudos, as concentrações com os maiores efeitos formaram também emaranhados constituídos de EE2 e o NPPS em conjunto com os organismos-teste. Tal fato, foi oposto ao esperado pela literatura, tendo em vista que um fator redutor da toxicidade do EE2 é a presença de matéria orgânica dissolvida (KOVACEVIC; SIMPSON; SIMPSON, 2019). Porém, foi possível observar nos testes o efeito físico destes aglomerados (Figura 18), podendo ser a origem do efeito agudo (imobilização dos organismos) devido a impossibilidade de natação dos organismos.

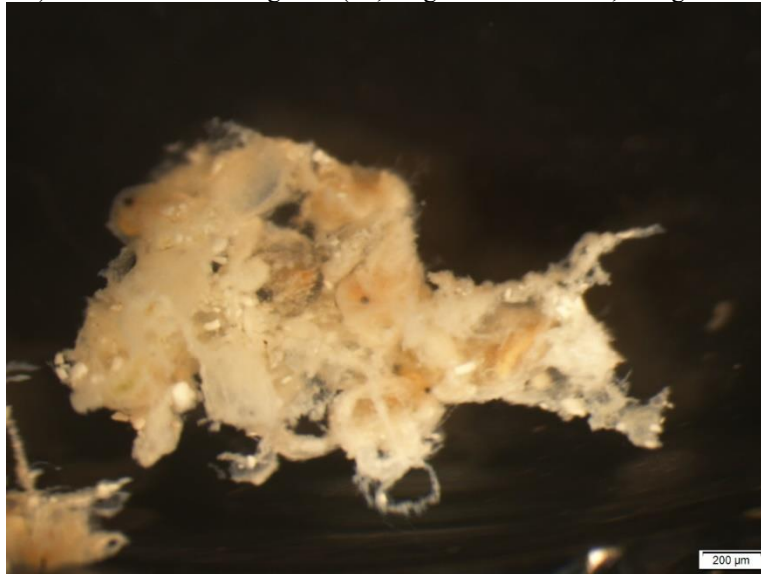
A observação da imobilização dos organismos corrobora com os resultados obtidos no MixTox, apontando a toxicidade como causada principalmente pela presença do EE2.

Figura 18 – Imagens microscópicas dos aglomerados formados pelo NPPS e EE2.

a) Ponto 5 do isoblograma ($3,35 \text{ mg L}^{-1}$ de EE2 e $133,04 \text{ mg L}^{-1}$ de NPPS).

b) Ponto 23 do isoblograma ($50,3 \text{ mg L}^{-1}$ de EE2 e $66,52 \text{ mg L}^{-1}$ de NPPS).

a)



b)



5.2.3 Ensaio de Toxicidade Crônica

5.2.3.1 Compostos isolados

Devido a utilização de concentrações ambientalmente relevantes, os resultados dos testes crônicos apontaram para a não existência de efeitos estatisticamente significativos nos organismos testados. Contudo, os gráficos do NPPS apresentaram padrões que podem ser destacados e discutidos.

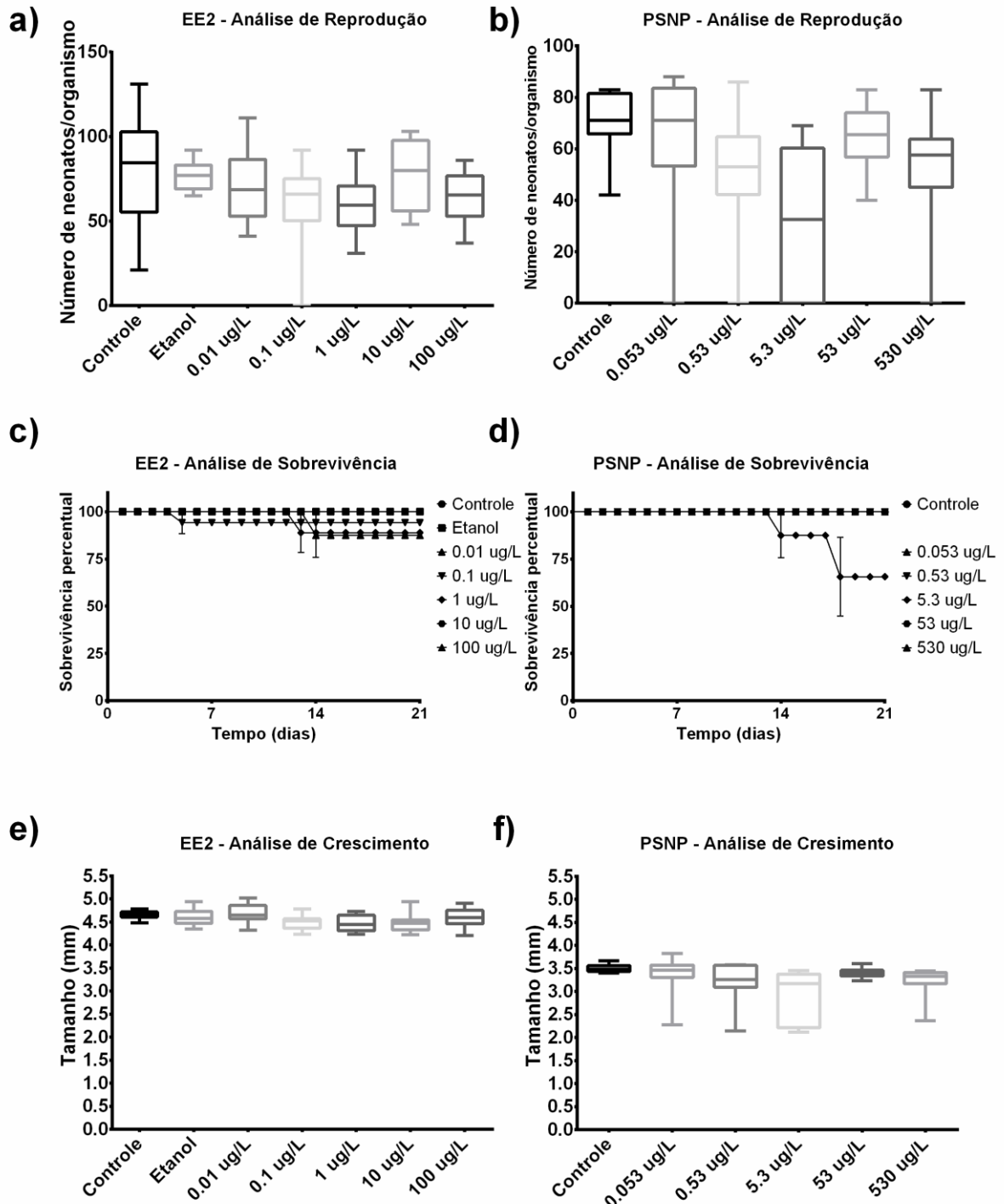
Devido à metodologia empregada para a troca dos ensaios crônicos, foi observado organismo por organismo e verificado seu comportamento. Na relação entre o gráfico de crescimento e reprodução foi mostrado que algumas fêmeas apresentaram tamanho levemente reduzido, bem como não geraram nenhum filhote durante o período, sendo isso para ambos os compostos quando comparados com seus respectivos controles. Somente no controle (concentração 53 $\mu\text{g L}^{-1}$) todos os organismos geraram filhotes. A não geração de filhotes por alguns organismos causaram um aumento no desvio padrão de suas respectivas concentrações. Assim, as comparações entre as concentrações acabam sendo limitadas.

