



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

INGRID DE SOUZA FREIRE

Impactos ecotoxicológicos de microplásticos de polietileno no peixe
Danio rerio e no caramujo *Biomphalaria glabrata*

Brasília – DF

2023

INGRID DE SOUZA FREIRE

Impactos ecotoxicológicos de microplásticos de polietileno no peixe
Danio rerio e no caramujo *Biomphalaria glabrata*

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação
em Biologia Animal da Universidade de Brasília
– UnB como parte dos requisitos para obtenção
de título de doutor em Biologia Animal.

Orientador: Prof^o Dr. Cesar Koppe Grisolia.

Brasília – DF

2023

Dedicatória

“Aos meus filhos, Leon e Amália”

Dedico

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”.

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por tudo que passei ao longo desses seis anos de doutorado, pois somente diante das dificuldades o ser humano consegue se transformar e enxergar o que realmente vale a pena na vida, que é viver aproveitando todos os dias como se fossem o último.

Agradeço ao meu orientador Professor Dr. Cesar Grisolia, que além de orientador foi um grande professor, mediou a construção do conhecimento, ajudou na bancada, na escrita e em todas as etapas deste projeto. Obrigada por ser paciente e compreensivo em todos os momentos em que eu precisei.

Agradeço aos outros professores que também foram fundamentais para execução deste projeto. Professor Thiago Rocha, por ajudar na escolha do tema e com a escrita do projeto inicial. Felizmente, os caminhos traçados por Deus foram divergentes dos que inicialmente pretendido. Ao Professor José Francisco Júnior, que insistiu que eu realizasse o projeto na Universidade de Brasília, dando-me todo o apoio. Ao Professor Eduardo Cyrino, que expandiu as oportunidades para mim e pude trabalhar mais uma vez com caramujos. À Professora Lenita Tallarico pelo treinamento com *Biomphalaria* no Instituto Butantan - SP. E ao Bruno da UNIFESP pelo auxílio na histologia.

Aos demais professores que me concederam ajuda e conhecimento ao longo desses anos de doutorado: Professor Osmino Júnior, Professor Rolando André, Professora Daniela Mara, Professora Mônica Garcia, Professor Ricardo Bentes. Pelas palavras de apoio e pelo acesso às portas dos laboratórios para o uso, sempre que foi preciso, obrigada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília – UnB, ao CNPq e a CAPES pelo apoio e incentivo financeiro.

Quero agradecer a duas pessoas sem as quais esse projeto não teria sido concluído da forma como foi. Primeiramente à Profa. Dra. Maria Luiza, que além de companheira de trabalho foi uma grande amiga, pois por várias vezes eu quis desistir e ela nunca permitiu, sempre dizendo que me ajudaria a fazer tudo que pudesse, e assim foi. E à Fabíula Amorim, que me ajudou em toda parte experimental com caramujos, e esteve ao meu lado nos momentos em que eu mais me desestabilizei emocionalmente. Sem vocês duas eu não teria conseguido fazer metade do que consegui fazer.

Ao meu marido, Vinícius Eustáquio, que é o amor da minha vida e sempre me apoiou, mesmo nos momentos mais difíceis, na dinâmica com as crianças e em tudo, agradeço. Aos meus filhos - metades de mim - Leon Freire e Amália Freire, minha vida sem vocês não teria metade das dificuldades e das preocupações, mas em compensação, não teria cor, não teria riso, não teria emoção, nem alegria e nem prazer. Vocês deram outro sentido à minha vida. Obrigada por existirem e por me fazerem sentir esse amor que transborda a alma.

Aos meus pais, por me ajudarem nessa dura jornada que é a vida, pelo apoio emocional, financeiro e com as crianças. Hoje, eu entendo o verdadeiro sentido do termo família.

Sou grata também a minha tia Cidália pela correção gramatical. E a Helysângela Torres, babá dos meus filhos, que sempre os tratou com paciência e carinho.

À minha amiga e parceira de bancada, Tathyana, obrigada pela ajuda no ensaio de embriotoxicidade (FET) e na histologia, pelas conversas e parcerias do dia a dia; aos demais colegas da pós: Thayres Andrade, Ana Clara, Diego Sousa, Joana Mona; aos colegas da ecologia: Regina, Guilherme e Allan. Sou grata por tudo!

Às amigas que a Embrapa me proporcionou: Nayara Luiz, Daphne Muniz e Taiane. Ter amigas que se apoiam na maternidade e na pesquisa é fundamental, porque só nós sabemos o que passamos para concluir mais esta etapa na vida.

Nem sempre os caminhos que traçamos são os que de fato acontecem. Felizmente, nos caminhos da vida, quem dita o percurso é Deus!

RESUMO

Microplásticos (MPs) são partículas com tamanho entre 5 - 1 mm, considerados poluentes emergentes e presentes no mundo todo. Em virtude do seu tamanho eles apresentam o potencial de atingir vários níveis da cadeia alimentar. Peixes e macroinvertebrados bentônicos estão suscetíveis a essa exposição e poucos dados na literatura relevam os efeitos adversos de MPs em organismos de água doce. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial ecotoxicológico de MPs de polietileno (PE MPs) em duas espécies aquáticas, o peixe *Danio rerio* ou *zebrafish*, e o caramujo bentônico de água doce *Biomphalaria glabrata*. Em *zebrafish* a toxicidade foi avaliada por meio do ensaio de embriotoxicidade, pelo ensaio de depuração dessas micropartículas em juvenis e em adultos, por meio de ensaios de genotoxicidade, citotoxicidade, histologia e marcadores bioquímicos em exposições de 96 horas e 28 dias, com um período de recuperação de 14 dias. Em caramujos adultos de *B. glabrata* foi investigado a alteração de marcadores bioquímicos em uma exposição aguda de 96 horas e em um ensaio de recuperação de 49 dias. Além disso, verificou-se o potencial de depuração de MPs em juvenis e adultos de *B. glabrata*, após a exposição aguda. A caracterização dos PE MPs por microscopia eletrônica de varredura e análise em programa *FijiJ*, que mostraram partículas esféricas, com média de $59 \pm 3,84 \mu\text{m}$ de diâmetro. Em peixes, não foram observadas alterações significativas em embriões pelo ensaio de embriotoxicidade e o ensaio de depuração em juvenis mostrou que no 12º dia de recuperação eles eliminaram todas as MPs. Já nos adultos, na exposição aguda, houve uma inibição da amônia tóxica em todos os grupos expostos quando comparados ao controle água, a diminuição foi nove vezes menor no grupo de 100 mg.L^{-1} . Isso foi confirmado na exposição crônica, tanto para MPs quanto para o dispersante *Tween 80* %. No ensaio de recuperação, a inibição de amônia tóxica deixa de ser significativa nos aquários que continham *Tween 80* % após 8 dias. Nos aquários com MPs somente após 14 dias percebe-se que essa diminuição deixa de ser estatisticamente significativa. As análises histológicas mostraram que os MPs se acumularam no lúmen intestinal, mas não em outros órgãos. Não foi observado genotoxicidade nos ensaios do cometa, nos ensaios de micronúcleos e de citotoxicidade, por anomalias nucleares na exposição aguda. Houve diminuição significativa na atividade de acetilcolinesterase (AChE) tanto nos ensaios agudo e crônico em amostras da cabeça e no ensaio de recuperação a diminuição ocorreu nas

amostras da cauda. A atividade de glutathione-S-transferase (GST) teve aumento significativo nos ensaios agudo, crônico e de recuperação; e, na atividade de lactato desidrogenase (LDH) teve diminuição estatisticamente significativo na exposição crônica. Verifica-se que esses PE MPs esféricos com 59 µm de diâmetro, causaram estresse oxidativo em *zebrafish*, mas não o suficiente para causar genotoxicidade. Além disso, a capacidade de depuração em juvenis de *zebrafish* foi significativamente rápida, em torno de 15 dias, os MPs se acumularam no lúmen do intestino, e apesar disso, 14 dias de recuperação não foram o suficiente para que eles se recuperassem totalmente do estresse oxidativo. Nos caramujos adultos de *B. glabrata* não foram observados valores estatisticamente significativos na concentração total de proteínas, na concentração de glicose, na atividade de LDH e AChE. Entretanto, houve uma diminuição significativa na atividade de GST. Na análise de depuração, os juvenis levaram 20 dias para eliminar totalmente os MPs e os adultos não conseguiram eliminar todas as partículas no total de 49 dias de recuperação em água mole sintética. Ademais, as análises em juvenis e adultos mostraram que os MPs também se concentraram principalmente no estômago e no intestino desses caramujos. Nesses animais, esses MPs também causaram estresse oxidativo, porém, apenas em um marcador, o que revela que os caramujos *B. glabrata* são mais resistentes do que *zebrafish* a esses PE MPs. Com relação a depuração, os juvenis se mostraram mais eficientes na eliminação de MPs do que caramujos adultos. Em conclusão, os efeitos toxicológicos de PE MPs dependem da espécie ao qual estão sendo expostos, da concentração e do tempo de exposição.

Palavras-chave: ecotoxicologia aquática; micropartículas plásticas; *zebrafish*; *Biomphalaria glabrata*; estresse oxidativo; genotoxicidade.

ABSTRACT

Microplastics (MPs) are classified as particles with size between 5 - 1 mm. They are considered as emerging pollutants, which have been found at worldwide. Due to their small size, they have the potential to reach different levels of the food chain. Fish and benthic macroinvertebrates are susceptible to exposures to MPs, and there is a lack of data in the literature revealing the adverse effects of such microparticle on freshwater organisms. The purposes of this work were to carry out bioassays to investigate the toxicity of polyethylene microplastics using different endpoints in two aquatic species as *Danio rerio* (zebrafish), and in the freshwater benthic snail *Biomphalaria glabrata*. In zebrafish, the toxicity was evaluated through fish embryotoxicity test, following by the clearance test in juveniles and in adults, using the endpoints of genotoxicity, cytotoxicity, histology, and biochemical marker after exposures of 96 hours (acute test), and 28 days (chronic test), following a 14-day recovery – clearance test. In adults of *B. glabrata*, the biochemical markers were investigated in a 96-hour acute exposure test, and after 49-day recovery test. In addition, the capability for clearance of such MPs in juveniles and adults of *B. glabrata* were verified. The characterization of polyethylene microplastics was performed by scanning electron microscopy, analyzed with Fiji J software showing spherical particles, with an average of $59 \pm 3.84 \mu\text{m}$ (SD) in diameter. In zebrafish, no significant embryotoxicity were observed, and the clearance test in juveniles showed that after 12 days in clean water the MPs were completely eliminated. In zebrafish adults, the acute exposures showed significant inhibition of toxic ammonia in all exposed groups when compared to the controls, and this inhibition was nine times down in the 100 mg.L^{-1} group. This was confirmed in the chronic exposure test, with significant p-values for microplastic exposures as well as exposures to Tween 80% dispersant. In the recovery test, the inhibition of toxic ammonia was not significant for Tween after 8 days. For microplastics, after 14 days, there decrease was no longer statistically significant. The histological analyzes showed that MPs accumulate in the intestinal lumen, but not in other organs. The acute exposure test showed no genotoxicity through comet tests and micronucleus tests, and no cytotoxicity for nuclear abnormalities. The AChE activity was significantly decreased in the acute and chronic tests in the samples from head. In the recovery test, this decrease occurred only in the tail samples. The GST

activity was significantly increased in acute, chronic and recovery tests. The LDH activity was statistically significant in the chronic exposure. In adult snails of *B. glabrata*, no statistically significant values were observed for total protein concentration, glucose concentration, LDH and AChE activity; however, the GST activities were decreased. In the recovery test, with the juvenile snails, the total clearance occurred in about 20 days, while for the adults was in around of 49 days. Furthermore, analyzes in juveniles and adults showed that MPs are concentrated mainly in the stomach and intestine of these snails. These spherical polyethylene microplastics, measuring 59 μm in diameter in average, caused oxidative stress in zebrafish, but not enough to cause genotoxicity. In addition, the clearance in zebrafish juveniles was significantly faster, around 15 days. The MPs were slowly eliminated from the lumen of the intestine, and the 14 days of recovery period was not enough to recover from the oxidative stress caused before. In snails, these MPs caused oxidative stress as well, but it was observed in only one marker, revealing that *B. glabrata* was more resistant than zebrafish to these polyethylene microplastics. Regarding the depuration test, the juvenile snails were more efficient in eliminating MPs than adults. In conclusion, the toxicological effects of polyethylene microplastics depend on the species to which they are exposed, the exposure-concentrations, and the exposure-time.

Keywords: aquatic ecotoxicology; microplastics; zebrafish; *Biomphalaria glabrata*; oxidative stress; genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de embalagens plásticas de acordo com o tipo de plástico.....	25
Figura 2. Desenvolvimento embrionarval de <i>zebrafish</i>	39
Figura 3. Fotomicrografia de fluorescência de microplástico de polietileno (EP MPs) com fluorocromo laranja (filtro 530 nm).....	43
Figura 4. Eletromicrografia de varredura (MEV) (Jeol JSM-7001F at 15 kV) de microplásticos de polietileno.....	44
Figura 5. Histograma da distribuição do diâmetro de microplásticos de polietileno em diferentes classes.....	44
Figura 6. Composição elementar observada em detector de energia dispersiva de raios X (EDX ou “EDS- Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy”).....	45
Figura 7. Desenho experimental do ensaio FET (<i>Fish Embryo Toxicity</i>): distribuição de diferentes concentrações do microplástico de polietileno e dos embriões de <i>zebrafish</i>	49
Figura 8. Exposição à diferentes concentrações do microplástico de polietileno no ensaio em adultos de <i>zebrafish</i>	51
Figura 9. Categoria de danos em nucleoides de sangue periférico de <i>zebrafish</i> no ensaio cometa (<i>Single Cell Gel Eletrophoresis</i> - SCGE).....	55
Figura 10. Panorama geral do ensaio de embriotoxicidade em <i>zebrafish</i> (FET).....	59
Figura 11. Fotomicrografia de embrião de <i>zebrafish</i> com 36 horas da fertilização...	60
Figura 12. Fotomicrografia de embrião de <i>zebrafish</i> com 72 horas da fertilização...	60
Figura 13. Fotomicrografia de larva de <i>zebrafish</i> com 96 horas da fertilização.	60
Figura 14. Fotomicrografia de larva de <i>zebrafish</i> com 96 horas da fertilização.	60
Figura 15. Fotomicrografia de larva de <i>zebrafish</i> com 96 horas da fertilização.....	60
Figura 16. Fotomicrografia de larva de <i>zebrafish</i> com 96 horas da fertilização.....	60
Figura 17. Fotomicrografia de fluorescência de larva de <i>zebrafish</i>	61
Figura 18. Fotomicrografia de fluorescência de juvenil de <i>zebrafish</i> após 24 horas de recuperação.	61
Figura 19. Fotomicrografia de fluorescência de juvenil de <i>zebrafish</i> após 07 dias de recuperação..	61
Figura 20. Fotomicrografia de fluorescência de juvenil de <i>zebrafish</i> após 12 dias de recuperação.	61
Figura 21. Fotomicrografia de fluorescência do intestino de adulto de <i>zebrafish</i>	66

Figura 22. Fotomicrografia de fluorescência do intestino de adulto de <i>zebrafish</i>	66
Figura 23. Fotomicrografia de fluorescência das brânquias de adulto de <i>zebrafish</i>	66
Figura 24. Fotomicrografia de fluorescência do fígado de adulto de <i>zebrafish</i>	66
Figura 25. Fotomicrografia de fluorescência do intestino de adulto de <i>zebrafish</i>	66
Figura 26. Fotomicrografia de fluorescência do intestino de adulto de <i>zebrafish</i>	66
Figura 27. Frequência absoluta de micronúcleo e anomalias nucleares em eritrócitos periféricos de <i>zebrafish</i> , ensaio agudo.....	67
Figura 28. Índice de danos moderados e elevados do DNA em eritrócitos de <i>zebrafish</i> , ensaio agudo.....	68
Figura 29. Índice de danos moderados e elevados do DNA em eritrócitos de <i>zebrafish</i> , ensaio crônico.. ..	68
Figura 30. Índice de danos moderados e elevados do DNA em eritrócitos de <i>zebrafish</i> , ensaio de recuperação.....	68
Figura 31. Acetilcolinesterase (AChE) em amostras da cabeça e da cauda em adultos de <i>zebrafish</i> , ensaio agudo.	70
Figura 32. Acetilcolinesterase (AChE) em amostras da cabeça e da cauda em adultos de <i>zebrafish</i> , ensaio crônico.....	70
Figura 33. Acetilcolinesterase (AChE) em amostras da cabeça e da cauda em adultos de <i>zebrafish</i> , ensaio de recuperação.. ..	70
Figura 34. Glutathiona-S-transferase (GST) em amostras da brânquia e corpo em adultos de <i>zebrafish</i> , ensaio agudo.....	72
Figura 35. Glutathiona-S-transferase (GST) em amostras da brânquia e corpo em adultos de <i>zebrafish</i> , ensaio crônico.. ..	72
Figura 36. Glutathiona-S-transferase (GST) em amostras da brânquia e corpo em adultos de <i>zebrafish</i> , ensaio de recuperação.....	72
Figura 37. Lactato desidrogenase (LDH) em amostras da cauda em adultos de <i>zebrafish</i> , ensaio agudo.. ..	74
Figura 38. Lactato desidrogenase (LDH) em amostras da cauda em adultos de <i>zebrafish</i> , ensaio crônico.....	74
Figura 39. Lactato desidrogenase (LDH) em amostras da cauda em adultos de <i>zebrafish</i> , ensaio de recuperação.	74
Figura 40. Desova de <i>Biomphalaria glabrata</i>	83

Figura 41. Desenho experimental do ensaio com <i>Biomphalaria glabrata</i> expostos à diferentes concentrações do microplástico de polietileno..	84
Figura 42. Fotografia da manipulação e retirada da concha de <i>Biomphalaria glabrata</i> .	86
Figura 43. Fotomicrografia de fluorescência de <i>Biomphalaria glabrata</i> juvenil após 96 horas de exposição.	91
Figura 44. Fotomicrografia de fluorescência de <i>Biomphalaria glabrata</i> juvenil após 96 horas de exposição..	91
Figura 45. Fotomicrografia de fluorescência de <i>Biomphalaria glabrata</i> juvenil após 96 horas de exposição..	91
Figura 46. Fotomicrografia de fluorescência de <i>Biomphalaria glabrata</i> juvenil após 72 horas de depuração em água mole sintética.....	91
Figura 47. Fotomicrografia de fluorescência de <i>Biomphalaria glabrata</i> juvenil após 11 dias de depuração.....	91
Figura 48. Fotomicrografia de fluorescência de <i>Biomphalaria glabrata</i> juvenil após 20 dias de depuração.....	91
Figura 49. Fotomicrografia de fluorescência de <i>Biomphalaria glabrata</i> adulto após 96 horas de exposição..	93
Figura 50. Fotomicrografia de fluorescência do corpo mole de <i>Biomphalaria glabrata</i> adulto após 96 horas de exposição.....	93
Figura 51. Fotomicrografia de fluorescência de <i>Biomphalaria glabrata</i> adulto após 48 horas de exposição..	93
Figura 52. Fotomicrografia de fluorescência de <i>Biomphalaria glabrata</i> adulto após 07 dias de depuração.....	93
Figura 53. Fotomicrografia de fluorescência de <i>Biomphalaria glabrata</i> adulto após 14 dias de depuração.....	93
Figura 54. Fotomicrografia de fluorescência de <i>Biomphalaria glabrata</i> adulto após 25 dias de depuração.....	93
Figura 55. Fotomicrografia de fluorescência de <i>Biomphalaria glabrata</i> adulto após 49 dias de depuração.	94
Figura 56. Fotomicrografia de fluorescência de <i>Biomphalaria glabrata</i> adulto após 49 dias de depuração.....	94
Figura 57. Fotomicrografia do corpo mole de <i>Biomphalaria glabrata</i> adulto após 49 dias de depuração.....	94

Figura 58. Fotomicrografia sob luz-UV do corpo mole de <i>Biomphalaria glabrata</i> adulto após 49 dias de depuração.....	94
Figura 59. Concentração de proteína total em sobrenadante pós-mitocondrial em amostras de caramujos selvagens da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i>	96
Figura 60. Concentração de glicose em sobrenadante pós-mitocondrial em amostras de caramujos selvagens da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i>	97
Figura 61. Concentração de lactato desidrogenase (LDH) em sobrenadante pós-mitocondrial em amostras de caramujos selvagens da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i>	98
Figura 62. Acetilcolinesterase (AChE) em sobrenadante pós-mitocondrial em amostras de caramujos selvagens da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i>	99
Figura 63. Glutathiona-S-transferase (GST) em sobrenadante pós-mitocondrial em amostras de caramujos selvagens da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i>	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Normas técnicas brasileira de ecotoxicologia.	35
Tabela 2. Amônia real na água de exposição de <i>zebrafish</i> no ensaio agudo.	63
Tabela 3. Amônia real na água de exposição de <i>zebrafish</i> no ensaio crônico.....	64
Tabela 4. Amônia real na água de exposição de <i>zebrafish</i> no ensaio de recuperação.	64
Tabela 5. Parâmetros físico-químicos da água após 96 horas de exposição de microplásticos em <i>Biomphalaria glabrata</i>	95

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ABIPLAST	Associação Brasileira da Indústria do Plástico
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AChE	Acetilcolinesterase
AN	Anomalias nucleares
APX	Ascorbato peroxidase
Au	Ouro
BtChE	Butirilcolinesterase
C	Carbono
CAT	Catalase
Ca	Cálcio
CDNB	1-cloro-2, 4 dinitrobenzeno
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal
ChE	Colinesterase
Cu	Cobre
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DTNB	5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)
ETE	Estações de tratamento de esgoto
EVA	Etileno acetato de vinila
FET	<i>Fish embryo toxicity test</i>
GSH	Glutathiona reduzida
GST	Glutathiona-S-transferase
GTOX	Laboratório de Genética Toxicológica
HCH	Hexa-cloro-ciclo-hexano
HPAs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
hpf	Horas após a fecundação
LDH	Lactato desidrogenase
Mg	Magnésio
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MN	Micronúcleo
MPs	Microplásticos
NP	Nanoplástico
OCPs	Pesticidas organoclorados
OD	Oxigênio dissolvido
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
PBBs	Bifenilas polibromadas
PBDEs	Éteres difenílicos polibromados
PCBs	Bifenila policlorados
PCDDs	Dibenzodioxinas policloradas
PCDFs	Furanos policlorados
PEAD	Polietileno de alta densidade
PEBD	Polietileno de baixa densidade
PEBDL	Polietileno linear de baixa densidade

