

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**LARISSA LECHINOVSKI**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE  
MICROPARTÍCULAS PROVENIENTES DE MÁSCARAS  
DESCARTÁVEIS NO ORGANISMO-TESTE *OREOCHROMIS  
NILOTICUS***

**CURITIBA**

**2023**

LARISSA LECHINOVSKI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE  
MICROPARTÍCULAS PROVENIENTES DE MÁSCARAS  
DESCARTÁVEIS NO ORGANISMO-TESTE *OREOCHROMIS  
NILOTICUS***

**EVALUATION OF THE TOXICOLOGICAL EFFECTS OF  
MICROPARTICLES FROM DISPOSABLE MASKS ON THE TEST  
ORGANISM *OREOCHROMIS NILOTICUS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Área de Concentração: Tecnologias e Processos Ambientais.

Linha de Pesquisa: Monitoramento e Gestão Ambiental

Orientador(a): Profa. Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf Nagata

Coorientador(a): Profa. Dra. Juliana Regina Kloss

**CURITIBA**

**2023**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, **desde que sejam atribuídos os devidos créditos pela criação original.**



LARISSA LECHINOVSKI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE MICROPARTÍCULAS PROVENIENTES  
DE MÁSCARAS  
DESCARTÁVEIS NO ORGANISMO-TESTE OREOCHROMIS NILOTICUS**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Ciência E Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologias E Processos Ambientais.

Data de aprovação: 31 de Maio de 2023

Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf Nagata, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Ana Carolina De Deus Bueno Krawczyk, Doutorado - Universidade Estadual do Paraná (Unespar)

Dra. Izonete Cristina Guiloski, Doutorado - Instituto de Pesquisa Pele Pequeno Principe - Ipppp

Dra. Juliana Regina Kloss, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 31/05/2023.

A Deus, e aos meus pais Lucia e Sergio. Por sempre serem minha fonte de força e cuidado.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, neste momento as palavras me faltam, jamais conseguiria expressar o que eu sinto por ele, pois em meio a tantos desafios, sua luz sempre brilhou em mim, me levando pelos caminhos certos, a Ele pertence a minha vida.

Também agradeço a minha família, de modo especial meus pais Sergio e Lucia que sempre deixaram claro que tenho um porto seguro em casa. Aos meus sobrinhos Gabriel, Lorenah, Mirela que tiravam meu juízo em alguns momentos, mas ao seu modo, também me davam forças para continuar. Ao meu irmão Paulo, que de um jeito estranho sempre me encorajam a seguir em frente. Agradeço também a minha tia Ir. Teresinha que cuidou de mim todo esse tempo, de modo especial quando adoeci e durante meu tratamento, que Deus os abençoe.

Agradeço aos meus professores por todos os conhecimentos passados, e pela dedicação ao seu trabalho, pois essa profissão pode ser muito prazerosa, mas também é cansativa. A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Wanessa, por aceitar me orientar durante essa etapa, por toda sua paciência e seus ensinamentos passados durante esses últimos anos. A minha coorientadora Prof<sup>a</sup> Juliana, pelos novos conhecimentos passados, e pelas novas visões e propostas.

A equipe do laboratório de ecotox, Isabela, Laís, Matheus, Rafaela, Fábio, Luana e tantos outros que passaram e passam pelo lab. Agradeço de maneira especial ao meu colega Yorrannys, por toda sua paciência, conselhos, ensinamentos e principalmente por ser um bom ouvinte de todas as minhas preocupações, sem você tudo teria sido mais difícil. Acreditem, todos vocês tornaram os momentos de pesquisa mais leves e descontraídos.

Aos meus amigos Samantha, Flávia, Gabriela, Mari, Fabíola, Daniela, Alessandro, Amanda, Simone e Duda, que mesmo estando longe ou perto, compartilharam junto comigo as minhas felicidades, tristezas e preocupações da pesquisa. Com vocês eu sempre conseguia sorrir. Também aos meus novos amigos da Jornada Jovem, que de maneiras que nem imaginam, me ajudaram a passar por muitos momentos difíceis.

A todos os laboratórios que me ajudaram com as análises necessárias para esse trabalho: Laboratório Multiusuários de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA) e as técnicas Cíntia, Rafaela e Jéssica; Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais (CMCM – UTFPR) e o técnico Alexandre; Central Analítica de Medianeira (CEANMED – UTFPR) e o Prof<sup>o</sup> Paulo; Laboratórios de Materiais de Construção (DACOC – CT –

UTFPR) e o técnico Felipe.

A UTFPR por toda a estrutura e por proporcionar a realização do meu mestrado e da minha pesquisa. Agradeço a todos os funcionários da Universidade que juntos, fazem a instituição funcionar com qualidade.

Aos membros da banca de qualificação, Prof<sup>a</sup> Dr. Izonete Cristina Guiloski e Dr. Rafael Kitamura, por todas as sugestões e contribuições para o presente trabalho.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

(Madre Teresa de Calcutá.)

## RESUMO

LECHINOVSKI, LARISSA. **Avaliação dos efeitos toxicológicos de micropartículas provenientes de máscaras descartáveis no organismo-teste *Oreochromis niloticus***. 2023. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2023.

A poluição por microplásticos vem sendo cada vez mais preocupante devido aos problemas trazidos ao meio ambiente, à sociedade e, de modo especial, aos seres humanos. Apesar de o uso de máscaras ter efeito para a redução das taxas de transmissão do vírus e para contribuir com a redução das infecções de pessoas pelo SARS-Cov-2 durante a pandemia, o descarte incorreto desse material acarreta em impactos aos ecossistemas. As máscaras faciais descartáveis, quando expostas as intempéries, podem vir a sofrer degradação, sendo as fibras deste polímero consideradas, em alguns casos, como microplásticos. Diante do apresentado, esse estudo teve por objetivo analisar os efeitos de máscaras, descartadas erradamente, na saúde dos peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo), após a exposição hídrica subcrônica (14 dias). Primeiramente, fragmentos de máscaras e elásticos foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR) para determinar a composição do material, seguido por microscopia eletrônica de varredura (MEV), juntamente com uma análise granulométrica. Os dados de FTIR revelaram que o polipropileno (PP) e o poliéster (PES) são os principais materiais constituintes da máscara, a análise de MEV mostrou fibras de materiais poliméricos ordenadas e lisas, tanto a parte frontal da máscara, como o elástico. A granulometria do material revelou que 89% das partículas usadas no experimento, possuía um diâmetro de 2,4 e 1,2  $\mu\text{m}$ . Para a avaliação genotóxica do material, os peixes foram expostos às micropartículas provenientes de máscaras descartáveis de cor branca e de cor preta, em três concentrações 0,2 mg/L; 1 mg/L e 5 mg/L, em um sistema semi-estático com renovação de  $\frac{3}{4}$  da água e do contaminante, para posterior análise da saúde dos peixes por meio do fator de condição de Fulton, biomarcador genético (ensaio cometa) e bioquímicos (acetilcolinesterase, catalase, glutathione-S-transferase e lipoperoxidação). O fator de condição de *Fulton* apontou uma diminuição significativa no tamanho corporal dos peixes nos grupos com 1 mg/L e 5 mg/L de máscara branca e no grupo de 0,2 mg/L de máscara preta, indicando um possível comprometimento da saúde do animal. Os resultados do ensaio cometa apontaram danos ao DNA na concentração mais alta de micropartículas de máscara preta. A atividade da acetilcolinesterase cerebral indicou um aumento na atividade da enzima nas concentrações de 1 mg/L e 5 mg/L da máscara branca e na concentração de 5 mg/L da máscara preta. As atividades da AChE muscular, catalase bem como da GST não apontaram diferenças significativas em relação ao controle. No entanto, os níveis de LPO aumentaram nos grupos expostos a 1mg/L e 5 mg/L da máscara branca e em todas as concentrações da máscara preta. Diante dos resultados obtidos pode-se indicar que ambas as alternativas de máscaras são nocivas ao meio ambiente, pois apresentaram efeitos tóxicos em concentrações subletais para *O. niloticus*. Este estudo contribui para elucidação dos efeitos causados por micropartículas de polipropileno no ambiente aquático, no entanto mais estudos são necessários na área, a fim de elucidar melhor os resultados aqui obtidos.

**Palavras-chave:** Biomarcadores; Toxicidade; Tilápia do Nilo; Polipropileno.



## ABSTRACT

LECHINOVSKI, LARISSA. **Evaluation of the toxicological effects of microparticles from disposable masks on the test organism *Oreochromis niloticus*.** 2023. 83 f. Dissertation (Master's in environmental Science and technology) – Federal Technological University of Paraná, Curitiba, 2023.

Microplastic pollution is becoming increasingly worrying due to the problems brought to the environment, society and especially to human beings. With the epidemic of the new coronavirus (SARS-CoV-2), masks have become mandatory for the entire population, to reduce the transmission of the virus, however, incorrect disposal can cause impacts on ecosystems. Disposable face masks, when exposed to the weather, may suffer degradation, with the fibers of this polymer considered in some cases as microplastics. Given the above, this study aims to analyze the effects of masks, incorrectly discarded, on the health of fish of the species *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia), after subchronic water exposure (14 days). First, the masks and elastics were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Scanning Electron Microscopy (SEM), together with a granulometric analysis. The FTIR data revealed that polypropylene (PP) and polyester (PES) are the main constituent materials of the mask, the SEM analysis showed ordered and smooth fibers of polymeric materials, both the front part of the mask and the elastic. The granulometry of the material revealed that 89% of the particles used in the experiment had a diameter of 2.4 and 1.2  $\mu\text{m}$ . For the genotoxic evaluation of the material, the fish were exposed to microparticles from white and black disposable masks, in three concentrations: 0.2 mg/L; 1 mg/L and 5 mg/L, in a semi-static system with renewal of  $\frac{3}{4}$  of the water and the contaminant, for subsequent analysis of the health of the fish using the Fulton condition factor, genetic biomarker (comet assay) and biochemicals (acetylcholinesterase, catalase, glutathione-S-transferase and lipoperoxidation). The Fulton condition factor showed a significant decrease in the body size of the fish in the groups with 1 mg/L and 5 mg/L of white mask and in the group with 0.2 mg/L of black mask, indicating a possible impairment of health of the animal. The comet assay results point to DNA damage at the highest concentration of the black mask. Cerebral acetylcholinesterase activity indicated an increase in enzyme activity at concentrations of 1 mg/L and 5 mg/L of the white mask and at the concentration of 5 mg/L of the black mask. Muscle AChE activity, catalase as well as GST showed no significant differences in relation to the control. However, LPO levels increased in the groups exposed to 1 mg/L and 5 mg/L of the white mask and in the groups exposed to 0.2 mg/L, 1 mg/L and 5 mg/L of the black mask. In view of the results obtained, it can be indicated that both mask alternatives are harmful to the environment, as they have toxic effects at sublethal concentrations for *O. niloticus* fingerlings. This study contributes to the elucidation of the effects caused by polypropylene microparticles in the aquatic environment, however more studies are needed in the area, in order to better elucidate the results obtained here.

**Keywords:** Biomarkers; Toxicity; Nile tilapia; Polypropylene.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Demonstração da cabeça e cauda de um nucleóide.....	28
<b>Figura 2</b> – Esquema da finalização da transmissão de impulsos.....	29
<b>Figura 3</b> – Exemplar da espécie <i>Oreochromis niloticus</i> .....	33
<b>Figura 4</b> – Amostras sendo peneiradas pelo peneirador eletromagnético.....	36
<b>Figura 5</b> – Aclimação de <i>Oreochromis niloticus</i> em laboratório.....	37
<b>Figura 6</b> – Amostras cortadas de máscaras brancas e pretas utilizadas para exposição.....	38
<b>Figura 7</b> – Amostras de máscaras prontas na mesa agitadora.....	39
<b>Figura 8</b> – Procedimento de preparo das amostras em laboratório.....	39
<b>Figura 9</b> – Representação esquemática do bioensaio.....	40
<b>Figura 10</b> – Aquários com <i>O. niloticus</i> durante a exposição do bioensaio com as máscaras .....	41
<b>Figura 11</b> – Metodologia do ensaio cometa com <i>Oreochromis niloticus</i> e a classificação dos danos no material genético.....	44
<b>Figura 12</b> – Fotomicrografias das amostras de máscara branca obtidas pelo MEV...48	
<b>Figura 13</b> – Fotomicrografias das amostras de máscara preta obtidas pelo MEV....49	
<b>Figura 14</b> – Espectro de absorção na região do infravermelho (FT-IR) das amostras das máscaras brancas e preta.....	50
<b>Figura 15</b> – Espectro de absorção na região do infravermelho (FT-IR) das amostras do elástico de máscaras brancas e pretas.....	51
<b>Figura 16</b> – Curva granulométrica.....	52
<b>Figura 17</b> – Valores do Fator de Condição de Fulton (K) dos bioensaios de <i>Oreochromis niloticus</i> após exposição subcrônica de 14 dias.....	54
<b>Figura 18</b> – Danos observados eritrócitos em de <i>Oreochromis niloticus</i> após exposição subcrônica por meio dos escores do ensaio cometa alcalino.....	56
<b>Figura 19</b> – Análise da atividade da acetilcolinesterase do cérebro e do músculo de <i>O. niloticus</i> após exposição subcrônica a máscaras de diferentes colorações.....	58
<b>Figura 20</b> – Atividade da enzima glutational-S-transferase no fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> após exposição subcrônica a máscaras de diferentes colorações.....	60
<b>Figura 21</b> – Atividade da catalase no fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> após a exposição subcrônica a máscaras de diferentes colorações .....	62

**Figura 22** – Lipoperoxidação no fígado de *Oreochromis niloticus* após a exposição subcrônica a máscara de diferentes colorações.....64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Nomeação dos grupos e concentrações para o bioensaio.....	39
<b>Tabela 2</b> – Volume das soluções adicionadas nos aquários.....	40
<b>Tabela 3</b> – Percentual retido nas malhas com abertura entre 4,76 a 0,15 mm.....	51
<b>Tabela 4</b> – Números de mortes durante o bioensaio.....	52
<b>Tabela 5</b> – Média e desvio padrão do comprimento total e peso do organismo <i>O. niloticus</i> entreos diferentes grupos do bioensaio.....	53
<b>Tabela 6</b> – Diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) com comparações entre os grupos.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACH	Acetilcolina
ACHE	Acetilcolinesterase
CAT	Catalase
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FTIR	Infravermelho com transformada de <i>Fourier</i>
GST	Glutathione-S-Transferase
MBC1	Máscara branca concentração 1
MBC2	Máscara branca concentração 2
MBC3	Máscara branca concentração 3
MPC1	Máscara preta concentração 1
MPC2	Máscara preta concentração 2
MPC3	Máscara preta concentração 3
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MP	Microplástico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PET	Poli(tereftalato de etileno)
PES	Poliéster
PC	Policarbonato
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PU	Poliuretano
SOD	Superóxido dismutase
TNT	Tecido não tecido

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1 OBJETIVOS .....	20
1.1.1 Objetivo geral.....	20
1.1.2 Objetivos específicos.....	20
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
2.1 OS MATERIAIS PLÁSTICOS.....	21
2.2 MICROPLÁSTICOS .....	22
2.3 A POLUIÇÃO DE MICROPLÁSTICOS PROVENIENTES DE MÁSCARAS ..	23
2.4 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS E INDICADORES BIOLÓGICOS.....	24
2.5 BIOMARCADORES .....	26
2.5.1 Biomarcador de genotoxicidade.....	27
2.5.1.1 Ensaio cometa alcalino.....	27
2.5.2 Biomarcadores bioquímicos.....	28
2.5.2.1 Biomarcadores de neurotoxicidade .....	29
2.5.3 Mecanismos de biotransformação.....	30
2.5.4 Estresse oxidativo.....	31
2.6 PEIXES COMO MODELOS DE ESTUDOS DE TOXICIDADE.....	32
2.7 <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> .....	33
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL BIOENSAIO .....	35
3.1.1 Microscopia eletrônica de varredura acoplado a espectroscopia por energia dispersiva(EDS) .....	35
3.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de <i>Fourier</i> (FTIR).....	35
3.1.3 Granulometria por peneiramento .....	35
3.2 ENSAIOS DE TOXICIDADE .....	36
3.2.1 Aquisição e aclimatação.....	36

3.2.2	Preparação das amostras.....	38
3.2.3	Ensaio subcrônicos .....	40
3.2.4	Coleta de material biológico .....	42
3.2.5	Biomarcador somático .....	42
3.2.6	Biomarcador de genotoxicidade.....	43
3.2.7	Biomarcadores bioquímicos.....	44
3.2.7.1	Proteínas totais .....	45
3.2.7.2	Atividade da Acetilcolinesterase (AChE).....	45
3.2.7.3	Glutathione-S-transferase (GST).....	46
3.2.7.4	Catalase (CAT).....	46
3.2.7.5	Lipoperoxidação lipídica (LPO).....	46
3.3	Análise estatística .....	47
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	48
4.1.1	Microscopia eletrônica de varredura acoplado a espectroscopia por energia dispersiva(EDS) .....	48
4.1.2	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de <i>Fourier</i> (FT-IR).....	49
4.1.3	Análise granulométrica .....	51
4.2	ENSAIOS DE TOXICIDADE .....	52
4.2.1	Parâmetros abióticos da água.....	53
4.3	BIOMARCADOR SOMÁTICO .....	54
4.4	BIOMARCADOR GENÉTICO.....	55
4.5	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.....	57
4.5.1	Biomarcador de neurotoxicidade (AChE).....	57
4.5.2	Glutathione-S-transferase (GST).....	60
4.5.3	Catalase (CAT).....	61

4.5.4 Lipoperoxidação lipídica (LPO).....	63
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As máscaras descartáveis de polipropileno são utilizadas pelos profissionais da área da saúde, como parte do equipamento de proteção individual (EPI), e em alguns países, quando os índices de qualidade do ar (IQA) atingem um estado crítico, é recomendado o uso de máscaras por toda a população (HANSSTEIN; ECHEGARAY, 2018; ZHANG; MU, 2018). Antes de novembro de 2019, não se tem muitos registros sobre a poluição ocasionada por máscaras ao redor do mundo, as pesquisas estavam relacionadas ao uso contra a poluição do ar, entretanto, com a pandemia do novo coronavírus, que se iniciou em Wuhan (LIN et al., 2021; LIN; HU; ZHOU, 2020), e espalhou-se pelo mundo, o uso de máscaras passou a ser obrigatório em escala mundial, aumentando a produção, lavagem e descarte (ZHOU et al., 2021). A partir deste momento, com o uso em larga escala de máscaras faciais, a preocupação com o descarte e os efeitos deste material na natureza começou a ganhar uma maior atenção, pois passou-se a perceber o abandono incorreto em estradas, aterros sanitários, terrenos baldios, rios, lagos e mares (CHOWDHURY; CHOWDHURY; SAIT, 2021).

As máscaras descartáveis são produzidas a partir do polipropileno (PP), que assim como grande parte dos polímeros podem ser degradados com o passar do tempo, em partes menores o que pode ocasionar os micros e nanoplásticos (; SHEN et al., 2021a). As máscaras podem vir a liberar fibras, quando expostas aos fatores ambientais, fato este que aumenta a taxa de fragmentação das mesmas (HU; SHEN; TANG, 2022).

Além da contaminação por fibras, as máscaras também podem liberar os aditivos presentes na formulação para o meio aquoso como, por exemplo, plastificantes, corantes e antimicrobianos e ainda, adsorver poluentes presentes na água (REBELEIN et al., 2021; WANG et al., 2022a; ZHANG et al., 2019). Dessa maneira, o descarte incorreto desse material tem preocupado a comunidade científica, visto que os microplásticos podem estar presentes nos corpos hídricos e se acumularem nos organismos vivos, afetando a cadeia trófica, a saúde ambiental e humana (HU; SHEN; TANG, 2022; SHEN et al., 2021).

A presença dos microplásticos no ambiente aquático é alvo de estudos desde o lançamento do primeiro material polimérico no mercado, visto que logo após surgiram os primeiros relatos de pequenos pedaços de plásticos em praias e no Oceano Atlântico feita por Carpenter e Smith em 1972 (CARPENTER; SMITH, 1972). As pesquisas já evidenciaram a presença de micro e nanoplásticos em pulmões, fezes, placenta e sangue

humano (JUNG et al., 2022). Não se sabe ao certo quais os efeitos que esses xenobióticos causam para a saúde dos seres humanos, mas pesquisas em animais relatam efeitos adversos a essa exposição (DENG et al., 2023; JUNG et al., 2022; NUGRAHAPRAJA et al., 2022; PATIL; MAITY; SARKAR, 2022).

A taxa de crescimento e reprodução de minhocas e zooplâncton diminuiu com a ingestão de microplásticos (BOTTERELL et al., 2019; HUERTA LWANGA et al., 2016). Em camundongos foram registrados distúrbios histológicos, inflamatórios e imunológicos no intestino delgado, além de disfunções no fígado, sistema excretor e reprodutivo (DJOUINA et al., 2022; ZOLOTOVA et al., 2022). No peixe zebra os microplásticos diminuíram os genes responsáveis pelo transporte lipídico, resultando na má absorção lipídica e no crescimento insuficiente do animal (ZHANG et al., 2022).

Os testes com peixes são fundamentais para avaliações ecotoxicológicas. Diferentes espécies são utilizadas como modelos experimentais, os animais são escolhidos de acordo com as características de adaptabilidade e facilidade de manejo (ABDEL-KHALEK et al., 2015; LEE; KANG; KIM, 2023a; THORÉ et al., 2021). Esses animais apresentam sensibilidade para responder a diferentes alterações ambientais, principalmente frente à exposição de concentrações ambientais de diferentes contaminantes. Os peixes podem auxiliar na detecção de vários xenobióticos presentes no ambiente como agrotóxicos, metais pesados, contaminantes emergentes e, mais recentemente, à contaminação por microplásticos (GALLEGO-RIOS; PEÑUELA; MARTÍNEZ-LOPES, 2021; UDROIU, 2006; WHITFIELD; ELLIOTT, 2002).

Outro motivo que os torna indicados como modelo de estudo é o fato de que os peixes ocupam vários níveis tróficos e possuem uma grande importância comercial. Também estão em contato direto com as micropartículas (MP) de plásticos, sendo por meio da alimentação ou pelo fato de habitarem um ambiente contaminado. É importante ressaltar que os peixes são comercialmente importantes, aumentando o risco de exposição para a população humana, por meio da ingestão da carne destes animais (MAKHDOUMI; HOSSINI; PIRSAHEB, 2023; WOOTTON; REIS-SANTOS; GILLANDERS, 2021).