Devido à não observação dos efeitos, é possível afirmar que para o presente estudo a CENO do NPPS correspondeu a 530 $\mu\text{g L}^{-1}$ e a CENO do EE2 foi de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 12 - Resultados dos ensaios crônicos dos compostos isolados.

		Efeitos Crônicos		
		Reprodução	Crescimento	Mortalidade
NPPS	Controle	70,00 ± 12,19	3,50 ± 0,08	0%
	0,053 $\mu\text{g L}^{-1}$	63,80 ± 26,51	3,38 ± 0,42	0%
	0,53 $\mu\text{g L}^{-1}$	50,40 ± 23,23	3,21 ± 0,43	0%
	5,30 $\mu\text{g L}^{-1}$	31,80 ± 28,53	2,89 ± 0,57	20%
	53,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	64,70 ± 12,19	3,40 ± 0,10	0%
	530 $\mu\text{g L}^{-1}$	53,30 ± 22,02	3,21 ± 0,33	0%
EE2	Controle	79,60 ± 33,67	4,66 ± 0,08	0%
	Etanol	77,30 ± 8,25	4,60 ± 0,19	0%
	0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$	70,80 ± 22,16	4,69 ± 0,21	0%
	0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$	59,70 ± 26,07	4,49 ± 0,15	0%
	1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	59,30 ± 17,44	4,47 ± 0,17	10%
	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	77,10 ± 20,79	4,47 ± 0,20	0%
	100 $\mu\text{g L}^{-1}$	63,70 ± 16,77	4,60 ± 0,21	10%

Figura 19 - Resultados dos ensaios crônicos dos compostos isolados.



5.2.3.2 Mistura NPPS e EE2

Os ensaios das misturas em concentrações ambientalmente relevantes não apresentaram efeitos estatisticamente significativos em nenhuma das combinações de misturas. Para fins de avaliação, o presente trabalho optou por apresentar os resultados de maneira gráfica em porcentagens dos respectivos controles dos testes e, assim, foram obtidos dados para avaliação.

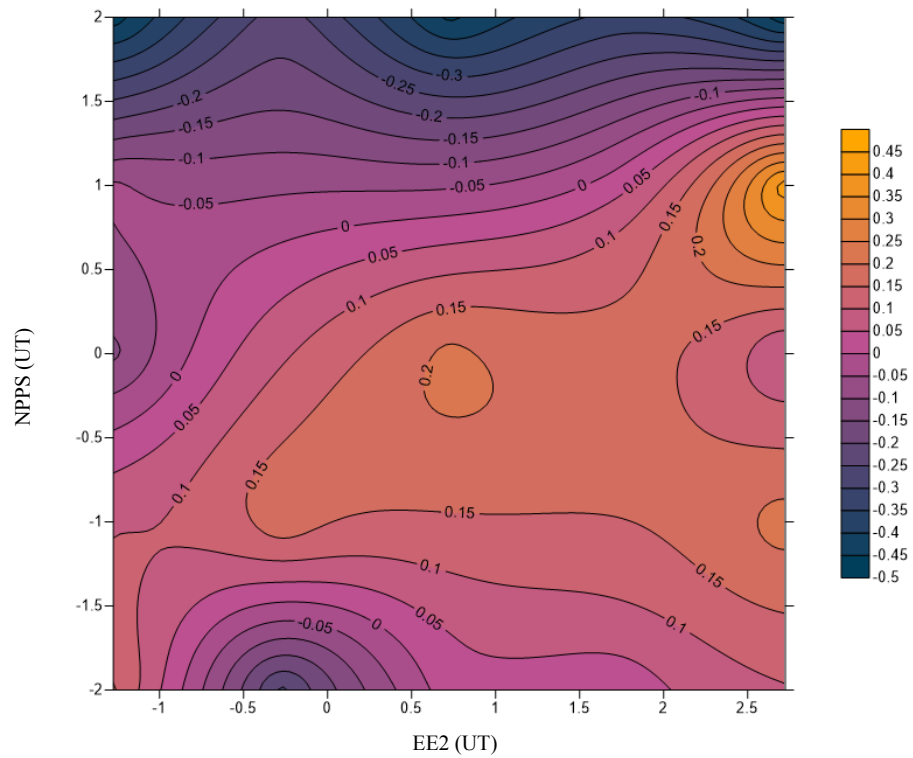
Quanto à reprodução, verificou-se que a grande variação do número de neonatos por organismo não varia significativamente nos efeitos. Dessa forma, como nos ensaios dos compostos isolados também foram verificados organismos que não geraram filhotes, fato também observado no controle, portanto, não se tratando de um efeito do poluente necessariamente.

A mortalidade dos organismos no teste das misturas apresentou resultados inesperadamente maiores nos pontos de mistura 7, 8 e 12. Isso mesmo sendo os mais altos, por exemplo, a mistura 12 ocasionou a morte de 30% dos organismos, mesmo sem efeito estatisticamente significativo.