PET	Polietileno tereftalato
PFA s	Perfluoroalquiladas
PFOS	Ácido sulfônico perfluorooctano
PLA	Ácido polilático
POP	Poluentes Orgânicos Persistentes
PP	Polipropileno
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase

SUMÁRIO

1. Introdução	22
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2. Plástico.....	24
2.1 Plástico e meio ambiente	26
2.2 Plástico e poluentes	29
2.3 Plástico e biota aquática	31
3. Ensaio ecotoxicológicos	33
4. Organismos bioindicadores	36
5. Marcadores de toxicidade	38
6. Microplásticos de polietileno com fluorocromo	42
7. Hipótese	46
8. Objetivo	47
8.1 Objetivos específicos	47
CAPÍTULO II – ENSAIOS COM O PEIXE ZEBRAFISH (<i>Danio rerio</i>).....	48
9. Delineamento experimental com <i>Zebrafish</i>	48
9.1 Ensaio de embriotoxicidade em <i>zebrafish</i> (FET).....	48
9.2 Ensaio com juvenis	50
9.3 Ensaio com adultos	50
9.3.1 Ensaio agudo	51
9.3.2 Ensaio crônico.....	51
9.3.3 Ensaio de recuperação	51
10. Marcadores para adultos.....	52
10.1 Parâmetros físico-químicos da água <i>zebrafish</i>	52
10.2 Análise histológica	52
10.3 Frequência de micronúcleos e anomalias nucleares	53
10.4 Ensaio do cometa	54
10.5 Marcadores bioquímicos	56
10.5.1 Atividade de acetilcolinesterase (AChE)	56
10.5.2 Atividade de Glutathione-S-Transferase (GST).....	57
10.5.3 Atividade de Lactato desidrogenase (LDH)	57
11. Análise estatística	58
12. Resultados (ensaio com <i>zebrafish</i>)	58

12.1 Ensaio de embriotoxicidade em <i>zebrafish</i> (FET).....	58
12.2 Ensaio com juvenis	61
12.3 Ensaio com adultos.....	62
12.3.1 Avaliação dos parâmetros físico-químicos da água de <i>zebrafish</i>	62
12.3.2 Análises histológicas	65
12.3.3 Frequência de Micronúcleos e de Anomalias Nucleares.....	66
12.3.4 Ensaio do Cometa.....	67
12.3.5 Marcadores bioquímicos	69
12.3.5.1 Atividade de acetilcolinesterase	69
12.3.5.2 Atividade de glutational-S-transferase.....	71
12.3.5.3 Atividade de lactato desidrogenase	73
13. Discussão sobre os ensaios com <i>zebrafish</i>	75
14. Conclusão	81
CAPÍTULO III – ENSAIOS COM O CARAMUJO <i>BIOMPHALARIA GLABRATA</i>	
.....	82
15. Cultivo e manutenção de <i>Biomphalaria glabrata</i>	82
16. Delineamento experimental com <i>Biomphalaria glabrata</i>	83
16.1 Ensaio de depuração em juvenis de <i>B. glabrata</i>	83
16.2 Ensaio com adultos de <i>B. glabrata</i>	84
16.2.1 Ensaio agudo	85
16.2.2 Ensaio de recuperação	85
16.3 Preparo das amostras.....	85
17. Marcadores	87
17.1 Parâmetros físico-químicos da água de <i>B. glabrata</i>	87
17.2 Concentração de proteína total.....	87
17.3 Concentração de glicose.....	88
17.4 Atividade de lactato desidrogenase	88
17.5 Atividade de acetilcolinesterase.....	89
17.6 Atividade de glutational-S-transferase	89
18. Resultado do ensaio de depuração com juvenis de <i>B. glabrata</i>	90
19. Resultados dos ensaios com adultos de <i>B. glabrata</i>	92
19.1 Resultados do ensaio de depuração com adultos de <i>B. glabrata</i>	92
19.2 Avaliação dos parâmetros físico-químicos da água de <i>B. glabrata</i>	95

<u>19.3</u>	<u>Concentração de proteína total</u>	<u>96</u>
<u>19.4</u>	<u>Concentração de glicose</u>	<u>97</u>
<u>19.5</u>	<u>Atividade de lactato desidrogenase</u>	<u>98</u>
<u>19.6</u>	<u>Atividade de acetilcolinesterase</u>	<u>99</u>
<u>19.7</u>	<u>Atividade de glutathione-S-transferase</u>	<u>100</u>
<u>20.</u>	<u>Discussão sobre os ensaios com <i>Biomphalaria glabrata</i></u>	<u>101</u>
<u>21.</u>	<u>Conclusão</u>	<u>105</u>
<u>22.</u>	<u>Considerações finais</u>	<u>105</u>
	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>106</u>
	<u>Apoio Financeiro</u>	<u>126</u>
	<u>ANEXO I – Formulário Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA)</u>	<u>127</u>

1. Introdução

Os materiais plásticos possuem uma alta versatilidade, e por isso, estão em todos os setores da indústria e no nosso cotidiano (ABIPLAST, 2021), o que acaba facilitando a sua presença em diferentes habitats, o que faz com que ele seja um poluente emergente. Quando descartados de forma irregular eles alcançam lagos, rios e oceanos (WANG et al. 2022).

Em virtude da sua densidade, alta ou baixa, eles podem estar na coluna d'água, na superfície ou ainda no fundo (LEBRETON et al. 2017), e desta forma eles estão disponíveis para organismos de diferentes níveis tróficos, podendo agir como nova estratégia alimentar, se bioacumulando (MILLER; KROON, 2020), ou mesmo, sendo usados como substrato para que espécies exóticas e invasoras atinjam outros ambientes (NOAA MARINE DEBRIS PROGRAM, 2017).

Na natureza eles acabam sofrendo a ação de fatores físicos e químicos, como a luz solar, radiação UV e chuva (MANUEL et al. 2022; BADEA; BALAS, DINISCHIOTU, 2023), e assim, eles se fragmentam atingindo variados tamanhos, sendo classificados como microplásticos (MPs), nanoplásticos (NPs) de acordo com o seu diâmetro.

Os MPs são definidos como plásticos menores que 5 mm (< 5 mm) (UNITED NATIONS ENVIRONMENTAL PROGRAMME, 2016; FRIAS; NASH, 2019; BADEA; BALAS; DINISCHIOTU, 2023) e estão distribuídos no solo, em ambientes de água doce ou marinha (XU et al. 2020a). Eles podem adsorver poluentes orgânicos, metais, hormônios, antibióticos, antidepressivos, agrotóxicos (LI; ZHANG; YU et al. 2018; ZHANG, 2018; WU et al. 2023) e afetar a saúde humana por meio de processos de biomagnificação ou via ingestão direta (YAN et al. 2022).

Muitos estudos relatam a ocorrência de MPs em organismos marinhos, sobretudo naqueles usados na alimentação humana como ostras e mexilhões (EXPÓSITO et al., 2022; BOSKOVIC; JOKSIMOVIC; BAJT, 2023; MANOLAKI et al. 2023), e aqueles que servem como base de cadeia alimentar, como zooplânctons (COLE et al. 2013; AMIN et al. 2020; ZAVALA-ALARCON et al. 2023).

Em peixes a bibliografia é grande, todavia, percebe-se que poucos trabalhos realizam ensaios com diferentes tempos de exposição, ou com período de recuperação. Em invertebrados a diferença é clara, poucos estudos relatam os efeitos

negativos de MPs em macroinvertebrados bentônicos (REDONDO-HASSELERHARM et al. 2020), sobretudo, em estudos de ecotoxicidade em laboratório, pois a maioria ainda realiza a coleta de amostras em campo para a identificação de MPs (RODRIGUES; SALLA; ROCHA, 2023). Neste contexto, a realização de ensaios de ecotoxicidade em peixes e invertebrados de água doce se fazem necessários pois dados sobre ecotoxicidade de plásticos nesses organismos ainda são limitados (WAGNER et a. 2014).

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. Plástico

O plástico é um polímero orgânico derivado da polimerização de monômeros que podem ser extraídos tanto do petróleo quanto do gás natural. A produção do plástico em larga escala começou por volta de 1940 (COLE et al. 2011), e desde então ele se tornou um grave problema ambiental, sobretudo no ambiente aquático.

A origem do plástico que se conhece atualmente ocorreu em 1909 com Leo Hendrik Baekeland, um químico belga que produziu uma resina sintética à prova de calor e com grande capacidade isolante elétrica, o polioxibenzimetilenglicolanidrido, também conhecido como baquelite, resina termofixa obtida do fenol e do formaldeído, esse foi considerado o primeiro polímero artificial (PARENTE, 2006; LOUREIRO, 2021). Atualmente, os plásticos são derivados da nafta, subproduto do petróleo (ABIPLAST, 2017).

Os polímeros podem ser de origem natural, como a seda e a celulose, ou sintética, como os termoplásticos ou plásticos, termofixos, borrachas e fibras. O plástico é definido como uma classe de polímeros orgânicos sintéticos que passam para o estado plástico quando submetidos a elevadas temperaturas e pressão, de forma isolada ou em conjunto (LETRAS, 2008). Em virtude do comportamento térmico destes polímeros durante o seu processamento eles podem ser classificados em: termoplásticos ou plásticos, os que amolecem quando aquecidos e podem passar por esse processo inúmeras vezes; e os termofixos ou termorrígidos, que não são facilmente moldáveis por aquecimento. Desta forma, os termofixos tendem a ser mais rígidos que os termoplásticos (DIAS, 2016).

Segundo a Associação Brasileira da Indústria do Plástico (ABIPLAST) (2021), em 2020 foram produzidos no mundo cerca de 367 milhões de toneladas de resinas plásticas, o que inclui: termoplásticos, termofixos, poliuretanos, elastômeros, adesivos, revestimento e outro; e 373 milhões de toneladas transformados em plásticos. Desse número, o Brasil detém 2 % das resinas e 1,9 % da transformação plástica. Além disso, estima-se que até 2050 a produção mundial de resíduos plásticos atinja a marca de 1,1 bilhão de toneladas, sendo que até o ano de 2017 a produção foi de cerca de 7 bilhões de toneladas de resíduos (GEYER, 2020).

No Brasil, os dados mostram que os plásticos mais consumidos em 2020 foram o polipropileno (PP – 20,1 %) e os polietilenos de alta densidade (PEAD – 12,5 %), de baixa densidade (PEBD – 8%) e o linear de baixa densidade (PEBDL – 12,3 %), sendo o PET (polietileno tereftalato) o mais reciclado pós-consumo nesse mesmo ano, 53,5 %, e o menos reciclado o PEBD/PEBDL com apenas 10,1 % (ABIPLAST, 2021).

Neste contexto, as embalagens plásticas podem ser classificadas de acordo com o tipo de material plástico, a figura 1 ilustra os tipos (ABIPLAST, 2018; SOUSA; BARATA, LINHARES, 2020).

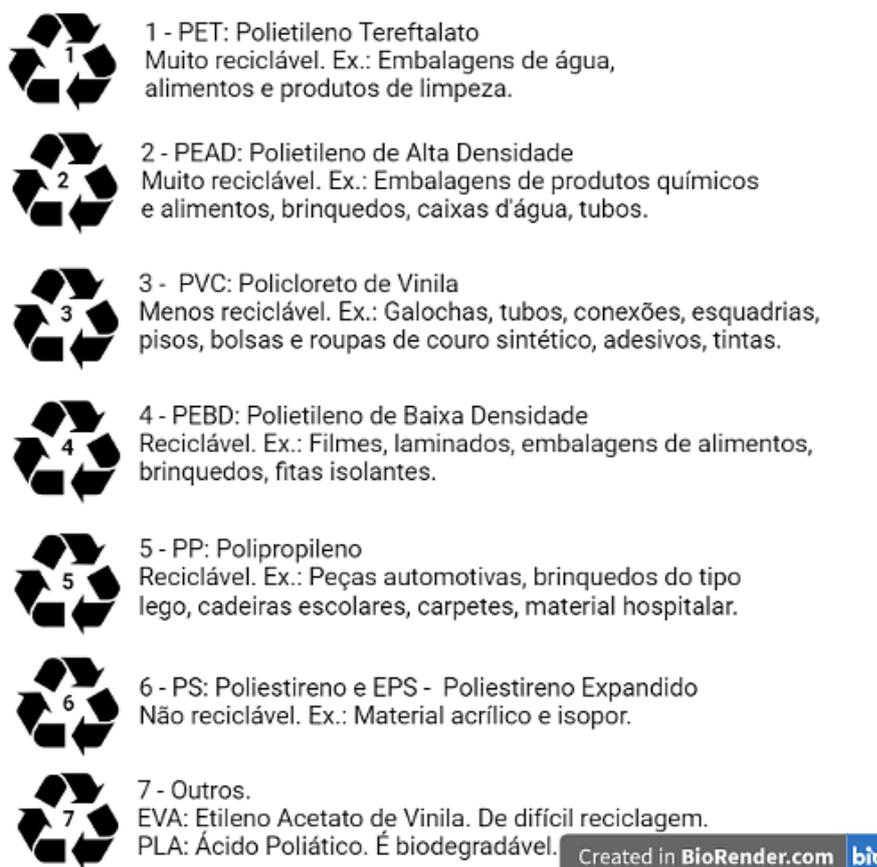


Figura 1. Tipos de embalagens plásticas de acordo com o tipo de plástico.
Fonte: (AUTORIA PRÓPRIA, 2023).

Em 2019 foi divulgado que o Brasil ocupa a quarta posição em geração de resíduos plásticos, ficando atrás dos Estados Unidos da América (EUA), China e Índia (WWF, 2019). Com isso, com base na Lei Federal nº 12.305 de 2010, que institui a política nacional de resíduos sólidos (BRASIL, 2010), muitos Estados brasileiros estão proibindo o uso e distribuição de sacolas plásticas gratuitas em supermercados, como forma de diminuir os impactos gerados por este poluente.

Isso traz à tona a problemática ambiental do plástico, pois a versatilidade desses materiais permite que eles estejam em diferentes setores como na construção civil, na medicina e na indústria alimentícia (ABIPLAST, 2021). Logo, o consumo desenfreado desses produtos ocasiona danos ambientais irreparáveis e imensuráveis, pois quando no ambiente, expostos a fatores físicos e químicos, eles podem se fragmentar e se transformar em pellets, fibras, filmes, esferas, micro ou nanopartículas plásticas (COLE et. al., 2011), o que facilita a sua ingestão por organismos aquáticos e terrestres, e conseqüentemente, a sua presença em diferentes níveis tróficos.

Dentre os produtos plásticos, para MPs, Frias e Nash (2019) propuseram um consenso quanto a sua definição “quaisquer partículas sólidas sintéticas ou de matriz polimérica, com forma regular ou irregular, com tamanho variando entre 1 µm a 5 mm, de qualquer origem de fabricação e que sejam insolúveis em água”. Em 2020, a norma ISO/TR 21960 definiu os MPs como quaisquer partículas plásticas sólidas insolúveis em água com dimensões entre 1 µm e 1000 µm. Isso significa que a literatura apresenta diferentes formas de classificação dos MPs em virtude do seu tamanho ou diâmetro, o que algumas vezes foge das dimensões adotadas para o padrão de milímetro, micrometro e nanômetro.

Com relação as dimensões dos materiais plásticos, os NPs são partículas com 1 e 100 nm (BADEA; BALAS; DINISCHIOTU, 2023), o *pellet* virgem refere-se ao material plástico que foi recém produzido pela indústria e é destinado a produção de itens plásticos, ele também é conhecido como grânulos ou *nibs* (FISNER, 2012; BADEA; BALAS; DINISCHIOTU, 2023).

2.1 Plástico e meio ambiente

O plástico é um poluente emergente e onipresente de magnitude mundial (MONTAGNER et al. 2021; FREIRE et al. 2023), eles estão presentes na água, no ar e no solo, nas plantas e nos humanos (AMELIA et al. 2021), e por isso, eles representam um risco à vida dos organismos (WEBB et al. 2013). No ambiente eles podem levar até 100 anos para se degradar totalmente (CHAMAS et al. 2020), sendo que isso pode variar dependendo do ambiente ao qual são expostos.

Chamas e colaboradores (2020) usaram a taxa de degradação de superfície específica (SSDRs) para extrapolar meia-vidas de diferentes materiais plásticos e em

diferentes ambientes, e mostraram que o mesmo tipo de plástico, tal como os PEAD, podem ter diferentes taxas de degradação em diferentes ambientes de exposição, ou seja, uma garrafa PEAD tem meia-vida estimada em 58 anos e de 1200 anos quando na forma de tubo, já o ácido polilático (PLA) em terra se degrada 20 vezes mais rápido do que no ambiente marinho.

Os plásticos podem também sofrer com a ação de microrganismos que participam do seu processo de degradação, mas características como uma alta massa molar média e hidrofobicidade dificultam a ação deles sob o plástico, o que faz com que ele possa ter um tempo de vida ainda mais elevado do que o esperado (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006). Eles também sofrem com a ação química ou biológica, tais como radiação, luz solar, chuva, ação de compostos químicos biodisponibilizados, ou mesmo a ação mecânica do homem, de animais, ou de microrganismos. Isso promove a redução do material plástico, se transformando em micro ou NPs (MANUEL et al. 2022).

O uso de materiais plásticos está inserido no nosso contexto diário, eles estão nas cerdas de escovas de dentes e vassouras, em roupas como fibras de tecido poliamida (nylon), em embalagens para indústria alimentícia (isopor, filme PVC), médica e na construção civil (caixas d'água, conectores e tubos, isolantes térmicos) etc. (ABIPLAST, 2021).

Outro problema para o qual muitos não se atentam é para o uso de MPs durante o festejo de Carnaval, em forma de purpurina e glitter. O glitter é um poliéster feito de polietileno tereftalato (PET), insolúveis em água, revestidas por metal, alumínio, para obter refletividade. De forma geral são classificados como MPs em virtude do seu tamanho < 5 mm (YURTSEVER, 2019). Eles também são usados em produtos de beleza, maquiagem, óleos de corpos, esfoliantes corporais e faciais, brilho labial, esmaltes. Isso acaba refletindo na forte presença desse tipo de plástico em águas de estações de tratamento de esgoto (XU et al. 2020a), sobretudo em países onde o saneamento básico não atende a real demanda local.

Em 2020 (PORTALCORREIO), a Companhia de Água e Esgotos da Paraíba (CAGEPA) alertou para o uso do glitter durante o Carnaval, tendo em vista que em virtude do seu tamanho, os MPs não são filtrados pelas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), com isso, o efluente acaba sendo uma fonte rica de MPs.

Dessa forma, tanto de forma indireta quando direta, os MPs atingem o homem. Pois, alguns estudos já identificaram a presença de plásticos nos pulmões (AMATO-

LOURENÇO et al. 2021) e mesmo na placenta de humanos (RAGUSA et al. 2021; ZHU et al. 2023). E em crianças, ainda faltam estudos que quantifiquem o quanto elas estão expostas a esses poluentes, NPs e MPs, nas escolas (SRIPADA et al. 2022).

Como consequência desse derrame desenfreado de plásticos no ambiente, em 2001 Moore e colaboradores descobriram uma extensa área no Giro do Pacífico Norte que contém resíduos de plástico acumulados. A concentração de plásticos encontrados foi seis vezes maior à de plânctons coletados na mesma área. Eles também estão presentes na zona pelágica, em praias, e em zona e sedimentos costeiros. Esse dado alertou a comunidade científica para a problemática que envolve o consumo demasiado de plástico e, sobretudo, o seu destino final (IMHOF et al. 2013; MCCORMICK et al. 2014).

Os giros oceânicos são resultados de correntes formadas pelo vento e que por conta do movimento de rotação da Terra, são no sentido horário no hemisfério norte, e no anti-horário no hemisfério sul, eles ocorrem no Pacífico, no Atlântico e no Oceano Índico (MENDES; SOARES-GOMES, 2007). Assim como ocorre no giro do Pacífico Norte, no giro subtropical do Atlântico Norte também foi detectado a presença de resíduos plásticos (LAW et al. 2010), e nas águas e em organismos do Pacífico Leste e nas Ilhas Galápagos (ALFARO-NÚÑEZ et al. 2021).

A distribuição global dos MPs já atingiu os mares do Continente Antártico. MPs foram encontrados tanto em águas superficiais como em sedimentos nas águas oceânicas da Baía do Almirantado onde se localizam as Estações de Pesquisa Machu Picchu (Peru), Comandante Ferraz (Brasil) e Henryk Arctowski (Polônia). Suspeita-se que essas contaminações sejam provenientes dessas bases de pesquisa, além do descarte de navios (WALLER et al. 2017).

No Brasil, um estudo realizado em rios e em uma baía adjacente identificou 44,6 MPs/m³ em regiões de pluma, em época de alta precipitação, e 4,0 MPs/m³ em períodos de baixa precipitação. Eles confirmaram ainda que, o transporte de MPs do rio para o ambiente costeiro é influenciado pela variação temporal (LIMA et al. 2023).

Drabinski e colaboradores (2023), coletaram amostras ao longo de três rios no estado do Rio de Janeiro – RJ, e identificaram plásticos em todas as amostras, sendo predominante amostras do tipo fibra (67,3 %), quanto ao tipo de polímero os de PE, fibras de poliéster e polietileno de alta densidade (PEAD) corresponderam a 50 % dos identificados. Além disso, eles mostraram que a concentração de MPs está relacionada ao nível de urbanização.

Em uma revisão sistemática, pesquisadores constataram que apenas 16 % dos estudos na América Latina correspondem a identificação de MPs em água doce e 59 % se referem ao ambiente marinho (FERNANDES et al. 2022). Isso acaba refletindo na defasagem de pesquisas no ambiente de água doce, sendo que esse ambiente muitas vezes funciona como reservatório de materiais plásticos (ALMEIDA et al., 2023), e nos traz ainda, um alerta para que associações dos efeitos tóxicos de MPs sejam feitas em todos os elementos desse cenário (BADEA; BALAS, DINISCHIOTU, 2023).