A espécie de peixe *Oreochromis niloticus*, ou tilápia do Nilo, é utilizada em vários estudos ecotoxicológicos relacionados a contaminantes emergentes (ABDEL-KHALEK et al., 2015; DA SILVA et al., 2020; FATHY et al., 2019). Com o aumento da poluição por microplásticos, essa espécie também auxilia na verificação da toxicidade do material em várias pesquisas pelo mundo (COSTA et al., 2023; KHAN et al., 2020; TIEN; WANG; CHEN, 2020; ZHENG et al., 2022).

Os estudos referentes a toxicidade das máscaras em peixes ainda demandam mais pesquisas, e concentrações ambientalmente relevantes ainda estão sendo definidas. Com o aumento da produção de máscaras de polipropileno a partir de 2020, e conseqüentemente, seu descarte incorreto, e carreamento para o meio aquático, elevando os efeitos negativos desses produtos para os organismos do ambiente aquático (ARAGAW, 2020; DU; HUANG; WANG, 2022; RAY et al., 2022).

O polipropileno bem como outros plásticos, mostrou-se tóxico para organismos aquáticos, o que reforça a necessidade de estudos (CHEN et al., 2023; ESTERHUIZEN; KIM, 2021; SCHIAVO et al., 2021). Portanto, o presente trabalho tem por objetivo verificar a possível toxicidade de micropartículas provenientes de máscaras faciais, nas cores branca e preta, na espécie de peixe comercial *Oreochromis niloticus*, utilizando biomarcadores somático, genético e bioquímico.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliação da toxicidade de micropartículas provenientes de máscaras faciais cirúrgicas em *Oreochromis niloticus* após a exposição hídrica subcrônica.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar fragmentos da máscara descartável de polipropileno de cores branca e preta por meio das técnicas de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de *Fourier* (FT-IR), análise granulométrica e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar as condições de saúde dos alevinos *Oreochromis niloticus* após a exposição subcrônica (14 dias) a MPs de máscaras faciais por meio do fator de condição de Fulton;
- Avaliar a genotoxicidade das máscaras em eritrócitos de peixes de *Oreochromis niloticus* após exposição subcrônica, por meio do biomarcador ensaio cometa,
- Avaliar e comparar os efeitos em diferentes órgãos (músculo, fígado e cérebro) das micropartículas originárias das máscaras sobre os biomarcadores bioquímicos Acetilcolinesterase (cerebral e muscular), Glutathione-S-transferase, Lipoperoxidação e Catalase;

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 OS MATERIAIS PLÁSTICOS

A ciência trabalha constantemente para criar tecnologias que propiciem conforto, qualidade de vida e o bem-estar da sociedade. Dentre estas tecnologias está uma das classes de materiais poliméricos, conhecida como plástico, que se tornou indispensável para a sociedade atual por seus benefícios e facilidades (OKOFFO et al., 2021; RASMUSSEN, 2018).

Em 1850 surgiram os primeiros materiais que possuíam maior durabilidade, além de ser possível moldar mais facilmente o produto e manter uma rigidez satisfatória (WILLIAMS; RANGEL-BUITRAGO, 2022). Neste período surgiram os compostos a base de celulose e nitrocelulose, o que contribuiu para a criação e formulação dos plásticos.

Em 1869 o americano J. John Wesley Hyatt inventou um material resistente e flexível para substituir o marfim, provenientes de animais de grande porte, utilizados para confeccionar a bola de bilhar (RASMUSSEN, 2018). Hyatt patenteou sua ideia em 1870, iniciando a fabricação desse material em uma escala maior, construindo, em 1873 a primeira fábrica de plástico do mundo, juntamente com seu irmão Isaiah Hyatt (JIANG; JIANG, 2013; RASMUSSEN, 2018).

Anos depois, em 1907 a primeira resina sintética foi produzida a baquelite, pelo belgo-americano Leo Hendrik Baekeland, foi o primeiro passo para a produção de polímeros fenólicos. Desde então, foi questão de tempo e estudos para que esta classe de materiais fosse usada e aceita pela sociedade (JIANG; JIANG, 2013; WILLIAMS; RANGEL-BUITRAGO, 2022).

Em 1950 os plásticos ficaram mais populares e passaram a substituir alguns materiais mais caros, pesados e quebráveis, pois apresentavam boas características para serem usados em grande escala, sendo elas a durabilidade, resistência à corrosão, propriedades de isolamento térmico e elétrico, maleabilidade, dentre outros (JUNG et al., 2022; OKOFFO et al., 2021; SOARES et al., 2021). Seu uso também trouxe outros benefícios, principalmente em embalagens, os quais reduziram custos do produto, além de se tornarem mais leves para o transporte (SOARES et al., 2021). Outro motivo importante para sua popularização, foi o custo de produção relativamente baixo quando comparado a outros materiais como o vidro ou a madeira (RASMUSSEN, 2018).

Atualmente os polímeros são considerados por muitos “o símbolo contemporâneo da modernidade” e estão presentes no cotidiano de milhões de pessoas (WILLIAMS; RANGEL- BUITRAGO, 2022). A sociedade encontra-se dependente desse material, pois apresenta diversos benefícios em seu uso. Os ramos da construção civil, fabricação de veículos, equipamentos de proteção, eletroeletrônicos são beneficiados diariamente por suas características. Entretanto, os plásticos de uso único causam o aumento da poluição, pois são descartados rapidamente gerando problemas ao meio ambiente (FRIAS; NASH, 2019; OKOFFO et al., 2021).

## 2.2 MICROPLÁSTICOS

O plástico está presente em vários ramos da sociedade, pois apresenta produtos com bom custo-benefício ao mercado, conseqüentemente também está nos rios, lagos, mares e oceanos (WILLIAMS; RANGEL-BUITRAGO, 2022). Quando os plásticos são descartados incorretamente ficam expostos às intempéries do tempo, como a radiação solar, oxidação, dinâmica das correntes de rios e oceanos e interação com microrganismos, isso faz com que o material comece a se degradar em partículas menores (FRIAS & NASH, 2019). As partículas plásticas podem ser encontradas em diversos componentes do ecossistema como: água, solos, tecidos de animais e em seres humanos (JIN et al., 2021; WILLIAMS; RANGEL-BUITRAGO, 2022).

Os microplásticos (MP) podem ser definidos como quaisquer partículas sólidas sintéticas com forma regular ou irregular e com dimensões compreendidas entre 1 µm a 5 mm (FRIAS & NASH, 2019; JIN et al., 2021). Podem ser divididos de acordo com seu surgimento e tratamento, sendo eles classificados como primários e secundários. Os MP primários são plásticos não envelhecidos, normalmente comercializados na forma de pellets, que são microesferas de plástico de tamanhos e formas diferentes usados com intuito de transformar o material em outros produtos (ANDRADY, 2017). O MP primário também é usado para a fabricação de produtos de cuidados pessoais, como é o caso dos cosméticos e esfoliantes (ANDRADY, 2017; ARHANT et al., 2019; CERA; CESARINI; SCALICI, 2020). Já os MP secundários são produtos da degradação do lixo plástico que devido às ações do tempo acabam se transformando em pedaços cada vez menores (ARHANT et al., 2019; CERA; CESARINI; SCALICI, 2020) ou ainda se degradam por meio do uso, como as fibras têxteis (ANDRADY, 2017).

Os primeiros relatos sobre a poluição plástica começaram logo após o início de

sua fabricação, sendo que no mesmo ano da descoberta da baquelite o pesquisador Willian B. Herms relatou os vestígios do material em praias e ambientes costeiros (HERMS, 1907). Anos depois, em 1972, Carpenter e Smith relataram pela primeira vez pedaços de plásticos encontrados no Oceano Atlântico, o que até então não se mostrava nenhuma novidade, mas eles fizeram a primeira referência aos microplásticos, o qual falaram sobre o tamanho dos plásticos encontrados na água e de como sua poluição poderia vir a ser danosa aos organismos existentes neste ambiente, visto que eles estavam se alimentando do material, e que deveria haver uma diminuição do problema (CARPENTER; SMITH, 1972; RYAN; CHITAKA, 2022).

Estudos relacionam a poluição microplástica com diversos problemas ambientais, econômicos e na área da saúde humana. Um dos vários transtornos causados por esse resíduo é a ingestão por animais aquáticos, em especial os peixes, importante fonte de alimentação humana (SANTOS et al., 2020; TROMBETA et al., 2021). Os MP em organismos aquáticos podem causar o acúmulo de material no trato digestivo, o que pode causar lesões e rompimento e eliminação de pseudofeces, alteração tecidual, crescimento comprometido, estresse oxidativo, distúrbios hormonais e tantos outros problemas decorrentes da exposição a esses poluentes (DHARMARAJ et al., 2021; MA et al., 2020)

Outros estudos mostram a interação de MP no solo, causando a perda de peso em minhocas, além de aumentarem o tráfego dessas partículas facilitando seu transporte para lençóis freáticos e incorporação por plantas (HUERTA LWANGA et al., 2017).

### 2.3 A POLUIÇÃO POR MICROPLÁSTICOS PROVENIENTES DE MÁSCARAS

Com o início da pandemia do novo coronavírus no fim de 2019, a utilização de máscaras faciais passou a ser obrigatória, a fim de ajudar na contenção do vírus (DHARMARAJ et al., 2021; PATRÍCIO SILVA et al., 2021). A China, em fevereiro de 2020, tornou-se um dos países que mais confeccionavam máscaras, a produção passou a ter uma média de 14,8 milhões de máscaras por dia (CHEN et al., 2021; SHEN et al., 2021a). Semanas depois, devido à má gestão de resíduos sólidos, já era possível visualizar em muitos países máscaras descartadas nas ruas, terrenos baldios, rios e mares (HU; SHEN; TANG, 2022).

As máscaras cirúrgicas são confeccionadas principalmente a partir do polipropileno (PP), um polímero muito utilizado na indústria devido a sua boa rigidez, resistência e ductibilidade (BOBORI et al., 2022; RABELLO, 2021). Outros compostos

plásticos também podem ser utilizados, como o poliuretano (PU), poliacrilonitrila (PAN), poliamida (PA), poliestireno (PS), policarbonato (PC), polietileno (PE) e polietileno tereftalato (PET) (BUSSAN et al., 2022; CHEN et al., 2021).

As máscaras são formadas por três camadas de tecido não tecido (TNT) fabricadas por meio da técnica *spenbond* e *meltblown*, o qual consiste em fazer com que as fibras poliméricas sejam entrelaçadas e juntadas por termofixação, permanecendo contínuas e entrelaçadas (CHELLAMANI; VEERASUBRAMANIAN; VIGNESH BALAJI, 2013). A camada mais interna é projetada para absorver a umidade da respiração, a do meio filtra as partículas e a mais externa repele líquidos vindo de fora (ADANUR; JAYSWAL, 2022; KHAYAN et al., 2021; LIAO; JI; CHI, 2022)

Quando as máscaras não têm um destino correto, são despejadas em aterros sanitários e outros lugares que fazem com que fiquem suscetíveis aos fatores abióticos, como a luz solar e a variação de temperatura, o qual acabam facilitando a degradação do PP (CHEN et al., 2023; SHARMA; CHATTERJEE, 2017). No Brasil, as agências governamentais recomendam que as máscaras sejam colocadas dentro de dois sacos plásticos resistentes, sendo descartadas no lixo sanitário ou orgânico (BEZERRA; CASSAB, 2020; GÜNTHER, 2020).

A OMS recomenda que as máscaras cirúrgicas não sejam recicladas mecanicamente após o uso, antes de passarem por processos de descontaminação, por risco biológico, uma vez que são consideradas como resíduo médico (MADERUELO-SANZ et al., 2021). A abrasão e envelhecimento do PP faz com que as ligações químicas sejam quebradas, gerando partículas de tamanho micro e nano, além de que radicais poliméricos são liberados para o ambiente (CHEN et al., 2023).

## 2.4 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS E INDICADORES BIOLÓGICOS

A ecotoxicologia é uma área especializada da toxicologia ambiental, seus estudos são baseados nos impactos causados por agentes naturais ou sintéticos que possam incidir sobre organismos vivos e sua interação com o meio (COSTA et al., 2008; MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Os ensaios ecotoxicológicos são realizados em laboratórios, com condições experimentais controladas que permitem avaliar os efeitos dos agentes químicos e físicos provenientes de causas antropogênicas, sobre os organismos vivos (HAHN, 2011). Essa ciência auxilia no fornecimento de informações importantes para os gestores ambientais, no que diz respeito ao monitoramento ambiental e na previsão de



futuros impactos ambientais (ZAGATTO& BERTOLETTI, 2008).

Nos últimos anos, a toxicologia aquática vem tendo destaque devido a crescente poluição nos corpos hídricos, principalmente pelos chamados contaminantes emergentes, os quais não apresentam métodos para sua quantificação bem estabelecidos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Cada vez mais a ecotoxicologia aquática busca encontrar soluções para os problemas que assolam esse ambiente, assim como novos estudos para descobrir organismos bioindicadores que possam captar e responder o objeto de interesse eficientemente quando expostos a agentes nocivos à saúde ambiental (COSTA et al., 2008; WALKER et al.,2019).

Para auxiliar na avaliação dos impactos de determinadas substâncias químicas em ambientes aquáticos, são utilizados testes de ecotoxicidade com invertebrados e vertebrados, pois muitas espécies podem atuar como sentinelas, indicando inicialmente o efeito de contaminantes em seu habitat (CASTRO et al., 2018b; PEREIRA NAVARRO LINS et al., 2010). As informações obtidas por meio destes testes são usadas para comparar diferentes substâncias químicas presentes na água, e verificar a sensibilidade de diversos organismos aquáticos a um mesmo elemento. Pois somente análises físicas e químicas não são suficientes para avaliar o risco de contaminantes presentes na água (COSTA et al., 2008; SILVA;POMPÊO; PAIVA, 2015)

Estes testes são efetuados com organismos indicadores, que podem apresentar sensibilidade a estressores, são escolhidos por suas características de respostas a determinadas substâncias, e mostram alterações comportamentais, fisiológicas e morfológicas (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008; SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015). A exposição do organismo pode ser considerada aguda, quando um agente tóxico é liberado em grande quantidade, de apenas uma vez, e tendo rápida absorção pelo organismo em um período de tempo que varia entre 24 a 96 horas. As respostas dos testes agudos são analisadas por meio da mortalidade ou imobilidade dos organismos, que podem ser expressas por meio dos valores de CE50 ou CL50 (COSTA et al., 2008; MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

A exposição subcrônica dos organismos visa medir os efeitos das substâncias químicas por um período que abrange parte da vida do animal, aproximadamente 10% do tempo de vida, normalmente estes ensaios são feitos a partir de dez (10) dias (SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008). As substâncias testadas são liberadas lentamente e em baixas concentrações, permitindo avaliar concentrações subletais, as quais não levam a morte do organismo, mas podem afetar seu crescimento, reprodução,

alimentação, podendo se fazer análises histológicas, hematológicas e comportamentais (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008).

Os testes de toxicidade podem ser divididos de acordo com a quantidade de trocas periódicas das soluções, podendo ser estático, semi-estático e dinâmico. No teste estático não há a renovação da solução-teste, enquanto que no semi-estático a uma renovação contínua, em média a cada 24 horas, e nos testes dinâmicos as soluções são renovadas continuamente (COSTA et al., 2008).

Os peixes e invertebrados de água doce são bastante sensíveis a variações ambientais, sendo amplamente utilizados por suas respostas aos testes ecotoxicológicos (CARTRO et al., 2018a). Esses organismos exibem sinais que podem indicar algum estressor no ambiente que estão expostos, sendo que eles com ampla função indicadora, desde monitorar área de lançamento de efluentes até indicar determinadas mudanças em local de interesse, fornecendo informações complementares, muito necessárias para a análise de risco ecológico (ARIAS et al., 2007; DAMATO, 2001).

## 2.5 BIOMARCADORES

Os biomarcadores podem ser definidos como uma resposta biológica do organismo a estressores presentes no ambiente em que vivem, elas podem se manifestar em alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais (DE JESUS & DE CARVALHO, 2008; GUIRADO & MARTINS, 2019). Os biomarcadores possibilitam identificar as interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos, bem como permite mensurar os efeitos sub-letais (DE JESUS; DE CARVALHO, 2008).

Os biomarcadores são essenciais para monitorar a saúde do ecossistema aquático, auxiliando no monitoramento ambiental para uma detecção precoce de eventos adversos reversíveis (AMORIN, 2003; WINKALER et al., 2001). Os biomarcadores são classificados como o de exposição, efeito ou suscetibilidade.

Os biomarcadores de exposição são alterações biológicas mensuráveis e que mostram a exposição dos organismos a um poluente, são conhecidos por serem sensíveis e específicos quanto aos compostos analisados. Os biomarcadores de efeito não são tão específicos quanto aos estressores, não fornecendo muitas informações acerca de sua natureza, mas mostram as informações de respostas bioquímicas, tecidual, fisiológica ou comportamental. E o biomarcador de suscetibilidade são as mudanças das respostas do

organismo ao longo do tempo e entre a exposição e o efeito (AMORIN, 2003; DE JESUS & DE CARVALHO, 2008).

O grau de eficiência do biomarcador depende do organismo e de sua posição na cadeia trófica, por isso é necessário conhecer a viabilidade de cada um para cada situação (DE JESUS; DE CARVALHO, 2008).

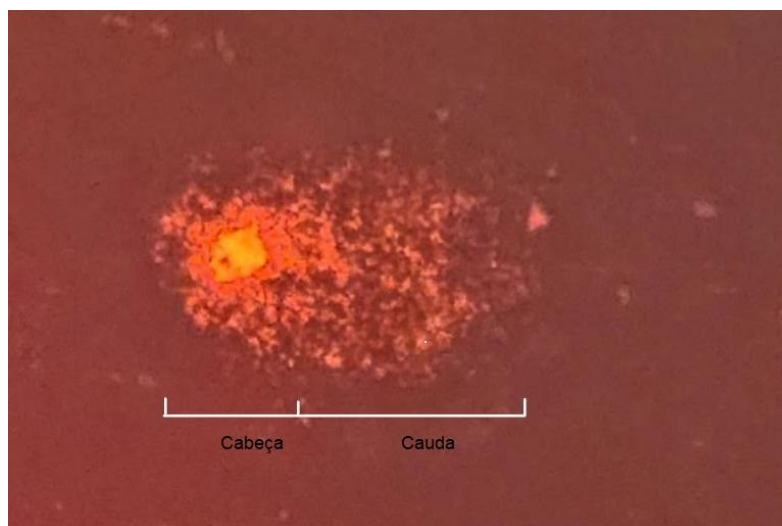
### 2.5.1 Biomarcadores de genotoxicidade

#### 2.5.1.1 Ensaio cometa alcalino

O ensaio cometa ou eletroforese em gel de célula única é uma técnica utilizada ao redor do mundo para a detecção de danos no DNA, que podem ser causados por agentes genotóxicos (DA ROCHA et al., 2009a; GAJSK; LANGIE; ZHANATAEV, 2020). Esse ensaio foi introduzido pelos pesquisadores Ostiling e Johanson (1984) e adaptada por Singh (1988) e Olive (1990) e se popularizou devido ao fato de poder ser aplicado na maioria das células eucarióticas, além de ser um ensaio sensível, confiável, rápido e de baixo custo (CHOUCROUN et al., 2001; DA ROCHA et al., 2009a; ŽEGURA; FILIPIC, 2019).

O ensaio cometa consiste em remover as membranas e proteínas celulares e nucleares das células por meio da lise celular. Sendo que após o tratamento alcalino e de eletroforese o DNA migra em direção ao ânodo, a extensão da migração do DNA reflete a extensão do dano (CHOUCROUN et al., 2001; DA ROCHA et al., 2009a). Assim sendo, o ensaio se baseia na hipótese de que os danos causados no DNA por agentes genotóxicos produzem cadeias de DNA de baixo peso molecular, sendo elas liberadas ao longo do processo de lise, formando a cauda do cometa (CHOUCROUN et al., 2001). Enquanto que o DNA de alto peso molecular permanece no núcleo, não migrando para nenhuma região, formando a cabeça do cometa (CASTRO et al., 2021; CHOUCROUN et al., 2001; MCART et al., 2009; NAGUIB et al., 2022).

Figura 1 - Demonstração da cabeça e cauda de um nucleóide.



Fonte: a autora (2022)

O ensaio cometa é uma análise que se mostra sensível para quantificar os danos genotóxicos em várias espécies de peixes (NAZ et al., 2019). A maioria dos ensaios utiliza os eritrócitos para realizar este teste, pois a obtenção das células é relativamente fácil, além de que essas células são nucleadas. Esse procedimento pode ser aplicado em vários tipos de células, de acordo com o tipo de contaminante e seu modo de interação com o organismo, além dos eritrócitos, as células mais utilizadas são das brânquias, fígado, rim e intestino (COTELLE; FORARD, 1999; GAJSKI et al., 2019a; MURALY; K. V., 2021).

### 2.5.2 Biomarcadores bioquímicos

Os biomarcadores bioquímicos são muito utilizados na detecção de poluentes no ambiente aquático, pois oferecem muitas vantagens como uma grande sensibilidade e especificidade, são detectados por primeiro em nível molecular e celular e possuem um custo relativamente baixo. Assim sendo, permitem auxiliar na antecipação de possíveis efeitos na cadeia trófica, bem como na saúde humana (LOPES et al., 2019; MOREIRA; GUILHERMINO, 2005).