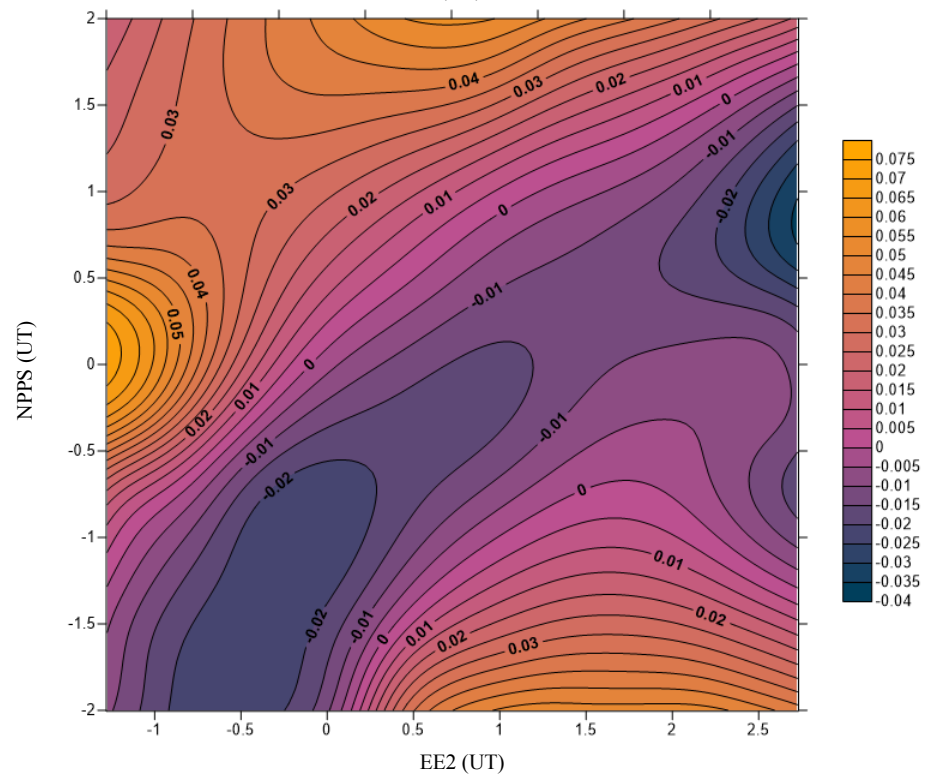
Para visualizar melhor os resultados foram plotados isoblograma, comparando os efeitos dos testes com seus respectivos controles para demonstrar a pequena alteração de efeitos entre as concentrações. Portanto, os gráficos serão apresentados em porcentagens dos controles, sendo valores positivos um aumento no tamanho, reprodução ou mortalidade e valores negativos uma redução percentual dos mesmos parâmetros. Na Figura 16 são apresentados os três gráficos.

Figura 20 - Resultados dos testes crônicos da mistura NPPS-EE2, onde a) reprodução; b) crescimento; e c) longevidade.

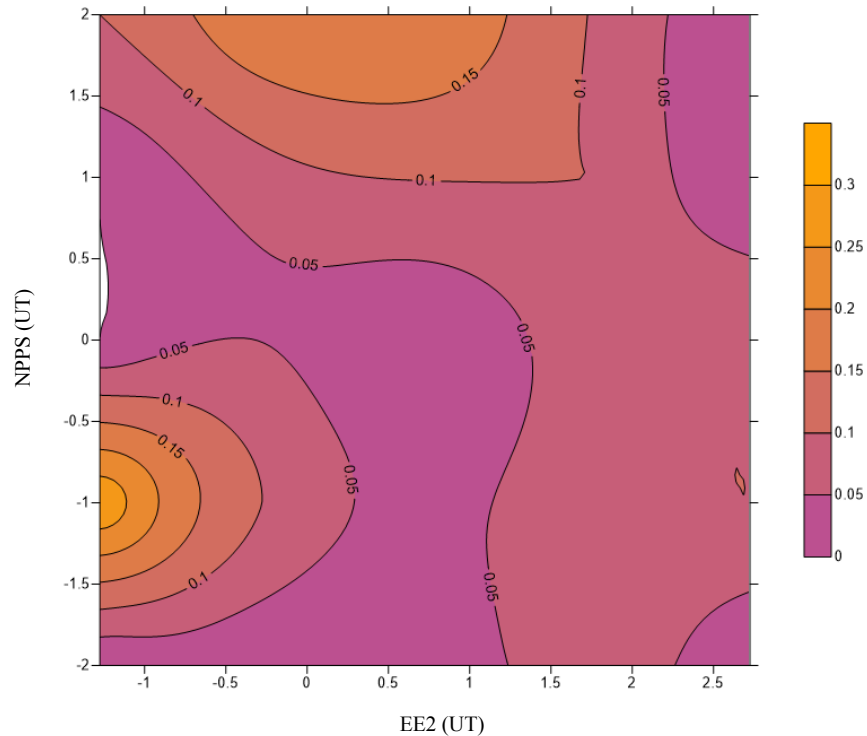
a)



b)



c)



Os efeitos observados corroboraram com o trabalho reportado por Bakir et al, (2016), que modelou a dessorção dos poluentes no trato gastrointestinal de organismos aquáticos através do modelo OMEGA (*Optimal Modelling for Ecotoxicological Applications – Modelagem Otimizada para Aplicação Ecotoxicológicas*). Sendo estimado que nas concentrações ambientais a dessorção de poluentes oriundos de MP não foi significativa, logo, possuindo probabilidades baixas de causar maiores efeitos na biota aquática (BAKIR et al., 2016). O que o presente trabalho apresentou foi a possibilidade de os NP não apresentarem efeitos tão relevantes nas concentrações ambientalmente relevantes

Em conclusão, a toxicidade de um poluente pode não ser alterada pela presença dos plásticos, mas sua concentração no meio pode ser reduzida devido a sua aderência à superfície do plástico (HORTON et al., 2018). Não somente os plásticos como também a biomassa viva e morta pode ser vetor para estes outros poluentes no meio. As concentrações de biomassa são da ordem de 10^3 maiores que as concentrações de plásticos (FRYDKJÆR; IVERSEN; ROSLEV, 2017). A presente análise reforça o plástico como tendo um papel secundário no transporte destes poluentes, dando maior relevância para outras rotas no em se tratando

especificamente do carreamento de outros poluentes para os organismos vivos (KOELMANS et al., 2016; ZICCARDI et al., 2016).