À vista disso, percebe-se que os resíduos plásticos conseguem atingir todos os locais do mundo, seja diretamente como o derrame e uso de produtos, ou indiretamente, via aterros, incineração de resíduos, e estações de tratamento de águas residuais (WARD; KACH, 2009). As emissões provenientes de fontes terrestres primeiro alcançam os rios e através do transporte fluvial elas conseguem atingir oceanos, além das próprias emissões diretas nos oceanos (McCORMICK et al. 2014).

2.2 Plástico e poluentes

Desde o início dos anos 1990 tem se alertado para a interação do plástico com compostos químicos que podem afetar a saúde humana e o meio ambiente, tais como os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs). Eles foram assim definidos pela Convenção de Estocolmo 2004, por possuírem potencial tóxico e serem resistentes à degradação ambiental por meio de processos químicos, biológicos e fotolíticos. São exemplos de compostos definidos como POPs: Bifenila Policlorados (PCBs), éteres difenílicos polibromados (PBDEs), pesticidas organoclorados (OCPs), substâncias perfluoroalquiladas, ácido sulfônico perfluorooctano (PFAs/PFOS) e dibenzodioxinas/furanos policlorados (PCDD/Fs) (WORM et al. 2017; CHAKRABORTY et al. 2022).

Vários efeitos adversos decorrentes da exposição aos POPs são observados, entre os quais os causados pelos PCBs, que suprimem o sistema imunológico e são carcinogênicos (CARPENTER, 2006), já os PBDEs assim como as dioxinas agem como desreguladores endócrinos, possuem efeito sob a tireoide assim como interfere na qualidade do sêmen e na saúde neonatal (SINGH et al. 2022), e os organoclorados, substâncias usadas em pesticidas cancerígenas, são associadas a câncer de pulmão,

próstata, mieloma múltiplo e cólon (VARGHESE et al. 2020), além de estarem associados a neurotoxicidade e doenças como o Parkinson (COSTA, 2015).

Estes poluentes podem ser adicionados ao plástico durante o seu processo de produção - como o uso de retardantes de chama como as bifenilas polibromadas (PBBs) e éteres difenílicos policromados - ou serem adsorvidos ao plástico quando em contato com eles no ambiente (PIERONI; LEONEL; FILLMANN, 2017; CHAKRABORTY et al. 2022).

Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs), hexa-cloro-ciclo-hexano (HCH), diclorodifeniltricloroetano (DDT), nonilfenol (NP), benzenos clorados e dioxinas também podem ser adsorvidos no plástico (AVIO et al. 2015). A adsorção depende tanto das características do polímero quanto do poluente, sendo que densidade, hidrofobicidade e peso molecular interferem nessa adsorção (OKOYE et al. 2022).

Em 2011 Hirai et al. analisaram amostras plásticas de aproximadamente 10 mm coletadas no Giro do Pacífico, Oceano Pacífico, Mar do Caribe e detectaram POPs em concentrações de 1/10.000 ng/g. Sobral et al. (2011) encontraram POPs em todas as amostras plásticas coletadas na Costa Portuguesa, as concentrações de PAH foram de 0,2 a 319,6 ng/g⁻¹ (*pellets* pretos e envelhecidos possuem maior capacidade de adsorção), 0,16 a 4,05 ng/g⁻¹ de bifenila policlorada (PCB), os *pellets* envelhecidos também mostraram maior capacidade de adsorção desse composto. Vedolin (2014) identificou a presença de metais tanto em *pellets* virgens quando em plásticos coletados em praias do litoral de São Paulo. Porém verificou-se que os fragmentos plásticos coletados possuíam maior capacidade de adsorver metais do que *pellets* virgens, em virtude do desenvolvimento de sítios de adsorção na superfície para realização de foto-oxidação, incrustação e deposição de sedimentos finos durante a exposição ambiental.

Outros poluentes também podem ser adsorvidos pelo material plástico, o ftalato, por exemplo, que dá maleabilidade ao plástico e age como um desregulador endócrino (WANG; QIAN, 2021) já foi detectado a concentração de 6,09 ng/g em amostras de MPs coletadas na China (ZHANG et al. 2018). Antibióticos como amoxicilina, ciprofloxacino, sulfadiazina, trimetoprima e tetraclicinas têm sido recentemente detectados em amostras de MPs. Poliamida (PA) encontrados em água doce possuem maior capacidade de adsorver esses antibióticos que outros MPs, a capacidade de adsorção foi ainda maior em água doce do que em água do mar (LI; ZHANG; ZHANG, 2018). O desregulador endócrino biosfenol-A e seus derivados

também já foram detectados em amostras de lixo plástico e em tecido de peixes em amostras coletadas na Espanha, confirmando que o plástico age como vetor de contaminação para esse composto (GIL-SOLSONA et al. 2022).

Outro trabalho (YU et al. 2021), desta vez com o herbicida glifosato e MPs de poliestireno, mostrou que quando associados eles possuem a capacidade de ativar o sistema antioxidante da planta *Salvinia cucullata* aumentando a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). Esse mesmo pesticida foi recentemente também detectado em amostras de água superficial e subterrânea em áreas agrícolas e de nascente da Bacia Hidrográfica do Rio Preto (que abrange os estados do Distrito Federal, Goiás e Minas Gerais) (PIRES et al. 2023), o que significa que a população desses estados, sobretudo aqueles da zona rural, estão frequentemente expostos a esses compostos de elevado potencial cancerígeno. E isso, se juntando ao derrame inapropriado de resíduos plásticos pode ser intensificado com uma possível ação sinérgica. Em ecotoxicologia, este fenômeno é denominado de “efeito cavalo de troia”, quando os MPs adsorvem poluentes orgânicos, e ao serem ingeridos pelos organismos, que os confundem com alimento, carregam então para dentro deles.

2.3 Plástico e biota aquática

Os MPs estão presentes em vários locais, inclusive nos mais remotos, desde a Antártica (AVES et al. 2022) ao fundo dos oceanos (BERGMANN et al. 2017), e por isso, estes materiais podem ser frequentemente ingeridos por animais de diferentes níveis tróficos.

Poliquetas (KNUTSEN et al. 2020), bivalves (BOSKOVIC; JOKSIMOVIC, BAJT, 2023), zooplânctons (ZAVALA-ALARCON et al. 2023) e aves marinhas (FACKELMANN et al. 2023) em diferentes fases de vida podem consumir MPs disponíveis no ambiente. E isso faz com que essas partículas sejam biomagnificadas ao longo da cadeia alimentar e chegue até o consumo humano (MILLER; KROON, 2020).

Boskovic, Joksimovic e Bajt (2023), identificaram três tipos de MPs em mexilhões destinados ao consumo humano. Polietileno, polipropileno e tereftalato de polietileno foram identificados em 53 % dos animais coletados. Expósito et al. (2022) verificaram níveis de 22,8 e 18,6 de MPs em ostras e mexilhões, respectivamente.

Assim como, os MPs também foram identificados em zooplanktons, que servem de alimento para esses moluscos (COLE et al. 2013; ZAVALA-ALARCON et al. 2023).

Em mamíferos, Nelms et al. (2019) analisaram amostras dos tratos digestivos de cetáceos e pinípedes, e verificaram uma maior quantidade de plásticos no estômago do que no intestino. Além disso, percebeu-se que os animais que morreram de doença infecciosa tinham maior quantidade de plástico do que os que morreram por trauma ou outros fatores. Outro trabalho, com aves marinhas, identificou plástico em todos os órgãos analisados: rins, baço, proventrículo e estômago. E constataram efeitos subletais, a nível celular e tecidual (RIVER-AUTY et al., 2023).

Em organismos de água doce, os plásticos foram observados em peixes em um rio na Argentina (BLETTER et al. 2019). Na Suíça, plásticos contaminados com POP foram encontrados no intestino de peixes e aves (FAURE et al. 2015). Na China, MPs foram encontrados no caramujo *Bellamyia aeruginos* (XU et al., 2020b) e no Michigan (EUA), os pesquisadores perceberam que o quanto maior o peixe maior o número de partículas neles, e que isso também está ligado às características alimentares do peixe (MCNEISH et al. 2018).

Recentemente, Walkinshaw et al. (2022), relataram que além da contaminação que ocorre no seu habitat natural, peixes destinados ao consumo humano, mantidos em tanques de criação, podem se contaminar através do farelo de soja que lhes é ofertado. E em organismos produtores, verificou-se que diferentes concentrações de glitter interferiram no crescimento das cianobactérias de água doce *Microcystis aeruginosa* e *Nodularia spumigena* (MACHADO et al. 2023).

Um outro trabalho com peixes identificou a transferência trófica ao expor alevinos de *Poecilia reticulata* (guppy), à PE MPs e em seguida ofertá-los como alimento ao *Danio rerio* (zebrafish) (ARAÚJO et al. 2020).

Neste contexto, o problema ambiental acerca do consumo de material plástico envolve diferentes fatores, tais como a destinação final deles, os efeitos adversos que eles podem ter sob a biota aquática, a bioacumulação deles em organismos que podem ser consumidos pelo homem como crustáceos, moluscos e peixes, e seu potencial de transferência trófica.

Segundo Callisto et al. (2005), o uso de organismos bioindicadores pode indicar a magnitude de impactos ambientais em um ecossistema aquático e sua bacia de drenagem. Os macroinvertebrados bentônicos são eficientes para a avaliação e monitoramento de impactos de atividades antrópicas em ecossistemas aquáticos

continentais. Muitos deles alimentam-se de matéria orgânica produzida na coluna d'água e são importantes componentes da dieta de peixes, anfíbios e aves aquáticas, e por isso transferem a energia obtida da matéria orgânica morta retida no sedimento para os animais que deles se alimentam.

O aumento da produção e o uso dos plásticos pela sociedade têm gerado preocupações sobre o seu impacto no ambiente aquático. Muitos estudos focam na ingestão desses detritos por aves marinhas em função da sua capacidade de regurgitação, ou em outros organismos aquáticos. Todavia, pouco ainda se sabe sobre os efeitos da ingestão desses MPs em organismos de água doce (MOORE et al. 2001; BADEA; BALAS, DINISCHIOTU, 2023).

3. Ensaio ecotoxicológicos

A Ecotoxicologia é a ciência dos contaminantes da biosfera, ela tem um objetivo abrangente de explicar e prever fenômenos de efeitos ou exposições em vários níveis de organização biológica (GIULIO; NEWMAN, 2019). Ou seja, ela estuda o efeito das substâncias sobre os organismos vivos e a interação delas no ambiente, com exposição a curto ou longo prazo (SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015).

Uma das áreas de concentração da ecotoxicologia é a ecotoxicologia aquática, que se refere aos estudos dos efeitos adversos de contaminantes em corpos hídricos se utilizando ainda, de organismos aquáticos como indicadores de qualidade ambiental. Os primeiros ensaios nesse sentido datam de 1800, com insetos aquáticos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

A publicação do livro “Primavera Silenciosa”, de Rachel Carson, ainda em 1962, foi o divisor entre a Ecotoxicologia e a Toxicologia Clássica. No livro, a autora relaciona o uso indiscriminado de pesticidas nos anos de 1940 a 1950 a efeitos de malformações de ovos de pássaros e outros efeitos de contaminação no ecossistema. Desde então, vários países começaram a regulamentar o uso de produtos químicos e biológicos (WERNER; HITZFELD, 2012).

A exemplo disso, muitas organizações adotam, normatizam e regulamentam bioensaios para a avaliação de toxicidade em organismos indicadores de qualidade ambiental. Um exemplo disso temos a OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) que é uma organização intergovernamental, a ABNT

(Associação Brasileira de Normas Técnicas), CETESB (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO). As duas últimas elaboram e servem de respaldo para a realização de ensaios ecotoxicológicos no Brasil. Elas indicam o uso de organismos bioindicadores e cita que eles devem ser abundantes e de grande disponibilidade, de significativa representação ecológica, prévio conhecimento de sua biologia e hábitos alimentares, apurada importância ambiental e comercial, e de fácil cultivo (SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015).

Após busca foram encontradas 22 normas técnicas que regulam os ensaios ecotoxicológicos no Brasil. A tabela 1 mostra as normas técnicas vigentes neste país.

Tabela 1. Normas técnicas brasileira de ecotoxicologia.

Agência Norma	Descrição
ABNT NBR ISO 17616: 2010	Qualidade do solo – Guia para a seleção e a avaliação de bioensaios para caracterização ecotoxicológica de solos e materiais de solo.
ABNT NBR ISO 17512- 1: 2011	Qualidade do solo – Ensaio de fuga para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento
ABNT NBR ISO 15799: 2011	Qualidade do solo – Guia para caracterização ecotoxicológica de solos e materiais de solo
ABNT NBR ISO 16387: 2012	Qualidade do solo – Efeitos de poluentes em Enchytraeidae (<i>Enchytraeus</i> sp.) – Determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência.
ABNT NBR ISO 11269-2: 2014	Qualidade do solo – Determinação dos efeitos de poluentes na flora terrestre
ABNT NBR 15537: 2014	Ecotoxicologia terrestre – Toxicidade aguda – Método de ensaio com minhocas (Lumbricidae)
ABNT NBR 15638: 2015	Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Métodos de ensaio com anfípodos marinhos e estuarinos em sedimentos.
ABNT NBR 12648: 2018	Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)
ABNT NBR 15469: 2021	Ecotoxicologia – Coleta, preservação e preparo de amostras.
ABNT NBR 15470: 2021	Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda e crônica – Método de ensaio com <i>Hyalella</i> sp (Amphipoda) em sedimentos
ABNT NBR 15411-1: 2021	Ecotoxicologia aquática – Efeito inibitório sobre a bioluminescência de <i>Vibrio fischeri</i>
ABNT NBR 16723: 2021	Ecotoxicologia aquática — Método de ensaio com copépodos marinhos e estuarinos (Copepoda, Crustacea)
ABNT NBR 16530: 2021	Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com <i>Artemia</i> sp (Crustacea, Brachiopoda)
ABNT NBR 16181: 2021	Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com microalgas marinhas
ABNT NBR 16456: 2022	Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio de curta duração com embriões de mexilhões (Mollusca – Bivalvia)
ABNT NBR 15499: 2022	Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com peixes
ABNT NBR 15088: 2022	Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes (Cyprinidae)
ABNT NBR 12713: 2022	Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com <i>Daphnia</i> sp (Crustacea, Cladocera)
ABNT NBR 15350: 2023	Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)
ABNT NBR 15308: 2023	Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com misídeos (Crustacea)
CETESB L5.228 1988	Teste de toxicidade aguda utilizando <i>Spirillum volutans</i> – Método de ensaio

Fonte: AUTORIA PRÓPRIA (2023).

Além das normas técnicas, a legislação vigente, a resolução CONAMA nº 357 (BRASIL, 2005) prevê ensaios de ecotoxicidade para averiguar interações entre substâncias e contaminantes, e efeitos tóxicos em organismos. O decreto nº 4074 (BRASIL, 2002) estabelece que para a regulação de agrotóxicos na fase II devem ser realizados testes de toxicidade para animais superiores, como por exemplo roedores,

e na fase III, testes de ecotoxicidade em organismos aquáticos e terrestres, como *Daphnia*, algas, peixes, aves, abelhas, de acordo com o produto pretendido.

No cenário internacional, os *guidelines* da OECD para ensaios de produtos químicos, refletem métodos de ensaios acordados internacionalmente, utilizados por diferentes setores da indústria e do governo para caracterizar e identificar os potenciais perigos de produtos químicos. Por exemplo, o *guideline* n^o 236 (OECD, 2013), usado neste trabalho, destina-se a determinar a toxicidade aguda ou letal de produtos químicos em estágios embrionários de peixes, entre eles o da espécie *D. rerio*. Logo, essas normas, assim como outras, dão o respaldo legal para a realização de ensaios de ecotoxicidade.

4. Organismos bioindicadores

As normas ou *guidelines* internacionais preveem a utilização de organismos bioindicadores, para se estudar a interação de contaminantes com o ambiente. Organismos bioindicadores são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas cuja presença, quantidade e distribuição indicam a magnitude de impactos ambientais em um ecossistema aquático e sua bacia de drenagem. Sua utilização permite a avaliação integrada dos efeitos ecológicos causados por múltiplas fontes de poluição (CALLISTO et al. 2005).

Os organismos bioindicadores envolvem todos os táxons, por exemplo, o nematodo *Caenorhabditis elegans* é usado como modelo em estudos de desenvolvimento, neurotoxicidade, sendo sensível à vários contaminantes (QUEIRÓS et al. 2019). *Daphnias* são crustáceos planctônicos com ciclo de vida partenogênico cíclico e é um modelo ecológico em estudos de toxicidade bem estabelecido. Este gênero está distribuído no mundo todo, tanto em ambientes de água doce quanto água salobra, muito sensíveis elas desempenham um papel crítico nesses tipos de ensaios (OLIVEIRA-FILHO; NAKANO; TALLARICO, 2017; EBERT, 2022).

Outros organismos considerados base de cadeia alimentar também se destacam como importantes ferramentas de estudo, algas unicelulares como *Raphidocelis subcapitata*, que são mundialmente distribuídas em corpos de água doce e solos são usadas em estudos de ecotoxicidade em virtude de suas funções

metabólicas que podem ser alteradas por agentes químicos introduzidos no ambiente (JONSSON, 2005).

Dentro da cadeia alimentar, peixes desempenham papel importantíssimo em virtude do consumo humano. O peixe tropical teleósteo *Danio rerio* (F. Hamilton, 1822), da família Cyprinidae, é conhecido na comunidade científica como *zebrafish*, e no Brasil como paulistinha (GRISOLIA, 2021), é mundialmente utilizado como modelo em ensaios ecotoxicológicos, como em estudos de desenvolvimento embrionário, fisiologia, genética e toxicologia (SILVA, 2015). Ele foi introduzido como modelo para estudo genético em 1980 e produz centenas de embriões translúcidos (CHOI et al. 2021), o que permite avaliar o potencial tóxico de substâncias ao longo do seu desenvolvimento embriolarval.

Por ser um modelo bem estabelecido, informações sobre sua morfologia, bioquímica, genética e fisiologia já são bem conhecidas, fazem com que *D. rerio* seja um dos modelos ideais para estudar efeitos adversos (CANEDO; ROCHA, 2021; OLIVEIRA et al. 2021). Além dos mais, sua manutenção laboratorial é significativamente simples (GRISOLIA, 2021).

Ele tem sido utilizado com recorrência em ensaios para avaliar estresse químico e embriotoxicidade (ANIFOWOSHE, A.T. et al. 2022; PIAU et al. 2022), genotoxicidade (CANEDO; ROCHA, 2021; ANIFOWOSHE, A.T. et al. 2022) e alterações histológicas (RAMOS et al. 2022), o que confirma a sua importância em estudo de toxicidade e o seu papel como organismo bioindicador.

Ademais, organismos bentônicos também estão sendo mundialmente utilizados como indicadores de qualidade ambiental, pois são sensíveis a vários tipos de degradação ambiental e respondem diferentemente a um amplo espectro de nível e tipos de poluição (FERNANDES, 2007).

Os invertebrados do filo Mollusca se destaca por sua importância médica, veterinária e econômica. A classe Gastropoda constitui cerca três quartos do número total de espécies do filo e inclui organismos transmissores de doenças como a esquistossomose e helmintoses. A classe Bivalvia se destaca pelas espécies usadas na alimentação humana (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008) e por espécies muito usadas em ensaios de ecotoxicidade, sobretudo as marinhas, como ostras e mexilhões (EXPÓSITO et al., 2022; BOSKOVIC; JOKSIMOVIC; BAJT, 2023).

No Brasil, o caramujo pulmonado de água doce *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Gastropoda; Planorbidae), raspador, hermafrodita, e hospedeiro intermediário

do parasita trematoda *Schistosoma mansoni* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008), se destaca pela sua versatilidade em busca alimentar, sendo encontrado em vários tipos de ambiente (FREITAS; SANTOS, 1995). No Brasil, eles podem ser encontrados em vários estados: Alagoas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, São Paulo e Sergipe. É uma espécie susceptível pois pode se infectar com todas as linhagens de *S. mansoni* (CARVALHO, 2008).

Em estudos eles são usados em ensaio de marcadores de estresse químico como acetilcolinesterase (CHIANG et al. 1972), concentração de glicogênio e ácido úrico (ANSALDO et al. 2006; MELLO-SILVA et al. 2010), e também em ensaios de genotoxicidade, como no ensaio do cometa (GRAZEFTE et al. 2008).

Considerando que *B. glabrata* possui hábitos bentônicos, pois se movem e rastejam no fundo de corpos d'água, eles são um importante modelo ecotoxicológico quando se pretende testar materiais que podem tanto ficar na coluna d'água ou no fundo (OLIVEIRA-FILHO et al. 2019), comportamento esse apresentado por materiais plásticos de diferentes densidades.

5. Marcadores de toxicidade

Com a crescente liberação de produtos no ambiente, ensaios de avaliação de toxicidade são requeridos, entre eles o ensaio de embriotoxicidade ou *Fish Embryo Toxicity Test* (FET), que tem como objetivo determinar a letalidade de produtos químicos em estágios embrionários de peixes da espécie *D. rerio*, observando os parâmetros: coagulação de ovos fertilizados, ausência de formação dos somitos, o não desprendimento do broto da cauda do saco vitelino e ausência de batimento cardíaco (OECD, 2019). Adicionalmente, para a avaliação da toxicidade aguda ou sub-letalidade avalia-se também atrasos de pigmentação e do desenvolvimento, alterações ou malformações de estruturas corporais e alterações comportamentais (PIAU et al. 2022). A metodologia do ensaio segue conforme detalhes da embriogênese normal estabelecidos por Kimmel et al. (1995), conforme imagem que se segue (fig. 2).