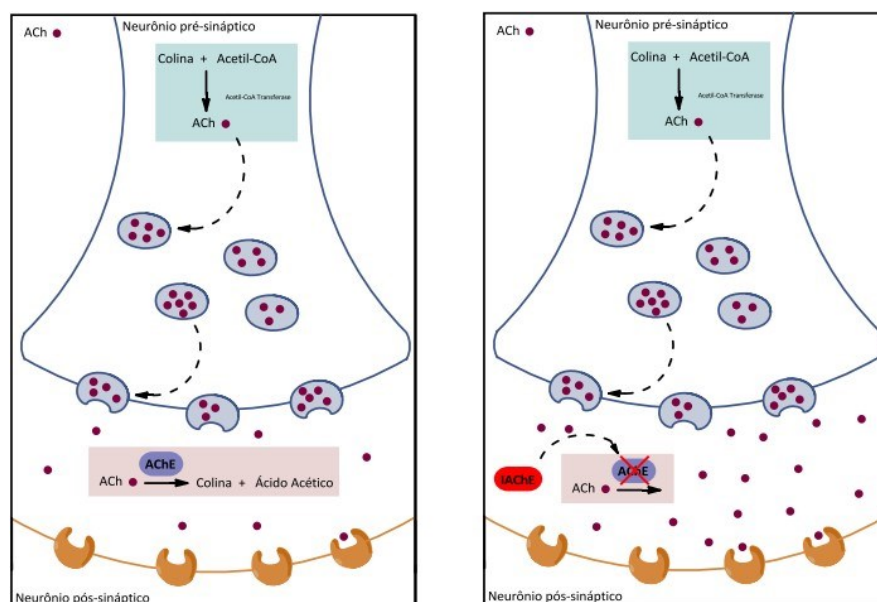
Para o monitoramento de ambientes aquáticos, os biomarcadores bioquímicos são utilizados principalmente em peixes, pois além de estarem em contato constante com o contaminante, também ocupam um importante papel na cadeia trófica, estando presentes na alimentação humana. Por esse motivo, os biomarcadores mais usados em pesquisas

envolvendo o meio aquático estão relacionados com as enzimas responsáveis pela detoxificação do organismo em relação aos xenobióticos (MARTINEZ, 2006).

### 2.5.2.1 Biomarcadores de neurotoxicidade

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que está presente no sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP), tendo um papel importante na regulação de neurotransmissores, atuando em diversas funções fisiológicas do organismo (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016). A AChE é responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético durante as sinapses colinérgicas, cessando os impulsos nervosos (DE BE MATOS et al., 2022; LOPES et al., 2019).

Figura 2 - Esquema da finalização da transmissão de impulsos.



Fonte: Araujo; Santos; Gonsalves, 2016.

Legenda: a imagem a esquerda ilustra a transmissão das sinapses de maneira normal e a imagem a direita indica a inibição da AChE.

A ACh precisa ser degradada rapidamente, antes de um novo impulso nervoso, garantindo um funcionamento normal do sistema sensorial e neuromuscular. Quando a AChE é inibida ocorre o acúmulo de ACh na fenda sináptica e nos tecidos musculares, desregulando o sistema colinérgico (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016; LOPES et al., 2019).

A determinação da atividade da AChE é muito utilizada nos estudos ecotoxicológicos com peixes, sendo um marcador importante de danos nervosos, sua inibição ocorre em exposição a contaminantes como carbamatos, organofosforados, metais pesados e piretróides (DE BE MATOS et al., 2022; DE LA TORRE; FERRARI; SALIBIÁN, 2002a; MENÉNDEZ-HELMAN et al., 2015) A atividade normal da AChE nos peixes é importante para regular as funções fisiológicas, como a capacidade locomotora, fuga de predadores, forrageamento, distribuição espacial, interação social, dentre outros (FULTON; KEY, 2001; KIST et al., 2012a; MENÉNDEZ-HELMAN et al., 2015). Em casos de inibição da atividade da AChE pode ocorrer síndrome colinérgica, insuficiência respiratória e em casos mais graves a morte do indivíduo (LOPES et al., 2019; YAWETZ; MANELIS; GASITH, 1993).

Este estudo utilizou o método de Ellman et al (1961) adaptado para microplaca por Silva de Assis (1998), a qual parte do princípio de que a AChE da amostra biológica utilizada hidrolisa um substrato sintético (iodeto de acetilcolina) em tiocolina e acetato, de modo que a tiocolina resultante interage com o reagente (5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoato), formando o ânion 5-tio-2-nitrobenzoato que pode ser mensurado por aumento da absorbância.

### 2.5.3 Sistema de biotransformação

Os animais vertebrados possuem em seu organismo um conjunto de enzimas responsáveis por converter os xenobióticos em compostos menos tóxicos, de modo a facilitar a excreção pelas vias urinárias, esse processo é conhecido como biotransformação (LIVINGSTONE, 1998; NEBBIA, 2001; ÖZASLAN et al., 2017). As enzimas responsáveis por esse processo em sua maioria estão presentes no fígado, cuja função é converter os xenobióticos hidrofóbicos e lipossolúveis em metabólitos excretáveis e solúveis em água (NEBBIA, 2001; ÖZASLAN et al., 2017).

Entretanto a biotransformação não significa desintoxicação do organismo, em alguns casos os metabólitos formados podem reagir com outras moléculas causando a bioativação, dando origem a metabólitos estáveis ou instáveis mais tóxicos do que os compostos originais (LIVINGSTONE, 1998; NEBBIA, 2001). A biotransformação ocorre em etapas, a primeira delas é chamada de Fase I. Esta fase adiciona um grupo polar como a hidroxila (OH), carboxila (COOH), tiol (SH) e amino (NH<sub>2</sub>) na molécula por meio das reações de oxidação, redução e hidrólise, sendo catalisadas por enzimas pertencentes

à superfamília citocromo P450 (SANTOS; BUENO DOS REIS MARTINEZ, 2020). Nas reações da Fase II os metabólitos passam por reações de conjugação de substratos hidrofílicos endógenos, o que aumenta a hidrossolubilidade dos compostos, facilitando a excreção nas células (DOS REIS et al., 2020; HOFFMANN et al., 2014; JOKANOVIC, 2001; NEBBIA, 2001).

As isoenzimas Glutationa-S-transferases (GST) são enzimas ligadas a detoxificação da Fase II, sendo encontradas no citosol da célula. A GST tem diversas funções, entre elas está a defesa contra danos oxidativos, antioxidante de metabólitos secundários, além de converter espécies reativas de oxigênio (ERO) em substâncias menos nocivas (GALLEGO-RIOS; PEÑUELA; MARTÍNEZ-LOPES, 2021; PARK et al., 2018; SEVIOR; PELKONEN; AHOKAS, 2012). A GST protege as células contra substâncias endógenas e exógenas (xenobióticos) por meio da catálise da ligação nucleofílica da glutatona reduzida (GSH), juntamente com vários metabólitos envolvidos na desintoxicação de intermediários reativos, convertendo uma molécula lipofílica reativa em uma molécula não reativa solúvel em água, sendo excretada mais facilmente (BASTOS et al., 2013; KIM et al., 2010; SAMANTA et al., 2014; WANG; LU; CUI, 2012). A atividade da GST pode ser reduzida ou aumentada por uma série de xenobióticos (SAMANTA et al., 2014; WANG; LU; CUI, 2012).

#### 2.5.4 Estresse oxidativo

Todos os organismos aeróbicos geram radicais livres durante as funções fisiológicas normais do organismo, pois parte do oxigênio absorvido é convertido em subprodutos por meio de reações de óxido-redução, um dos subprodutos mais estudados são as espécies reativas de oxigênio (ERO) (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; WU et al., 2021). As ERO são formadas continuamente pelo metabolismo dos organismos em seu processo normal, são concentrações tão baixas que as células já apresentam meios de defesa para conter os efeitos desses radicais (AJIMA et al., 2017; BARBOSA et al., 2010).

Entretanto alguns xenobióticos tem o potencial de produzir ERO, superando a proteção proporcionada pelos mecanismos de defesa antioxidante do metabolismo do organismo (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017; LUSHCHAK, 2016; WU et al., 2021). Quando os níveis de ERO aumenta começa a ocorrer o dano oxidativo, o qual danifica as macromoléculas bem como o DNA, proteínas, lipídios e açúcares. Em humanos o

aumento desse radical livre pode causar algumas doenças como o Parkinson, além de participar ativamente nos processos de envelhecimento (LUSHCHAK, 2016; SUN et al., 2006; YANG; LIM; SONG, 2020).

Os principais sistemas de defesa antioxidante dos vertebrados são os enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) e os não enzimáticos que incluem as vitaminas E, C e A. Se esses sistemas começam a falhar, propiciasse um ambiente para o aumento de danos oxidativos (GONZÁLEZ-RIVERA, 2021; JOS et al., 2005).

A CAT é uma das principais enzimas antioxidantes envolvida na decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), estando amplamente distribuída no tecido dos peixes, o qual atua transformando o  $H_2O_2$  em água e oxigênio, sem produzir radicais livres (YANG; LIM; SONG, 2020). Além de atuarem neste processo, tem um papel importante em vários processos biológicos, incluindo inflamação, mutagênese, prevenção da apoptose e estimulação de um amplo espectro de tumores. A diminuição da atividade da CAT aumenta o risco de peroxidação lipídica devido o acúmulo do peróxido de hidrogênio nos tecidos (YANG; LIM; SONG, 2020; ZHANG et al., 2011).

A membrana plasmática também acaba por ser suscetível a danos pela quantidade excessiva de EROs, por meio da peroxidação lipídica (LPO). A LPO incorpora oxigênio molecular aos ácidos graxos poliinsaturados, produzindo os hidroperóxidos, o que levam a destruição de sua estrutura, fazendo com que a membrana perca sua integridade e permeabilidade, facilitando a entrada de espécies reativas no interior das células (CARVALHO et al., 2012; HIGUCHI, 2003; LIMA SILVA; ABDALLA, 2001). A peroxidação lipídica é um dos indicadores utilizados para avaliar o dano oxidativo em peixes, o qual contribui na perda da função celular e fisiológica do animal (AJIMA et al., 2017).

## 2.6 PEIXES COMO MODELOS DE ESTUDOS TOXICOLÓGICOS

Os peixes estão presentes em todos os sistemas aquáticos e em vários níveis tróficos, sendo capazes de reter xenobióticos que estão na água, além de estarem expostos diretamente ao contaminante, fazendo com que reajam a quaisquer alterações do ambiente, refletindo sensivelmente as concentrações existentes no local (CASTRO et al., 2018a; GALLEGOS-RIOS; PEÑUELA; MARTÍNEZ-LOPES, 2021; UDROIU, 2006; WHITFIELD; ELLIOTT, 2002).



Outras características que os tornam tão importantes para o monitoramento ambiental são as de que os peixes também respondem de modo semelhante aos demais vertebrados, estão presentes na dieta humana e respondem aos xenobióticos do nível molecular até o populacional (CASTRO et al., 2018a; WHITFIELD; ELLIOTT, 2002).

Por serem animais que oferecem uma gama de características que possibilitam verificar os efeitos dos xenobióticos no funcionamento do seu organismo, são muito utilizados em ensaios agudos (96h) e subcrônicos (7 a 21 dias) em laboratórios (BAVIA et al., 2022; HAMED et al., 2019). Desse modo a literatura envolvendo pesquisas com peixe é extenso, isso possibilita uma análise de dados e comparações mais completas e eficientes (BAVIA et al., 2022; BOLGER; CONNOLLY, 1989; DA ROCHA et al., 2009; ÖZASLAN et al., 2017; THORÉ et al., 2021; WHITFIELD; ELLIOTT, 2002; WU et al., 2021).

### 2.7 *Oreochromis niloticus*

A espécie de peixe *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), conhecida popularmente como tilápia do Nilo é originária da África, principalmente na região do Rio Nilo. Sua distribuição geográfica atual é mais ampla, devido a introdução desta espécie em diversos países. São peixes subtropicais e tropicais de água doce, pertencente à família Cichlidae (GRAMMER et al., 2012; GU et al., 2016).

Figura 3 - Exemplar da espécie *Oreochromis niloticus*



Fonte: Camoleze (2019)

Muitos países cultivam essa espécie para fins comerciais, pois a tilápia possui grande importância na indústria alimentícia, ficando conhecido como o “frango aquático” devido ao seu grande consumo e um alto índice de proteína dietética (TAO et al., 2021). A rápida adesão por parte dos piscicultores a essa espécie se dá devido ao seu rápido crescimento, boa reprodução, fácil cultivo, capacidade de se alimentar em diferentes níveis tróficos (GRAMMER et al., 2012).

Como a tilápia do Nilo vem ganhando espaço em diversos países, as pesquisas laboratoriais envolvendo esse animal também aumentou, pois, esse peixe tem sido amplamente utilizado para acompanhar os impactos de diversas fontes de contaminação dos ecossistemas aquáticos. Pesquisadores utilizam a espécie para avaliar o estado geral da saúde dos peixes, por meio dos biomarcadores, dentre eles, os genéticos e bioquímicos (BAVIA et al., 2022; CARVALHO et al., 2012). Atualmente as pesquisas envolvendo *Oreochromis niloticus* são usadas na toxicologia para avaliar muitos contaminantes (AMIN et al., 2022; HAMED; ISMAL; FAGGIO, 2021; MARINS et al., 2021; YANG et al., 2022), fármacos (AJIMA et al., 2021; LIU et al., 2021; VIJITKUL et al., 2022), contaminantes emergentes (ALMEIDA et al., 2002; BARBIERI et al., 2016; GEMUSSE et al., 2021; HANDAYANI; SOEGIANTO; LIGNOT, 2020; LIU et al., 2023) e também microplásticos (DING et al., 2018; HAMED et al., 2019; ISMAIL; SALEH; SAYED, 2021a; OLIVA-HERNÁNDEZ et al., 2021).

Estudos utilizando o gênero *Oreochromis* para avaliação dos danos causados por microplásticos apontam alterações celulares, bioquímicas e histopatológicas nos animais. O aumento nos índices de estresse oxidativo, peroxidação lipídica, fragmentação do DNA, apoptose, bem como alterações no sistema de detoxificação e reprodução do animal, são algumas das disfunções ocasionados por micropartículas plásticas (HAMED et al., 2019,2020; ISMAIL; SALEH; SAYED, 2021; JEYAVANI et al., 2023; RAZA et al., 2023).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

##### 3.1.1 Microscopia eletrônica de varredura acoplado a espectroscopia por energia dispersiva(EDS).

Para verificação da morfologia do material estudado, as amostras de máscara branca e preta (10 mm X 10 mm) foram fixadas em um suporte próprio para a análise (*stub*), submetidas a uma metalização com ouro (equipamento: Quanta Quorum – modelo Q150R ES), e avaliadas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura, no aparelho Zeiss modelo Evo MA 15, com detector de energia dispersiva EDS X (Centro multiusuário de caracterizações de material, UTFPR CampusCuritiba, sede Centro). As amostras foram visualizadas nas condições de 15 kV e aumentos de 50x, 100x, 200x e 500x.

Com objetivo de analisar os elementos químicos presentes no material, foi utilizado o detector EDS X para análise química qualitativa do material.

##### 3.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR)

As amostras das duas cores de máscaras foram analisadas sobre os espectros de absorção na região do infravermelho, sendo submetidas a faixa de número de onda de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$  nos espectrofotômetros: Fontier PerkinElmer – modelo Spectrum 100S (UTFPR campusMedianeira – Central Analítica Multiusuário de Medianeira). Para as amostras sólidas os espectros foram registrados em pastilhas de brometo de potássio (KBr) a partir de uma média de 8 varreduras, com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . As pastilhas foram preparadas a uma pressão próxima a 9 kbar em prensa axial.

##### 3.1.3 Granulometria por peneiramento

Para o ensaio de granulometria, foi utilizado o método descrito por JORDAN et

al., (2016), seguindo as recomendações da norma ABNT NBR 7181 (2016), dispendo de parâmetrose metodologias para análise granulométrica de solos.

As amostras das máscaras cortadas para a exposição do bioensaio, foram submetidas ao processo de peneiramento em oito peneiras com tela de aço inox. As dimensões das malhas (mesh) utilizadas, variaram entre 4,7600 a 0,0755 mm. O material foi submetido por 20 minutos em peneirador eletromagnético: marca Cotenco (UTFPR Campus Curitiba), na intensidade máxima de vibração, ao final, as amostras ainda foram submetidas ao peneiramento manual. Após, pesou-se o material em balança semi-analítica, as partículas retidas nas peneiras foram tratadas para posterior determinação da granulometria do material.

Figura 4 – Amostras sendo peneiradas pelo peneirador eletromagnético.



Fonte: a autora (2023)

### 3.2 ENSAIOS DE TOXICIDADE

O bioensaio com peixes iniciou-se após a aprovação do projeto pela Comissão de

Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) com o protocolo número 2022-03 (Processo nº 23064.016838/2022-90).

### 3.2.1 Aquisição e aclimação

Peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (n=150 alevinos) foram adquiridos comercialmente em piscicultura local para a realização do bioensaio. A aclimação dos peixes ocorreu no Laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR durante 30 dias em tanques de 250 L e mais cinco dias em aquários de 24 L contendo água filtrada e declorada, sob aeração constante e fotoperíodo natural.

Figura 5 - Aclimação de *Oreochromis niloticus* em laboratório.



Legenda: em (A) os tanques de aclimação dos peixes no laboratório e (B) os peixes durante a aclimação.

Fonte: a autora (2022)

As condições para aclimação foram monitoradas diariamente (temperatura, pH, mortalidade), bem como a realização da troca parcial da água dos tanques e/ou aquários por meio na sifonação, seguido com a higienização dos mesmos com etanol (70%) e papel toalha. O período de realização do bioensaio foi no inverno (entre maio e junho de 2022), no início da aclimação foram registradas mortes por conta do frio, sendo necessário o uso de aquecedores com termostatos para manter a temperatura em torno de 23 C° para o desenvolvimento dos peixes.

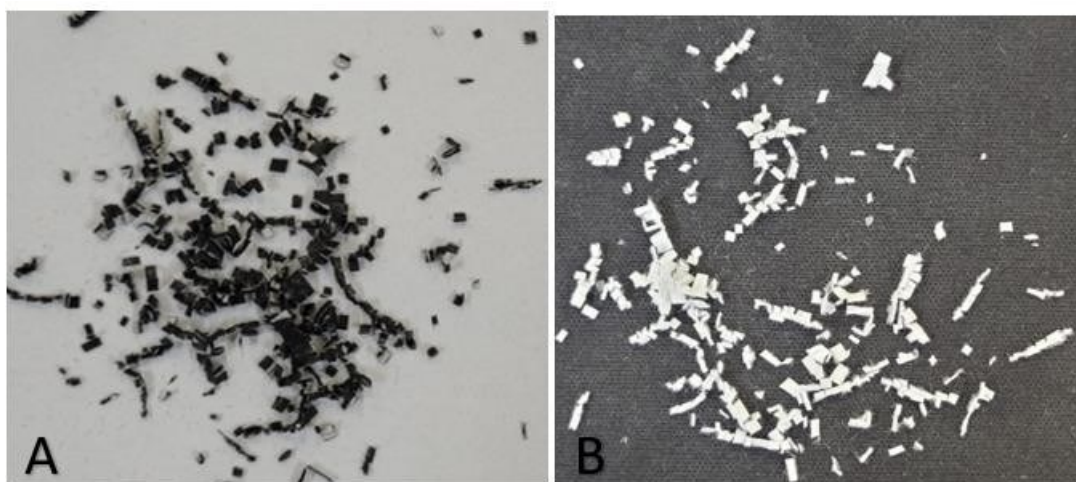
A alimentação era realizada três vezes ao dia (8, 13 e 18 horas) com ração comercial flutuante contendo 46% de proteínas. Durante a aclimação percebeu-se a presença de fungos nos alevinos, sendo tratados com sal grosso (com baixo teor de iodo) na concentração de 0,5 g/L, sendo diminuídas conforme a melhora do quadro. Durante todo o período de cuidado com os peixes, desde a aclimação até o fim da exposição, priorizou-se a qualidade de vida do animal, conforme as recomendações do CEUA e do

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Por isso, a densidade de peixes por aquário era inferior a 0,5 g/L, as pessoas que circulavam pelo ambiente foram orientadas a não se aproximar. Nos aquários foram colocados tubos inertes, para promover a distração dos organismos.

### 3.2.2 Preparação das amostras de máscaras

Para a padronização dos pedaços de microplásticos advindos as máscaras, foram realizados cortes em pedaços de aproximadamente 5 mm. Para tal procedimento retirou-se o clipe nasal das máscaras, e iniciou-se o processo de corte das máscaras com auxílio de uma tesoura.

Figura 6 – Amostras cortadas de máscaras branca e preta utilizadas para exposição.



Legenda: fragmentos das máscaras obtidos por meio do corte com tesoura, com tamanho inferior a 5 mm.

Em A máscaras descartáveis pretas e em B máscaras descartáveis brancas.

Fonte: a autora (2022)

Após obtenção do tamanho desejado as máscaras cortadas foram pesadas em balança analítica para o preparo da solução matriz de 5g por litro, a solução matriz foi dividida em erlenmeyers de 125 mL. Os erlenmeyers foram colocados na mesa agitadora por um período de 72 h sem intervalo de descanso, após o período pré-estabelecido, as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente onde não incidisse luz solar.



Figura 7 – Amostras de máscaras prontas para agitação em mesa agitadora.

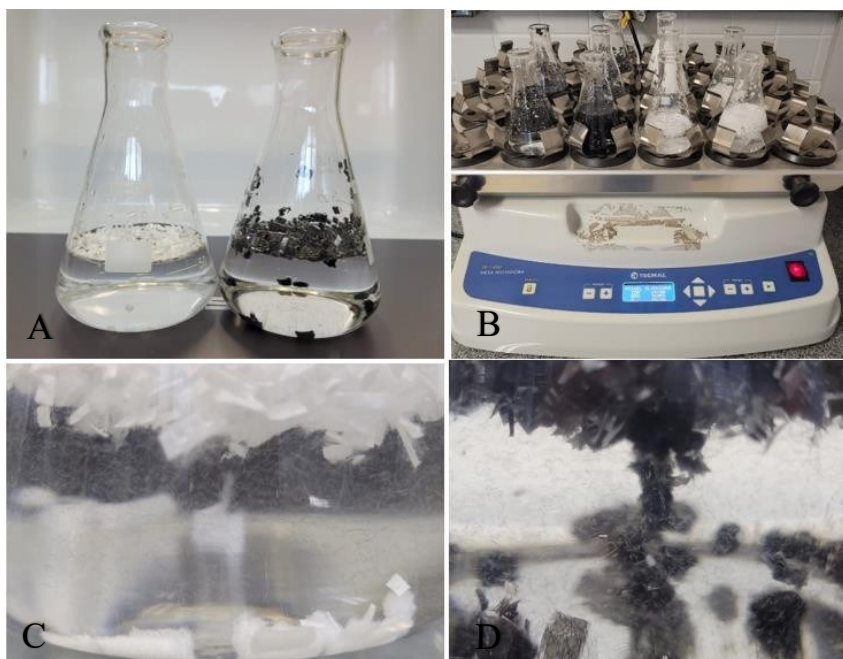


Legenda: erlenmeyers com as concentrações específicas de máscaras diluídas em água, prontas para serem colocadas na mesa agitadora.