Figura 21 - Resultados do teste crônico compilados em gráficos.

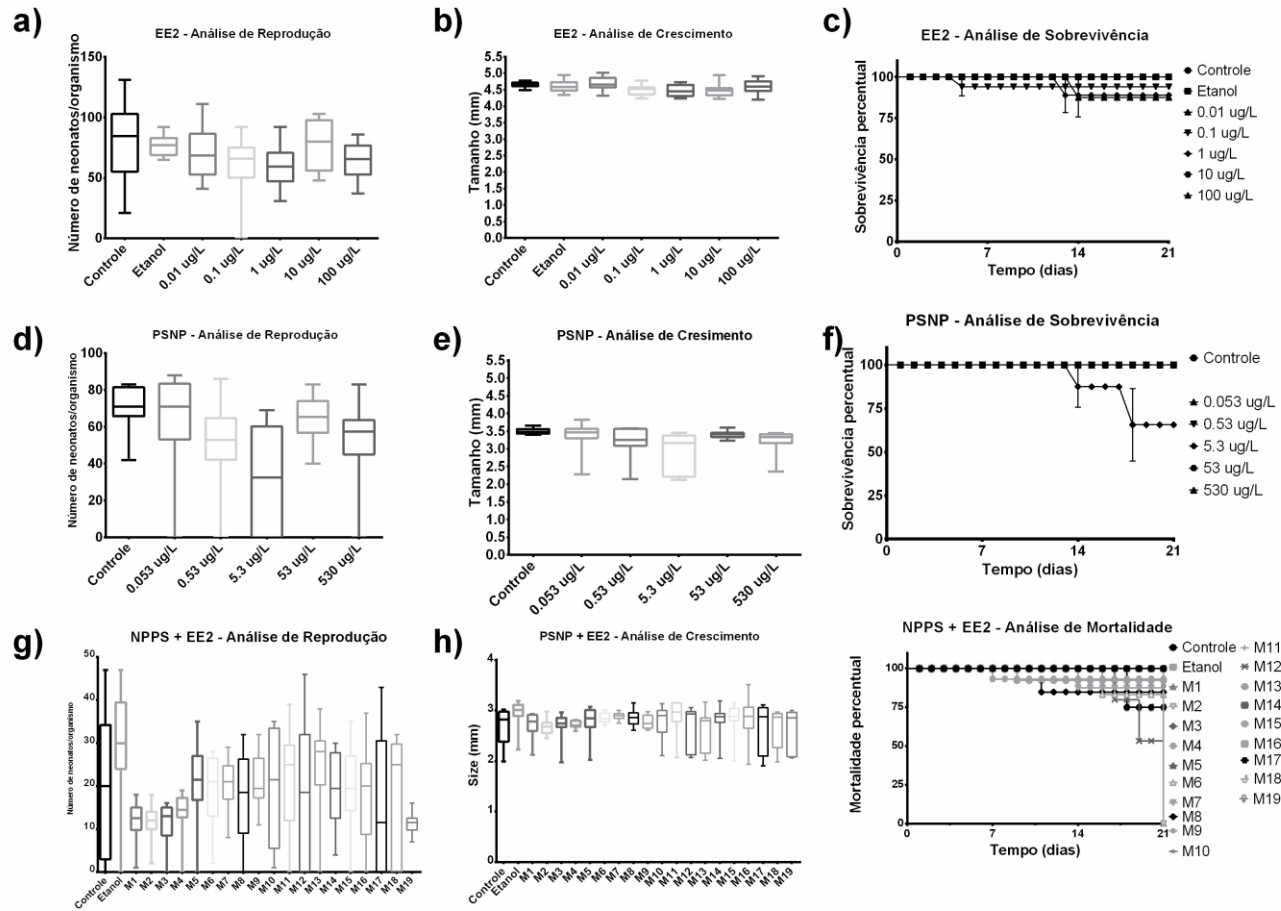


Tabela 13 - Resumo dos ensaios crônicos com NPPS e EE2

Ponto	NPPS (µg/L)	EE2 (µg/L)	pH	Tamanho (mm)	Tamanho em relação ao controle (%)	Reprodução (neonatos /Daphnia)	Reprodução em relação ao controle (%)	Mortalidade
Controle1-9	--	--	7,63 ± 0,07	2,74 ± 0,28	100%	14,10 ± 7,77	100%	0%
Etanol 1-9	--	--	7,60 ± 0,07	2,84 ± 0,12	104%	13,40 ± 5,60	95%	0%
1	0,05	0,01	7,62 ± 0,04	2,71 ± 0,25	99%	11,90 ± 4,93	84%	0%
2	0,53	0,10	7,61 ± 0,07	2,67 ± 0,16	98%	11,50 ± 4,17	82%	10%
3	5,30	1,00	7,68 ± 0,22	2,69 ± 0,28	98%	11,10 ± 5,24	79%	0%
4	53,00	10,00	7,68 ± 0,15	2,72 ± 0,07	99%	13,70 ± 5,33	97%	10%
5	530,00	100,00	7,64 ± 0,09	2,79 ± 0,31	102%	20,90 ± 9,45	148%	0%
6	53,00	100,00	7,61 ± 0,10	2,85 ± 0,10	104%	18,80 ± 8,69	133%	10%
7	5,30	100,00	7,71 ± 0,23	2,89 ± 0,07	106%	20,60 ± 6,04	146%	20%
8	0,53	100,00	7,76 ± 0,26	2,85 ± 0,16	104%	17,20 ± 10,75	122%	20%
9	0,05	100,00	7,50 ± 0,60	2,78 ± 0,14	102%	20,80 ± 6,30	148%	10%
Controle 10-19	--	--	7,57 ± 0,11	2,69 ± 0,35	100%	19,80 ± 16,88	100%	0%
Etanol 10-19	--	--	7,66 ± 0,06	2,94 ± 0,27	109%	28,80 ± 13,40	145%	0%
10	0,05	10,00	7,54 ± 0,11	2,77 ± 0,36	103%	20,60 ± 13,38	104%	0%
11	0,05	1,00	7,59 ± 0,11	2,89 ± 0,33	107%	22,00 ± 11,31	111%	0%
12	0,05	0,10	7,58 ± 0,15	2,71 ± 0,43	101%	17,90 ± 17,23	90%	30%
13	0,53	0,01	7,56 ± 0,11	2,64 ± 0,39	98%	25,00 ± 3,87	126%	0%
14	5,30	0,01	7,54 ± 0,09	2,82 ± 0,30	104%	19,30 ± 9,10	97%	0%
15	53,00	0,01	7,59 ± 0,07	2,83 ± 0,34	105%	19,50 ± 10,36	98%	10%
16	530,00	0,01	7,62 ± 0,10	2,81 ± 0,46	104%	17,90 ± 11,16	90%	0%
17	530,00	0,10	7,63 ± 0,10	2,66 ± 0,48	99%	15,40 ± 16,27	78%	10%
18	530,00	1,00	7,60 ± 0,06	2,66 ± 0,38	99%	18,90 ± 13,51	95%	10%
19	530,00	10,00	7,63 ± 0,09	2,60 ± 0,43	97%	11,30 ± 1,63	57%	0%