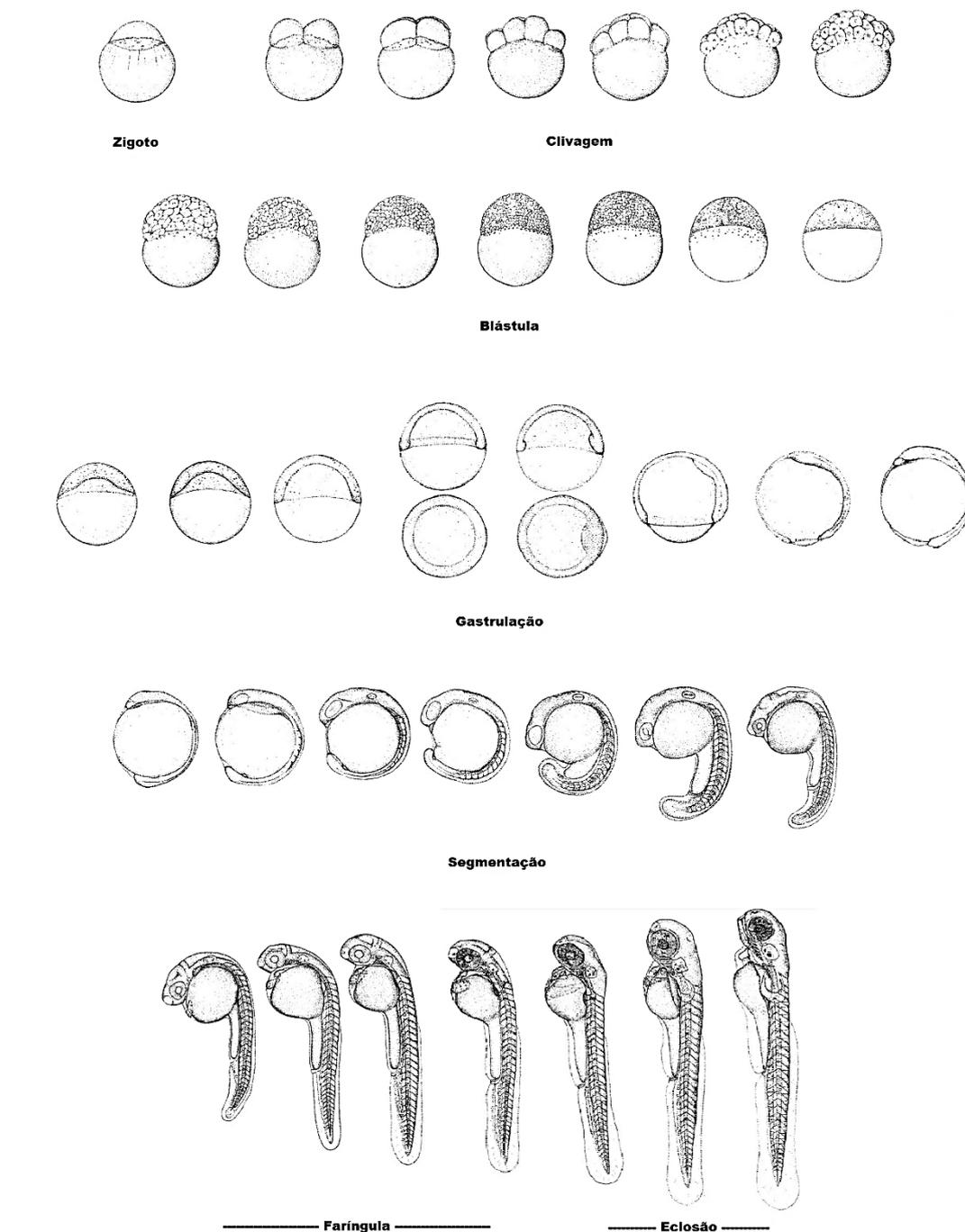


Figura 2. Desenvolvimento embriolarval de *zebrafish*, modificado de Kimmel et al. (1995).

Alguns estudos já detectaram a presença de MPs no estômago, fígado e brânquias de peixes (DING et al. 2018). Porém, alguns autores ainda discordam quanto a capacidade do plástico de se acumular no trato gastrointestinal de peixes, mesmo enfatizando que ele pode ser transportado para o fígado e que ao longo da vida destes animais não se sabe ao certo a real concentração à qual eles estarão

expostos, tendo em vista que a quantidade de plástico disponível no ambiente aquático não diminui (JOVANOVIC, 2017).

O trato gastrointestinal do *zebrafish* é diferente do de mamíferos. Este peixe não possui estômago ou ceco. A ausência de estômago indica que a acidificação não seja necessária para a digestão no *zebrafish* e o intestino é dividido em anterior, médio e posterior (DAMMSKI et al. 2011). Já no caramujo *B. glabrata* o estômago é dividido em papo, moela e piloro, contando ainda com a glândula digestiva, e por fim o intestino, dividido em anterior, médio e posterior (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Em virtude da capacidade de materiais ingeridos migrarem para outros tecidos ou órgãos, faz-se necessário estudos que avaliem o potencial de depuração de partículas plásticas em organismos de diferentes táxons, tais como o peixe *zebrafish* e no invertebrado *B. glabrata*.

Frequentemente o DNA pode sofrer danos oxidativos decorrentes de radicais livres, radiação ionizantes, produtos químicos e agente biológicos, isso pode provocar quebras de fita simples ou dupla, adutos de DNA, dímeros de purina e/ou pirimidina. Contudo, essas mutações podem ser reparadas pelo sistema de reparo, ou então a célula pode entrar em morte celular programada, chamada de apoptose, ou ainda, essas mutações podem se tornar irreversíveis e levar ao desenvolvimento do câncer, quando uma substância induz a formação cancerígena ela é denominada como carcinogênica (SINGH et al. 1988).

O ensaio do cometa (*Single Cell Gel Electrophoresis*) é um ensaio simples para medir quebras/danos na fita de DNA, ou seja, um ensaio de genotoxicidade. Ele serve para testar produtos químicos, biológicos, no monitoramento ambiental e humano (SINGH et al. 1988; COLLINS et al. 1995), ele se destaca por sua versatilidade e baixo custo. O método se baseia na teoria de que no núcleo da célula as alças de DNA estão presas em uma matriz nuclear e enroladas em torno de núcleos proteicos como os nucleossomos, quando essas proteínas são removidas por lise, o DNA permanece em um estado superenrolado compacto, a menos que haja uma quebra, caso em que o enrolamento dessa alça é relaxado. Na etapa de eletroforese, as alças ainda presas à matriz, são atraídas em direção ao ânodo, formando a característica cauda do cometa, dessa forma, a porcentagem de DNA na cauda reflete a frequência das quebras (SANTOS et al. 2021a).

Outro ensaio de genotoxicidade que mede o potencial mutagênico é o ensaio do micronúcleo (MN), que mede quebras cromossômicas, quebras de cromátides ou

malsegregação cromossômicas (aneuploidias). Os micronúcleos são expressos em células em divisão que contêm quebras de cromossomos sem centrômeros, ou cromossomos inteiros que são incapazes de migrar aos polos durante a mitose e ficam para trás na anáfase. Na telófase, um envelope nuclear envolve os cromossomos ou fragmentos deles, como esses fragmentos assumem um tamanho menor ao do núcleo principal eles assumem o termo de micronúcleo. Essa técnica fornece um índice confiável de quebra e perda cromossômica e foi proposta como ensaio regulatório de genotoxicidade com adoção da OECD (MANTOVANNI, et al. 2021).

Os eritrócitos de peixes, diferentemente dos de mamíferos, são nucleados, e isso possibilita além da avaliação de MN a avaliação de outro parâmetro, as anomalias no núcleo dessas células. Alguns autores costumam observar essas anomalias sugerindo que elas sejam consideradas pois também indicam processos de genotoxicidade (WENDT, 2013).

As alterações morfológicas no envelope nuclear podem ser: núcleo vacuolado ou bolhoso (*blebbed*); com lobos, que se assemelham a um rim (*lobed*); com constricção (*notched*); broto (*bud*), que se refere a uma projeção do núcleo ou o início da formação de um micronúcleo ainda não desprendido; e célula binucleada, que ocorre quando o núcleo se fragmenta em dois, de tamanhos proporcionalmente iguais ou semelhantes. Essas anomalias nucleares estão relacionadas com a exposição a contaminantes químicos citotóxicos, com potencial mutagênico (PALHARES; GRISOLIA, 2002).

Baseando-se nisso, estes ensaios, do micronúcleo e de anomalias nucleares podem prever os efeitos genéticos de um composto sob as células, tecido e sob o organismo (CANEDO; ROCHA, 2021; CANEDO et al. 2021), e por isso, eles têm sido amplamente utilizados como marcadores em ensaios de ecotoxicidade aquática (CÁCERES-VÉLEZ et al. 2016; ALMEIDA et al. 2019; CANEDO et al. 2021).

Ensaio baseado em biomarcadores são importantes para a investigar funções fisiológicas, como neurotoxicidade, crescimento e comportamento. Em 2002, Behra et al. descobriram que a atividade da acetilcolinesterase (AChE) pode prejudicar o desenvolvimento muscular e nervoso do peixe *D. rerio*.

A acetilcolina é um neurotransmissor excitatório, sintetizada por neurônio colinérgicos e liberada para a fenda sináptica para transmitir o sinal. Após a sinapse ela é hidrolisada por enzimas do grupo das colinesterases (ChEs), a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BtChE) (SANT'ANNA, 2009). A

enzima acetilcolinesterase ao hidrolisar a acetilcolina gera colina e ácido acético, e isso é feito principalmente nas fendas sinápticas, nas hemácias e nos músculos estriados. Essa enzima é produzida tanto por invertebrados quanto por vertebrados (SILVA, 2016), por isso, a quantificação da atividade enzimática da AChE pode auxiliar a entender como certos poluentes podem interferir neurologicamente no comportamento e desenvolvimento dos animais.

Esses marcadores bioquímicos são muito usados devido sua alta sensibilidade. Outro exemplo é a glutatona-S-transferase (GST), que está envolvida em mecanismos de prevenção ao estresse oxidativo ou de desintoxicação de xenobióticos (ALMEIDA et al. 2019; PIAU et al. 2022). A enzima GST catalisa a conjugação da glutatona reduzida (GSH) e um xenobiótico, transformando o composto mais hidrofílico, o que facilita a sua excreção (SILVA, 2012; SANTOS et al. 2021b).

Assim como AChE, GST, a lactato desidrogenase (LDH) também tem sido usada como marcador de toxicidade em organismos aquáticos (ALMEIDA et al. 2019; FREIRE et al. 2023), ela participa do metabolismo celular transformando piruvato em lactato, via anaeróbia, e está presente em animais, plantas e em bactérias (CASTRO, 2015).

Em caramujos, alterações na medição de reservas energéticas podem predizer efeitos tóxico de um contaminante, pois em situações de estresse caramujos usam lipídeos e proteínas como fonte alternativa a glicose (SILVA, 2014).

6. Microplásticos de polietileno com fluorocromo

Os microplásticos de polietileno com fluorocromo laranja (605 nm) utilizados neste estudo, foram adquiridos da empresa comercial Cospheric®, que segundo fabricante apresentavam tamanho entre 53 – 73 µm de diâmetro.

Para a caracterização das micropartículas, elas foram previamente metalizadas com ouro (Au) em pó para caracterização em microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Jeol JSM-7001F at 15 kV), e além disso, a composição elementar das amostras foi avaliada em detector de energia dispersiva de raios X (EDX ou “EDS-*Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*”). Uma análise posterior foi realizada para verificar o tamanho das partículas utilizando o programa FijiJ®.

Em visualização em microscopia de fluorescência, figura 3, percebeu-se o formato esférico dos PE MPs e a coloração alaranjada. Utilizando o programa *FijiJ*®, e por meio de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (fig. 4), o formato esférico e a superfície lisa dos MPs foram confirmados, e a média do diâmetro das partículas foi de 59 μm de diâmetro ($\pm 3,84$ desvio padrão) em um total de 501 partículas contabilizadas, conforme figura 5.

Na análise de composição elementar da amostra, por meio de MEV foram identificados os seguintes elementos: C (carbono) peso em porcentagem na amostra de 13,98%, Cu (cobre) 13,61%, e Au (ouro) 72,41%, conforme figura 6. Esses elementos, (C, Cu e Au) fazem parte dos componentes utilizados para a caracterização do material.

Desta forma, os MPs também foram denominados como microesferas plásticas de polietileno com fluorocromo.

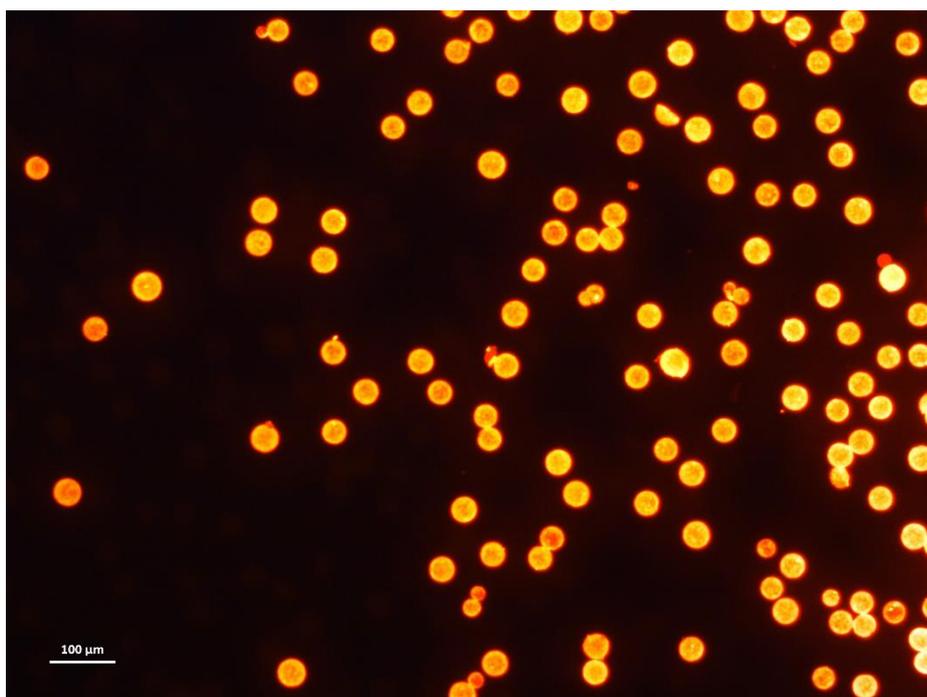


Figura 3. Fotomicrografia de fluorescência de microplástico de polietileno (EP MPs) com fluorocromo laranja (filtro 530 nm). Os MPs possuem formato de microesferas.

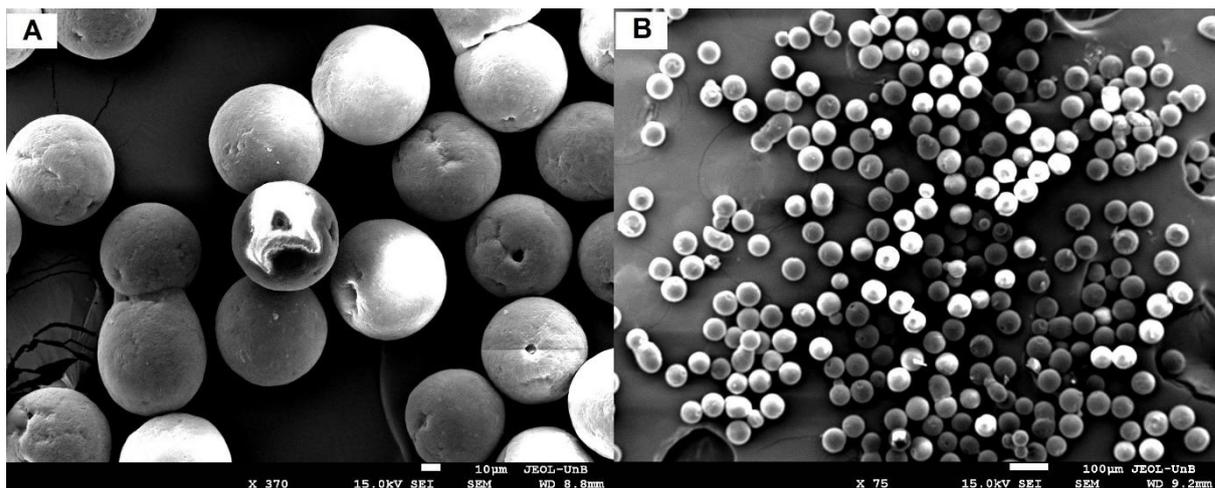


Figura 4. Eletromicrografia de varredura (MEV) (Jeol JSM-7001F at 15 kV) de microplásticos de polietileno.

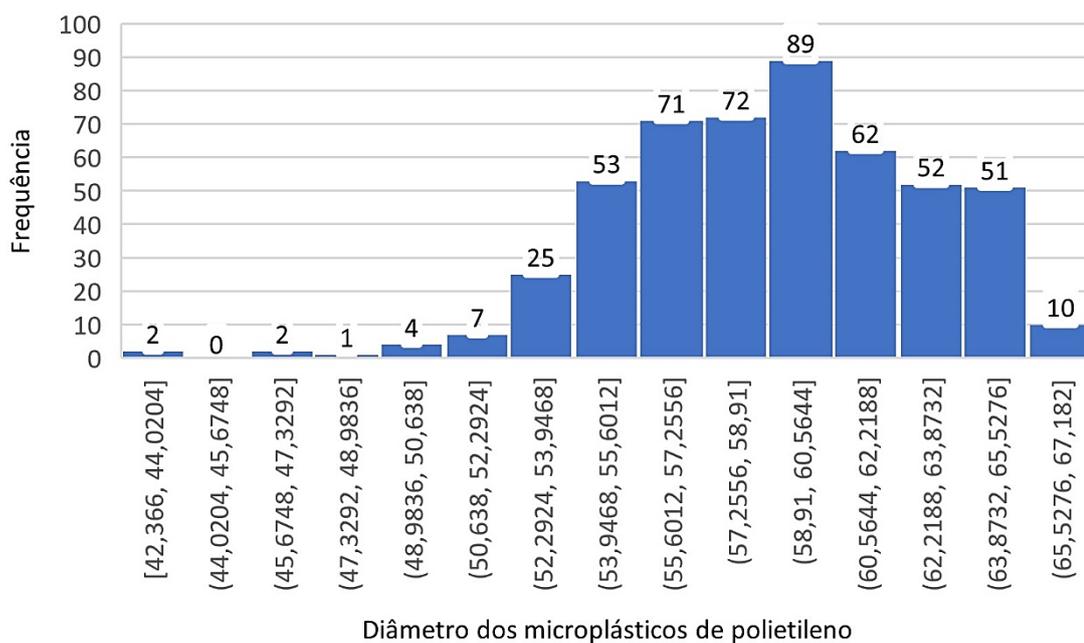


Figura 5. Histograma da distribuição do diâmetro de microplásticos de polietileno em diferentes classes.

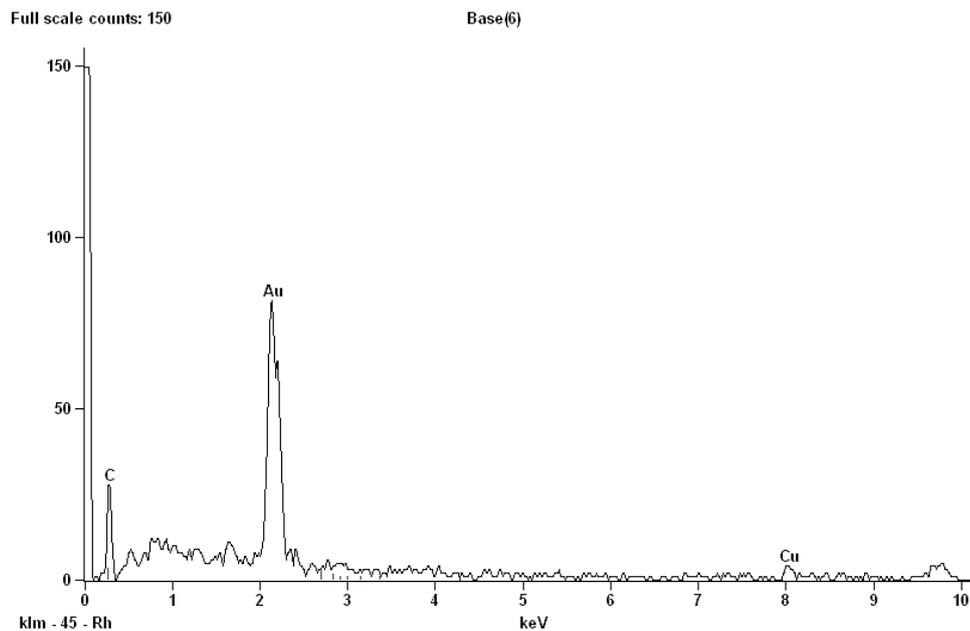


Figura 6. Composição elementar observada em detector de energia dispersiva de raios X (EDX ou “EDS- Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy”).

7. Hipótese

Como os MPs representam uma problemática mundial em termos de poluição ambiental, estando presentes no modo ubíquo em todos os compartimentos ambientais, então, a exposição a esse poluente interfere no desenvolvimento de *zebrafish* causando danos citotóxicos, genotóxicos e alterando a atividade de suas enzimas.

Os efeitos dos MPs ocasionam alterações nas atividades enzimáticas de *B. glabrata* interferindo no metabolismo deles.

O processo de depuração desses MPs é diferente nas duas espécies.

8. Objetivo

Investigar os mecanismos de toxicidade das micropartículas de plástico de polietileno (PE MPs) em organismos do ecossistema aquático de dois níveis tróficos, o macroinvertebrado *Biomphalaria glabrata*, e o peixe *Danio rerio* (*zebrafish*), por meio da análise de múltiplos biomarcadores. Além de buscar entender os processos de internalização e de depuração desses MPs em ambas as espécies.

8.1 Objetivos específicos

- Investigar o potencial embriotóxico, genotóxico e citotóxico de PE MPs em *zebrafish*;
- Avaliar o potencial de depuração de PE MPs em juvenis de *zebrafish*;
- Verificar alterações em marcadores bioquímicos nos tecidos de adultos de *zebrafish*;
- Investigar alterações em biomarcadores de neurotoxicidade e estresse por meio de marcadores bioquímicos em *Biomphalaria glabrata* expostos a PE MPs, e;
- Avaliar o potencial de depuração de PE MPs de polietileno em juvenis e adultos de *B. glabrata*.