Fonte: a autora (2022)

O uso da mesa agitadora teve por objetivo aumentar a superfície de contato com a água, liberando uma quantidade maior de partículas, simulando assim o desprendimento de fibras nos corpos d'água.

Figura 8 - Procedimento de preparo das amostras em laboratório.



Legenda: em A e B as amostras prontas para o início do ciclo de 72 horas, em C e D as amostras após o período de agitação com as fibras soltas na água.

Fonte: a autora (2022).

### 3.2.3 Ensaios subcrônicos

Os bioensaios foram conduzidos em condições semelhantes aos da aclimação (aeração constante, pH, temperatura, fotoperíodo, frequência de alimentação e limpeza). Foram realizados sete tratamentos de exposição: controle negativo (CN), três grupos com micropartículas provenientes da máscara branca e três grupos com micropartículas provenientes da máscara preta. Para melhor organização das concentrações, os aquários foram nomeados conforme apresentado na Tabela 1.

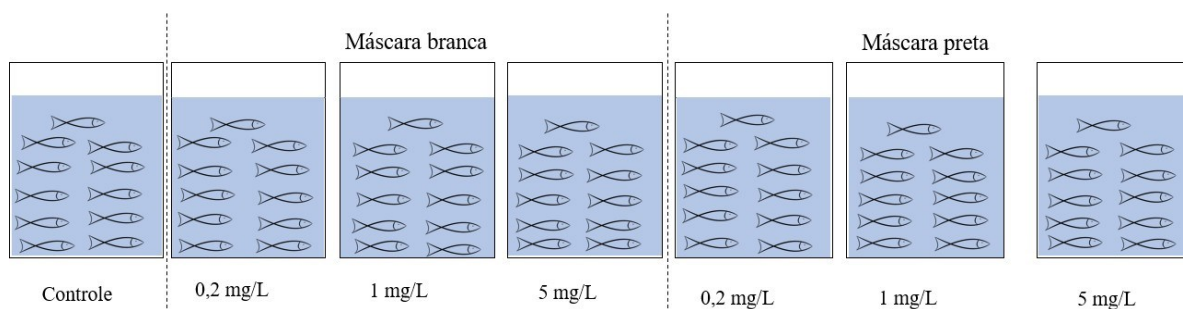
Tabela 1 – Nomenclatura adotada para os grupos e concentrações no bioensaio.

Grupos	Concentração	Nomeação
Controle	---	C
Máscara branca	0,2 mg/L	MBC1
Máscara branca	1 mg/L	MBC2
Máscara branca	5 mg/L	MBC3
Máscara preta	0,2 mg/L	MPC1
Máscara preta	1 mg/L	MPC2
Máscara preta	5 mg/L	MPC3

Fonte: a autora (2023)

Cada grupo experimental foi formado por aquários contendo 50 L de água filtrada contendo 11 indivíduos por aquário, totalizando 77 indivíduos no bioensaio.

Figura 9 - Representação esquemática do bioensaio



Fonte: a autora (2022)



Para o presente trabalho foi escolhido fazer uma progressão de 5 vezes mais partículas do que a concentração anterior, a qual iniciou-se em 0,2 mg/L (0,2mg/L x 5; 1mg/L x 5 e 5mg/L), assim como em trabalhos semelhantes. No trabalho de Hamed et al. (2019) utilizando *O. niloticus*, os organismos foram submetidos as concentrações de 1mg/L; 10 mg/L e 100 mg/L de pó bruto de um microplástico não especificado. Bem como no trabalho de Ding et al. (2018) que usou concentrações de PS entre 0,001 a 0,1mg/L.

O método para exposição foi o subcrônico, com 14 dias de exposição em um sistema semi-estático com renovação parcial diária de  $\frac{3}{4}$  do contaminante e da água (DING et al., 2018; ISMAIL; SALEH; SAYED, 2021; JEYAVANI et al., 2023). No primeiro dia, a solução estoque de 5 g/L contendo as micropartículas provenientes das máscaras descartáveis foi pipetada nos aquários, sendo renovadas diariamente conforme a troca parcial da água. Durante os o período de ensaio os peixes eram alimentados com ração comercial.

Tabela 2 - Volume das soluções pipetadas nos aquários.

Grupos	Vi (1º dia)	Vr ( 2º ao 14º dia)
	V (50 L) / mL	V (40 L) / mL
0,2 mg/L	2	1,6
1 mg/L	10	8
5 mg/L	50	40

Fonte: a autora

Legenda: Vi – volume inicial das misturas estoques, adicionadas no primeiro dia de exposição nos aquários contendo 50 L de água. Vr – volume da mistura estoque adicionada para renovação parcial, em aquários com renovação de 40 litros de água.

Figura 10 – Aquários com *Oreochromis niloticus* durante a exposição do bioensaio com as máscaras



Fonte: a autora

### 3.2.4 Coleta do material biológico

Após os 14 dias de exposição, os peixes foram capturados e anestesiados via hídrica em benzocaína 10% para a coleta de dados bióticos como o peso, comprimento padrão, comprimento total e observações morfológicas. Após o aferimento das medidas coletou-se o sangue dos peixes por punção cardíaca utilizando um capilar heparinizado, o sangue foi utilizado para análises de genotoxicidade pelo ensaio cometa. Na sequência, foi realizada a eutanásia dos peixes por secção medular e então foram retirados os órgãos pertinentes para às análises de biomarcadores bioquímicos (fígado, músculo e cérebro). Para não haver desnaturação das proteínas e enzimas, os órgãos coletados foram armazenados individualmente em microtubos em ultrafreezer a -80 °C.

### 3.2.5 Biomarcador Somático

Os dados coletados referentes ao peso e tamanho dos peixes foram utilizados para calcular o Fator de Condição de Fulton (K). Esses dados auxiliam a averiguar a condição de saúde e o estado nutricional dos peixes calculado conforme a equação (FULTON, 1902):

$$K=W/L^3$$

Onde:

W = peso do indivíduo (g)

L = comprimento do indivíduo (cm)

### 3.2.6 Biomarcadores de genotoxicidade

Para a realização do ensaio cometa aproximadamente 10 a 15 microlitros de eritrócitos foram coletados dos peixes, após o material foi colocado em microtubos contendo 1 mL de sorobovino fetal (SBF), a fim de conservar o material biológico (RAMSDORF et al., 2009). Posteriormente, 15 µL de cada amostra foram diluídos em 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) para então a suspensão celular ser homogeneizada com micropipeta, adicionada em uma lâmina de microscopia previamente coberta com agarose de fusão normal (1,5%) e coberta com uma lamínula. Após, as lâminas foram mantidas na geladeira para a solidificação da agarose LMP

Na próxima etapa da técnica, as lamínulas foram removidas cuidadosamente e as

lâminas depositadas em cubetas contendo solução de lise uso (Triton X100 (1%), DMSO (10%) na solução de lise estoque (NaCl (2,5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH (0,8%), N- lauril-sarcosinato (1%)) por 24 horas a 4°C. Após, as lâminas foram dispostas em uma cuba horizontal e imersas em uma solução tampão de eletroforese gelada alcalina (pH>13; NaOH (10 N) e EDTA (200 mM)) por 25 minutos para desnaturar o DNA, e então, foi realizada a eletroforese a 300 mA - 25V por 25 minutos. As etapas seguintes foram três banhos de neutralização em 0,4 M Tris (pH 7,5) e a fixação em álcool etílico P.A. por 10 minutos. Ao final, as lâminas foram coradas usando 20 µL de brometo de etídeo diluído a 20 µL·mL<sup>-1</sup> para observação de nucleóides em microscópio de epifluorescência (Leica DMLS2) em aumento de 400 vezes.

Todas as etapas do ensaio cometa foram desenvolvidas no escuro, e em cada lâmina foram analisados cem nucleóides, sendo separadas em cinco classes de dano: classe 0 (sem dano), classe 1 (dano mínimo), classe 2 (dano médio), classe 3 (dano intenso) e classe 4 (dano máximo). Para o cálculo dos escores foi multiplicado o total de nucleóides classificados em uma classe pelo número da classe, em seguida foi realizada a somatória das multiplicações, conforme mostra a equação:

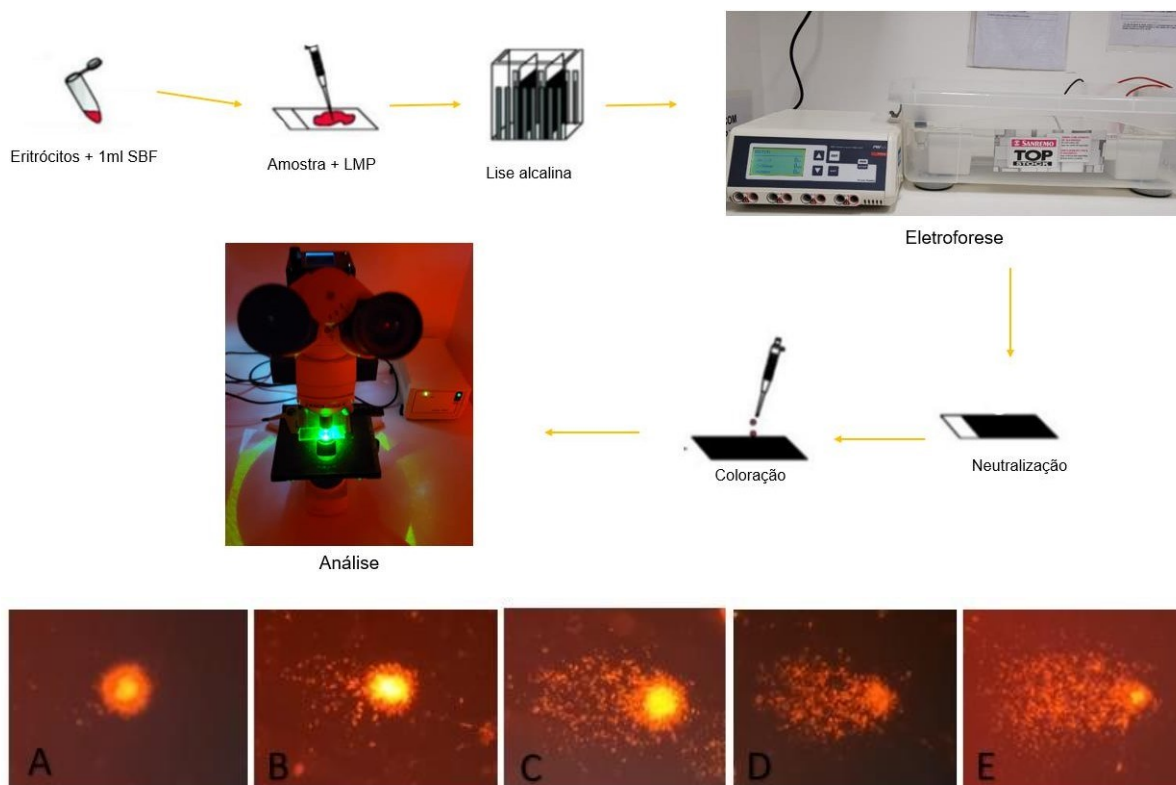
$$\text{Escore} = (0 \times n) + (1 \times n) + (2 \times n) + (3 \times n) + (4 \times n)$$

onde:

“n” representa o total de danos de uma classe (0, 1, 2, 3 ou 4) avaliados em uma lâmina.

Durante a leitura os cometas que estavam sobrepostos, sem formação da cabeça ou com caudas difusas, foram desconsiderados da classificação, pois estas características podem estar associadas à morte celular, seja por apoptose ou por necrose celular (OLIVE et al., 1990).

Figura 11 - Esquema da metodologia do ensaio cometa com *Oreochromis niloticus* e a classificação dos danos no material genético.



Legenda: Imagens capturadas no microscópio de epifluorescência em aumento de 400 vezes, mostrando (A) classe 0, (B) classe 1, (C) classe 2, (D) classe 3, (E) classe 4. Fonte:

A autora (2023).

### 3.2.7 Biomarcadores bioquímicos

Os órgãos coletados após o ensaio foram retirados do ultrafreezer, pesados e colocados em frascos de 2 ml com tampão fosfato de potássio na proporção 1:2 (m/v) de músculo e 1:3 (m/v) de cérebro em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  com pH 7,5. Enquanto a proporção para o fígado foi de 1:3 (m/v) com tampão fosfato de  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  e pH 6,5. Após adicionado o tampão nos frascos foi utilizado um desagregador de tecidos modelo ultra-turrax (Meclab), durante todo o procedimento as amostras permaneceram refrigeradas. Após a homogeneização, o material foi centrifugado a  $10.000 \text{ g}$  por 20 min a  $4^\circ \text{C}$ , em seguida o sobrenadante foi separado e armazenado no ultrafreezer ( $-80^\circ \text{C}$ ) até a realização dos testes. Por fim as amostras foram preparadas em quadruplicatas em microplacas de 96 poços e lidas na leitora de microplacas FluoStar Ômega, conforme o protocolo.

### 3.2.7.1 Proteínas totais

Para a determinação da concentração de proteínas totais foi utilizado o método de Bradford (1976), adaptado para microplacas de 96 poços. Esse método parte do princípio da detecção espectrofotométrica da reação entre o corante reativo de Bradford com proteínas contendo aminoácidos de cadeias laterais ou aromáticas, resultando em valores das atividades enzimáticas em função da quantidade de proteínas, a fim de averiguar a quantidade de proteínas nas amostras. Para isso foi feita uma curva de calibração utilizando soro de albumina bovina (BSA) nas concentrações de 0,125; 0,25; e 0,5 g·L<sup>-1</sup>, sendo adicionado 10 µL de BSA para 250µL de reativo de Bradford diluído em água destilada (1:5) em cada poço da microplaca. A absorbância foi medida em leitora de microplacas no comprimento de onda de 595 nm.

O sobrenadante dos homogenatos das amostras dos tecidos cerebrais, musculares e hepáticos foram diluídos na proporção 1:20 em seus respectivos tampões (50 µL do homogenato em 950 µL de tampão). Em cada poço da microplaca foi adicionado o volume 10 µL da amostra diluída para 250 µL de reativo de Bradford diluído (1:5). Durante a leitura, a absorbância foi mensurada a 595 nm.

### 3.2.7.2 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

Para a avaliação da atividade de acetilcolinesterase em cérebro e músculo foi utilizada a metodologia de Ellman et al. (1961) adaptada para microplaca por Silva de Assis (1998). Esse método se baseia na hidrólise da acetilcolina pela AChE em tiocolina e acetato, onde a tiocolina reage com o DTNB originando uma coloração amarelada, sendo assim mensurados. Desse modo, as amostras homogeneizadas foram diluídas em tampão fosfato (0,1 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7,5) na proporção 1:5 (100 µL do homogenato em 400 µL de tampão) e agitadas no vórtex. Em cada poço da microplaca foi colocado 50 µL da amostra diluída, 200 µL de reagente DTNB 0,75 Mm (5,5- ditio-bis-2 nitrobenzoato) e 50 µL de ATC (iodeto de acetiltiocolina) a 9 mM. A absorbância foi medida a 405 nm durante 9 min, a cada 40 s. Após o tratamento e normalização dos dados da absorbância, os resultados foram expressos em nmol de acetilcolina formada por minuto por mg de proteína.

### 3.2.7.3 Glutathiona-S-Transferase (GST)

Para a avaliação da atividade da enzima GST foi utilizado o método de Keen; Habig; Jakoby (1976). O sobrenadante obtido do fígado foi diluído em tampão fosfato ( $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 6,5) na proporção 1:4 (100  $\mu\text{L}$  de homogenato em 300  $\mu\text{L}$  de tampão). Posteriormente foi pipetado na microplaca 50  $\mu\text{L}$  da amostra e 150  $\mu\text{L}$  da solução de reação de GSH (2 mM glutathiona reduzida) e CDNB (2,5 mM 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno). A absorvância foi medida a 340 nm durante 2 minutos, com ciclos de 20 segundos. Essa reação ocorre por meio da conjugação do CDNB com a enzima GSH que é catalisada pela GST, formando o tio éter, o qual permite a quantificação do aumento da absorvância. Os dados tratados e normalizados, foram expressos em resultados de nmol de CDNB conjugado por minuto por mg de proteína.

#### 3.2.7.4 Atividade da Catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada usando a metodologia de Aebi (1984), adaptado para microplacas de 96 poços por Vicentini et al (2022). Foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  da amostra do sobrenadante e 295  $\mu\text{L}$  da solução de reação com pH 8, em uma placa de quartzo. A solução de reação do pH 8 era constituída por Tampão Tris (1M), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA - 5 mM), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$  - 2 mM) e água de osmose. O método desta análise consiste em medir o decréscimo da absorvância, que é ocasionado pela degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  por meio da enzima catalase. Assim, a absorvância é mensurada a 240 nm, medida por 2 minutos com ciclos de 10 segundos. Os dados resultantes foram tratados e normalizados, os resultados foram expressos em nmol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  degradado por minuto por mg de proteína.

#### 3.2.7.5 Peroxidação lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica foi avaliada de acordo com o protocolo de Jiang; Hunt; Wolff (1992). O homogenato das amostras de fígado foram diluídas em metanol 90% na proporção 1:2, agitadas em vórtex e centrifugadas por 20 min a  $4^\circ\text{C}$  e 10.000 g. Após, foi pipetado na microplaca 30  $\mu\text{L}$  o sobrenadante e 270  $\mu\text{L}$  a solução de reação (laranja de xilenol 0,1 mM, ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  - 0,25 mM), butil hidroxitolueno (BHT - 4 mM) e sulfato ferroso amoniacal  $(\text{NH}_4)_2 \text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  - 0,25 mM), metanol 90%), e reservada e protegida da luz por 30 minutos, em temperatura ambiente ( $25^\circ$ ) para posterior leitura em espectrofotômetro a 570 nm. Esse método se baseia na oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  mediado por peróxido em condições ácidas formando o  $\text{Fe}^{3+}$  com laranja de xilenol e BHT, que absorve no comprimento de onda entre 550 a 570 nm. Após tratamento e normalização dos dados,

os resultados foram expressos em nmol de hidroperóxidos por mg de proteína.

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism® versão 9 para o conjunto de dados. Primeiramente, foi verificada a normalidade e homoscedasticidade dos dados dos diferentes biomarcadores pelo teste de Shapiro-Wilk. No biomarcador somático, os valores do Fator de Condição de Fulton foram avaliados pelo teste de ANOVA. Para o biomarcador genético foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn. Os biomarcadores bioquímicos foram testados quanto à normalidade e homoscedasticidade, após foi realizado o teste ANOVA one-way com pós teste de Tukey.

Os resultados obtidos foram apresentados com média  $\pm$  desvio para os grupos experimentais (grupos controle negativo, 0,2 mg/L; 1 mg/L e 5 mg/L de máscara branca e preta) e foram considerados diferentes significativamente quando o valor de  $p \leq 0,05$ .

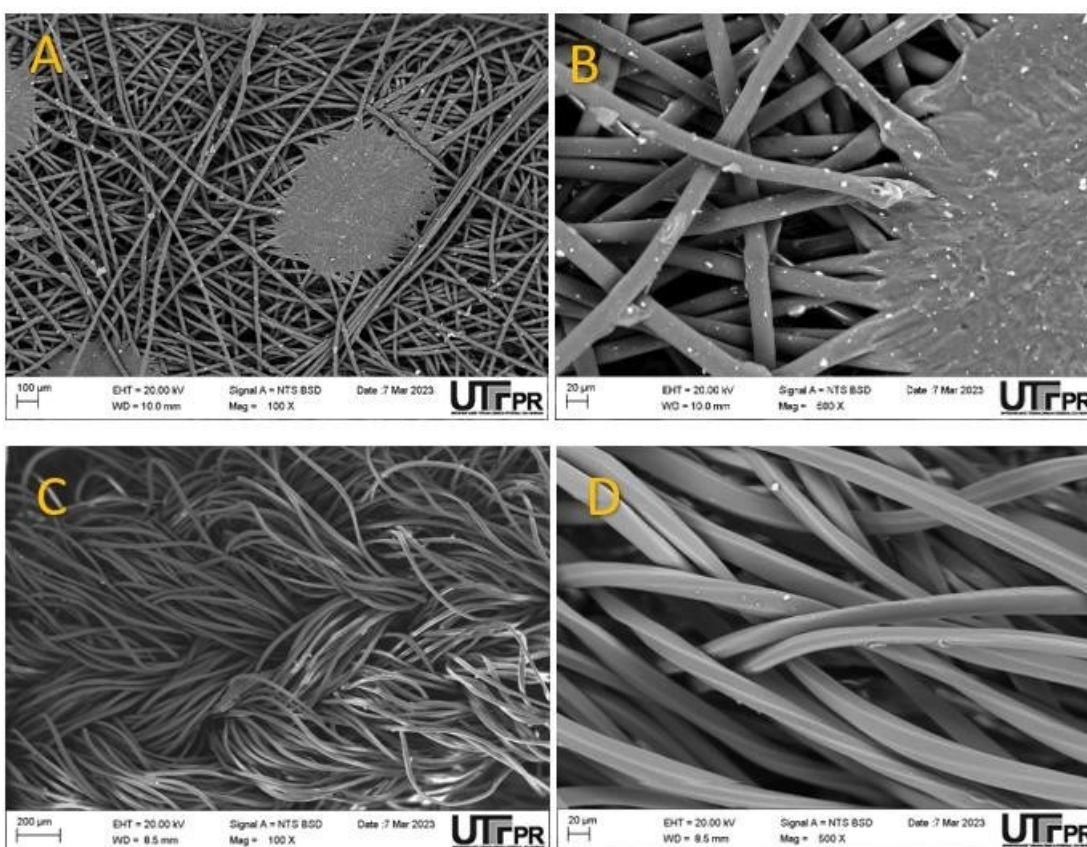
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

#### 4.1.1 Microscopia eletrônica de varredura acoplado a espectroscopia por energia dispersiva(EDS).

Como pode-se verificar nas imagens apresentadas nas figuras 12 e 13, o material possui certa organização, fibras lisas e regulares e com pouca rugosidade, sem trincas, e com pontos no material, os quais seriam os elementos químicos presentes na máscara.

Figura 12 – Fotomicrografias das amostras da máscara branca obtidas por MEV.



Legenda: as imagens A (100x) e B (500x) são amostras da parte frontal das máscaras, enquanto C (100x) e D(500x) são amostras do elástico da máscara.