6 CONCLUSÃO

A presente dissertação visou avaliar a o potencial toxicológico do NPPS em mistura com o hormônio EE2 como um representante dos poluentes emergentes hidrofóbicos. Os métodos utilizados para esta avaliação foram a caracterização dos materiais e os ensaios toxicológicos.

A etapa de caracterização demonstrou que o NPPS apresentou formato esférico, diâmetro de $85,13 \pm 11,08$ nm, monodisperso e altamente estável. A presença do EE2 reduziu sua estabilidade, mas não tornando-o instável. Não foi possível concluir interações dos compostos na mistura com os espectros de FTIR. A quantificação de Al total demonstrou que o EE2 reduziu a retenção de NPPS nos organismos quando presente na mistura.

Quanto aos ensaios agudos, foi observado que o EE2 apresentou maior toxicidade ($CE50 = 6,70 \text{ mg L}^{-1}$) e que o maior efeito do NPPS isolado foi majoritariamente físico ($CE50 = 133,04 \text{ mg L}^{-1}$). A mistura dos ensaios agudos, ocasionou a formação de emaranhados formada pelo NPPS, EE2 e os organismos presentes no meio, causando a imobilização física destes e levando à mortalidade. A análise do isobograma através do MixTox demonstrou que a toxicidade é dependente da razão entre os compostos (DR) com efeito sinérgico causado principalmente pelo EE2.

Os ensaios crônicos em concentrações ambientalmente relevantes demonstraram pouco ou nenhum efeito tanto dos compostos isolados quanto em mistura. Com o NPPS apresentando uma $CENO > 530 \mu\text{g L}^{-1}$ e o EE2 com uma $CENO > 100 \mu\text{g L}^{-1}$ Este fato, portanto, não representa a ausência de riscos quanto à exposição do referido organismo-teste em qualquer outra condição. O meio ambiente apresenta altíssima complexidade também devido à presença de incontáveis outros compostos químicos que podem alterar os efeitos observados pelos compostos testados no presente trabalho.

Com a construção dos isobogramas e avaliação dos resultados com os organismos teste, foi possível concluir que os poluentes tanto isoladamente quanto em mistura causaram poucos ou nenhum efeito nas concentrações aplicadas. Com a elaboração de tais gráficos, a presente pesquisa poderá servir de subsídio para a alimentação de um modelo de avaliação de risco em concentrações ambientalmente relevantes. Portanto, será possível aproximar as condições reais à modelagem matemática e compreender melhor como se dão as interações entre os poluentes para a causa da toxicidade.

7 RECOMENDAÇÕES

- Maior compreensão das **vias de ação tóxica** de ambos os compostos;
- Ensaio para compreender o papel das proteínas liberadas no meio produzidas pelos organismos-teste, formando as **eco-coronas**, na toxicidade;
- Aplicar **metodologias de misturas complexas** em concentrações ambientalmente relevantes para observar a possível ocorrência de efeitos significativos entre os diversos poluentes do meio;
- Aplicar os dados em modelos de avaliação de risco, observando a possibilidade da coexposição com outros diversos compostos do meio.

REFERÊNCIAS

- ADEMA, D. M. M. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests, **Hydrobiologia**, v. 59, n. 2, p. 125–134, 1978,
- ARIS, A. Z.; SHAMSUDDIN, A. S.; PRAVEENA, S. M. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: A review. **Environment International**, v. 69, p. 104–119, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.04.011>>.
- ASGHARI, S, et al, Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*, **Journal of Nanobiotechnology**, v, 10, p, 1–11, 2012,
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS: NBR 12,713 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera), 2009.
- AZEVEDO, S. L. et al. A mixture toxicity approach to predict the toxicity of Ag decorated ZnO nanomaterials. **Science of the Total Environment**, v. 579, p. 337–344, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.095>>.
- BAKIR, A. et al. Relative importance of microplastics as a pathway for the transfer of hydrophobic organic chemicals to marine life. **Environmental Pollution**, v. 219, p. 56–65, 1 dez. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749116313112?via%3Dihub>>. Acesso em: 15 jan. 2020.
- BENEDITO, Aline de Souza; SILVA, Fabiana Fanger; SANTOS, Ísis V, de Souza, NANOPARTÍCULAS DE PRATA: APLICAÇÕES E IMPACTO AMBIENTAL: NANOPARTÍCULAS DE PRATA: APLICAÇÕES E IMPACTO AMBIENTAL, **Faculdades Oswaldo Cruz**, Faculdades Oswaldo Cruz, v, 1, n, 1, p,1-12, jan, 2016, Disponível em: <http://revista.oswaldocruz.br/Content/pdf/Edicao_16_BENEDITO_Aline_de_Souza.pdf>, Acesso em: 15 nov, 2018,
- BERNARDELLI, J. K. B. Biodegradação De Estrona, 17B-Estradiol E 17 α -Ethinilestradiol Em Sistemas Aeróbios De Tratamento. **FLorianópolis**, p. 197, 2014.
- BESSELING, E. et al. Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 20, p. 12336–12343, 2014.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e conseqüências. **Quimica Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.
- BLASER, S, A, et al, Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles, **Science of the Total Environment**, v, 390, n, 2–3, p, 396–409, 2008,
- BLINOVA, I, et al, Toxicity of two types of silver nanoparticles to aquatic crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*, **Environmental Science and Pollution Research**, v, 20, n, 5, p, 3456–3463, 2013,
- BLISS, C. I. the Toxicity of Poisons Applied Jointly. **Annals of Applied Biology**, v. 26, n. 3, p. 585–615, 1939.
- BOUWMEESTER, H.; HOLLMAN, P. C. H.; PETERS, R. J. B. Potential Health Impact of Environmentally Released Micro- and Nanoplastics in the Human Food Production Chain: Experiences from Nanotoxicology. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 15, p. 8932–8947, 2015.

- CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos polímeros**. 2ª ed. São Paulo: Artliber Editora Ltda., 2006.
- CAO, Q. et al. Wheat phytotoxicity from arsenic and cadmium separately and together in solution culture and in a calcareous soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 148, n. 1–2, p. 377–382, 2007.
- CARTER, Walter H.; GENNINGS, Chris, Analysis of chemical combinations: relating isobolograms to response surfaces, In: **Toxicology of chemical mixtures**, 1994, p. 643–663.
- CHOU, T. et al. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 67, n. 3, p. 621–681, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669015000278>%5Cn<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157508000653>%5Cn<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610000464>%5Cn<http://www.mdpi.com/1420-3049/17/12/14336/>%5Cn<http://www.sco>>.
- COLE, M. et al. Microplastic ingestion by zooplankton. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 12, p. 6646–6655, 2013.
- COSTA, C, R, et al, A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação, **Química Nova**, v, 31, n, 7, p, 1820–1830, 2008.
- DA COSTA, J. P. et al. (Nano)plastics in the environment - Sources, fates and effects. **Science of the Total Environment**, v. 566–567, p. 15–26, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.041>>.
- DE MARCH, B, G, E, Simple similar action and independent joint action - two similar models for the joint effects of toxicants applied as mixtures, **Aquatic Toxicology**, v, 9, n, 6, p, 291–304, 1987,
- DENG, R. et al. Nanoparticle interactions with co-existing contaminants: joint toxicity, bioaccumulation and risk. **Nanotoxicology**, v. 11, n. 5, p. 591–612, 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17435390.2017.1343404>>.
- DRIS, R. et al. Beyond the ocean : Contamination of freshwater ecosystems with (micro-) plastic particles. **Environmental Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 539–550, 2015.
- Environmental Protection Agency (EPA). **ECOTOX Knowledgebase Home Search Explore Help**. 2019. Disponível em: <<https://cfpub.epa.gov/ecotox/>>. Acesso em: 07 jan. 2020.
- FADARE, O. O. et al. Humic acid alleviates the toxicity of polystyrene nanoplastic particles to: *Daphnia magna*. **Environmental Science: Nano**, v. 6, n. 5, p. 1466–1477, 2019.
- FANG JunFei, XUAN YiMin* & LI Qiang. Preparation of polystyrene spheres in different particle sizes and assembly of the PS colloidal crystals. 2010 Vol.53 No.11: 3088–3093 doi: 10.1007/s11431-010-4110-5
- FÓRUM ECONÔMICO MUNDIAL (Suíça) (Ed.), **The New Plastics Economy: Rethinking the future of plastics**, Genebra: Fórum Econômico Mundial, 2016, 36 p, Disponível em: <http://www3.weforum.org/docs/WEF_The_New_Plastics_Economy.pdf>, Acesso em: 12 nov, 2018,
- FOUCQUIER, J.; GUEDJ, M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. **Pharmacology Research and Perspectives**, v. 3, n. 3, 2015.
- FRYDKJÆR, C. K.; IVERSEN, N.; ROSLEV, P. Ingestion and Egestion of Microplastics by the Cladoceran *Daphnia magna*: Effects of Regular and Irregular Shaped Plastic and Sorbed Phenanthrene. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 99, n. 6, p. 655–661, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00128-017-2186-3>>.
- GENNINGS, C. et al. Statistical analysis of interactive cytotoxicity in human epidermal keratinocytes following exposure to a mixture of four metals. **Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics**, v. 7,

n. 1, p. 58–73, 2002.

GESTEL, C. A. M. van. **Mixture Toxicity - Call-for-Action**. [s.l: s.n.]

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, uses, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, p. 5, 2017.

GIGAULT, J. et al. Current opinion: What is a nanoplastic? **Environmental Pollution**, v. 235, n. January, p. 1030–1034, 2018.

GOTTSCHALK, F, et al, Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions, **Environmental Science & Technology**, v, 43, n, 24, p, 9216–9222, 15 dez, 2009, Disponível em: <[http://pubs.acs.org/doi/abs/10,1021/es9015553](http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es9015553)>, Acesso em: 13 mar, 2018.

GREGORY, M. R. Environmental implications of plastic debris in marine settings- entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 2013–2025, 2009.

HAAS, C. N. et al. Quantitative description of mixture toxicity: Effect of level of response on interactions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 8, p. 1429–1437, 1996.

HEWLETT, P. S.; PLACKETT, R. L. A Unified Theory for Quantal Responses to Mixtures of Drugs : Non-Interactive Action. **Biometrics**, v. 15, n. 4, p. 591–610, 1959.

HIRAI, H. et al. Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 8, p. 1683–1692, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.06.004>>.

HORTON, A. A. et al. Acute toxicity of organic pesticides to *Daphnia magna* is unchanged by co-exposure to polystyrene microplastics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, p. 26–34, 30 dez. 2018.

HU, Y, et al, Distinct toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna* in M4 medium and surface water, **Science of the Total Environment**, v, 618, p, 838–846, 2018,

ISWARYA, V. et al. Individual and binary toxicity of anatase and rutile nanoparticles towards *Ceriodaphnia dubia*. **Aquatic Toxicology**, v. 178, p. 209–221, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.007>>.

JIANG, J.; OBERDÖRSTER, G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, n. 1, p. 77–89, 2009.

JIANG, R. et al. Quantifying nanoplastic-bound chemicals accumulated in: *Daphnia magna* with a passive dosing method. **Environmental Science: Nano**, v. 5, n. 3, p. 776–781, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.025>>.

JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. **Science of the Total Environment**, v. 256, n. 2–3, p. 163–173, 2000.