Para melhor organização e compreensão do trabalho a metodologia e os resultados foram divididos em capítulos: I – Revisão bibliográfica, II - Ensaio com o peixe *zebrafish* (*Danio rerio*) e III – Ensaio com o caramujo *Biomphalaria glabrata*.

CAPÍTULO II – ENSAIOS COM O PEIXE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

9. Delineamento experimental com *Zebrafish*

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnBDoC nº 112/2019, Anexo I). Neste contexto, os procedimentos seguiram os princípios éticos de experimentação animal.

Foram realizados ensaios com embriões, juvenis e adultos de *zebrafish*, linhagem selvagem. Os animais utilizados foram selecionados do Biotério Zebrafish da Universidade de Brasília – UnB, Laboratório de Genética Toxicológica (GTOX), Departamento de Genética e Morfologia (ZebTec - Tecniplast, Varese -Italy), mantidos sob parâmetros de água controlados: temperatura a $27,0 \pm 1$ °C, condutividade a 650 ± 100 $\mu\text{S/cm}$, pH $7,0 \pm 0,5$ e oxigênio dissolvido $\geq 95\%$ de saturação.

Foram realizados três ensaios com diferentes tempos de duração: agudo, com 96 horas de exposição, crônico, com duração de 28 dias, e, de recuperação, com 14 dias de recuperação.

9.1 Ensaio de embriotoxicidade em *zebrafish* (FET)

O ensaio de embriotoxicidade, ou *Fish Embryo Toxicity Test (FET)* seguiu o *guideline* da OECD nº 236 (OECD, 2013), com modificações. Os embriões foram obtidos usando o sistema de fecundação *Ispawn (Tecniplast, Itália)* e expostos a 6,25, 12,5, 50 e 100 mg.L^{-1} de microesferas plásticas de polietileno. Além disso, dois grupos controles foram estabelecidos, um para o dispersante *Tween 80* % a 0,01 % (controle solvente) e um grupo controle com água de manutenção do Sistema *Zebrafish*, por 96 horas. Devido a característica hidrofóbica da partícula, verificado em ensaio piloto, o uso de *Tween 80* % foi necessário e indicado pelo fabricante e verificado em literatura (RIST; BAUN; HARTMANN, 2017; BALAKRISHNAN et al. 2019; GERDES et al. 2019).

Os ovos não fertilizados e aqueles com irregularidades de clivagem ou lesões foram desconsiderados. Foram utilizados 60 embriões por tratamento, em triplicata, selecionados e distribuídos ao acaso em microplacas de 24 poços, com 2 mL de água

de manutenção do Sistema *Zebrafish*. A figura 7 ilustra a distribuição das placas, triplicatas do controle água, do *Tween* 80%, e das concentrações com PE MPs. As placas contaram com um controle interno.

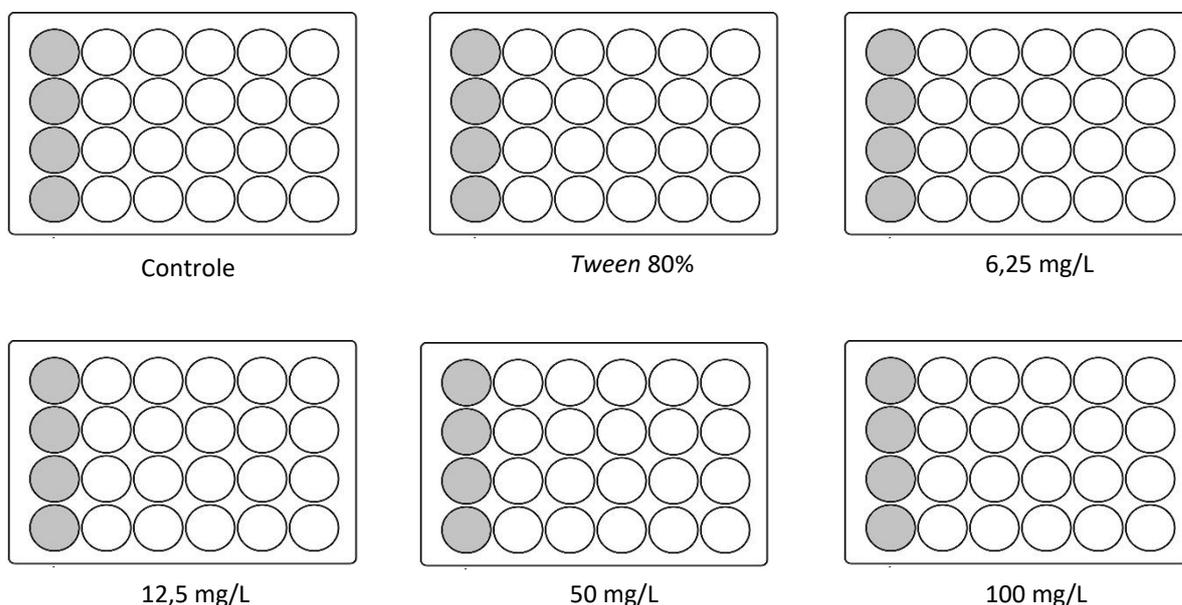


Figura 7. Desenho experimental do ensaio FET (*Fish Embryo Toxicity*): distribuição de diferentes concentrações do microplástico de polietileno e dos embriões de *zebrafish*. O experimento foi realizado em triplicata e os poços sombreados correspondem ao controle interno de cada placa.

Durante a exposição, os animais foram mantidos em incubadora BOD (SOLAB Científica®) com temperatura a 27 °C e fotoperíodo 12 horas claro/escuro controlados e observados diariamente com o auxílio de estereomicroscópio (Stemi 2000 ZEISS®). Os seguintes parâmetros foram avaliados: letalidade (coagulação, ausência da formação dos somitos e batimentos cardíacos, desprendimento da cauda do saco vitelino) e sub-letalidade (atrasos no desenvolvimento e na pigmentação, atrasos na absorção do saco vitelino, alterações na frequência cardíaca, eclosão e ocorrência de malformações). As malformações corporais foram avaliadas e documentadas conforme recomendado pelo protocolo OECD. Posteriormente, as larvas foram observadas por até 7 dias após a fertilização para verificar se seus hábitos alimentares levariam à ingestão das partículas.

9.2 Ensaio com juvenis

Para verificar a depuração dos MPs, juvenis com 40 dias ($n = 08$) (SINGLEMAN; HOLTZMAN et al. 2014) foram expostos por 72 horas a 50 mg.L^{-1} de PE MPs suspensos em água de manutenção do Sistema *Zebrafish* e *Tween 80* % a 0,01 % em aquários com capacidade para 4 L. Ao final da exposição a água foi renovada, sem MPs, e os juvenis foram monitorados por 15 dias para verificar a presença ou ausência de micropartículas no trato gastrointestinal.

9.3 Ensaio com adultos

Foram realizados três ensaios com diferentes tempos de duração: agudo, com 96 horas de exposição, crônico, com duração de 28 dias, e, de recuperação, com 14 dias de recuperação.

Adultos de *zebrafish*, de ambos os sexos, com 6 a 12 meses de vida foram expostos as seguintes concentrações: $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$, 50 mg.L^{-1} e 100 mg.L^{-1} , seguindo *guideline* OECD nº 203 (2019), com modificações. Além disso, um grupo controle foi estabelecido com água reconstituída (ABNT, 2022a) e outro com o dispersante *Tween 80* % a 0,01 %. Os peixes foram alimentados uma vez ao dia com pouca ração comercial (Tetramin®), para incentivar a ingestão das microesferas plásticas de polietileno. A exposição foi realizada em regime estático, fotoperíodo de 10 horas claro/14 horas escuro, aeração constante. O experimento foi conduzido em triplicata (figura 8) e ao término da exposição os peixes foram anestesiados com tricaina (5 %) e eutanasiados por secção medular.

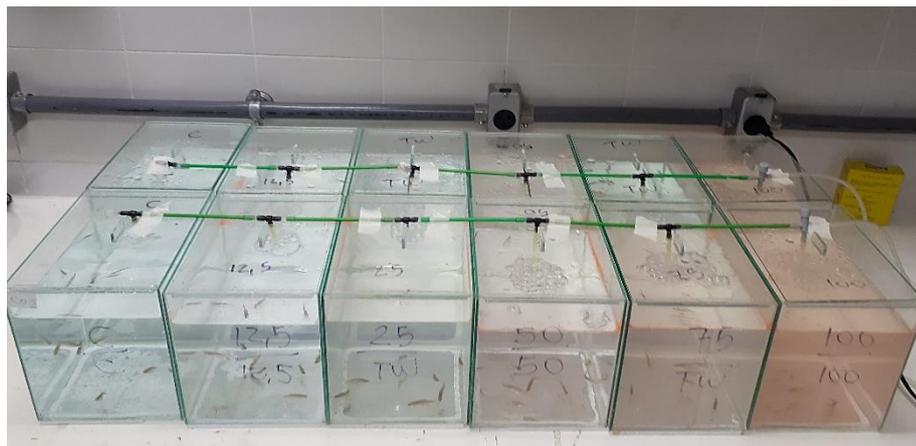


Figura 8. Exposição à diferentes concentrações do microplástico de polietileno no ensaio em adultos de *zebrafish*. O experimento foi realizado em triplicata (n = 07 / aquário).

9.3.1 Ensaio agudo

Adultos de *zebrafish* (n = 07), média de 0,378 g e 4 cm, foram aclimatados por 48 h e posteriormente expostos por 96 h às microesferas de polietileno com fluorocromo, em aquários com capacidade para 4 L em água reconstituída, baseado no protocolo OEDC nº. 203 (OECD, 2019).

Neste experimento os marcadores analisados foram: histologia, micronúcleo e anomalias nucleares, ensaio do cometa e marcadores bioquímicos, para isso, os peixes foram selecionados ao acaso para cada biomarcador.

9.3.2 Ensaio crônico

No ensaio crônico, ou exposição de longa duração, os animais foram expostos por 28 dias aos MPs, n = 07. Os peixes foram anteriormente aclimatados por 72 horas, e tinham em média 0,585 g, e 3,54 cm. Nesta exposição foram usados como marcadores o ensaio do cometa e de marcadores bioquímicos. Essa exposição ocorreu em duplicata.

9.3.3 Ensaio de recuperação

Após exposição de 28 dias aos MPs os peixes restantes da exposição crônica foram submetidos ao ensaio de recuperação, que consistiu em uma exposição de

recuperação de 14 dias em água reconstituída. Os peixes tinham em média de 0,492 g e 3,62 cm, e apenas o ensaio do cometa e marcadores bioquímicos foram avaliados.

As concentrações dos ensaios crônicos foram as mesmas do ensaio agudo: controle água reconstituída, controle *Tween* 80 %, 12 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹, e a cada quatro dias os parâmetros da água eram monitorados e toda a água do experimento era renovada, a fim de controlar esses parâmetros, sobretudo OD (oxigênio dissolvido), pH e amônia tóxica total.

Para essas exposições seguiu-se as recomendações do protocolo OECD nº. 204 (2014) com adaptações, mas sob as mesmas condições de fotoperíodo, alimentação, aeração e condições da água que no ensaio agudo.

10. Marcadores para adultos

10.1 Parâmetros físico-químicos da água *zebrafish*

No experimento agudo, os parâmetros foram medidos ao término da exposição, mas no crônico a cada troca de água, realizada a cada 96 horas, os parâmetros eram mensurados tanto na água nova quanto na água de exposição. O mesmo foi feito no ensaio de recuperação. Os parâmetros monitorados foram: temperatura e o oxigênio dissolvido (OD) (com sonda portátil multiparâmetro YSI®), turbidez, com turbidímetro QUIMIS®, pH e amônia tóxica, essa última dada em função do pH (kit de amônia tóxica). No experimento agudo a turbidez não foi mensurada, e no crônico os parâmetros que ficavam na faixa de zero na água de troca, como a amônia e turbidez, não foram monitorados.

10.2 Análise histológica

Conforme literatura consultada (GONÇALVES et al. 2018), o plástico de forma geral degrada na presença de solventes como o xilol e o fixador *Davidson*, este último quando exposto por mais de uma semana, desta forma, a metodologia para microplástico foge da tradicional.

Após exposição de 96 horas os peixes (n = 07) foram dissecados retirando a pele com auxílio de pinça e lupa, e armazenados inteiros em tubos para centrifuga

(tipo Falcon®) com fixador *Davidson* (12,5 % glicerina P.A, 12,5 % formaldeído P.A, 37,5 % etanol P.A e 37,5 % água destilada (acrescido de 9 partes da solução *Davidson* anterior para 1 parte de ácido acético glacial P.A)) por 24 horas, sendo em seguida passados para o álcool isopropílico 70 %. Um processo de descalcificação foi realizado com EDTA 4 % por 7 dias com renovação total da solução após 4 dias (CASTANIA et al. 2015). Posteriormente, as amostras foram lavadas com água ultrapura e em seguida desidratadas em gradiente crescente de concentração de álcool isopropílico (70% por 30 minutos, 95% três vezes por 15 minutos, 100% três vezes por uma hora), a inclusão na parafina líquida foi a 56 - 58 °C *overnight*. Após emblocamento, as amostras foram geladas em freezer e cortadas com 5 µm de espessura. Para retirar a parafina restante as lâminas foram colocadas em estufa a 65 – 70 °C e em seguida lavadas no álcool isopropílico 100 % até remoção da parafina. Como as micropartículas plásticas de polietileno são fluorescentes não foi necessária a coloração das lâminas.

10.3 Frequência de micronúcleos e anomalias nucleares

Após exposição de 96 horas e secção medular, coletou-se uma amostra de sangue periférico com o auxílio de uma pipeta heparinizada e homogeneizou-se com 200 µL de soro fetal bovino (SFB) em microtubo, sendo que 50 µL dessa mistura foram utilizados para a realização do esfregaço sanguíneo, feito em duplicata para cada indivíduo. Em seguida, as lâminas foram fixadas por 7 minutos com metanol P.A, e posteriormente, coradas com *Giemsa* a 5% por 15 - 20 minutos.

Para o ensaio do micronúcleo (MN) o protocolo utilizado foi o de Hooftman; Raat (1982) e Rivero et al. (2008). A cito-genotoxicidade foi avaliada através das anomalias nucleares (AN), para isso foram contadas células binucleadas, células com núcleos: *buds* (broto), *blebbed* (vacuoladas), *lobed* (com lobos) e *notched* (com constricção), que foram classificadas de acordo com Souza e Fontanetti (2006).

Em microscopia de luz, magnificação de 1000X, foram avaliados em teste cego 3000 eritrócitos, 1500 por lâmina, onde se contabilizou os micronúcleos nas 2000 (dois mil) primeiras células e as anomalias nucleares no total de 3000 (três mil). Considerou-se anomalia nuclear os eritrócitos que continham núcleos com acentuada irregularidade, e para análise de eritrócitos micronucleados foram adotados os critérios seguintes (FENECH, 2000): 1. O micronúcleo deve ser um terço menor que

o núcleo principal; 2. O micronúcleo não deve tocar no núcleo principal; 3. Não deve ser refringente, ou seja, deve ter mesma coloração e intensidade do micronúcleo principal.

10.4 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado nas três exposições com *zebrafish*: ensaio agudo, crônico e de recuperação. Para a preparação das lâminas, ponta fosca e lapidadas, não é necessário riscar, foram mergulhadas em agarose 1,5 % (ponto de fusão normal) em solução salina PBS, colocadas para secar a temperatura ambiente e posteriormente armazenadas a 4 °C.

Após o período de exposição, 20 µL da amostra de sangue + SFB foram homogeneizados a 100 µL de agarose baixo ponto de fusão a 0,5 % (GibcoBRL®), diluída anteriormente em solução salina PBS a 37 °C. Esse material foi então distribuído nas lâminas, as quais foram cobertas com lamínulas (24 x 60 mm) e mantidas em geladeira (4 °C) por cerca de 20 minutos para fixação. Além disso, cerca de 7 lâminas com amostras aleatórias de sangue + SBF foram separadas para o grupo controle positivo, onde se expos o material a uma solução de H₂O₂ (água oxigenada) à 0,1 %, diluída em PBS, e depois lavadas com PBS gelado para parar a reação.

Após solidificação, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram mergulhadas em solução de lise uso contendo 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris (pH ajustado para 10,0 com NaOH), 1 % de N-lauril sarcosina, 1 mL de Triton X-100 e 10% DMSO. A solução de lise uso foi preparada a partir de uma solução-estoque contendo NaCl 2,5 M; EDTA 100 mM e Tris 10 mM. As lâminas permaneceram nessa solução por no mínimo uma hora, a 4 °C e protegidas da luz. Em seguida, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese e submersas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13,0) recém preparado e mantido a 4 °C. Após 15 minutos de submersão neste tampão, procedeu-se com a eletroforese a 250 V, 350 mA e a 4 °C durante 15 minutos. Ao término da corrida, as lâminas foram neutralizadas em solução 0,4 M Tris-HCl; pH 7,5, e a cada 5 minutos as lâminas eram retiradas do tampão, permanecendo a temperatura ambiente e depois retornando para o tampão por mais 5 minutos, e assim sucessivamente por três vezes. Para finalizar, elas foram fixadas em etanol P.A por 7 minutos. Após secagem em temperatura ambiente, protegidas da luz, as lâminas

foram guardadas a 4 °C até o momento da análise. Todas as etapas foram realizadas em ausência de luz direta (penumbra) para evitar danos adicionais no DNA, e de forma aleatória cada cuba de lise e corrida continham pelo ao menos uma lâmina de controle positivo.

Nos ensaios crônico e de recuperação, a eletroforese ocorreu a 300 mA, a 4 °C, com 20 minutos de descanso e 20 minutos de corrida.

Foram avaliadas 100 células por indivíduo, 50 em cada lâmina, teste duplo-cego, e a coloração realizada com brometo de etídio a 20 mg.mL⁻¹. A avaliação visual foi feita através de um microscópio de fluorescência Axioskop-II da Carl Zeiss®, filtro de 510 - 560 nm, barreira de filtro de 590 nm e aumento total de 400X, utilizando-se as 5 classes de cometa propostas por Collins (1995), conforme ilustra figura 9, e o índice de danos no DNA foi calculado de acordo com Jaloszyński e colaboradores (1997).

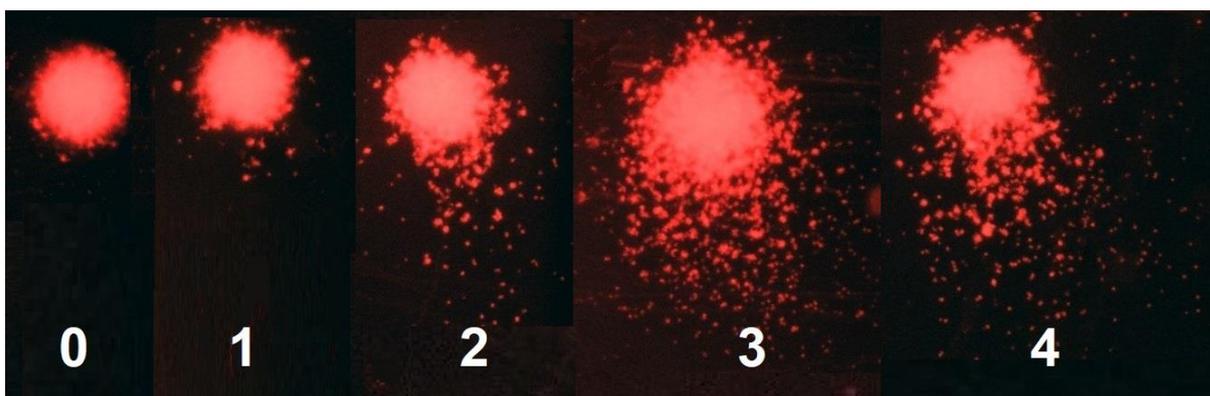


Figura 9. Categoria de danos em nucleoides de sangue periférico de *zebrafish* no ensaio cometa (*Single Cell Gel Eletrophoresis* - SCGE). Aumento 400X. Fonte: (AUTORIA PRÓPRIA, 2023).

A quantificação do índice de dano no DNA foi mensurada em danos moderados (DM) e elevados (DE), para o escore total de 100. Para a quantificação do dano moderado (DM) foi utilizada a fórmula:

$$DM (ua) = \frac{100 \times N1 + N2}{400}$$

E para a quantificação do dano elevado (DE) foi utilizada a seguinte fórmula:

$$DE (ua) = \frac{100 \times N3 + N4}{400}$$

10.5 Marcadores bioquímicos

Assim como o ensaio do cometa, os marcadores bioquímicos foram avaliados nas três exposições: aguda, crônica e de recuperação.

A acetilcolinesterase (AChE) foi mensurada nas amostras da cabeça e na cauda (musculatura esquelética). A cabeça foi considerada da boca até o opérculo, e a cauda, do poro anal até a ponta da nadadeira caudal. Para medição da glutathione-S-transferase (GST) utilizou-se amostras de brânquias e do corpo, para este último foi considerado desde o opérculo até o poro anal. E para as análises de lactato desidrogenase (LDH) foram selecionadas apenas amostras da cauda.

As amostras da cabeça, brânquias, corpo e cauda de sete animais, foram seccionadas e armazenadas em tubo de microcentrifuga (Eppendorf®) com 1 mL de tampão fosfato 0.1 M pH 7,2, trituradas com auxílio tesoura e armazenadas a - 20 °C, sendo posteriormente sonicadas com três pulsos de 20 segundos a 99 Hz em disruptor de célula ultra-sônico (UNIQUE®), com intervalos de mesmo tempo, sob béquer com gelo para evitar o aquecimento e perda do material. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 RPM, à 4 °C, por 20 minutos, o sobrenadante pós-mitocondrial (PMS) foi separado e novamente congelado a - 20 °C até posterior análise em Multiskan FC Thermo Scientific®.

A quantificação da concentração total de proteínas foi determinada segundo protocolo de Bradford (1976). Toda a análise foi determinada em quadruplicata a 595 nm, utilizando a γ -globulina como padrão, para a determinação das enzimas foram utilizadas as concentrações de 0,3 - 0,7 mg/L de proteínas.