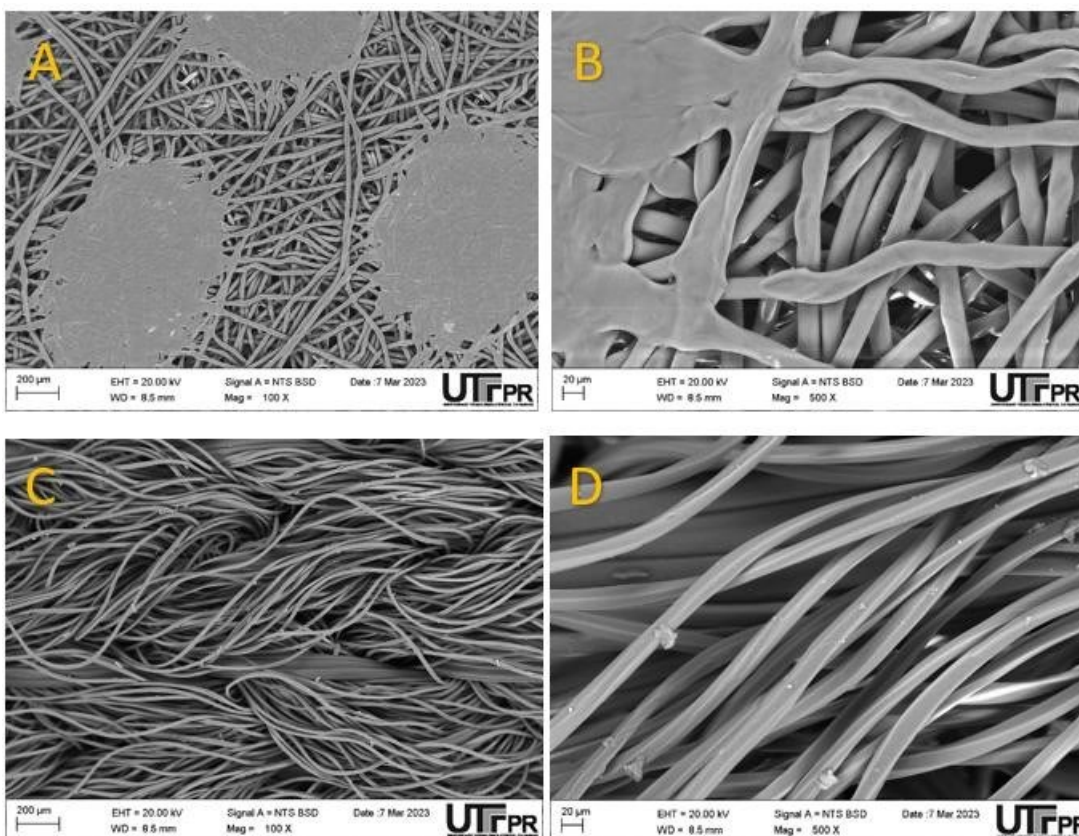
Fonte: autora (2023)

Sobre a análise do EDS na parte do tecido da máscara foi possível perceber alguns elementos químicos constituintes, o qual se sobressai o carbono, oxigênio e cálcio em maior quantidade.



As máscaras de coloração preta possuíram as mesmas características morfológicas quando comparadas as máscaras brancas. Por meio das fotomicrografias é possível verificar o alto grau de entrelaçamento das fibras, essa característica dá ao material maior resistência a tração, principalmente a parte elástica da máscara (WANG et al., 2022; XIE et al., 2023).

Figura 13 - Fotomicrografias das amostras da máscara preta obtidas por MEV.



Legenda: nas imagens de A (100x) e B (500x) são amostras da parte frontal das máscaras, enquanto C (100x) e D (500x) são amostras do elástico da máscara.

Fonte: autora (2023)

Com análise de EDS na máscara preta foram encontrados onze elementos químicos, dentre eles os com maiores quantidades foram o cálcio, oxigênio e o carbono. Não foram encontrados traços de chumbo, cobre ou zinco como os achados em algumas máscaras de coloração preta no trabalho de Bussan et al. (2022). Conforme as imagens de MEV, não houve uma diferença entre a estrutura da máscara branca e da máscara preta, os elementos presentes também foram similares.

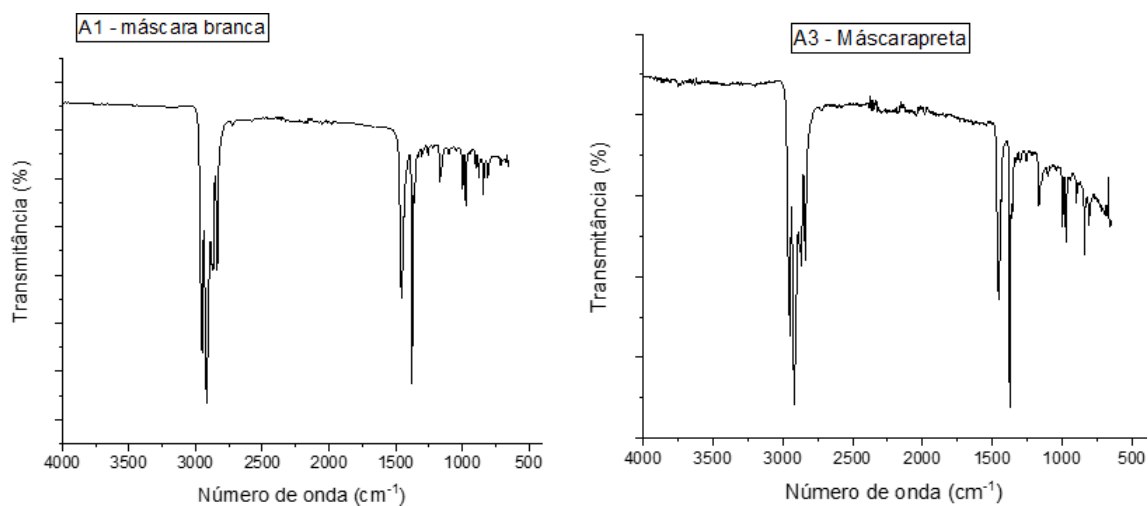
Como aponta nas figuras 12 e 13, o material é formado por muitos feixes próximos, onde unidos formam uma estrutura maior. No entanto, quando entra em contato com

fatores abióticos, esses feixes podem se quebrar e formar as nanopartículas (AKARSU; MADENLI; DEVECI, 2021).

#### 4.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de *Fourier* (FT-IR)

Para determinar a composição das máscaras, foi utilizado espectros do FT-IR, com o números de onda entre 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ , o qual mostrou para o PP bandas entre 3000 e 2800  $\text{cm}^{-1}$  (figura 14), sendo atribuídas à deformação simétrica e deformação assimétrica de  $-\text{CH}_3$  e  $-\text{CH}_2$  (HU; LIN, 2021; PITARELI et al., 2002). Na faixa de 1453  $\text{cm}^{-1}$  deformação angular assimétrica de  $-\text{CH}_3$ ; em 1372  $\text{cm}^{-1}$  deformação angular simétrica de  $-\text{CH}_3$ . E em 1160  $\text{cm}^{-1}$  deformação angular de  $-\text{CH}_3$ , estes resultados já foram observados por De-La-Torre et al (2022); Lee et al (2022); Pitareli et al (2002). Quanto as bandas em torno de 840  $\text{cm}^{-1}$ , atribuiu-se ao estiramento de C-  $\text{CH}_3$  (FADARE; OKOFFO, 2020; GOPANNA et al., 2019; GUO et al.,2023).

Figura 14 - Espectro de absorção na região do infravermelho (FT-IR) das amostras da máscara branca e máscarapreta.

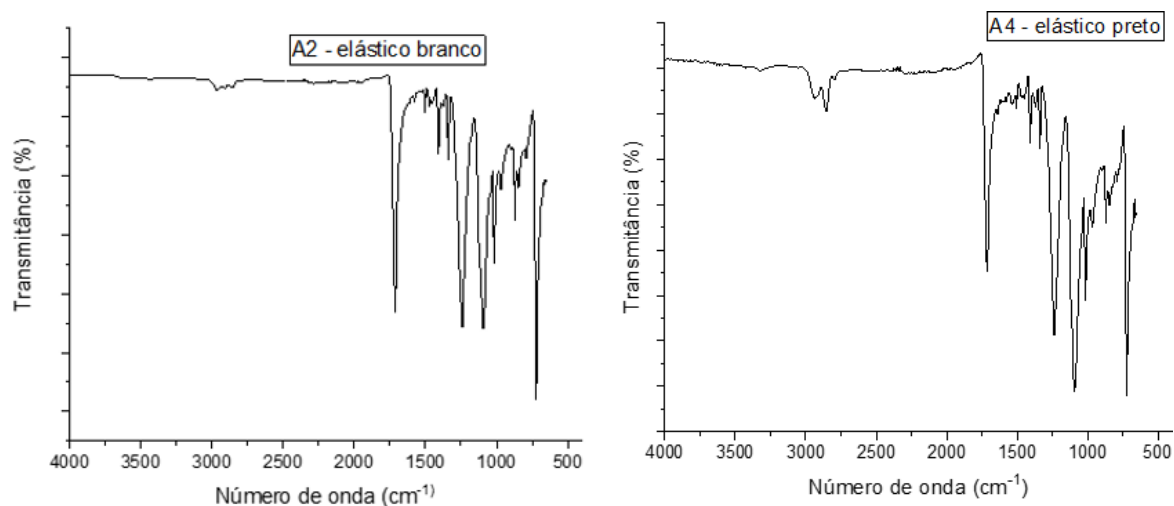


Fonte: o autor

De acordo com o observado nos espectros e a correlação com as bandas verificadas para o grupamento éster, foi avaliado os números de ondas, os quais possuem grupamentos específicos para o éster, o que dá indícios de ser o material poliéster. Segundo a literatura, os grupamentos específicos para o éster, tem por bandas principais a carbonila em 1710  $\text{cm}^{-1}$  de uma ligação de éster aromático ( $\text{C}=\text{O}$ ) (HASAN et al., 2019).

As bandas em  $1236\text{ cm}^{-1}$  e  $1097\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas a vibração do alongamento da ligação éster C=O, enquanto as bandas em torno de  $1400\text{ cm}^{-1}$  estão associadas a vibração do estiramento C=C, e as bandas  $1096\text{-}1245\text{ cm}^{-1}$  atribuí-se ao grupo éster C-O (HASAN et al., 2019; NGUYEN-TRI; PRUD'HOMME, 2019; ROSS et al., 2021; WANG et al., 2022).

Figura 15 - Espectro de absorção na região do infravermelho (FT-IR) das amostras A2) parte elástica máscara branca e A4) parte elástica máscara preta.

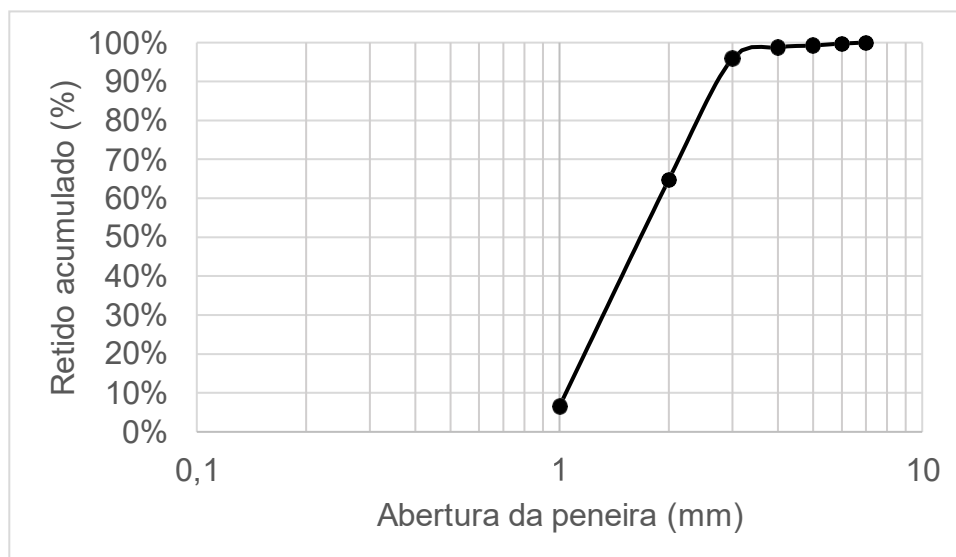


Fonte: a autora

#### 4.1.3 Análise granulométrica

A análise granulométrica, consiste na determinação de distribuição das partículas de acordo com seu diâmetro das peneiras. Esse resultado foi interessante para informar o tamanho dos fragmentos utilizados nas exposições. Assim sendo, os dados obtidos no ensaio foram traçados em um diagrama semi-logarítmico, no qual as abscissas correspondem aos logaritmos das dimensões das partículas e as ordenadas as porcentagens das partículas retidas em cada peneira. A faixa granulométrica foi de 4,76 a 0,015 mm, como representado na figura abaixo (figura 16).

Figura 16 - Curva granulométrica (4,76 - 0,015 mm).



Fonte: a autora

Legenda: Curva granulométrica traçada em um diagrama semi-logarítmico, demonstrando o percentual de partículas retidas em cada peneira.

De acordo com o diagrama, foi observado que a distribuição se concentrou nas peneiras de 2,4 e 1,2 mesh, quando comparado as outras amostras, isso pode ser confirmado ao se observar os dados da tabela 3.

Tabela 3 - Percentual retido nas malhas com abertura entre 4,76 a 0,15 mm.

Abertura/mm	4,76	2,4	1,2	0,60	0,3	0,15	Fundo
Massa retida/g	2,6	23,1	12,4	1,1	0,2	0,2	0,1

Fonte: a autora.

Legenda: Percentual de partículas retidas nas malhas com aberturas entre 4,76 a 0,15 mm.

As partículas das máscaras passaram por todas as peneiras, sendo que aproximadamente 89% ficaram retidas nas malhas de 2,4 e 1,2 mm, podendo ser indicado que a maior parte dos fragmentos apresentou diâmetro entre 2,4 e 1,2 mm. Quanto ao restante das partículas (4 %) apresentaram tamanhos inferiores a 0,6 mm. Assim sendo, todas as amostras podem ser caracterizadas como microplásticos, uma vez que, possuem um tamanho menor que 5 mm (FRIAS; NASH, 2019; JIN et al., 2021).

## 4.2 ENSAIOS DE TOXICIDADE

### 4.2.1 Parâmetros abióticos da água

Durante o bioensaio utilizando o organismo *O. niloticus*, foram controlados os parâmetros de temperatura, pH e fotoperíodo. A média de temperatura da água foi de  $23 \pm 0,6^\circ\text{C}$  e o pH  $7,8 \pm 0,06$ . Ressalta-se que a temperatura se manteve estável devido aos aquecedores e termostatos. No decorrer do experimento foram registradas a morte de cinco indivíduos, apenas o grupo controle e o grupo MPC1 não registrou mortes.

Tabela 4 - Números de mortes durante o bioensaio.

Aquários	Controle	MBC1	MBC2	MBC3	MPC1	MPC2	MPC3
Mortes	0	1	1	1	0	1	1
Vivos	11	10	10	10	11	10	10

Fonte: a autora

Legenda: C – Controle negativo; MBC1 – grupo de máscara branca concentração de 0,2 mg/L; MBC2 - grupo de máscara branca concentração de 1 mg/L; MBC3 - grupo de máscara branca concentração de 5 mg/L; MPC1 - grupo de máscara preta concentração 0,2 mg/L; MPC2 - grupo de máscara preta concentração 1 mg/L; MPC3 - grupo de máscara preta concentração 5mg/L. Vivos: número de peixes que chegaram vivos até o fim do experimento.

Ao final do bioensaio, foram analisados o peso corporal e o comprimento total dos peixes. A média e o desvio padrão dos dados biométricos de massa e comprimento total por grupos são demonstrados na tabela 5.

Tabela 5 – Média e desvio padrão do comprimento total e peso do organismo *Oreochromis niloticus* entre os diferentes grupos do bioensaio ( $p < 0,05$ ).

Grupo	Peso (g)	Tamanho (cm)
Controle	6,02±2,71	6,30±0,86
MBC1	5,93±3,25	6,65±1,02
MBC2	6,41±0,63	7±0,63
MBC3	5,69±0,80	6,65±0,80
MPC1	7,76±3,43	7,40±1,06
MPC2	6,66±2,28	6,80±0,76
MPC3	4,90±2,45	6±0,88

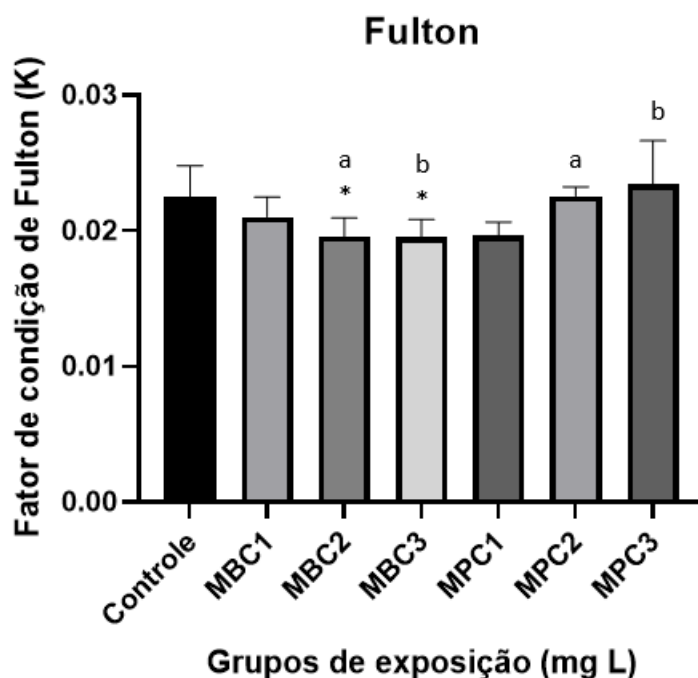
Fonte: a autora

Avaliando o peso e comprimento dos indivíduos pelo teste de ANOVA ao nível de 5% de significância, os valores não apresentaram diferença estatística entre os grupos de exposição em relação ao grupo controle.

### 4.3 BIOMARCADOR SOMÁTICO

Para a avaliação das condições nutricionais e saúde dos peixes foi utilizado o biomarcador somático, onde foram calculados o fator de condição de Fulton (K). Em seguida, analisada a normalidade (Shapiro-Wilk) seguido da ANOVA, com intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Os peixes expostos aos tratamentos MBC2, MBC3 e MPC1 apresentaram redução do fator de condição de Fulton, quando comparados ao tratamento controle.

Figura 17 - Valores do Fator de Condição de Fulton (K) dos bioensaios de *Oreochromis niloticus* após exposição subcrônica de 14 dias.



Fonte: a autora (2023)

Legenda: Os resultados apresentados com média  $\pm$  desvio padrão dos grupos.

\* Significa os grupos onde houve uma diferença significativa quando comparada ao controle.

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa (Anova com nível de significância  $p < 0,05$ ; com pós teste de Tukey). N= 9 a 11.

Os valores do Fator de Condição de Fulton (K) avaliam o estado nutricional dos peixes e sua saúde de acordo com a relação entre comprimento e peso do indivíduo (BOLGER; CONNOLLY, 1989). No presente estudo os grupos MBC2, MBC3 e MPC1 apresentaram uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do seu tamanho e peso corporal quando comparados ao controle, apontando uma possível diminuição da alimentação dos peixes durante o tempo do bioensaio.

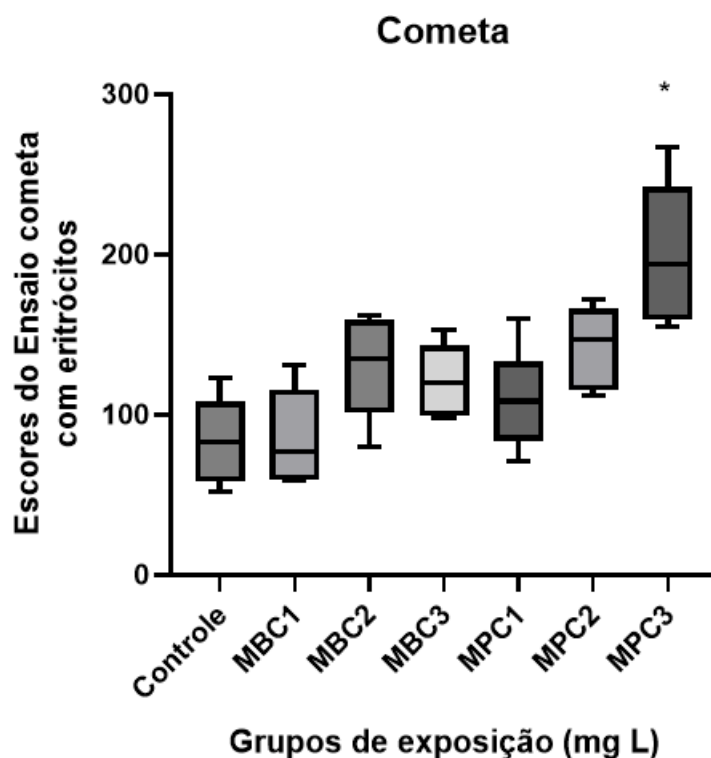
O estudo realizado por Filgueiras et al. (2020) investigou a presença de microplásticos (MP) no trato gastrointestinal de quatro espécies de peixes: *Engraulis encrasicolus*, *Sardina pilchardus*, *Callionymus lyra* e *Mullus surmuletus*. A análise foi conduzida por meio da espectroscopia Raman, que permitiu a identificação das partículas presentes, com predominância de polietileno (PE) e polipropileno (PP). Os resultados revelaram uma correlação entre a presença de MP no trato gastrointestinal dos peixes e seu tamanho corporal. Os peixes que continham uma carga menor de MP no intestino apresentaram um tamanho corporal significativamente maior em comparação com aqueles que tinham uma alta carga de MP no órgão. Esta descoberta sugere que a ingestão de microplásticos pode ter um impacto negativo no crescimento e desenvolvimento dos peixes. É possível que a presença de MP no trato gastrointestinal interfira na absorção de nutrientes ou cause estresse fisiológico nos animais, levando a um menor crescimento corporal.