JONKER, M. A. J. et al. Significance Testing of Synergistic / Antagonistic , Dose Level – Dependent , or Dose Ratio – Dependent Effects in Mixture Dose – Response Analysis. v. 24, n. 10, p. 2701–2713, 2005.

JURGENS, M. D, et al, The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English Rivers, **Environmental Toxicology and Chemistry**, v, 21, n, 3, p, 480–488, 2002, Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1897/1551-5028\(2002\)021%3C0480:TPFEAE%3E2,0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1897/1551-5028(2002)021%3C0480:TPFEAE%3E2,0.CO;2)>,

JURGENS, M. D. et al. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English Rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 480–488, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1897/1551-5028\(2002\)021%3C0480:TPFEAE%3E2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1897/1551-5028(2002)021%3C0480:TPFEAE%3E2.0.CO;2)>.

KLEIN, S.; WORCH, E.; KNEPPER, T. P. Occurrence and spatial distribution of microplastics in river shore sediments of the rhine-main area in Germany. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 10, p. 6070–6076, 2015.

KNIE, J, L, W.; LOPES, E, W, B, Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações, Florianópolis: FATMA/ GTZ, 2004,

KOELMANS, A. A. et al. Microplastic as a Vector for Chemicals in the Aquatic Environment: Critical Review and Model-Supported Reinterpretation of Empirical Studies. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 7, p. 3315–3326, 5 abr. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.est.5b06069>>.

KOVACEVIC, V.; SIMPSON, A. J.; SIMPSON, M. J. The concentration of dissolved organic matter impacts the metabolic response in *Daphnia magna* exposed to 17 α -ethinylestradiol and perfluorooctane sulfonate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 170, p. 468–478, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651318312946>>.

KÜLKAMP, I. C. et al. Stabilization of Lipoic Acid by Encapsulation in Polymeric Nanocapsules Designed for Cutaneous Administration. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2078–2084, 2009.

LOPES, S. et al. Joint toxicity prediction of nanoparticles and ionic counterparts: Simulating toxicity under a fate scenario. **Journal of Hazardous Materials**, v. 320, p. 1–9, 2016.

MA, Y. et al. Effects of nanoplastics and microplastics on toxicity, bioaccumulation, and environmental fate of phenanthrene in fresh water. **Environmental Pollution**, v. 219, p. 166–173, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.061>>.

MANSANO, A. S. **Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran , isolados e em mistura , sobre organismos aquáticos e avaliação de risco ecológico** Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran , isolados e em mistura , sobre organismos aquáticos e avaliação de risco ecológico. 2016. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 2016.

MATOZZO, V. et al. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. **Environment International**, v. 34, n. 4, p. 531–545, 2008.

MATTSSON, K. et al. Altered behavior, physiology, and metabolism in fish exposed to polystyrene nanoparticles. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 553–561, 2015.

MCCORMICK, A. R. et al. Microplastic in surface waters of urban rivers: Concentration, sources, and associated bacterial assemblages. **Ecosphere**, v. 7, n. 11, 2016.

MCGILLICUDDY, E. et al. Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 231–246, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.041>>.

MORÉ-T-FERGUSON, S. et al. The size, mass, and composition of plastic debris in the western North Atlantic Ocean. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 10, p. 1873–1878, 2010.

MULFINGER, L, et al, Synthesis and Study of Silver Nanoparticles, **Journal of Chemical Education**, v, 84, n, 2, p, 322, 2007, Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed084p322>>,

MURDOCK, R. C. et al. Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to In Vitro Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. **Toxicological Sciences**, v. 101, n. 2, p. 239–253, 13 set. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm240>>.

NOWACK, B.; KRUG, H, F.; HEIGHT, M, 120 years of nanosilver history: Implications for policy makers, **Environmental Science and Technology**, v, 45, n, 4, p, 1177–1183, 2011,

NYS, C.; JANSSEN, C. R.; DE SCHAMPHELAERE, K. A. C. Development and validation of a metal mixture bioavailability model (MMBM) to predict chronic toxicity of Ni-Zn-Pb mixtures to *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 1271–1281, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.104>>.

PACHECO, A.; MARTINS, A.; GUILHERMINO, L, Toxicological interactions induced by chronic exposure to gold nanoparticles and microplastics mixtures in *Daphnia magna*, **Science of the Total Environment**, v, 628–629, p, 474–483, 2018, Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.081>>.

PARK, S,-Y.; CHOI, J,-H, Geno- and Ecotoxicity Evaluation of Silver Nanoparticles in Freshwater Crustacean *Daphnia magna*, **Environmental Engineering Research**, v, 15, n, 1, p, 23–27, 2010, Disponível em: <<http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=E1HGBK&py=2010&vnc=v15n1&sp=23>>.

MELEGARI, Silvia Pedrosa et al. Can the surface modification and/or morphology affect the ecotoxicity of zinc oxide nanomaterials? **Chemosphere**, [s.l.], v. 224, p.237-246, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.093>.

PLASTICSEUROPE - ASSOCIATION OF PLASTICS MANUFACTURERS (Bélgica), **Plastics – the Facts 2017: An analysis of European plastics production, demand and waste data**, Bruxelas: Plasticseurope, 2017, 44 p, Disponível em: <https://www.plasticseurope.org/application/files/5715/1717/4180/Plastics_the_facts_2017_FINAL_for_website_one_page.pdf>, Acesso em: 13 nov, 2018,

REIS FILHO, R. W.; DE ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: Contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817–822, 2006.

RIBEIRO, F, et al, Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*, **Science of the Total Environment journal**, v, 466–467, p, 232–241, 2014, Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.101>>.

RIST, S. et al. Ingestion of micro- and nanoplastics in *Daphnia magna* – Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. **Environmental Pollution**, v. 228, p. 398–407, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.048>>.

RODEA-PALOMARES, I. et al. Additivity and Interactions in Ecotoxicity of Pollutant Mixtures: Some Patterns, Conclusions, and Open Questions. **Toxics**, v. 3, n. 4, p. 342–369, 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2305-6304/3/4/342/>>.

ROH, H. K. **DECIPHERING ACTIVE ESTROGEN-DEGRADING MICROORGANISMS IN BIOREACTORS**. 2009. Texas A&M University, 2009.

ROSENKRANZ, P. et al. A Comparison of Nanoparticle and Fine Particle Uptake by *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 2142–2149, 2009.