10.5.1 Atividade de acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi mensurada em amostras da cabeça e cauda. A atividade enzimática foi determinada através do aumento da cor amarela proveniente da produção de 5-mercaptop-2-nitrobenzoato pela reação do substrato tiocolina com 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) ou DTNB.

A atividade da AChE foi expressa em nanomol de substrato hidrolisado por minuto por mg de proteína, após 10 minutos de reação a absorbância foi mensurada em 405 nm, com intervalos de 40 segundo num total de 5 minutos, conforme protocolo de Ellman et al. (1961), adaptado para microplacas (GUILHERMINO et al. 1996). Para isso, foram utilizados 50 µl de PMS e 250 µl de solução de reação (acetilcolina (ACh) e propioniltiocolina (75 mM) e DTNB (10 mM)) em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) contra o branco, 50 µl de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) e 250 µl de solução de reação.

10.5.2 Atividade de Glutathione-S-Transferase (GST)

A avaliação do estresse oxidativo por meio da enzima glutathione-S-transferase (GST) seguiu-se as metodologias descritas por Monteiro et al. (2006). A atividade da GST foi medida de acordo com 1-cloro-2, 4 dinitrobenzeno (CDNB) como substrato (HABIG et al. 1974). A formação de adutos glutathione S-2 ,4-dinitrofenil foi acompanhada pelo aumento da absorbância a 340 nm contra o branco. O coeficiente de extinção molar utilizado para CDBN foi de $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. A atividade foi expressa como a quantidade de enzima que catalisa a formação de um nanomols de produto formado por minuto por miligrama de proteína, em amostras da brânquia e corpo.

A atividade foi determinada usando 100 µl de PMS, 200 µl de solução de reação (glutathione (10 mM), diluída em tampão fosfato (0,1 M, pH 6,5, e CDBN (10 mM)) em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) contra o branco, 100 µl de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) e 200 µl de solução de reação, lido de imediato com intervalos de 40 segundos, em um total de 5 minutos, ou 8 leituras.

10.5.3 Atividade de Lactato desidrogenase (LDH)

As determinações de LDH foram mensuradas em amostras da cauda e seguiram a metodologia descrita por Vassault et al. (1983), com modificações introduzidas por Diamantino et al. (2001). A atividade enzimática foi determinada em quadruplicata e expressa em nanomols de substrato hidrolisado por minuto, por mg de proteína. Para isso, usou-se 40 µl de PMS mais 250 µl de solução de reação (NADH (0,24 mM), piruvato (10 mM)) e tampão Tris-NaCl (0,1 M, pH 7,2), contra o branco, 40 µl de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) e 250 µl de solução de reação, mensurados em

340 nm, com intervalos de 40 segundos, perfazendo um total de 05 minutos de leitura, ou, 08 leituras.

11. Análise estatística

Para a avaliação das diferenças estatísticas os dados foram avaliados utilizando o pacote SigmaPlot versão 12.5. Para tanto, os dados foram avaliados quanto a distribuição de normalidade pelo teste de *Shapiro-Wilk* e quanto a homogeneidade da variância pelo teste de Levene. Quando os dados apresentaram nenhuma significância ($p > 0,05$) quanto a normalidade ou homogeneidade foi utilizado o teste ANOVA *One-Way*. Quando os dados não passaram no teste de normalidade e/ou no teste de homogeneidade de variância, o teste de *Kruskal-Wallis* foi utilizado. O teste de *Dunn* ou *Dunnnett* foi utilizado para detectar diferenças significativas entre as concentrações testadas e o grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Adicionalmente, foi utilizado o teste ANOVA *Two-Way* seguido do teste *Holm-Sidak*, para averiguar diferenças entre os grupos experimentais ao longo do tempo de exposição.

12. Resultados (ensaios com *zebrafish*)

12.1 Ensaio de embriotoxicidade em *zebrafish* (FET)

Os PE MPs não causaram alterações significativas na embriogênese de *zebrafish*, como atraso na eclosão, indução de malformações e aumento da mortalidade (figura 10, ANOVA $p > 0.05$). Além disso, os MPs com 59 μm de diâmetro não ultrapassaram a membrana coriônica dos embriões, conforme se pode visualizar nas figuras 11 e 12, elas permanecem do lado de fora do córion, dessa forma o córion age como barreira protetora para os embriões. As figuras 13 e 14 mostram larvas do controle água e do controle *Tween* 80 %, e as figuras 15 e 16, o intestino das larvas com MPs, elucidando que a contaminação realmente se inicia após a eclosão.

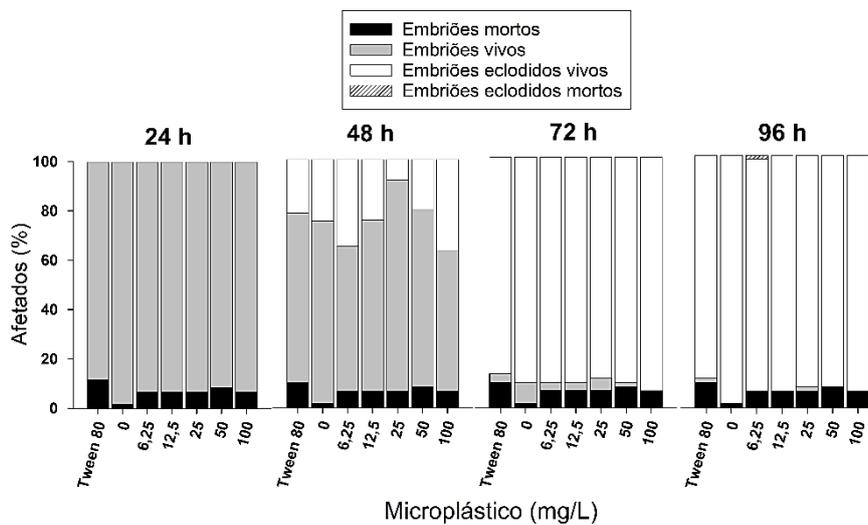


Figura 10. Panorama geral do ensaio de embriotoxicidade em *zebrafish* (FET). Os embriões foram expostos a micropartículas de polietileno ao longo de 96 h de exposição. Não foram observadas alterações significativas quando comparados ao controle água (ANOVA, $p > 0.05$).

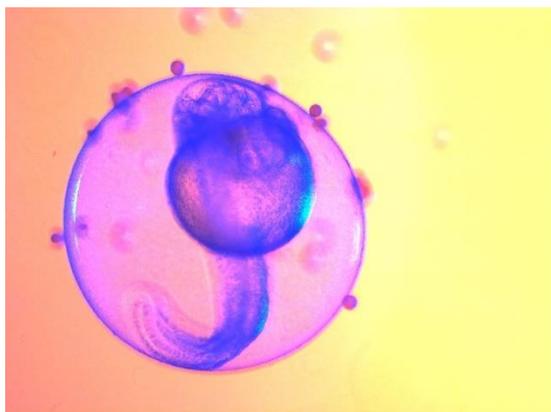


Figura 11. Fotomicrografia de embrião de *zebrafish* com 36 horas da fertilização. Concentração de 50 mg.L⁻¹. Aumento 50X.



Figura 12. Fotomicrografia de embrião de *zebrafish* com 72 horas da fertilização. Concentração de 12,5 mg.L⁻¹. Aumento 32X.



Figura 13. Fotomicrografia de larva de *zebrafish* com 96 horas da fertilização. Concentração 0,00 mg.L⁻¹ - grupo controle. Aumento 20X.

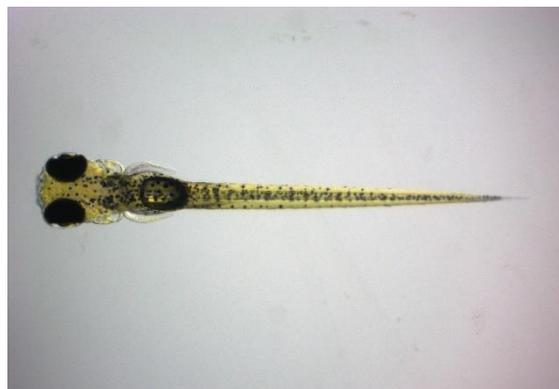


Figura 14. Fotomicrografia de larva de *zebrafish* com 96 horas da fertilização. Concentração 0,01 % de Tween 80 %. Aumento 20X.



Figura 15. Fotomicrografia de larva de *zebrafish* com 96 horas da fertilização. Concentração de 50 mg.L⁻¹. Aumento 20X. A seta indica um microplástico de polietileno no intestino da larva.



Figura 16. Fotomicrografia de larva de *zebrafish* com 96 horas da fertilização. Concentração de 100 mg.L⁻¹. Aumento 20X. A seta indica um microplástico de polietileno no intestino da larva.

12.2 Ensaio com juvenis

Somente após 15 dias em água limpa, livres de MPs, o aglomerado de MPs desapareceu do lúmen intestinal dos juvenis, expostos a 50 mg.L^{-1} . Isso mostra que a depuração gastrointestinal ocorre de forma lenta, figuras 17 a 20.

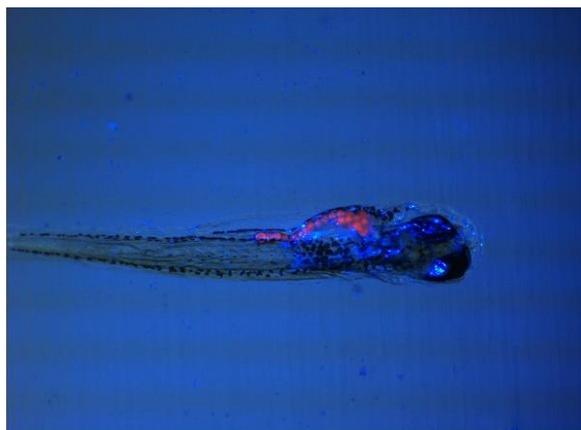


Figura 17. Fotomicrografia de fluorescência de larva de *zebrafish*. Microplásticos de polietileno no intestino. Magnificação 15X.

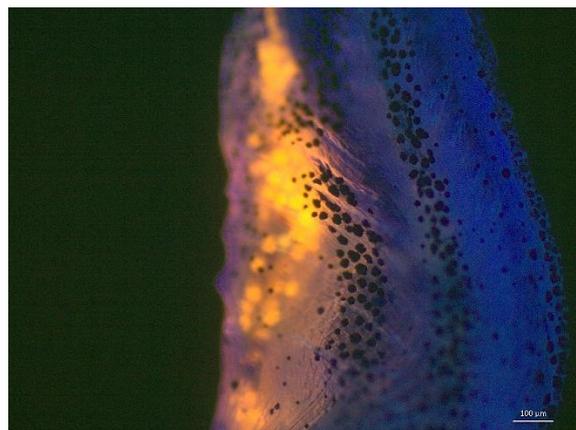


Figura 18. Fotomicrografia de fluorescência de juvenil de *zebrafish* após 24 horas de recuperação. Concentração de 50 mg.L^{-1} .



Figura 19. Fotomicrografia de fluorescência de juvenil de *zebrafish* após 07 dias de recuperação. Concentração de 50 mg.L^{-1} .

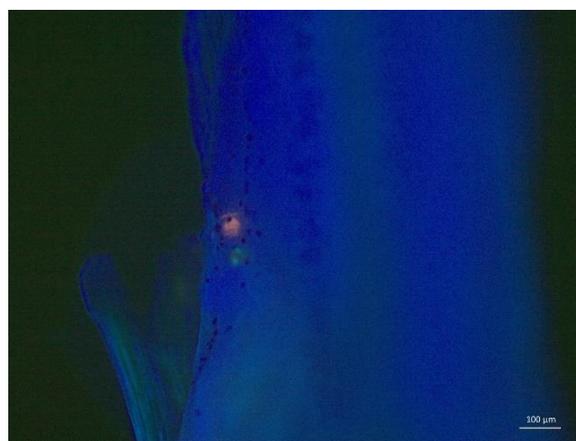


Figura 20. Fotomicrografia de fluorescência de juvenil de *zebrafish* após 12 dias de recuperação. Concentração de 50 mg.L^{-1} .

12.3 Ensaio com adultos

12.3.1 Avaliação dos parâmetros físico-químicos da água de *zebrafish*

Ao longo das três exposições o pH se manteve na faixa de 7 ± 1 , a temperatura no ensaio agudo se manteve em $26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$, no crônico a $24 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ e na recuperação $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$. Na exposição crônica a turbidez teve um aumento gradativo conforme o aumento de partículas presentes na água, mínima de 1,44 UNT (controle água) e máxima de 9,47 UNT (100 mg/L), as médias foram obtidas do total de semanas de exposição, e na recuperação a média foi de 1,30 UNT. No experimento agudo a turbidez não foi medida.

O oxigênio dissolvido (OD) - fundamental para a vida aquática - no experimento agudo foi diminuindo gradativamente e ao término o menor valor detectado foi de 4 mg/L o que corresponde a 48 % de oxigenação. Na exposição crônica a mínima de OD foi de 5,75 mg/L (68,1 %). Na recuperação, o OD se manteve com a concentração na faixa de 8 - 9 mg/L, e saturação acima de 100 %.

A amônia total não ionizada (NH_3 , ou amônia real) é mensurada em função do pH e da temperatura, valores acima de 0,04 ppm não são considerados seguros para peixes (ALCON, [202-?]). No ensaio agudo, os valores apresentados na tabela 2 se referem aos dados brutos (amônia total em ppm) obtidos de uma única medição realizada após as 96 horas de exposição. Ao analisar os dados, percebe-se uma diminuição na liberação da amônia após a exposição, a concentração de amônia nos aquários com 100 mg.L^{-1} de MPs foi de 0,004 ppm, 9 vezes menor que o controle água (0,036 ppm).

Para o ensaio crônico, foram realizadas várias medições de amônia tóxica ao longo dos 28 dias. E o que se observa na tabela 3, é que todos os valores da média de amônia tóxica ficam abaixo do valor de referência que foi o controle água. Desta forma, percebe-se que essa inibição da liberação de amônia ocorre de forma significativa ($p < 0,05$) a partir do 22º dia de exposição. Isso confirma o resultado já observado na exposição aguda.

Na recuperação, a liberação de amônia tóxica ao longo dos 14 dias foi representada na tabela 4. Quando se comparou a média do controle *versus* a média dos grupos expostos após 4 dias de recuperação, todos os grupos tiveram uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Com 8 dias de recuperação,

apenas os grupos expostos a microplásticos tiveram um aumento significativo na concentração de amônia; e com 14 dias, a concentração de amônia não foi estatisticamente significativa em nenhum dos grupos ($p > 0,05$).

Tabela 2. Amônia real na água de exposição de *zebrafish* no ensaio agudo.

Grupo	Ensaio agudo (dados brutos)
Controle	0,036 ppm
<i>Tween</i> 80 %	0,028 ppm
12,5 mg.L ⁻¹	0,028 ppm
50 mg.L ⁻¹	0,018 ppm
100 mg.L ⁻¹	0,004 ppm

Os valores do ensaio agudo se referem aos valores brutos de amônia tóxica.

Tabela 3. Amônia real na água de exposição de *zebrafish* no ensaio crônico.

Amônia \bar{x} (média do controle)	4 dias \bar{x} (0,0490)	8 dias \bar{x} (0,0205)	12 dias \bar{x} (0,0620)	14 dias \bar{x} (0,0365)	18 dias \bar{x} (0,0615)	22 dias \bar{x} (0,111)	24 dias \bar{x} (0,090)	28 dias \bar{x} (0,127)
Controle vs Tween 80 % (\bar{x} média e valor de p)	0,0280 ($p = 0,421$)	0,0105 ($p = 0,917$)	0,0255 ($p = 0,020$)	0,0220 ($p = 0,289$)	0,0165 ($p = 0,008$)	0,0460 ($p < 0,001$)	0,0460 ($p = 0,002$)	0,0161 ($p = 0,035$)
Controle vs 12,5 mg.L ⁻¹ (\bar{x} média e valor de p)	0,0280 ($p = 0,337$)	0,0105 ($p = 0,845$)	0,0230 ($p = 0,019$)	0,0110 ($p = 0,128$)	0,0420 ($p = 0,289$)	0,0270 ($p < 0,001$)	0,0270 ($p < 0,001$)	0,0900 ($p = 0,027$)
Controle vs 50 mg.L ⁻¹ (\bar{x} média e valor de p)	0,0490 ($p = 1,000$)	0,0185 ($p = 0,883$)	0,0315 ($p = 0,030$)	0,0105 ($p = 0,224$)	0,0615 ($p = 1,000$)	0,0360 ($p < 0,001$)	0,0360 ($p = 0,001$)	0,0720 ($p < 0,001$)
Controle vs 100 mg.L ⁻¹ (\bar{x} média e valor de p)	0,0490 ($p = 1,000$)	0,0110 ($p = 0,736$)	0,0140 ($p = 0,004$)	0,0105 ($p = 0,173$)	0,0335 ($p = 0,128$)	0,0145 ($p < 0,001$)	0,0145 ($p < 0,001$)	0,0995 ($p = 0,048$)

Os valores apresentados na tabela se referem a média (\bar{x}) do controle em relação à média (\bar{x}) dos grupos expostos. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$, os quais estão destacados em negrito.

Tabela 4. Amônia real na água de exposição de *zebrafish* no ensaio de recuperação.

Amônia \bar{x} (média do controle)	4 dias \bar{x} (0,0720)	8 dias \bar{x} (0,127)	14 dias \bar{x} (0,0180)
Controle vs Tween 80 % (\bar{x} média e valor de p)	0,127 ($p < 0,001$)	0,127 ($p = 1,000$)	0,0180 ($p = 1,000$)
Controle vs 12,5 mg.L ⁻¹ (\bar{x} média e valor de p)	0,127 ($p < 0,001$)	0,0750 ($p < 0,001$)	0,0225 ($p = 0,769$)
Controle vs 50 mg.L ⁻¹ (\bar{x} média e valor de p)	0,127 ($p < 0,001$)	0,156 ($p = 0,002$)	0,00180 ($p = 0,122$)
Controle vs 100 mg.L ⁻¹ (\bar{x} média e valor de p)	0,127 ($p < 0,001$)	0,0900 ($p < 0,001$)	0,0235 ($p = 0,817$)

Os valores apresentados na tabela se referem a média (\bar{x}) do controle em relação à média (\bar{x}) dos grupos expostos. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$, os quais estão destacados em negrito.

12.3.2 Análises histológicas

As análises histológicas mostram aglomerados de MPs de polietileno com fluorocromo laranja no lúmen intestinal do peixe *D. rerio*. Conforme pode-se ver nas figuras 23 e 24, esses MPs não estavam presentes nas brânquias nem em outros órgãos deste peixe. A figura 21 refere-se ao controle água, as figuras 22, 25 e 26 mostram o acúmulo dessas partículas no intestino de *zebrafish*.

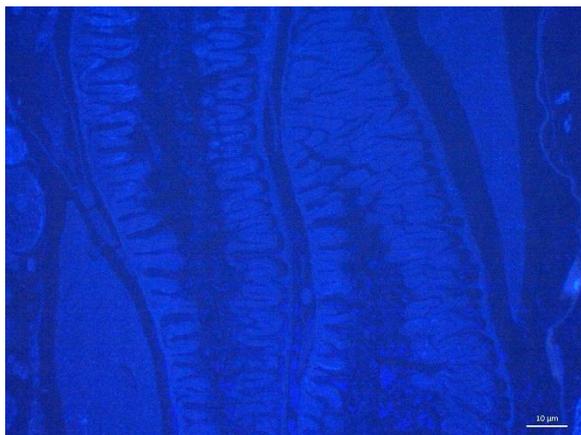


Figura 21. Fotomicrografia de fluorescência do intestino de adulto de *zebrafish*. Concentração $0,00 \text{ mg.L}^{-1}$ - grupo controle. Não foram detectados microplásticos de polietileno.

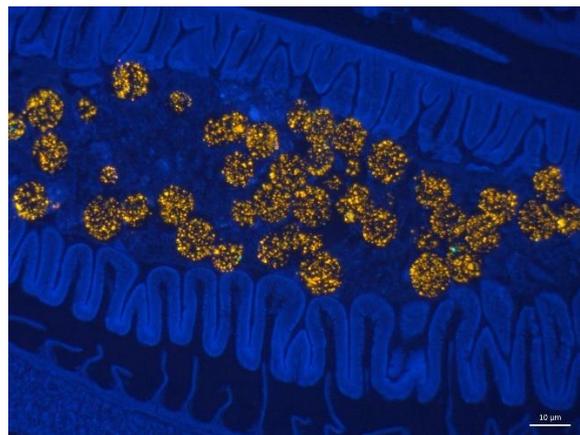


Figura 22. Fotomicrografia de fluorescência do intestino de adulto de *zebrafish*. Concentração de 50 mg.L^{-1} . Foram detectados microplásticos de polietileno na luz intestinal.

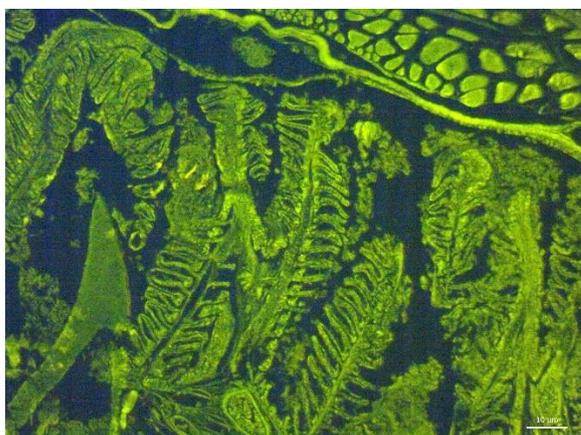


Figura 23. Fotomicrografia de fluorescência das brânquias de adulto de *zebrafish*. Concentração de 50 mg.L^{-1} . Não foram detectados microplásticos de polietileno.