Um estudo similar analisou o trato digestivo da espécie de peixe *Perca fluviatilis*, capturados em lagos italianos, o qual mostrou que os polímeros mais encontrados foram o PE e o PET. As diferenças no Fator de condição de Fulton não foram significativas, entretanto os peixes com estômago vazio tinham uma probabilidade maior de ingestão de partículas de MPs, pois essas partículas não são excretadas por meio da digestão com eficiência (GALAFASSI et al., 2021).

#### 4.4 BIOMARCADORES GENÉTICOS

Peixes expostos ao tratamento MPC3 apresentaram aumento de danos ao DNA em eritrócitos, quando comparados com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Quanto aos demais grupos, não houve diferença entre os danos observados quando comparados ao grupo controle.

Figura 18 - Danos observados eritrócitos de *Oreochromis niloticus* após exposição subcrônica por meio dos escores do ensaio cometa alcalino.



Legenda: \* Representa diferença estatística entre os grupos experimentais pelo teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunns ( $p < 0,05$ ). N= 9 a 11.

Fonte: a autora (2023).

A membrana plasmática é o primeiro alvo das ERO, que por sua vez ocasionam a peroxidação lipídica, fazendo com que os danos cheguem até o DNA do organismo (BACCHETTA et al., 2017; COSTA et al., 2011; SINGH et al., 2019). Desse modo, quando há danos ao DNA do organismo teste, a membrana da célula foi comprometida pelo xenobiótico.

Um estudo utilizou o ensaio cometa para analisar os danos potenciais ao DNA no peixe *Oryzias latipes* causados por partículas de microplásticos. Foram analisados dois grupos de partículas plásticas. O primeiro grupo consistia em microplásticos virgens, incluindo Polietileno de Baixa Densidade (PEBD), Polietileno de Alta Densidade (PEAD), Polipropileno (PP) e Poliestireno (PS). O segundo grupo continha microplásticos coletados em praias. Os resultados obtidos revelaram uma diferença significativa entre os peixes expostos às partículas de microplásticos virgens em comparação com aqueles expostos aos microplásticos coletados em praias. O ensaio cometa indicou danos mais pronunciados ao DNA nos peixes expostos aos microplásticos virgens. Os autores sugeriram que os efeitos observados podem ser atribuídos aos contaminantes que se acumularam nos microplásticos coletados em praias ao longo do



tempo. Esses contaminantes podem incluir uma variedade de substâncias tóxicas presentes no ambiente marinho, que se ligam aos microplásticos e são ingeridos pelos peixes. Essa exposição a contaminantes químicos pode ser responsável pelos danos ao DNA observados nos peixes expostos a esses microplásticos coletados em praias (PANNETIER et al., 2019). Este não é o caso do presente trabalho, pois as máscaras que foram expostas no bioensaio estavam em embalagens lacradas, não tendo contato com contaminantes.

Apesar disso, estudos envolvendo cladóceros evidenciaram maiores danos ao DNA de MP com interações a outros contaminantes, como é o caso do ensaio cometa realizado por Nugnes et al (2022) o qual revelou que o microplástico de poliestireno pode causar danos no DNA no cladóceros *Ceriodaphnia dubia*, neste estudo os organismos foram expostos ao poliestireno virgem com a interação de um fármaco e um agrotóxico, mostrando a capacidade de adsorção deste material. Também em algas, o lixiviado de polipropileno virgem induziu um efeito significativo para o dano no DNA de *Dunaliella tertiolecta* após 24 horas de exposição (SCHIAVO et al., 2021).

É importante salientar que os aditivos e, principalmente, os corantes utilizados nas máscaras podem ser danosos ao meio ambiente e à saúde dos seres vivos, visto que alguns corantes possuem grandes efeitos tóxicos, como mutagenicidade, citotoxicidade e carcinogenicidade (FERNANDES; UMBUZEIRO; SALVADORI, 2019; SCHNEIDER; HAFNER; JÄGER, 2004). Segundo Lakhout; Al-Rashed (2022) os corantes utilizados em máscaras possuem solventes orgânicos, como o tolueno, acetato de etila e álcool isopropílico. Esses aditivos podem causar problemas a saúde de maneira direta ou indireta, atualmente não existe estudos científicos que especifiquem ou proponham diretrizes para a fabricação de máscaras.

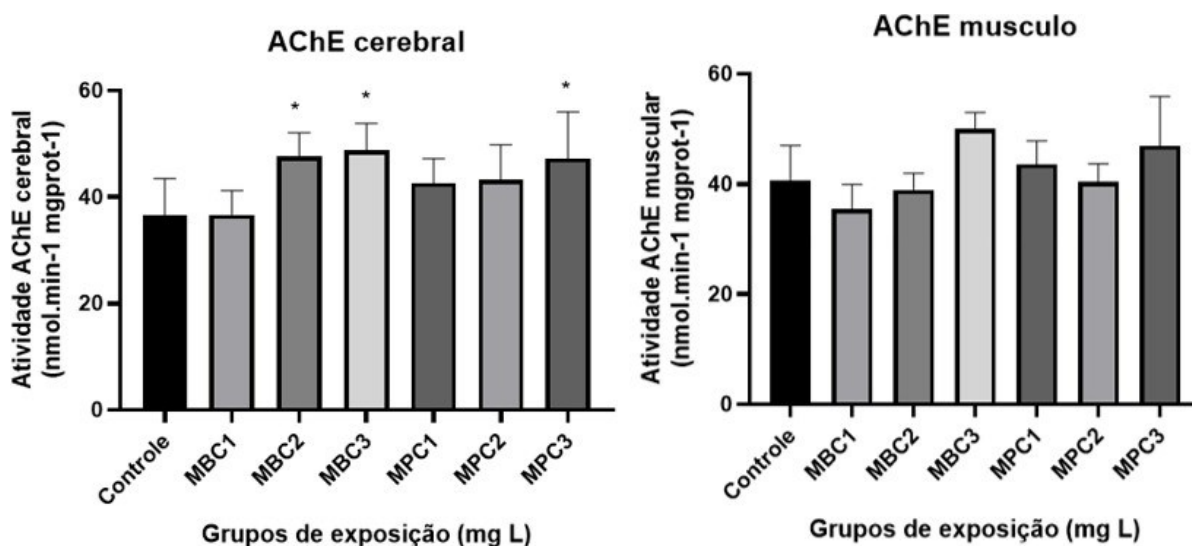
No presente estudo, por mais que o dano significativo ao DNA foi registrado na maior de concentração da máscara preta, não se pode inferir que haja uma relação com os corantes utilizados. Entretanto, mais estudos devem ser realizados nesta área a fim de delinear melhor esses resultados.

## 4.5 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

### 4.5.1 Biomarcadores de neurotoxicidade (AChE)

Peixes expostos aos tratamentos MBC2 ( $p=0.0134$ ), MBC3 ( $p=0.0020$ ) e MPC3 ( $p=0.0134$ ) apresentaram aumento significativo da atividade de AChE cerebral, quando comparados ao grupo controle. Em relação à atividade de AChE nos músculos, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

Figura 19 - Análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE) do cérebro e músculo de *Oreochromis niloticus* pós exposição subcrônica a máscaras de diferentes colorações.



Legenda: \* Representa diferença estatística entre os grupos experimentais pelo teste ANOVA com pós teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). N = 9 a 11.

Fonte: a autora (2023)

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima importante para a detecção de neurotoxicidade de xenobióticos em organismos e tem sido amplamente utilizada como uma ferramenta diagnóstica em estudos de avaliação de risco ecotoxicológico e programas de biomonitoramento de sistemas aquáticos (DE LA TORRE; FERRARI; SALIBIÁN, 2002b). A atividade da AChE pode variar entre diferentes tecidos e fluidos de um mesmo organismo, devido à variação na densidade e nas diferentes formas de colinesterases presentes. Nos peixes, a AChE está concentrada no cérebro e nos músculos, e sua atividade é crucial para prevenir a rápida contração dos músculos voluntários e a subsequente paralisia (DE LA TORRE; FERRARI; SALIBIÁN, 2002; OLIVARES-RUBIO; ESPINOSA-AGUIRRE, 2021).

Essa enzima é o alvo primário de inseticidas organofosforados e carbamatos, que causam a diminuição ou inibição de sua atividade por meio da fosforilação do resíduo de serina no sítio ativo. Além disso, outros contaminantes também podem inibir a AChE. No

entanto, a AChE também pode desempenhar um papel regulador na apoptose, podendo ser induzida por estímulos apoptóticos, e a superexpressão da AChE pode inibir a proliferação celular e promover apoptose (HINOJOSA et al., 2019; JIANG; ZHANG, 2008; KIST et al., 2012b).

Os resultados deste estudo demonstram uma alteração enzimática na atividade cerebral da AChE em comparação com o grupo controle, especialmente nas concentrações de exposição mais elevadas, como observado nas concentrações de 5 mg/L das máscaras de cor branca e preta.

Outro estudo realizado por Barboza et al. (2020) analisou 150 peixes de três espécies diferentes, capturados no mar, e constatou que 73 desses peixes continham microplásticos em seus tratos gastrointestinais. Ao avaliar a atividade cerebral da AChE nesses peixes, observou-se um aumento significativo na atividade da enzima nos peixes contaminados com microplásticos em comparação com aqueles sem contaminação visível. Em um estudo com a exposição de *O. niloticus* a 100 µg/L de nano e microplásticos de poliestireno, a atividade da AChE variou ao longo do tempo, com um aumento inicial observado no sexto dia do experimento, mas com inibição da atividade no 14º dia, sugerindo a presença de mecanismos adicionais que afetam a neurotoxicidade do PS (DING et al., 2020).

Estudos com crustáceos *A. amphitrite* e *A. franciscana* também mostraram diferentes reações à exposição de micropartículas de PS, com *A. amphitrite* apresentando um aumento da atividade da AChE na menor concentração e uma diminuição conforme as concentrações aumentavam, enquanto *A. franciscana* apresentou uma inibição da atividade da AChE nas menores concentrações (GAMBARDELLA et al., 2017).

Contudo, o estudo de Iheanacho; Odo (2020) com *Clarias gariepinus* (bagre africano) demonstrou uma redução significativa da atividade da AChE após exposição a micropartículas de cloreto de polivilina (PVC). Em outra pesquisa, o PS também inibiu a atividade da AChE após quatorze dias de exposição em concentrações de 10 e 100 µg/L em *Oreochromis niloticus* (DING et al., 2018b). Além disso, um estudo com o microcrustáceo *Artemia salina* indicou uma redução significativa na atividade da AChE quando exposto a uma concentração de 100 µg/mL de polipropileno virgem (JEYAVANI et al., 2022).

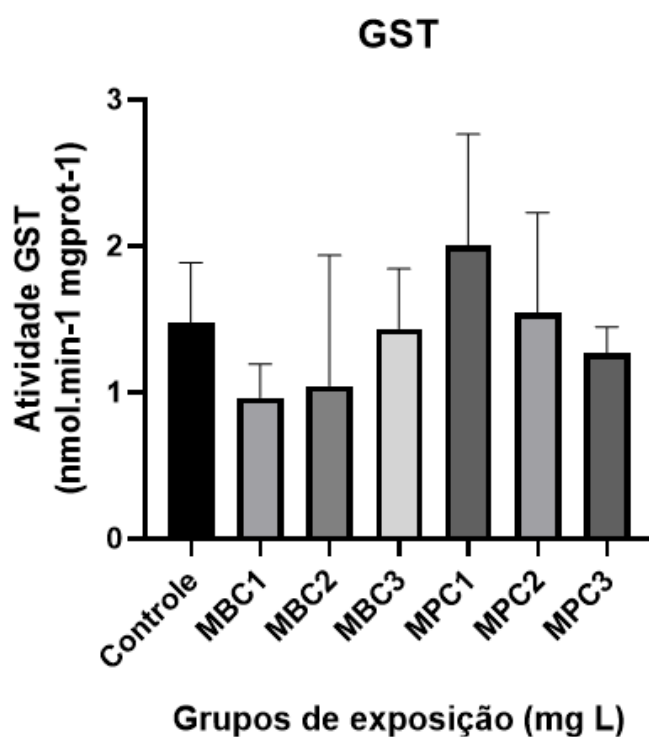
Esses resultados destacam a complexidade dos efeitos dos microplásticos e seus componentes nas atividades enzimáticas dos organismos aquáticos. Os mecanismos tóxicos podem variar de acordo com a espécie, o tipo de microplástico e sua concentração,

bem como o tempo de exposição. A inibição da AChE pode levar a consequências comportamentais e fisiológicas nos organismos, incluindo hipoatividade e alterações na resposta muscular. Portanto, é essencial continuar pesquisando os efeitos dos microplásticos nos ecossistemas aquáticos para compreender melhor seus impactos e tomar medidas adequadas de proteção ambiental.

#### 4.5.2 Atividade da glutathiona-S-transferase (GST)

As máscaras não foram capazes de alterar significativamente a atividade da enzima glutathiona-S-transferase (GST) no fígado das espécies de *O. niloticus* (Figura 18), quando comparados ao grupo controle.

Figura 20 - Atividade da enzima glutathiona-S-transferase no fígado de *Oreochromis niloticus* após exposição subcrônica a máscaras de diferentes colorações.



Fonte: a autora (2023)

Legenda: ANOVA ( $p < 0,05$ ).

A GST é uma enzima importante na desintoxicação do organismo, estando presente na fase II, a qual ativa a excreção celular catalisando a GSH. A GST, junto com a GSH, protege as células de danos induzidos pelas ERO, por isso, é usada como um

indicador de toxicidade e estresse oxidativo (LEE; KANG; KIM, 2023). Dessa maneira, esperava-se o aumento da atividade da GST, uma vez que o sistema deveria estar tentando suprimir a quantidade excedente de ERO no organismo, causada por um material exógeno. O aumento da atividade da GST tende a diminuir a quantidade de ERO e, conseqüentemente, prevenir a peroxidação lipídica. Então essas análises tendem a ser inversamente proporcionais frente aos contaminantes, ou expressar resultados similares. É o que aponta o estudo de Cohen-Sanchez et al., (2023), utilizando peixes da espécie *Xyrichtys novacula* capturados nas Ilhas Baleares, que continham partículas plásticas de policarbonato, polipropileno e polietileno em seu trato gastrointestinal. Os níveis da GST foram elevados significativamente, enquanto, os níveis de malonaldeído (MDA), um indicador de peroxidação lipídica, se mantevedentro do esperado.

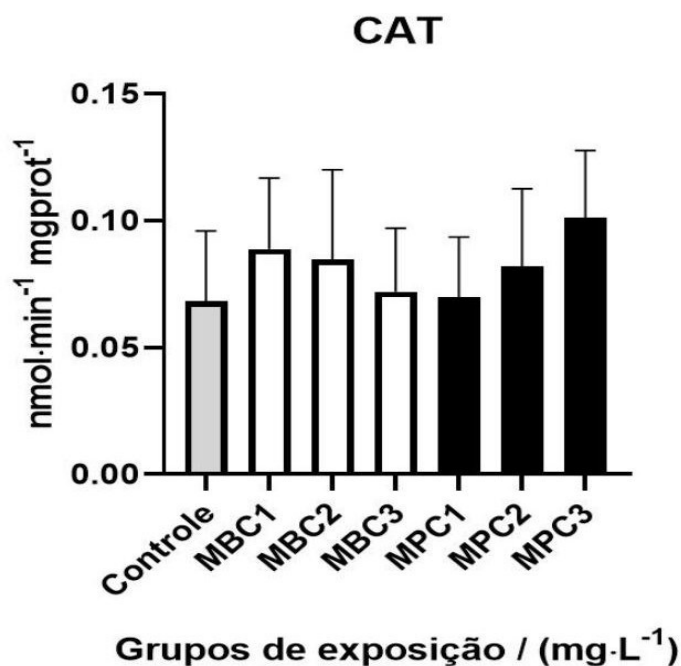
Outros estudos sugerem o aumento da atividade da GST quando o organismo é exposto a algum tipo de material plástico. Entretanto diferentes espécies de peixes reagem de maneira diferente ao contaminante, como visto no estudo de Capó et al., (2022) onde foram analisadas três espécies de peixes, o qual somente *M. surmuletus* mostrou um aumento significativo na atividade hepática da GST. Um aumento na GST foi observado também na espécie *M.surmuletus* capturados na Ilha de Maiorca, sugerindo a indução do sistema de desintoxicação do organismo, a espectroscopia de infravermelho de Fourier mostrou que o polietileno foi o plástico mais abundante encontrados nos peixes (ALOMAR et al., 2017). No estudo de Solomando et al., (2022b) a GST mostrou um aumento de sua atividade no fígado dos peixes da espécie *Seriola dumerili* que continham uma alta carga de MPs, mostrando uma tentativa dedesintoxicação do organismo.

A atividade da GST do microcrustáceo *Artemia salina* também apresentou um aumento quando exposta a uma concentração de 75 e 100 µg/ml de polipropileno virgem (JEYAVANI et al., 2022). Mas o caranguejo da espécie *Eriocheir sinensis* exposto a concentrações entre 40 a 40000 µg/L de PS apresentaram uma redução significativa da atividade da GST, sendo associada ao custo energético que estava causando em resposta a desintoxicação (YU et al., 2018).

#### 4.5.3 Atividade da catalase (CAT)

As máscaras não foram capazes de alterar significativamente a atividade do biomarcadorde estresse oxidativo catalase (CAT) no fígado das espécies de *O. niloticus* (Figura 19), quando comparados ao grupo controle.

Figura 21 - Atividade da catalase no fígado de *Oreochromis niloticus* após exposição subcrônica a máscaras de diferentes colorações.



Fonte: a autora.

Legenda: ANOVA ( $p < 0,05$ ) N= 9 a 11.

Um das enzimas antioxidantes presente nos organismos é a catalase, ela é considerada uma defesa de primeira linha contra radicais superóxido no organismo, pois convertem ROS em metabólitos inofensivos. A CAT converte o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigênio ( $H_2O + O_2$ ) a fim de eliminar o estresse oxidativo em peixes após a exposição de xenobióticos, a diminuição da catalase pode aumentar o risco de peroxidação lipídica (YANG; LIM; SONG, 2020; YEDIER; YALÇINKAYA; BOSTANCI, 2023). Embora a CAT, seja considerada uma enzima de primeira linha de defesa que elimina diretamente as ERO, sua atividade é regulada por outros agentes do sistema antioxidante, como os níveis de glutatona peroxidase, superóxido dismutase e até glutatona total, e depende da energia disponível para sua ativação (CAMPOS et al., 2021; REGOLI; GIULIANI, 2014).

Embora não se tenha observado alterações na atividade da catalase para as máscaras faciais cirúrgicas, estudos com microplásticos mostram alterações na atividade desta enzima para organismos expostos a microplásticos: Microcrustáceos: *Artemia salina* (JEYAVANI et al., 2022), *Artemia franciscana* (GAMBARDELLA et al., 2017); Peixes

*Oryzias javanicus* (USMAN et al., 2021) e *Danio rerio* (LU et al., 2016).

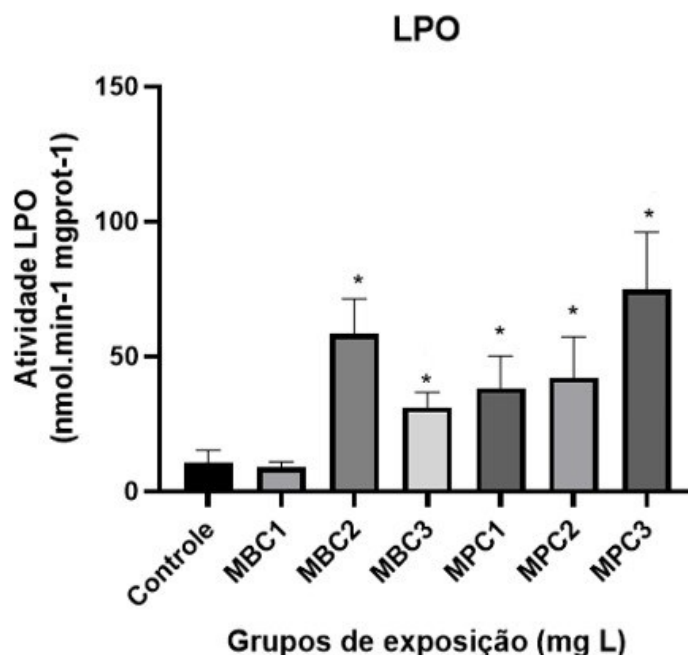
A atividade da CAT foi significativamente reduzida em 96 h e 14 dias de exposição a microplásticos de polipropileno, os grupos de *Oreochromis mossambicus* foram alimentados com o material e apresentaram maiores danos de estresse oxidativo em comparação com os grupos controle (JEYAVANI et al., 2023). Os peixes da espécie *Cyprinus carpio* foram expostos por via trófica a partículas de PP, apresentando uma diminuição da catalase, o que pode levar a uma ruptura no sistema de defesa antioxidante (YEDIER; YALÇINKAYA; BOSTANCI, 2023).

Em estudo utilizando microplásticos com dimensões de 100 nm nas concentrações de 1, 10 e 100 mg-L em alevinos da espécie *O. niloticus*, foi observado um aumento significativo da atividade da CAT em 15 dias de exposição, porém após um período de recuperação de 15 dias observou-se que a atividade da CAT retornou à normalidade (HAMED et al., 2020). O trabalho de Solomando et al. (2022) feito com peixes da espécie *Seriola dumerili* capturados nas Ilhas Baleares no Mar Mediterrâneo, apontaram aumento significativo dos níveis de catalase, dos peixes que tinham fibras e MP de plásticos no trato digestivo. E por fim, as larvas do peixe *Argyrosomus regius* expostos ao PE por 7 h apresentaram um aumento dos níveis de catalase (CAMPOS et al., 2021).

#### 4.5.4 Determinação da peroxidação lipídica (LPO)

Houve um aumento dos níveis de LPO no fígado dos peixes expostos aos tratamentos MBC2, MBC3, MPC1, MPC2 e MPC3 ( $p < 0,05$ ), quando comparados ao grupo controle. Também houve diferenças significativas entre os grupos de exposição, como observado na tabela 6.

Figura 22 - Lipoperoxidação no fígado de *Oreochromis niloticus* após exposição subcrônica amáscaras brancas e pretas.



Legenda: O símbolo “\*” representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos experimentais em relação ao controle, pelo teste ANOVA, com pós teste de Tukey. N = 9 a 11.

Tabela 6 - Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) com comparações entre os grupos.