SILVA, A. F. et al. Sensitivity of aquatic organisms to ethanol and its potential use as bioindicators. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 38, n. 4, p. 377, 2016. Disponível em:

<<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/28946>>.

SILVA, E. et al. Toxicity prediction and assessment of an environmentally realistic pesticide mixture to *Daphnia magna* and *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicology**, p. 1–12, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10646-018-1938-0>>.

SILVERSTEIN, Robert M.; BASSLER, Clayton G.; MORRILL, Terence C. Identificação Espectrométrica dos Compostos Orgânicos. Traduzido por ALENCASTRO, Ricardo B. de; FARIA, Roberto de B. 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois. 1979. Cap. 3.

SOHN, E, K, et al, Aquatic toxicity comparison of silver nanoparticles and silver nanowires, **BioMed Research International**, v, 2015, 2015,

SUIDAN, M. T. et al. Challenges in biodegradation of trace organic contaminants - Gasoline oxygenates and sex hormones. **Water Environment Research**, v. 77, n. 1, p. 4–11, 2005.

TEUTEN, E. L. et al. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 2027–2045, 2009.

TIEDE, K, et al, Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessments for engineered nanoparticles, **Journal of Chromatography A**, v, 1216, n, 3, p, 503–509, 2009,

TIMBRELL, J. A. **Introduction to Toxicology**. 3^a ed. Londres: CRC Press LLC, 2002.

URGERT, W. **Microplastics in the rivers Meuse and Rhine: Developing guidance for a possible future monitoring program**. 2015. Open University of the Netherlands, Heerlen, 2015.

VAN DER GEEST, H. G. et al. Mixture Toxicity of Copper and Diazinon To Larvae of the Mayfly (*Ephoron Virgo*) Judging Additivity At Different Effect Levels. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 12, p. 2900, 2000. Disponível em: <[http://entc.allenpress.com/perlserv/?request=get-abstract&doi=10.1897%2F1551-5028\(2000\)019%3C2900%3AMTOCAD%3E2.0.CO%3B2](http://entc.allenpress.com/perlserv/?request=get-abstract&doi=10.1897%2F1551-5028(2000)019%3C2900%3AMTOCAD%3E2.0.CO%3B2)>.

VAN, A. et al. Persistent organic pollutants in plastic marine debris found on beaches in San Diego, California. **Chemosphere**, v. 86, n. 3, p. 258–263, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.09.039>>.

VERONEZ, Isabela P. et al. Development, characterization, and stability studies of ethinyl estradiol solid dispersion. **Journal Of Thermal Analysis And Calorimetry**, [s.l.], v. 120, n. 1, p.573-581, 3 mar. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10973-015-4508-1>.

VICENTINI, D. S. et al. Toxicological evaluation and quantification of ingested metal-core nanoplastic by *Daphnia magna* through fluorescence and ICP-MS methods. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2019. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/etc.4528>>.

VICENTINI, D. S. et al. Toxicological impact of morphology and surface functionalization of amorphous SiO₂ nanomaterials. **NanoImpact**, v. 5, p. 6–12, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.impact.2016.11.003>>.

VISNE, A.; BAT, L. PLASTIC POLLUTION IN SINOP SARIKUM LAGOON COAST IN THE SOUTHERN BLACK SEA. *In*:41st CIESM CONGRESS 2016, 2., 2016, Kiel. **Resumos**. Kiel: CIESM, 2016.

VOISIN, A. S. et al. Delayed impacts of developmental exposure to 17- α -ethinylestradiol in the self-fertilizing fish *Kryptolebias marmoratus*. **Aquatic Toxicology**, v. 180, p. 247–257, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.10.003>>.

VÖLKER, C, et al, Comparative Toxicity Assessment of Nanosilver on Three *Daphnia* Species in Acute, Chronic and Multi-Generation Experiments, **PLoS ONE**, v, 8, n, 10, 2013,

WAGNER, M.; LAMBERT, S. **Freshwater Microplastics**. [s.l.] Springer International Publishing, 2018.

WAN, J.-K. et al. Distribution of Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Ecosystems and Their Impacts on Aquatic Organisms, with Emphasis on Microalgae. In: **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. Kuala Lumpur: Springer, Cham, 2018. 246p. 133–158.

WANG, W. et al. Microplastics pollution in inland freshwaters of China: A case study in urban surface waters of Wuhan, China. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 1369–1374, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.213>>.

WEINAND, J. D.; SAFER, J. D. Hormone therapy in transgender adults is safe with provider supervision; A review of hormone therapy sequelae for transgender individuals. **Journal of Clinical and Translational Endocrinology**, v. 2, n. 2, p. 55–60, 2015.

WIJNHOFEN, S, W, P, et al, Nano-silver - A review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment, **Nanotoxicology**, v, 3, n, 2, p, 109–138, 2009,

WIT, M. De et al. An integrated transcriptomic and proteomic approach characterizing estrogenic and metabolic effects of 17 α -ethinylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 167, n. 2, p. 190–201, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcn.2010.03.003>>.

YU, M.-H. **Environmental Toxicology: Biological and Health Effects of Pollutants**. 2nd. ed. Estados Unidos: CRC Press LLC, 2005.

ZAKRZEWSKI, S. F. **Environmental Toxicology, Third Edition**. [s.l.] Oxford University Press, 2002.

ZHANG, C.; HU, Z.; DENG, B, Silver nanoparticles in aquatic environments: Physiochemical behavior and antimicrobial mechanisms, **Water Research**, v, 88, p, 403–427, 2016, Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.025>>,

ZHOU, K, et al, The role of exopolymeric substances in the bioaccumulation and toxicity of Ag nanoparticles to algae, **Scientific Reports**, v, 6, n, August, p, 1–11, 2016,

ZICCARDI, L. M. et al. Microplastics as vectors for bioaccumulation of hydrophobic organic chemicals in the marine environment: A state-of-the-science review. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 7, p. 1667–1676, 1 jul. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/etc.3461>>.

ZUEHLKE, S. et al. Long-Term Comparison of Trace Organics Removal Performances Between Conventional and Membrane Activated Sludge Processes. **Water Environment Research**, v. 78, n. 13, p. 2480–2486, 2006. Disponível em: <<http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1061-4303&volume=78&issue=13&spage=2480>>.