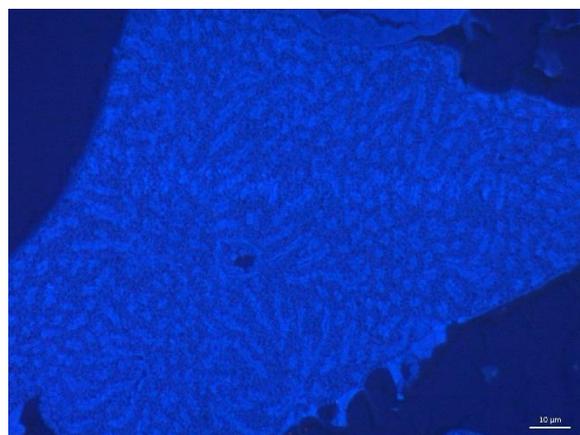


Figura 24. Fotomicrografia de fluorescência do fígado de adulto de *zebrafish*. Concentração de 50 mg.L^{-1} . Não foram detectados microplásticos de polietileno.

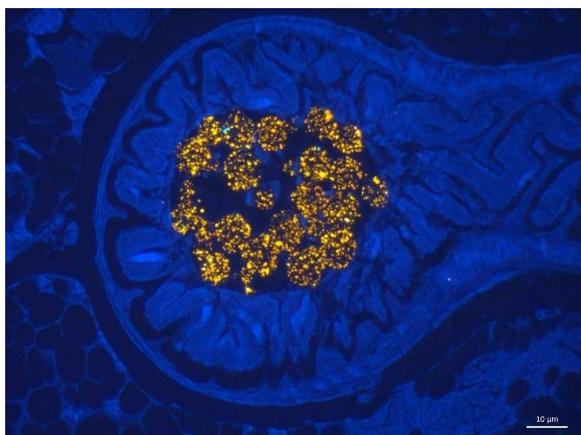


Figura 25. Fotomicrografia de fluorescência do intestino de adulto de *zebrafish*. Concentração de 50 mg.L^{-1} . Foram detectados microplásticos de polietileno na luz intestinal.

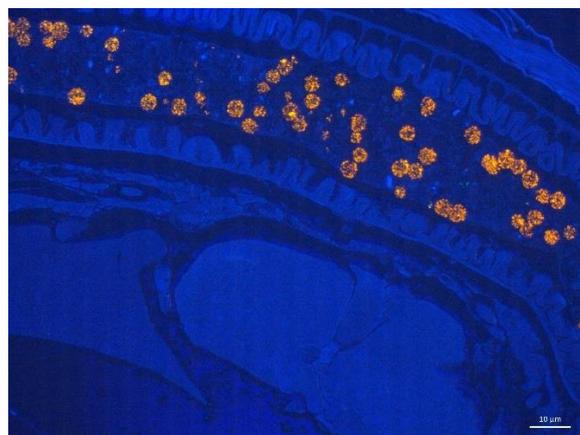


Figura 26. Fotomicrografia de fluorescência do intestino de adulto de *zebrafish*. Concentração de 50 mg.L^{-1} . Foram detectados microplásticos de polietileno na luz intestinal.

12.3.3 Frequência de Micronúcleos e de Anomalias Nucleares

A frequência de micronúcleos e de anomalias nucleares nos eritrócitos foram avaliadas apenas no ensaio agudo e não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$), figura 27.

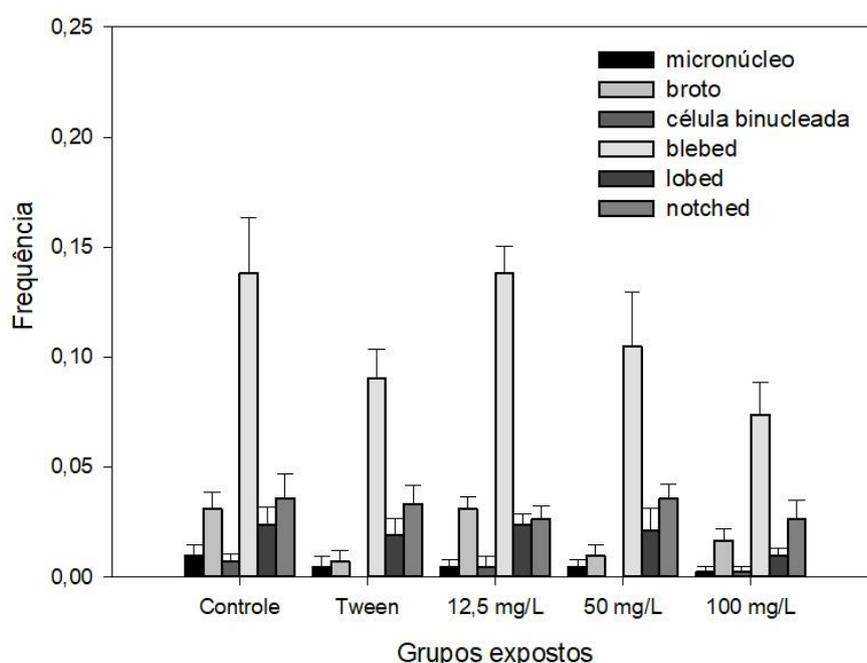


Figura 27. Frequência absoluta de micronúcleo e anomalias nucleares em eritrócitos periféricos de *zebrafish*, ensaio agudo. Os dados estão representados pela porcentagem média \pm erro padrão. O grupo controle foi comparado aos tratados com microplásticos de polietileno (12,5 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹) e ao dispersante grupo Tween 80 %, $p > 0,05$.

12.3.4 Ensaio do Cometa

No ensaio agudo, apenas o grupo controle positivo, expostos a H₂O₂ a 0,1%, teve danos moderados e elevados significativos ($p < 0,05$) quando comparados ao controle água. Os demais grupos expostos não tiveram o valor p significativo, figura 28. O mesmo resultado para os danos elevados foi observado na exposição crônica (28 dias), apenas a H₂O₂ teve dano elevado significativo (***) $p < 0,001$ quando comparados ao controle (fig. 29). No ensaio de 14 dias de recuperação, o exposto a H₂O₂, teve danos moderados e elevados significativos (***) $p < 0,001$ quando comparados ao controle (fig. 30). Todavia, o aumento da significância estatística se deve, possivelmente, ao maior tempo de corrida, que foi de 20 minutos nestes dois últimos ensaios.

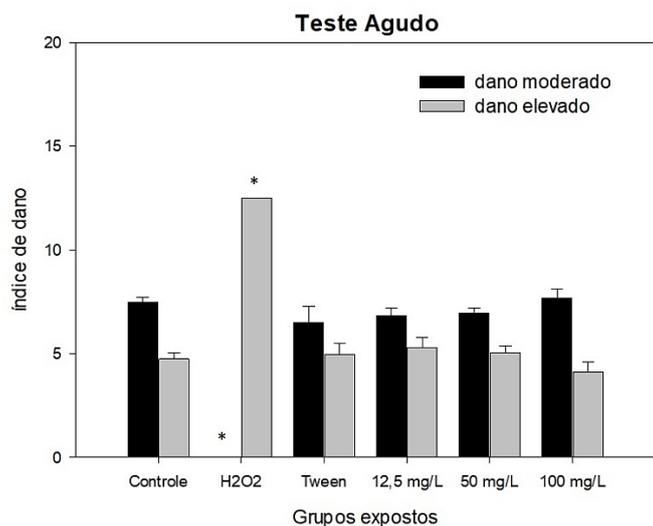


Figura 28. Índice de danos moderados e elevados do DNA em eritrócitos de *zebrafish*, ensaio agudo. Os dados estão representados pela média de índice de danos \pm erro padrão. O grupo controle foi comparado aos tratados com microplásticos de polietileno (12,5 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹) e ao grupo Tween 80 %, * $p < 0,05$.

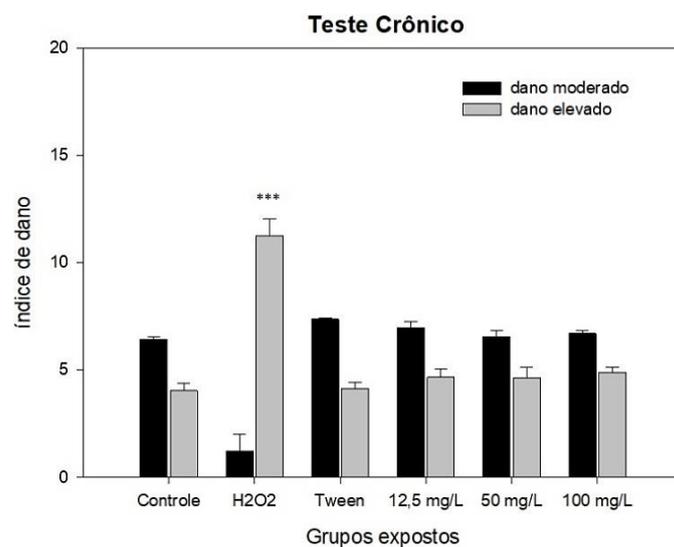


Figura 29. Índice de danos moderados e elevados do DNA em eritrócitos de *zebrafish*, ensaio crônico. Os dados estão representados pela média de índice de danos \pm erro padrão. O grupo controle foi comparado aos tratados com microplásticos de polietileno (12,5 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹) grupo Tween 80 %, *** $p < 0,001$.

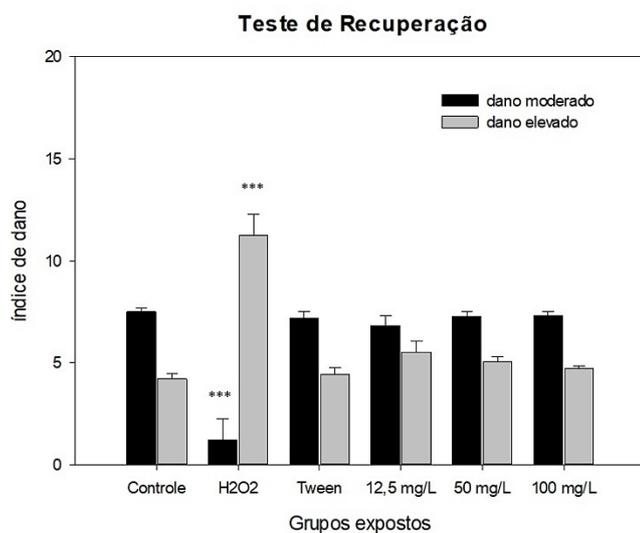


Figura 30. Índice de danos moderados e elevados do DNA em eritrócitos de *zebrafish*, ensaio de recuperação. Os dados estão representados pela média de índice de danos \pm erro padrão. O grupo controle foi comparado aos tratados com microplásticos de polietileno (12,5 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹) e ao grupo Tween 80 %, *** $p < 0,001$.

12.3.5 Marcadores bioquímicos

12.3.5.1 Atividade de acetilcolinesterase

No ensaio agudo, a atividade da AChE em amostras da cabeça tiveram diminuição significativa (***) $p < 0,001$) nas concentrações de 50 mg.L⁻¹ (135,8 nmol/mg de proteína) e 100 mg.L⁻¹ (131,5 nmol/mg de proteína) quando comparadas ao controle água (251,4 nmol/mg de proteína). Na cauda não foi detectada diferença estatística significativa, $p > 0,05$, conforme ilustra a figura 31. A diminuição também foi observada no ensaio crônico, sendo observados valores de p significativos (***) $p < 0,001$) quando se comparou o controle água (354,6 nmol/mg de proteína) aos grupos *Tween* 80 % (251,5 nmol/mg de proteína), 12,5 mg.L⁻¹ (245,6 nmol/mg de proteína) e 100 mg.L⁻¹ (200,7 nmol/mg de proteína), e significativo (**) quando comparado a concentração de 50 mg.L⁻¹ ($p = 0,002$), média de 272,5 nmol/mg de proteína. Na cauda, a atividade também não demonstrou valor significativo, $p = 0,058$ (fig. 32).

Em contrapartida, no grupo de recuperação, atividade de AChE na cabeça não demonstrou valor significativo, $p > 0,05$. Mas na cauda os valores de p foram significativos. A diminuição foi significativa (***) $p < 0,001$) quando comparados ao controle (649,2 nmol/mg de proteína) os grupos 12,5, 50 e 100 mg.L⁻¹, com médias de 451,3, 330,3 e 287 nmol/mg de proteína respectivamente. O valor de p foi significativo (**) $p < 0,01$) quando o controle foi comparado ao dispersante *Tween* 80 % (média de 491,7 nmol/mg de proteína), conforme figura 33.

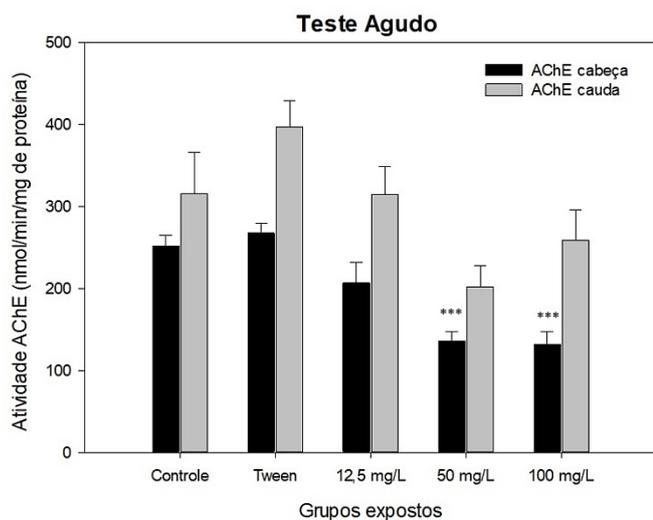


Figura 31. Acetilcolinesterase (AChE) em amostras da cabeça e da cauda em adultos de *zebrafish*, ensaio agudo. Os dados estão representados pela média da atividade de AChE \pm erro padrão. O grupo controle foi comparado aos tratados com microplásticos de polietileno (12,5 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹) e ao grupo Tween 80 %, *** $p < 0,001$.

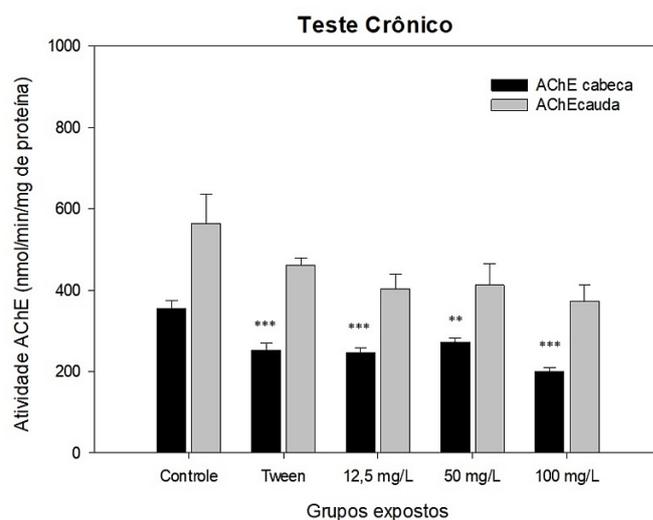


Figura 32. Acetilcolinesterase (AChE) em amostras da cabeça e da cauda em adultos de *zebrafish*, ensaio crônico. Os dados estão representados pela média da atividade de AChE \pm erro padrão. O grupo controle foi comparado aos tratados com microplásticos de polietileno (12,5 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹) e ao grupo Tween 80 %, *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$.

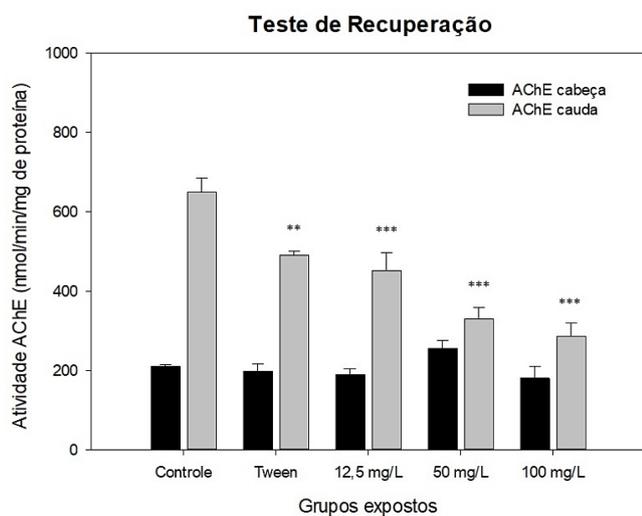


Figura 33. Acetilcolinesterase (AChE) em amostras da cabeça e da cauda em adultos de *zebrafish*, ensaio de recuperação. Os dados estão representados pela média da atividade de AChE \pm erro padrão. O grupo controle foi comparado aos tratados com microplásticos de polietileno (12,5 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹) e grupo Tween 80 %, *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$.

12.3.5.2 Atividade de glutathiona-S-transferase

Na exposição aguda, a mensuração da atividade de glutathiona-S-transferase nas brânquias de *zebrafish* teve aumento significativo (***) $p < 0,001$) quando se comparou os grupos expostos, *Tween* 80 %, 12,5, 50 e 100 mg.L⁻¹ ao controle ou água reconstituída, média de 46,9 nmol/mg de proteína no controle, e 55,9, 89,2, 95,4 e 93,2 nmol/mg de proteína, nos demais grupos respectivamente. Em contrapartida, nas amostras do corpo houve uma diminuição significativa, $p < 0,05$ na atividade enzimática quando se comparou o controle (75,43 nmol/mg de proteína) às concentrações de 50 mg.L⁻¹ (54,78 nmol/mg de proteína) e 100 mg.L⁻¹ (56,60 nmol/mg de proteína) (fig. 34).

No ensaio crônico, a atividade da GST nas brânquias permaneceu significativa (***) $p < 0,001$) quando se comparou o controle água à concentração de 12,5 mg.L⁻¹, e quando se comparou às concentrações de 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹ o aumento foi significativo, ** $p < 0,05$. Em contrapartida ao resultado das brânquias e ao resultado do corpo no experimento agudo, as amostras do corpo, no ensaio crônico, não tiveram diferenças significativas (fig. 35).

Na recuperação, as brânquias tiveram aumento significativo (* $p < 0,05$) quando se comparou o grupo água às concentrações de 12,5, 50 e 100 mg.L⁻¹. Porém, no corpo não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, $p < 0,05$ (fig. 36).

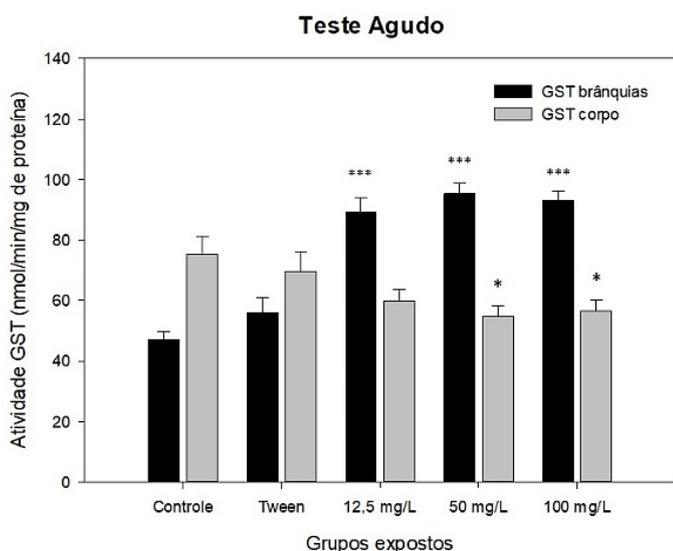


Figura 34. Glutaciona-S-transferase (GST) em amostras da brânquia e corpo em adultos de *zebrafish*, ensaio agudo. Os dados estão representados pela média da atividade de GST \pm erro padrão. O grupo controle foi comparado aos tratados com microplásticos de polietileno (12,5 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹) e ao grupo Tween 80 %, *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$.

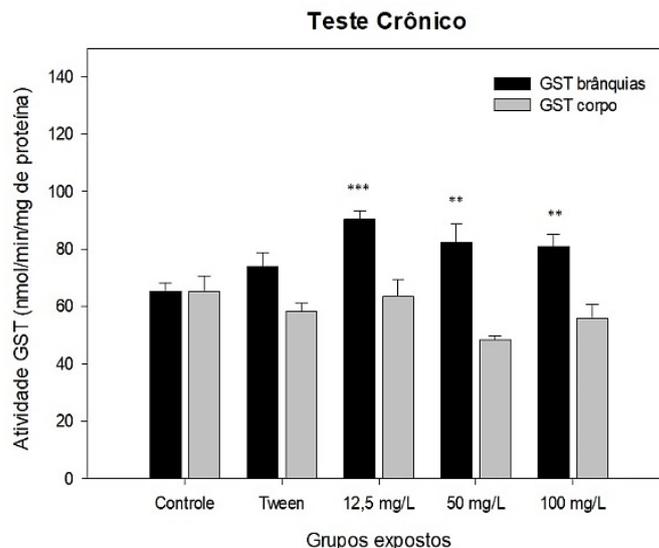


Figura 35. Glutaciona-S-transferase (GST) em amostras da brânquia e corpo em adultos de *zebrafish*, ensaio crônico. Os dados estão representados pela média da atividade de GST \pm erro padrão. O grupo controle foi comparado aos tratados com microplásticos de polietileno (12,5 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹) e ao grupo Tween 80 %, *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$.

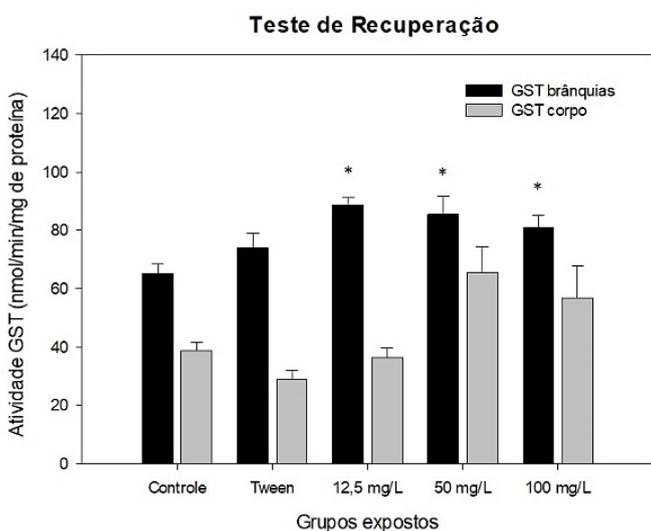


Figura 36. Glutaciona-S-transferase (GST) em amostras da brânquia e corpo em adultos de *zebrafish*, ensaio de recuperação. Os dados estão representados pela média da atividade de GST \pm erro padrão. O grupo controle foi comparado aos tratados com microplásticos de polietileno (12,5 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹) e ao grupo Tween 80 %, * $p < 0,05$.