Comparações entre as mesmas máscaras		Comparações entre máscaras de cores diferentes	
MBC1 X MBC2	P=0.0003	MBC1 X MPC1	P=0.0352
MPC1 X MPC3	P = 0.0054	MBC3 X MPC3	P= 0.0001
MPC2 X MPC3	P=0.0124		

Fonte: a autora

Legenda: na primeira coluna os grupos comparados se referem aos grupos expostos a mesma máscara, mas concentrações diferentes. A segunda coluna se refere a comparações entre mesmas concentrações, mas máscaras diferentes.

Os altos índices de LPO nos organismos, podem ser explicados pela capacidade que os MP possuem de induzir a produção de ERO no organismo (HAMED et al., 2020; LU et al., 2016). Tal fato indica um desequilíbrio no estado redox, onde os mecanismos de metabolização e as vias antioxidantes do animal não são suficientes para mitigar danos, causando efeitos deletérios, principalmente ao DNA (COSTA et al., 2011; OGUEJI et al., 2020). No presente estudo houve um aumento significativo da LPO, indicando a peroxidação das membranas, podendo ser atribuído aos efeitos tóxicos das máscaras, principalmente em concentrações mais altas, quando comparadas com



concentrações mais baixas.

Em um estudo na costa de Portugal, foram analisadas três espécies de peixes *Dicentrarchus labrax*, *Trachurus trachurus*, *Scomber colias*, os quais possuíam MP em seu trato gastrointestinal, após análises, foi verificado que esses animais apresentaram um aumento dos níveis de LPO no cérebro, músculo e brânquias, indicando a peroxidação lipídica (BARBOZA et al., 2020). O mesmo aconteceu em um estudo onde os peixes *Danio rerio* e *Perca fluviatilis* foram expostos por 21 dias as concentrações de 1 e 10 mg/L de PP por meio da alimentação, os animais tiveram um aumento significativo dos níveis de MDA em células hepáticas dos organismos, demonstrando a indução da peroxidação lipídica do sistema, o estudo também apontou o aumento de tamanho do fígado (BOBORI et al., 2022). A tilápia (*Oreochromis niloticus*) também teve um aumento do MDA quando exposto por 15 dias a MP com concentrações de 1mg/L, 10 mg/L e 100 mg/L (HAMED et al., 2020).

Os estudos de Piccardo et al (2021) com macroinvertebrado *Hydropsyche pellucidula*, utilizando o PP, Yu et al (2018) com o caranguejo da espécie *Eriocheir sinensis* exposto de 40 a 40000 ug/L de PS e de Lu et al (2016) que expôs o *Danio rerio* a 20, 200 e 2000 µg/L de PS, indicaram o aumento da peroxidação lipídica dos organismos teste utilizados. Em contrapartida, o trabalho de Solomando et al. (2022) com peixes da espécie *Seriola dumerili* capturados nas Ilhas Baleares no Mar Mediterrâneo, não demonstraram diferença significativa dos níveis de MDA no fígado dos organismos.

A LPO revelou danos nas membranas, principalmente na concentração MPC3, o que pode explicar o aumento significativo de danos genotóxicos apontados pelo ensaio cometa neste grupo. Outros grupos também apresentaram um aumento na LPO, mas os danos no DNA não foram registrados, no entanto, sugere-se que, se o tempo de ensaio fosse maior, poderia haver mais diferenças significativas no ensaio cometa. Estudos parecidos trazem resultados semelhantes, seja com o MP virgem, ou com a absorção de outros contaminantes, mas danos ao DNA de organismos em diferentes níveis tróficos são registrados.

## 5 CONCLUSÕES

Por meio das caracterizações realizadas, foi possível verificar que tanto as máscaras brancas como as pretas, têm como constituição principal o polímero polipropileno. Já a parte elástica das máscaras das duas colorações, o poliéster é o principal componentado material. As fibras que constituem tanto a parte frontal da máscara, como a parte elástica são organizadas uniformemente, além de serem lisas e com alto grau de entrelaçamento, o que dá resistência ao material. O perfil toxicológico do material foi analisado partindo de dados de danos ao DNA, por meio do ensaio cometa em eritrócitos, avaliação da catalase (CAT) e da lipoperoxidação (LPO). Além de avaliar as respostas bioquímicas das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e glutathione-S-transferase (GST), e de considerar o fator de condição de Fulton (K) para avaliar a saúde dos indivíduos.

Ao final do ensaio foi possível observar evidências de estresse oxidativo para quase todas as amostras testadas (MB e MP), pois a análise de lipoperoxidação mostrou que a integridade da membrana foi afetada na concentração intermediária e alta da máscara branca MBC2 e MBC3 (1 mg/l e 5 mg/l) e em todas as concentrações de máscara preta MPC1, MPC2 e MPC3 (0,2 mg/l; 1 mg/l e 5 mg/l). Também foi analisado o biomarcador de neurotoxicidade, onde os grupos MBC2, MBC3 e MPC3 apresentaram um aumento da atividade da AChE cerebral. Por meio do biomarcador de genotoxicidade constatou-se que, a amostra MPC3 tem potencial genotóxico e que os demais grupos não apresentaram efeitos estatisticamente significativos em relação ao controle. Com relação ao biomarcador somático, fator de condição de Fulton, o grupo MBC2, MBC3 e MPC1 afetaram o estado nutricional e bem-estar dos peixes. Diante dos resultados obtidos pode-se indicar que ambas as alternativas de máscaras são nocivas ao meio ambiente, pois apresentaram efeitos tóxicos em concentrações subletais para alevinos de *O. niloticus*. Este estudo contribui para elucidação dos efeitos causados por micropartículas de polipropileno no ambiente aquático, no entanto mais estudos são necessários na área, a fim de elucidar o potencial dano de máscaras para os organismos aquáticos.

Desse modo, é imprescindível que, as máscaras não sejam descartadas em locais onde ela ou suas micropartículas possam chegar ao ambiente aquático, como terrenos baldios, ruas, bueiros entre outros locais. No geral, as máscaras são descartadas com o

lixo orgânico sanitário, sendo levadas a aterros sanitários, entretanto estas medidas podem não se mostrar as das mais eficientes.

## 6 REFERÊNCIAS

ABDEL-KHALEK, A. ADEL et al. Ecotoxicological impacts of zinc metal in comparison to its nanoparticles in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 72, p. 113–125, out. 2015.

ABNT NBR 7181. - Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 7181: Solo - Análise Granulométrica. NBR 7181. São Paulo, 2016.a. 2016.

ADANUR, S.; JAYSWAL, A. Filtration mechanisms and manufacturing methods of face masks: An overview. **Journal of Industrial Textiles**, v. 51, n. 3\_suppl, p. 3683S-3717S, 22 jun. 2022.

AJIMA, M. N. O. et al. Neurotoxic effects, molecular responses and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) exposed to verapamil. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 196, p. 44–52, jun. 2017.

AJIMA, M. N. O. et al. Oxidative stress biomarkers, biochemical responses and Na<sup>+</sup> -K<sup>+</sup> - ATPase activities in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to diclofenac. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 240, p. 108934, fev.2021.

AKARSU, C.; MADENLI, Ö.; DEVECI, E. Ü. Characterization of littered face masks in the southeastern part of Turkey. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 34, p.47517–47527, 24 set. 2021.

ALMEIDA, J. A. et al. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. **Environment International**, v. 27, n. 8, p. 673–679, mar. 2002.

ALOMAR, C. et al. Microplastic ingestion by *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758 fish and its potential for causing oxidative stress. **Environmental Research**, v. 159, p. 135–142, nov. 2017.

AMIN, M. et al. Cholinesterase activity as a potential biomarker for neurotoxicity induced by pesticides *in vivo* exposed *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia): assessment tool for organophosphates and synthetic pyrethroids. **Environmental Technology**, p. 1–9, 12 jan. 2022.

AMORIN, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 2, p. 158–170, jun. 2003.

ANDRADY, A. L. The plastic in microplastics: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 119, n. 1, p. 12–22, jun. 2017.

ARAGAW, T. A. Surgical face masks as a potential source for microplastic pollution in the COVID-19 scenario. **Marine Pollution Bulletin**, v. 159, p. 111517, out. 2020.

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.

ARHANT, M. et al. Impact of hydrolytic degradation on mechanical properties of PET - Towards an understanding of microplastics formation. **Polymer Degradation and Stability**, v.161, p. 175–182, mar. 2019.

ARIAS, A. R. L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61–72, mar. 2007.

BACCHETTA, C. et al. Genotoxicity and oxidative stress in fish after a short-term exposure to silver nanoparticles. **Ecological Indicators**, v. 76, p. 230–239, maio 2017.

BARBIERI, E. et al. Histopathological Effects on Gills of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) Exposed to Pb and Carbon Nanotubes. **Microscopy and Microanalysis**, v. 22, n. 6, p. 1162–1169, 21 dez. 2016.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.

BARBOZA, L. G. A. et al. Microplastics in wild fish from North East Atlantic Ocean and its potential for causing neurotoxic effects, lipid oxidative damage, and human health risks associated with ingestion exposure. **Science of The Total Environment**, v. 717, p. 134625, maio 2020.

BASTOS, F. F. et al. Enzymatic GST levels and overall health of mullets from contaminated Brazilian Lagoons. **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 414–423, jan. 2013.

BASTOS, F. F. et al. A typical enzyme activity for glutathione conjugation indicates exposure of pacu to pollutants. **Neotropical Ichthyology**, v. 20, n. 3, 2022.

BAVIA, L. et al. Advances in the complement system of a teleost fish, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 123, p. 61–74, abr. 2022.

BEZERRA, L. G. E.; CASSAB, J. T. P. D. **Classificação e descarte das máscaras faciais de uso não profissional - Uma abordagem à luz das orientações da Anvisa e da normativa ambiental.**

BIRNIE-GAUVIN, K. et al. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. **Fish and Fisheries**, v. 18, n. 5, p. 928–942, set. 2017.

BOBORI, D. C. et al. Dose-Dependent Cytotoxicity of Polypropylene Microplastics (PP-MPs) in Two Freshwater Fishes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, p. 13878, 10 nov. 2022.

BOLGER, T.; CONNOLLY, P. L. The selection of suitable indices for the measurement and analysis of fish condition. **Journal of Fish Biology**, v. 34, n. 2, p. 171–182, fev. 1989.

BOTTERELL, Z. L. R. et al. Bioavailability and effects of microplastics on marine zooplankton: A review. **Environmental Pollution**, v. 245, p. 98–110, fev. 2019.

BUSSAN, D. D. et al. Quantification of trace elements in surgical and KN95 face masks widely used during the SARS-COVID-19 pandemic. **Science of The Total Environment**, v. 814, p. 151924, mar. 2022.

CAMOLEZE, E. Tilápia: O segundo peixe mais consumido do mundo. 2019.

CAMPOS, D. et al. Are Microplastics Impairing Marine Fish Larviculture?—Preliminary Results with *Argyrosomus regius*. **Water**, v. 13, n. 1, p. 104, 5 jan. 2021.

CAPÓ, X. et al. A Biomarker Approach as Responses of Bioindicator Commercial Fish Species to Microplastic Ingestion: Assessing Tissue and Biochemical Relationships. **Biology**, v. 11, n. 11, p. 1634, 8 nov. 2022.

CARPENTER, E. J.; SMITH, K. L. Plastics on the Sargasso Sea Surface. **Science**, v. 175, n. 4027, p. 1240–1241, 17 mar. 1972.

CARVALHO, C. DOS S. et al. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 89, n. 1, p. 60–69, set. 2012.

CASTRO, C. et al. Evaluation of copper-induced DNA damage in *Vitis vinifera* L. using Comet-FISH. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 6, p. 6600–6610, 1 fev. 2021.

CASTRO, T. F. D. et al. Anxiety-associated behavior and genotoxicity found in adult *Danio rerio* exposed to tebuconazole-based commercial product. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 62, p. 140–146, set. 2018a.

CERA, A.; CESARINI, G.; SCALICI, M. Microplastics in Freshwater: What Is the News from the World? **Diversity**, v. 12, n. 7, p. 276, 9 jul. 2020.

CHELLAMANI, K. P.; VEERASUBRAMANIAN D.; VIGNESH BALAJI R.S. Surgical Face Masks: Manufacturing Methods and Classification. **Journal of Academia and Industrial Research**, v. 2, n. 6, p. 320–324, 2013.

CHEN, X. et al. Used disposable face masks are significant sources of microplastics to environment. **Environmental Pollution**, v. 285, p. 117485, set. 2021.

CHEN, X. et al. Methine initiated polypropylene-based disposable face masks aging validated by micromechanical properties loss of atomic force microscopy. **Journal of Hazardous Materials**, v. 441, p. 129831, jan. 2023.

CHOUCROUN, P. et al. Comet assay and early apoptosis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 478, n. 1–2, p.

89–96, jul. 2001.

CHOWDHURY, H.; CHOWDHURY, T.; SAIT, S. M. Estimating marine plastic pollution from COVID-19 face masks in coastal regions. **Marine Pollution Bulletin**, v. 168, p. 112419, jul. 2021.

CLÁUDIA BUENO DOS REIS MARTINEZ. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. 2006.

COHEN-SÁNCHEZ, A. et al. Microplastic Presence in the Digestive Tract of Pearly Razor fish *Xyrichtys novacula* Causes Oxidative Stress in Liver Tissue. **Toxics**, v. 11, n. 4, p. 365, 11 abr. 2023.

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.

COSTA, L. L. et al. Quantifying microplastics in fishes: The first case study contrasting the perspective of untrained and experienced researchers. **Marine Pollution Bulletin**, v. 189, p. 114736, abr. 2023.

COSTA, P. M. et al. Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: Laboratory versus in situ studies. **Environmental Research**, v. 111, n. 1, p. 25–36, jan. 2011.

COTELLE, S.; FERRARD, J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 34, n. 4, p. 246–255, 1999.

DA ROCHA, C. A. M. et al. Evaluation of Genotoxic Effects of Xenobiotics in Fishes Using Comet Assay—A Review. **Reviews in Fisheries Science**, v. 17, n. 2, p. 170–173, 12 fev. 2009a.

DA ROCHA, C. A. M. et al. Evaluation of Genotoxic Effects of Xenobiotics in Fishes Using Comet Assay—A Review. **Reviews in Fisheries Science**, v. 17, n. 2, p. 170–173, 12 fev. 2009b.

DA SILVA, F. F. et al. Evaluation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings exposed to the pesticide pyriproxyfen. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 48, n. 5, p. 826–835, 1 nov. 2020.

DAMATO, M. O emprego de indicadores biológicos na determinação de poluentes orgânicos perigosos. Em: **Indicadores ambientais: conceitos e aplicações**. São Paulo: Editora Educ, 2001. p. 229–236.

DE BE MATOS, A. C. et al. Biochemical and histopathological responses in Nile tilapia exposed to a commercial insecticide mixture containing dinotefuran and lambda-cyhalothrin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 262, p. 109468, dez. 2022.

DE JESUS, T. B.; DE CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação de mercúrio (Hg). **Oecologia**

**Australis**, v. 12, n. 04, p. 680–693, dez. 2008.

DE LA TORRE, F. R.; FERRARI, L.; SALIBIÁN, A. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 131, n. 3, p. 271–280, mar. 2002a.

DE LA TORRE, F. R.; FERRARI, L.; SALIBIÁN, A. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 131, n. 3, p. 271–280, mar. 2002b.

DE-LA-TORRE, G. E. et al. Physical and chemical degradation of littered personal protective equipment (PPE) under simulated environmental conditions. **Marine Pollution Bulletin**, v. 178, p. 113587, maio 2022.

DENG, Y. et al. Overview of microplastic pollution and its influence on the health of organisms. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 58, n. 4, p. 412–422, 21 mar. 2023.

DHARMARAJ, S. et al. The COVID-19 pandemic face mask waste: A blooming threat to the marine environment. **Chemosphere**, v. 272, p. 129601, jun. 2021.

DING, J. et al. Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Pollution**, v. 238, p. 1–9, jul. 2018a.

DING, J. et al. Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Pollution**, v. 238, p. 1–9, jul. 2018b.

DING, J. et al. Toxicological effects of nano- and micro-polystyrene plastics on red tilapia: Are larger plastic particles more harmless? **Journal of Hazardous Materials**, v. 396, p. 122693, set. 2020.

DJOUINA, M. et al. Oral exposure to polyethylene microplastics alters gut morphology, immune response, and microbiota composition in mice. **Environmental Research**, v. 212, p. 113230, set. 2022.

DOS REIS, I. M. M. et al. Differential responses in the biotransformation systems of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1789) elicited by pyrene and fluorene: Molecular, biochemical and histological approach – Part II. **Aquatic Toxicology**, v. 226, p. 105565, set. 2020.

DU, H.; HUANG, S.; WANG, J. Environmental risks of polymer materials from disposable face masks linked to the COVID-19 pandemic. **Science of The Total Environment**, v. 815, p. 152980, abr. 2022.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, jul. 1961.



ESTERHUIZEN, M.; KIM, Y. J. Effects of polypropylene, polyvinyl chloride, polyethylene terephthalate, polyurethane, high-density polyethylene, and polystyrene microplastic on *Nelumbo nucifera* (Lotus) in water and sediment. **Environmental Science and Pollution Research**, 20 out. 2021.

FADARE, O. O.; OKOFFO, E. D. Covid-19 face masks: A potential source of microplastic fibers in the environment. **Science of The Total Environment**, v. 737, p. 140279, out. 2020.

FATHY, M. et al. Hemotoxic effects of some herbicides on juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 30, p. 30857–30865, 24 out. 2019.

FERNANDES, F. H.; UMBUZEIRO, G. DE A.; SALVADORI, D. M. F. Genotoxicity of textile dye C.I. Disperse Blue 291 in mouse bone marrow. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 837, p. 48–51, jan. 2019.

FILGUEIRAS, A. V. et al. Microplastic ingestion by pelagic and benthic fish and diet composition: A case study in the NW Iberian shelf. **Marine Pollution Bulletin**, v. 160, p. 111623, nov. 2020.

FRIAS, J. P. G. L.; NASH, R. Microplastics: Finding a consensus on the definition. **Marine Pollution Bulletin**, v. 138, p. 145–147, jan. 2019.

FULTON, M. H.; KEY, P. B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 37–45, jan. 2001.

FULTON, W. The rate of growth of fishes. **20th Annual Report of the Fishery Board of Scotland 1902**, v. 3, p. 326–446, 1902.

GAJSK, G.; LANGIE, S.; ZHANATAEV, A. Recent applications of the Comet Assay: A report from the International Comet Assay Workshop 2019. **Toxicology Letters**, v. 333, p. 1–3, out. 2020.

GAJSKI, G. et al. The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 2 Vertebrates). **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 781, p. 130–164, jul. 2019.

GALAFASSI, S. et al. Microplastic pollution in perch (*Perca fluviatilis*, Linnaeus 1758) from Italian south-alpine lakes. **Environmental Pollution**, v. 288, p. 117782, nov. 2021.

GALLEGO-RIOS, S. E.; PEÑUELA, G. A.; MARTÍNEZ-LOPES, E. Updating the use of biochemical biomarkers in fish for the evaluation of alterations produced by pharmaceutical products. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 88, p. 103756, nov. 2021.

GAMBARDELLA, C. et al. Effects of polystyrene microbeads in marine planktonic

crustaceans. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 145, p. 250–257, nov. 2017.

GEMUSSE, S. L. et al. Micropollutants impair the survival of *Oreochromis niloticus* and threatlocal species from Iguaçu River, Southern of Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 83, p. 103596, abr. 2021.

GONZÁLEZ-RIVERA, R. M. Oxidative stress in fish induced by brominated flame retardants, a review. **Hidrobiológica**, v. 30, n. 3, p. 77–92, 30 abr. 2021.

GOPANNA, A. et al. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Raman spectroscopy and wide-angle X-ray scattering (WAXS) of polypropylene (PP)/cyclic olefin copolymer (COC) blends for qualitative and quantitative analysis. **Polymer Bulletin**, v. 76, n. 8, p. 4259–4274, 10 ago. 2019.

GRAMMER, G. et al. Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) establishment in temperate Mississippi, USA: multi-year survival confirmed by otolith ages. **Aquatic Invasions**, v. 7, n. 3, p. 367–376, 2012.

GU, D. E. et al. Identification of wild tilapia species in the main rivers of south China using mitochondrial control region sequence and morphology. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 65, p. 100–107, abr. 2016.

GUIRADO, G. M. DE P.; MARTINS, L. S. A importância dos biomarcadores e a listagem destes no Brasil e em outros países. **Revista Saúde em Foco**, n.11, p. 1463–1469, 2019.

GÜNTHER, W. M. R. Como descartar máscara de proteção individual de forma segura. **Laboratório de Gestão Ambiental, Inovação e Sustentabilidade da Faculdade de Saúde Pública da USP**, 2020.

GUO, Y. et al. Disposable Polypropylene Face Masks: A Potential Source of Micro/Nanoparticles and Organic Contaminates in Humans. **Environmental Science & Technology**, v. 57, n. 14, p. 5739–5750, 11 abr. 2023.

HAHN, M. E. Mechanistic research in aquatic toxicology: Perspectives and future directions. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3–4, p. 67–71, out. 2011.

HAMED, H. S.; ISMAL, S. M.; FAGGIO, C. Effect of allicin on antioxidant defense system, and immune response after carbofuran exposure in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 240, p. 108919, fev. 2021.

HAMED, M. et al. Assessment the effect of exposure to microplastics in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) early juvenile: I. blood biomarkers. **Chemosphere**, v. 228, p. 345–350, ago. 2019a.

HAMED, M. et al. Assessment the effect of exposure to microplastics in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) early juvenile: I. blood biomarkers. **Chemosphere**, v. 228, p. 345–350, ago. 2019b.

HAMED, M. et al. Antioxidants and molecular damage in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) after exposure to microplastics. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 13, p. 14581–14588, 11 maio 2020.

HANDAYANI, K. S.; SOEGIAN TO, A.; LIGNOT, J.-H. Change of osmoregulatory and hematological parameters in tilapia (*Oreochromis niloticus*) after exposure to sublethal mercury concentrations. **Emerging Contaminants**, v. 6, p. 337–344, 2020.

HANSSTEIN, F. V.; ECHEGARAY, F. Exploring motivations behind pollution-mask use in a sample of young adults in urban China. **Globalization and Health**, v. 14, n. 1, p. 122, 4 dez. 2018.

HASAN, K. et al. A Novel Coloration of Polyester Fabric through Green Silver Nanoparticles(G-AgNPs@PET). **Nanomaterials**, v. 9, n. 4, p. 569, 8 abr. 2019.

HERMS, W. B. An ecological and experimental study of Sarcophagidæ with relation to lake beach debris. **Journal of Experimental Zoology**, v. 4, n. 1, p. 45–83, fev. 1907.

HIGUCHI, Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1527–1535, out. 2003.

HINOJOSA, M. G. et al. Neurotoxicity induced by microcystins and cylindrospermopsin: A review. **Science of The Total Environment**, v. 668, p. 547–565, jun. 2019.

HOFFMANN, M. F. et al. The Transformer database: biotransformation of xenobiotics. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D1113–D1117, jan. 2014.

HU, T.; SHEN, M.; TANG, W. Wet wipes and disposable surgical masks are becoming new sources of fiber microplastic pollution during global COVID-19. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 1, p. 284–292, 10 jan. 2022.

HU, X.; LIN, Z. Transforming waste polypropylene face masks into S-doped porous carbon as the cathode electrode for supercapacitors. **Ionics**, v. 27, n. 5, p. 2169–2179, 18 maio 2021.

HUERTA LWANGA, E. et al. Microplastics in the Terrestrial Ecosystem: Implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae). **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 5, p. 2685–2691, 1 mar. 2016.

HUERTA LWANGA, E. et al. Incorporation of microplastics from litter into burrows of *Lumbricus terrestris*. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 523–531, jan. 2017.

IHEANACHO, S. C.; ODO, G. E. Neurotoxicity, oxidative stress biomarkers and haematological responses in African catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to polyvinyl chloride microparticles. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 232, p. 108741, jun. 2020.

ISMAIL, R. F.; SALEH, N. E.; SAYED, A. E.-D. H. Impacts of microplastics on reproductive performance of male tilapia (*Oreochromis niloticus*) pre-fed on *Amphora coffeaeformis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 48, p. 68732–

68744, 19 dez. 2021.

ISTIFLI, E. S. Preliminary in Silico Studies of the Interactions of Certain Genotoxic Azo Dyes with Different Double-Stranded DNA Conformations. **Colorants**, v. 1, n. 2, p. 236–255, 14 jun. 2022.

JEYAVANI, J. et al. Toxicity evaluation of polypropylene microplastic on marine microcrustacean *Artemia salina*: An analysis of implications and vulnerability. **Chemosphere**, v. 296, p. 133990, jun. 2022.

JEYAVANI, J. et al. Biochemical, Genotoxic and Histological Implications of Polypropylene Microplastics on Freshwater Fish *Oreochromis mossambicus*: An Aquatic Eco-Toxicological Assessment. **Toxics**, v. 11, n. 3, p. 282, 19 mar. 2023.

JIANG, H.; ZHANG, X.-J. Acetylcholinesterase and apoptosis. **FEBS Journal**, v. 275, n. 4, p. 612–617, fev. 2008.

JIANG, Y. X.; JIANG, M. Plastics: The Discovery in the World and Development in China. **Advanced Materials Research**, v. 750–752, p. 811–815, ago. 2013.

JIANG, Z.-Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384–389, maio 1992.

JIN, M. et al. Microplastics contamination in food and beverages: Direct exposure to humans. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 7, p. 2816–2837, 19 jul. 2021.

JOKANOVIC, M. Biotransformation of organophosphorus compounds. **Toxicology**, v. 166, n.3, p. 139–160, set. 2001.

JORDAN, R. A. et al. Caracterização granulométrica de biomassa polidispersa pelo método de peneiramento mecânico. **Engenharia Agrícola**, v. 36, n. 1, 2016.

JOS, A. et al. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*) under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 72, n. 3, p. 261–271, abr. 2005.

JUNG, Y. S. et al. Characterization and regulation of microplastic pollution for protecting planetary and human health. **Environmental Pollution**, v. 315, p. 120442, dez. 2022.

KABRA, K. B. et al. Inactivation strategies for SARS-CoV-2 on surgical masks using light-activated chemical dyes. **American Journal of Infection Control**, v. 50, n. 8, p. 844–848, ago. 2022.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183–6188, out. 1976.

KHAN, F. R. et al. ‘The Plastic Nile’: First Evidence of Microplastic Contamination in Fish from the Nile River (Cairo, Egypt). **Toxics**, v. 8, n. 2, p. 22, 25 mar. 2020.

KHAYAN, K. et al. Respiratory mask using a combination of spunbond, meltblown, and activated carbon materials for reducing exposure to CO: an in vivo study. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 15, p. 18989–18994, 13 abr. 2021.

KIM, J.-H. et al. Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes in cadmium-exposed river pufferfish (*Takifugu obscurus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 151, n. 1, p. 99–106, jan. 2010.

KIST, L. W. et al. Microcystin-LR acute exposure increases AChE activity via transcriptional ache activation in zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 155, n. 2, p. 247–252, mar. 2012a.

LAKHOUIT, A.; AL-RASHED, W. S. The Impact of Face Mask Inks and Dyes on the Environment and Human Health. **Journal of Geoscience and Environment Protection**, v. 10, n. 12, p. 87–99, 2022.

LEE, G. et al. Efficient upcycling of polypropylene-based waste disposable masks into hard carbons for anodes in sodium ion batteries. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 105, p. 268–277, jan. 2022.

LEE, J.-H.; KANG, J.-C.; KIM, J.-H. Toxic effects of microplastic (Polyethylene) on fish: Accumulation, hematological parameters and antioxidant responses in Korean Bullhead, *Pseudobagrus fulvidraco*. **Science of The Total Environment**, v. 877, p. 162874, jun. 2023.

LIAO, J.; JI, S.; CHI, Y. Effects of Discarded Masks on the Offshore Microorganisms during the COVID-19 Pandemic. **Toxics**, v. 10, n. 8, p. 426, 28 jul. 2022.

LIMA SILVA, E.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293–303, 2001.

LIN, Q. et al. The Spatiotemporal Characteristics and Climatic Factors of COVID-19 in Wuhan, China. **Sustainability**, v. 13, n. 14, p. 8112, 20 jul. 2021.

LIN, Q.-S.; HU, T.-J.; ZHOU, X.-H. Estimating the daily trend in the size of the COVID-19 infected population in Wuhan. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 1, p. 69, 18 dez. 2020.

LIU, S. et al. Butylparaben Exposure Induced Darker Skin Pigmentation in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Toxics**, v. 11, n. 2, p. 119, 25 jan. 2023.

LIU, Y.-H. et al. Uptake, elimination, and toxicokinetics of selected pharmaceuticals in multiple tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to environmentally relevant concentrations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 226, p. 112874, dez. 2021.

LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative

and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 120, n. 1, p.43–49, maio 1998.

LOPES, D. F. C. et al. Brain acetylcholinesterase of three perciformes: From the characterization to the in vitro effect of metal ions and pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 173, p. 494–503, maio 2019.

LU, Y. et al. Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 7, p. 4054–4060, 5 abr. 2016.

LUSHCHAK, V. L. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 711–747, 26 abr. 2016.

MA, H. et al. Microplastics in aquatic environments: Toxicity to trigger ecological consequences. **Environmental Pollution**, v. 261, p. 114089, jun. 2020.

MADERUELO-SANZ, R. et al. The recycling of surgical face masks as sound porous absorbers: Preliminary evaluation. **Science of The Total Environment**, v. 786, p. 147461, set.2021.

MAGALHÃES, D. DE P.; FERRÃO FILHO, A. DA S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecol. Bras**, v. 12, n. 3, p. 355–381, 2008.

MAKHDOUMI, P.; HOSSINI, H.; PIRSAHEB, M. A review of microplastic pollution in commercial fish for human consumption. **Reviews on Environmental Health**, v. 38, n. 1, p. 97–109, 28 mar. 2023.

MARINS, A. T. et al. Environmentally relevant pesticides induce biochemical changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ecotoxicology**, v. 30, n. 4, p. 585–598, 26 maio 2021.

MCART, D. G. et al. Modelling the comet assay. **Biochemical Society Transactions**, v. 37, n.4, p. 914–917, 1 ago. 2009.

MENÉNDEZ-HELMAN, R. J. et al. Circannual rhythms of acetylcholinesterase (AChE) activity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 111, p. 236–241, jan. 2015.

MOREIRA, S. M.; GUILHERMINO, L. The Use of *Mytilus Galloprovincialis* Acetylcholinesterase and Glutathione S-Transferases Activities as Biomarkers of Environmental Contamination Along the Northwest Portuguese Coast. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 105, n. 1–3, p. 309–325, jun. 2005.

MURALY, S.; K. V., J. Eco-Genotoxicity Assessment in Vemband Lake Using Comet Assay on Fish, *Etroplus suratensis*. **International Journal of Advanced Scientific Research and Management**, v. 6, n. 8, p. 7, 15 ago. 2021.

- NAGUIB, M. et al. Genotoxic evaluation of silver nanoparticles in catfish *Clarias gariepinus* erythrocytes; DNA strand breakage using comet assay. **Scientific African**, v. 16, p. e01260, jul. 2022.
- NAZ, H. et al. Comet Assay: Quantification of Damaged DNA in *Catla catla* Exposed to Endosulfan and Chlorpyrifos. **Punjab University Journal of Zoology**, jun. 2019.
- NEBBIA, C. Biotransformation Enzymes as Determinants of Xenobiotic Toxicity in Domestic Animals. **The Veterinary Journal**, v. 161, n. 3, p. 238–252, maio 2001.
- NGUYEN-TRI, P.; PRUD'HOMME, R. E. Nanoscale analysis of the photodegradation of polyester fibers by AFM-IR. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.371, p. 196–204, fev. 2019.
- NUGNES, R. et al. Polystyrene microplastic particles in combination with pesticides and antiviral drugs: Toxicity and genotoxicity in *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Pollution**, v.313, p. 120088, nov. 2022.
- NUGRAHAPRAJA, H. et al. Effects of Microplastic on Human Gut Microbiome: Detection of Plastic-Degrading Genes in Human Gut Exposed to Microplastics—Preliminary Study. **Environments**, v. 9, n. 11, p. 140, 9 nov. 2022.
- OGUEJI, E. et al. Oxidative stress, biochemical, lipid peroxidation, and antioxidant responses in *Clarias gariepinus* exposed to acute concentrations of ivermectin. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 14, p. 16806–16815, 5 maio 2020.
- OKOFFO, E. D. et al. Plastics in biosolids from 1950 to 2016: A function of global plastic production and consumption. **Water Research**, v. 201, p. 117367, ago. 2021.
- OLIVA-HERNÁNDEZ, B. E. et al. Microplastics in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Lake Amatitlán. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 16, n. 5, p. 1–10, 6 out. 2021.
- OLIVARES-RUBIO, H. F.; ESPINOSA-AGUIRRE, J. J. Acetylcholinesterase activity in fish species exposed to crude oil hydrocarbons: A review and new perspectives. **Chemosphere**, v. 264, p. 128401, fev. 2021.
- OLIVE, P. L. et al. Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the “Comet” Assay. **Radiation Research**, v. 122, n. 1, p. 86, abr. 1990.
- ÖZASLAN, M. S. et al. Some metals inhibit the glutathione S-transferase from Van Lake fishgills. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 31, n. 11, 31 nov. 2017.
- PANNETIER, P. et al. Toxicity assessment of pollutants sorbed on environmental microplastics collected on beaches: Part II—adverse effects on *Japanese medaka* early life stages. **Environmental Pollution**, v. 248, p. 1098–1107, maio 2019.
- PARK, J. C. et al. Genome-wide identification of the entire 90 glutathione S-transferase

(GST)subfamily genes in four rotifer *Brachionus* species and transcriptional modulation in response to endocrine disrupting chemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 28, p. 183–195, dez. 2018.

PATIL, P. B.; MAITY, S.; SARKAR, A. Potential human health risk assessment of microplastic exposure: current scenario and future perspectives. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 194, n. 12, p. 898, 17 dez. 2022.

PATRÍCIO SILVA, A. L. et al. Risks of Covid-19 face masks to wildlife: Present and future research needs. **Science of The Total Environment**, v. 792, p. 148505, out. 2021.

PEREIRA NAVARRO LINS, J. A. et al. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 8, n. 4, p. 469, 15 out. 2010.

PICCARDO, M. et al. Lethal and Sublethal Responses of *Hydropsyche pellucidula* (Insecta, Trichoptera) to Commercial Polypropylene Microplastics after Different Preconditioning Treatments. **Toxics**, v. 9, n. 10, p. 256, 9 out. 2021.

PITARELI, G. et al. Identificação de blendas polietileno/polipropileno por espectroscopia de infravermelho e calorimetria exploratória experimental. **Anais do 6o Congresso Brasileiro de Polímeros**, 2002.

RABELLO, M. S. **Estrutura e propriedades de polímeros**. 1. ed. Campina Grande: Editora do autor, 2021. v. 1

RASMUSSEN, S. C. Revisiting the Early History of Synthetic Polymers: Critiques and New Insights. **Ambix**, v. 65, n. 4, p. 356–372, 2 out. 2018.

RAY, S. S. et al. Microplastics waste in environment: A perspective on recycling issues from PPE kits and face masks during the COVID-19 pandemic. **Environmental Technology & Innovation**, v. 26, p. 102290, maio 2022.

RAZA, T. et al. Exploration of polyacrylamide microplastics and evaluation of their toxicity on multiple parameters of *Oreochromis niloticus*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 30, n.2, p. 103518, fev. 2023.

REBELEIN, A. et al. Microplastic fibers — Underestimated threat to aquatic organisms? **Science of The Total Environment**, v. 777, p. 146045, jul. 2021.

REGOLI, F.; GIULIANI, M. E. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. **Marine Environmental Research**, v. 93, p. 106–117, fev. 2014.

ROSS, P. S. et al. Pervasive distribution of polyester fibres in the Arctic Ocean is driven by Atlantic inputs. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 106, 12 jan. 2021.

RYAN, P. G.; CHITAKA, T. Y. Do we need more research on the environmental impacts of plastics? **Environmental Research Letters**, v. 17, n. 9, p. 090201, 1 set. 2022.



SAMANTA, P. et al. Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, p. 120–125, set. 2014.

SANTOS, C.; BUENO DOS REIS MARTINEZ, C. Biotransformation in the fish *Prochilodus lineatus*: An organ-specific approach to cypla gene expression and biochemical activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 80, p. 103467, nov. 2020.

SANTOS, M. D. DOS et al. Efeito do fotoperíodo na sobrevivência de larvas da tilápia nilótica (*Oreochromis Niloticus*) submetidas a diferentes fotoperíodos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 35835–35843, 2020.

SCHIAVO, S. et al. Polyethylene, Polystyrene, and Polypropylene leachate impact upon marinemicroalgae *Dunaliella tertiolecta*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 84, n. 6, p. 249–260, 19 mar. 2021.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. DE. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308–313, ago. 2004.

SCHNEIDER, K.; HAFNER, C.; JÄGER, I. Mutagenicity of textile dye products. **Journal of Applied Toxicology**, v. 24, n. 2, p. 83–91, mar. 2004.

SEVIOR, D. K.; PELKONEN, O.; AHOKAS, J. T. Hepatocytes: The powerhouse of biotransformation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 2, p.257–261, fev. 2012.

SHARMA, S.; CHATTERJEE, S. Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 27, p. 21530–21547, 16 set. 2017.

SHEN, M. et al. Neglected microplastics pollution in global COVID-19: Disposable surgical masks. **Science of The Total Environment**, v. 790, p. 148130, out. 2021.

SILVA, D. C. V. R.; POMPÊO, M.; PAIVA, T. C. B. A ECOTOXICOLOGIA NO CONTEXTO ATUAL NO BRASIL. Em: **Ecologia de reservatórios e interfaces**. São Paulo:[s.n.]. p. 340–353.

SILVA DE ASSIS. **O uso de biomarcadores para avaliação de poluição aquática**. Berlin:Universidade Técnica de Berlin, 1998.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, n. 1, p. 112–120, jan. 2008.

SINGH, M. et al. Distinctive finger prints of genotoxicity induced by As, Cr, Cd, and Ni in a freshwater fish. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 19, p.

19445– 19452, 10 jul. 2019.

SOARES, J. et al. Public views on plastic pollution: Knowledge, perceived impacts, and pro- environmental behaviours. **Journal of Hazardous Materials**, v. 412, p. 125227, jun. 2021.

SOLOMANDO, A. et al. Microplastic presence in the pelagic fish, *Seriola dumerili*, from Balearic Islands (Western Mediterranean), and assessment of oxidative stress and detoxification biomarkers in liver. **Environmental Research**, v. 212, p. 113369, set. 2022.

SUN, Y. et al. Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure. **Chemosphere**, v. 63, n. 8, p. 1319–1327, maio 2006.

TAO, W. et al. High-quality chromosome-level genomes of two tilapia species reveal their evolution of repeat sequences and sex chromosomes. **Molecular Ecology Resources**, v. 21, n.2, p. 543–560, 3 fev. 2021.

THORÉ, E. S. J. et al. Towards improved fish tests in ecotoxicology - Efficient chronic and multi-generational testing with the killifish *Nothobranchius furzeri*. **Chemosphere**, v. 273, p. 129697, jun. 2021.

TIEN, C.-J.; WANG, Z.-X.; CHEN, C. S. Microplastics in water, sediment and fish from the Fengshan River system: Relationship to aquatic factors and accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fish. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114962, out. 2020.

TROMBETA, T. D. et al. Viabilidade bioeconomica da produção de tilapia em pequena propriedade rural no noroeste de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Gestão e Engenharia**, v. 12, n. 1, p. 01–21, 2021.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 79, n. 2, p.201–204, ago. 2006.

USMAN, S. et al. Polystyrene Microplastics Exposure: An Insight into Multiple Organ Histological Alterations, Oxidative Stress and Neurotoxicity in Javanese Medaka Fish (*Oryzias javanicus* Bleeker, 1854). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 18, p. 9449, 7 set. 2021.

VIJITKUL, P. et al. Investigation of genotoxicity, mutagenicity, and cytotoxicity in erythrocytes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after fluoxetine exposure. **Toxicology Reports**, v. 9, p. 588–596, 2022.

WALKER, D. B. et al. Surface Water Pollution. Em: **Environmental and Pollution Science**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 261–292.

WANG, C.; LU, G.; CUI, J. Responses of AChE and GST activities to insecticide coexposure in *Carassius auratus*. **Environmental Toxicology**, v. 27, n. 1, p. 50–57, jan. 2012.

WANG, F. et al. Microfiber releasing into urban rivers from face masks during COVID-19. **Journal of Environmental Management**, v. 319, p. 115741, out. 2022a.

WANG, Q. et al. Puncture resistance behaviors and efficiencies of angle-interlock fabrics impregnated with shear thickening fluids. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 20, p. 415–427, set. 2022b.

WHITFIELD, A. K.; ELLIOTT, M. Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: a review of progress and some suggestions for the future. **Journal of Fish Biology**, v. 61, n. sa, p. 229–250, dez. 2002.

WILLIAMS, A. T.; RANGEL-BUITRAGO, N. The past, present, and future of plastic pollution. **Marine Pollution Bulletin**, v. 176, p. 113429, mar. 2022.

WINKALER, E. U. et al. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramentoda saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná . **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 507–514, 2001.

WOOTTON, N.; REIS-SANTOS, P.; GILLANDERS, B. M. Microplastic in fish – A global synthesis. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 31, n. 4, p. 753–771, 20 dez. 2021.

WU, H. et al. Development of biosensor for measuring oxidative stress of fish. **Fisheries Science**, v. 87, n. 1, p. 151–159, 6 jan. 2021.

WU, Q. et al. Microcystin-LR exposure induces developmental neurotoxicity in zebrafish embryo. **Environmental Pollution**, v. 213, p. 793–800, jun. 2016.

XIE, Z. et al. Effect of structural parameters on tensile properties of alumina fabrics. **Textile Research Journal**, v. 93, n. 9–10, p. 2095–2102, 25 maio 2023.

YANG, C.; LIM, W.; SONG, G. Mediation of oxidative stress toxicity induced by pyrethroid pesticides in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 234, p. 108758, ago. 2020.

YANG, Y. et al. Acute toxicity, bioaccumulation and elimination of prometryn in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Chemosphere**, v. 300, p. 134565, ago. 2022.

YAWETZ, A.; MANELIS, R.; GASITH, A. Cholinesterase Enzymatic Profiles and the Exposure of Fish to Organophosphorus and Carbamate Pesticides in Israel. **Water Science and Technology**, v. 27, n. 7–8, p. 465–472, 1 abr. 1993.

YEDIER, S.; YALÇINKAYA, S. K.; BOSTANCI, D. Exposure to polypropylene microplastics via diet and water induces oxidative stress in *Cyprinus carpio*. **Aquatic Toxicology**, v. 259, p. 106540, jun. 2023.

YU, P. et al. Accumulation of polystyrene microplastics in juvenile *Eriocheir sinensis* and oxidative stress effects in the liver. **Aquatic Toxicology**, v. 200, p. 28–36, jul. 2018.

ZAGATTO, P.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática Princípios e Aplicações**.

2. ed. [s.l: s.n.]. v. 0

ŽEGURA, B.; FILIPIC, M. The application of the Comet assay in fish cell lines. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 842, p. 72–84, jun. 2019.

ZHANG, J.; MU, Q. Air pollution and defensive expenditures: Evidence from particulate-filtering facemasks. **Journal of Environmental Economics and Management**, v. 92, p. 517–536, nov. 2018.

ZHANG, S. et al. Microplastics in the environment: A review of analytical methods, distribution, and biological effects. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 111, p. 62–72, fev. 2019.

ZHANG, X. et al. Photoaging enhanced the adverse effects of polyamide microplastics on the growth, intestinal health, and lipid absorption in developing zebrafish. **Environment International**, v. 158, p. 106922, jan. 2022.

ZHANG, Y. et al. Two catalase homologs are involved in host protection against bacterial infection and oxidative stress in *Crassostrea hongkongensis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.31, n. 6, p. 894–903, dez. 2011.

ZHENG, L. et al. Influences of molecular weight fractionated humic acids on polyamide 66 microplastic stability and toxicity in red tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Frontiers in Marine Science**, v. 9, 14 nov. 2022.

ZHOU, M. et al. Characterizing Wuhan residents' mask-wearing intention at early stages of the COVID-19 pandemic. **Patient Education and Counseling**, v. 104, n. 8, p. 1868–1877, ago. 2021.

ZOLOTOVA, N. et al. Harmful effects of the microplastic pollution on animal health: a literature review. **PeerJ**, v. 10, p. e13503, 14 jun. 2022.