12.3.5.3 Atividade de lactato desidrogenase

Na exposição de 96 horas (aguda) não foram observadas diferenças estatísticas nas amostras da cauda de *zebrafish* na atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), figura 37. No experimento crônico, uma diminuição significativa * $p < 0,05$ (fig. 38) foi observada quando se comparou o controle água (média de 1345,6 nmol/mg de proteína) aos expostos a MPs nas concentrações de 12,5 mg.L⁻¹ (1074,3 nmol/mg de proteína), 50 mg.L⁻¹ (1037,8 nmol/mg de proteína) e 100 mg.L⁻¹ (1090,5 nmol/mg de proteína). Assim como o observado no agudo, na recuperação não foram detectados valores estatisticamente significativos na atividade de LDH, $p > 0,05$ (fig. 39).

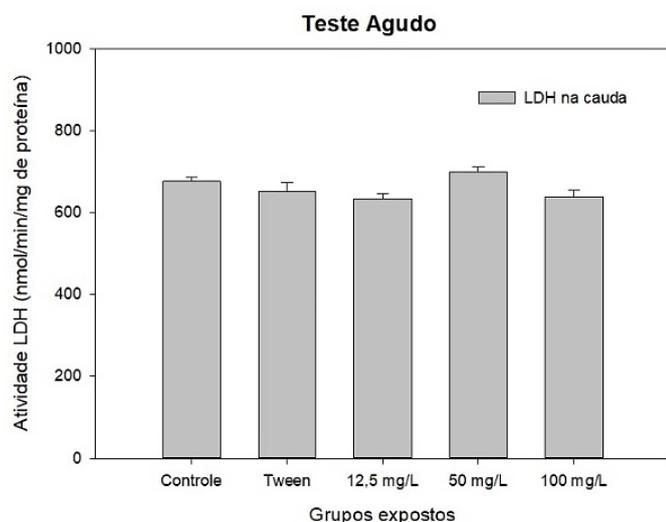


Figura 37. Lactato desidrogenase (LDH) em amostras da cauda em adultos de zebrafish, ensaio agudo. Os dados estão representados pela média da atividade de LDH \pm erro padrão. O grupo controle foi comparado aos tratados com microplásticos de polietileno (12,5 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹) e ao grupo Tween 80 %, $p > 0,05$.

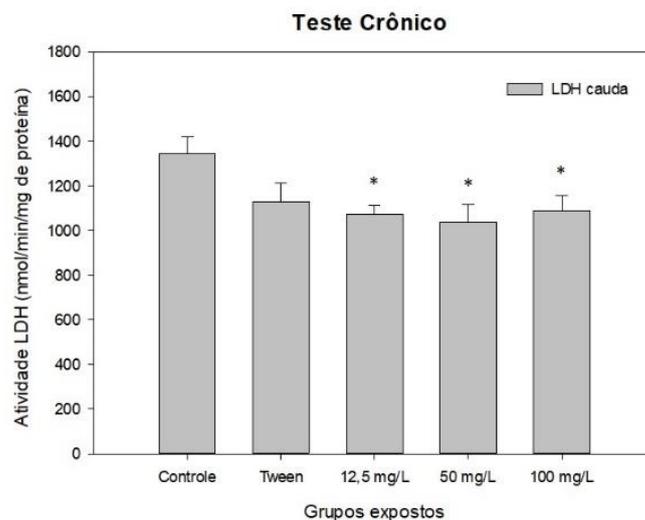


Figura 38. Lactato desidrogenase (LDH) em amostras da cauda em adultos de zebrafish, ensaio crônico. Os dados estão representados pela média da atividade de LDH \pm erro padrão. O grupo controle foi comparado aos tratados com microplásticos de polietileno (12,5 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹) e ao grupo Tween 80 %, * $p < 0,05$.

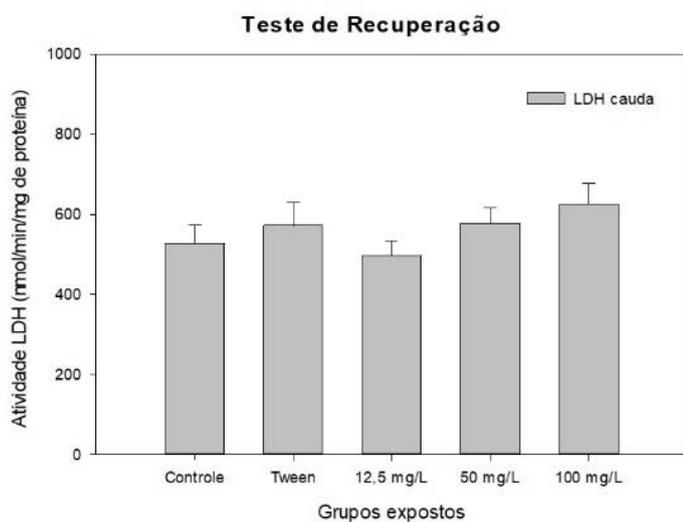


Figura 39. Lactato desidrogenase (LDH) em amostras da cauda em adultos de zebrafish, ensaio de recuperação. Os dados estão representados pela média da atividade de LDH \pm erro padrão. O grupo controle foi comparado aos tratados com microplásticos de polietileno (12,5 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹) e ao grupo Tween 80 %, $p > 0,05$.

13. Discussão sobre os ensaios com *zebrafish*

Plásticos são poluentes onipresentes em todo o mundo (PITT et al. 2018). As microesferas plásticas são comuns em produtos de limpeza facial e corporal (FENDALL; SEWELL, 2009; KATARE et al. 2022; WANG, et al. 2022), sendo que OS PE MPs estão presentes em cerca de 90 % de produtos esfoliantes facial e corporal, e devido ao seu tamanho, < 5 mm, não são retidas pelas estações de tratamento de água, e por isso estão presentes em grande quantidade nos efluentes (FENDALL; SEWELL, 2009). Além disso, plásticos de polietileno (de alta e baixa densidade) são um dos mais produzidos no Brasil (ABIPLAST, 2021), logo, em virtude desses dados, MPs de polietileno foram selecionados para este estudo.

A abundância e distribuição de MPs em água doce são afetadas sobretudo pela presença humana, pela proximidade a centros urbanos, condições hidrológicas e meteorológicas (XU et al. 2020a). Muitos estudos ecotoxicológicos revelam os efeitos de MPs em organismos marinhos (COLE et al. 2013; NELMS et al., 2019; EXPÓSITO et al., 2022; BOSKOVIC; JOKSIMOVIC; BAJT, 2023; RIVER-AUTY et al., 2023; ZAVALA-ALARCON et al. 2023), mas poucos trabalhos demonstram os efeitos em organismos de água doce, sobretudo em crustáceos e peixes (CASILLAS et al. 2023). Por isso, esses estudos se fazem necessários.

O ensaio de embriotoxicidade (FET) está bem descrito no *guideline* nº 236 da OECD (2013), e tem elucidado os possíveis efeitos adversos de substâncias que estão disponíveis no ambiente (PIAU et al. 2022). Nosso trabalho demonstrou que microesferas de polietileno de 59 µm não ultrapassam a barreira do córion, mas que podem ficar aderidas a ele (figuras 11 e 12). O córion tem uma espessura de cerca de 3,5 µm e abertura de 0,5 – 0,7 µm, ele age como uma barreira protetora para o embrião de *zebrafish*, por isso, compostos maiores que 3kDa não conseguem ultrapassar, mas compostos como a água, íons e outros produtos menores conseguem permear essa barreira (JONES; MARTIN; HARDY, 1978).

Conforme se observou, o contato direto do *zebrafish* com os MPs ocorreu após a eclosão, por volta de 72 horas após a fecundação (hpf), e a partir de então, a ingestão oral tomou importância (BAUER, MALLY, LIEDTKE, 2021). A ingestão de microplástico foi observada nas figuras 15 e 16, que mostram as larvas expostas, nas concentrações de 50 e 100 mg.L⁻¹, com essas partículas no intestino. Além disso,

outras alterações, por mais que tenham sido detectadas não foram estatisticamente significativas, $p > 0,05$.

Resultado semelhante foi encontrado por Qiang e Cheng (2019), eles não encontraram efeito no desenvolvimento embrionário de *zebrafish* exposto a MP de poliestireno verde de 1 μm de diâmetro, porém eles verificaram alterações na competência natatória, como distância e velocidade. Assim como nesse trabalho, outro estudo de 2022 (MANUEL et al.), também não viu alterações no desenvolvimento embrionário de *D. rerio* expostos a NPs de 22 nm. Todavia, Malafaia et al. (2020) expôs embriões de *zebrafish* a PE MPs de marcados cm Vermelho de Nilo de 38,6 μm e observou a eclosão precoce e alterações morfométricas significativas. Pitt et al. (2018), também perceberam que NPs de 34,8 nm atravessaram o córion. Desta forma, percebe-se que esses resultados estão mais associados à dinâmica das partículas, ao formato e tamanho delas, a concentração ou mesmo às condições de experimentação. Pois alguns trabalhos já relataram que MPs de forma irregular ou fragmentada possuem um perfil de interação diferente das microesferas plásticas (WEBER et al. 2021; WANG et al. 2022).

Assim como no resultado do FET, o ensaio com juvenis mostrou que após o desenvolvimento do hábito alimentar as MPs são facilmente ingeridas por *zebrafish*, as figuras 17 a 19 mostram o trato gastrointestinal cheio de MPs laranja. Porém, a total depuração delas não ocorre de forma imediata, pois no nosso experimento a eliminação total em juvenis levou cerca de duas semanas, figura 20.

Em um artigo de revisão, Xu et al. (2020a), consideraram que a depuração de MPs é significativamente rápida, até 14 dias em artemias e questão de horas para outras espécies como mexilhões. Pitt et al. (2018), também verificaram que a eliminação de NPs em *zebrafish* ocorre, mas de forma lenta, pois em 168 hpf elas ainda estavam presente no GI de larvas de *Danio*. Outros estudos mostram que as microesferas plásticas causam injurias no intestino, mas são eliminadas de forma mais rápida do que partículas irregulares (BARNES et al. 2009; VENDEL et al. 2017). Nesse sentido, percebe-se que a depuração ocorre, de forma rápida ou lenta, mas ocorre, o que corrobora nossos achados, pois percebe-se, que a eliminação de xenocompostos é uma estratégia de sobrevivência de muitos organismos aquáticos.

Pitt et al. (2018) indicam que após 120 hpf o trato gastrointestinal (GI) de *zebrafish* está funcional, e por isso, as partículas podem ali se acumular, conforme ilustra a figura 18. Assim como nesse estudo, outros já observaram a presença de

MPs no intestino de adultos de *zebrafish* (LU et al. 2016) e de tilápias (DING et al., 2018). Entretanto, esses mesmos trabalhos observaram essas partículas em outros órgãos como nas brânquias e no fígado, o que não foi observado nas amostras histológicas deste trabalho, figuras 21, 23 e 24. Talvez isso se deva ao tamanho do peixe, pois a tilápia atinge tamanhos maiores que os de *D. rerio*, ao tempo de exposição e à quantidade de microplástico ao qual o animal foi exposto.

A presença de MPs pode ocasionar um processo inflamatório no intestino de peixes (LU et al., 2016; QIANG; CHENG, 2019; MEDRIANO; BAE, 2022) e com isso alterar a microbiota causando disbiose intestinal (JIN et al. 2017; JIN et al. 2018). Essa alteração na microbiota intestinal e o processo inflamatório já foi observado inclusive em outras espécies como em aves-marinhas (FACKELMANN et al. 2023) e em humanos, onde a concentração de MPs foi maior no conteúdo fecal de pacientes com doença inflamatória intestinal (YAN et al. 2022).

Os plásticos podem causar estresse oxidativo e citotoxicidade devido ao processo inflamatório, além disso interferem, por vezes, na expressão gênica por meio de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BHUYAN, 2022) e assim causam danos no DNA (CAI et al. 2017; SÖKMEN et al. 2019). Lemoine et al. (2018) verificaram que MPs de polietileno de 10 – 45 µm induziram mudanças transcricionais durante o desenvolvimento embrionário de *zebrafish* e Limonta e colaboradores (2019) também perceberam o mesmo em adultos de *Danio*.

Araújo et al. (2022) demonstraram que MPs de polietileno de 36 µm, exposição de 15 dias, foram capazes de induzir quebra significativa no DNA de *zebrafish* no ensaio do cometa, porém não encontraram o mesmo no ensaio do micronúcleo e de anomalias nucleares. Apesar desse dado de cometa, nosso estudo não detectou alterações significativas no DNA por meio de ambos os ensaios, tanto na exposição de 96 horas quanto na de 28 dias (figuras 28 e 29), também não foram observadas alterações significativas em anomalias nucleares e no ensaio do micronúcleo (fig. 27).

Outro trabalho mostrou genotoxicidade em *Ceriodaphnia dubia* expostas a MPs (NUGNES et al. 2022). Entretanto, mais uma vez acredita-se que esses resultados estejam associados ao tempo de exposição, ao tamanho e às concentrações das MPs.

Outro marcador que deve ser considerado em ensaios com organismos aquáticos são os parâmetros que avaliam a qualidade da água dos experimentos, pois alguns deles são fundamentais para o bem-estar e qualidade de vida do peixe, como

o oxigênio dissolvido (OD), pH, turbidez e amônia tóxica. A Resolução CONAMA 357 (BRASIL, 2005) que classifica as águas doces para o consumo humano e preservação das comunidades aquáticas, observa que águas de classe 3 - as destinadas ao consumo humano, após tratamento convencional ou avançado, e destinada a pesca amadora - não devem ter OD menor que 4 mg.L^{-1} , turbidez até 100 UNT, e pH de 6 – 9.

Segundo a CETESB ([202-?a]), o OD é um fator limitante para a manutenção da vida aquática e de processos de autodepuração em sistemas aquáticos, sendo que algumas espécies não suportam valores menores que 3 mg.L^{-1} podendo causar hipóxia, por isso, em nossos ensaios com *zebrafish* foi mantida aeração constante, acima de 95 % de saturação, durante todo o período de experimentação.

A turbidez mede a quantidade de partículas suspensas na água (CHACON, 1988; FREIRE, 2012), uma turbidez muito alta pode diminuir a natação dos peixes, a procura por alimento, a resposta às alterações no ambiente e a reprodução. Já a diminuição do pH da água eleva a frequência respiratória dos peixes, e o aumento do pH pode levar a lesões no epitélio branquial e das nadadeiras. O extremo de ambos, pH alto ou baixo, pode levar a morte imediata dos peixes (CETESB, [202-?b]); NASCIMENTO; BOIJINK; PÁDUA, 2007). Nesse contexto, tanto a turbidez como o pH foram controlados durante as exposições, e ambos, estiveram dentro do recomendado.

A amônia é um poluente aquático associado a efeitos prejudiciais para organismos aquáticos. A exposição de organismos aquáticos a elevados níveis de amônia pode levar ao aumento de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), alteração na expressão gênica, liberação de citocinas relacionadas a dano no DNA e apoptose (ZHANG et al. 2020).

Neste trabalho, a cada 96 horas, a água de exposição era totalmente renovada para evitar que os níveis de amônia tóxica interferissem nos resultados. No ensaio agudo, ao término da exposição, a concentração de amônia liberada pelos peixes no grupo controle foi de 0,036 ppm, próximo ao máximo preconizado pela resolução CONAMA nº 357 (BRASIL, 2005), e nos grupos expostos houve uma diminuição gradativa deste metabolito conforme a concentração de MPs aumentava. A mínima foi de 0,004 ppm nos aquários com 100 mg.L^{-1} de MPs, esse valor é nove vezes inferior ao valor obtido no grupo controle água reconstituída, conforme tabela 2.

No ensaio crônico (tabela 3), a concentração de amônia nos grupos expostos também foi menor em todos os grupos quando comparados ao controle água. A partir do 12^o de exposição, a diminuição foi estatisticamente significativa ($p < 0,005$), com intervalos nessa significância ao longo de 18 dias de exposição.

Apesar desse intervalo, observou-se ainda que, a partir do 22^o dia de exposição em diante todos os tratamentos foram estatisticamente significativos. Esses resultados da exposição crônica confirmaram o resultado obtido na exposição aguda. A liberação de amônia tóxica foi inibida ao longo das exposições, ou seja, houve uma alteração metabólica em *zebrafish*.

No ensaio de recuperação (tabela 4), 14 dias em água reconstituída livre do contaminante, foi observado que nas primeiras 96 horas, a inibição da amônia permaneceu em todos os grupos comparados ao controle. Após 8 dias de recuperação, a concentração de amônia nos peixes que estavam expostos ao dispersante *Tween* 80% se iguala a concentração do controle água. Nos aquários com peixes que estavam expostos aos MPs a concentração de amônia se mantém inibida ($p < 0,05$), e somente a partir do 14^o dia a concentração de amônia nos aquários que continham MPs deixou de ser estatisticamente significativa. Porém, como a recuperação durou apenas 14 dias, não podemos afirmar que essa recuperação foi mantida.

Desta forma, percebe-se que *zebrafish* tem a liberação de amônia tóxica inibida ao longo da exposição a MPs de polietileno e ao *Tween* 80 % a partir do 12^o de exposição. Depois de 14 dias de recuperação os peixes conseguem eliminar todo o efeito do *Tween* 80 %, mas o mesmo não ocorre com os MPs. Com isso, acredita-se que duas semanas não são suficientes para que adultos de *zebrafish* consigam eliminar totalmente os efeitos causados por MPs.

Alguns trabalhos já indicaram que MPs podem causar uma disbiose intestinal, alterações metabólicas e estresse oxidativo em *zebrafish* (MEDRIANO; BAE, 2022), como alterações metabólicas no fígado, distúrbios lipídicos e no metabolismo energético (LU et al., 2016). Além disso, um estudo sugere que a redução da amônia pode estar associada a biossíntese de aminoácidos para satisfazer a demanda proteica para prover processos de desintoxicação (VENTURINI, 2010). Esses dados corroboraram nosso estudo, pois a amônia corresponde a 80 % do produto excretado por peixes, sendo sintetizada principalmente no fígado e transportada pelo sangue até as brânquias, onde são eliminadas por difusão simples (ISMIÑO-ORBE; ARAÚJO-

LIMA; GOMES, 2003). Associado à essas informações, observa-se que a atividade enzimática de glutathione-S-transferase nas brânquias, porção do peixe em que também ocorre a liberação da amônia, foram significativas quando comparadas ao controle. Essa enzima está relacionada à eliminação de xenobióticos, * $p < 0,05$.

A atividade da enzima AChE é usada para indicar neurotoxicidade (PIAU et al. 2022), que é predominante nos músculos e no sistema nervoso central (SILVA, 2016). Neste estudo, MPs provocaram a diminuição da atividade de AChE em amostras da cabeça de *zebrafish*, tanto na exposição aguda como crônica (figuras 31 e 32), essa diminuição foi significativa (** $p < 0,001$) na maior concentração de MPs (100 mg.L⁻¹) em ambos os tempos de exposição, e significativa na concentração de 12,5 mg.L⁻¹, na exposição crônica. Além disso, após a exposição, no grupo de recuperação, a diminuição da AChE deixou de ser significativa em amostras da cabeça e passou a ser detectada em amostras da cauda, onde a diminuição foi significativa (** $p < 0,001$) em todos os grupos expostos comparados ao controle água. Desta forma, podemos intervir que os MPs também são capazes de provocar neurotoxicidade.

Resultado semelhante foi encontrado por Ding et al. (2018), onde MPs também diminuiram a atividade da AChE em até 37,7%, sugerindo neurotoxicidade, e o mesmo foi sugerido em artigo de revisão por Prüst et al. (2020). Ademais, sabe-se que a inibição na atividade da AChE pode prejudicar o desenvolvimento muscular e nervoso de *zebrafish* (BEHRA et al. 2002).

A enzima glutathione-S-transferase (GST) está envolvida em processos de prevenção ao estresse oxidativo ou de desintoxicação de xenobióticos (ALMEIDA et al. 2019; PIAU et al. 2022), que promove a transformação de composto tornando-os mais hidrofílicos facilitando assim a sua excreção (SILVA, 2012; SANTOS et al. 2021b). De fato, o aumento na atividade de GST nas brânquias foi significativo tanto na exposição de 96 horas, quanto na de 28 dias e no de recuperação. Na exposição aguda, a atividade de GST aumentou significativamente ($p < 0,001$) em todos os grupos expostos à MPs, na exposição crônica esse aumento permaneceu, figuras 34 e 35. Porém, 14 dias de recuperação, em água limpa, não foram o suficientes para normalizar a situação de estresse no animal (fig. 36).

Lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima do metabolismo energético, que pode ser encontrada no músculo de vertebrados, além disso, é um importante parâmetro em peixes que produzem explosões repentinas de natação (RIBEIRO et al. 2015). Em nossos resultados, apenas na exposição crônica pode-se observar uma

diminuição de atividade estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (fig. 38), o que pode sugerir um início de dano celular ou tecidual.

Alterações enzimáticas como as encontradas, já foram percebidas em outros estudos com *zebrafish* e plásticos, Manuel et al. (2022), perceberam alterações de marcadores enzimáticos provocados por nanoplástico em AChE, GST e CAT. MPs de poliestirenos reduziram significativamente as atividades de SOD e CAT (LU et al. 2016; ARAÚJO et al. 2022). Desta forma, percebe-se a importância de estudos de toxicidade em organismos aquáticos, pois eles tentam simular situações que acontecem na natureza, por isso, podem ajudar a inferir quais são os mecanismos de ação destes poluentes e seus possíveis efeitos-adversos.

14. Conclusão

MPs de polietileno com fluorocromo laranja, esféricos, com 59 μm de diâmetro não provocaram embriotoxicidade, pois o córion agiu como barreira protetora e a contaminação só ocorreu após a eclosão. Esses se acumularam no lúmen do intestino, mas não em outros órgãos, e nos juvenis, a depuração ocorreu em torno de 15 dias. Em adultos, eles provocaram neurotoxicidade e estresse oxidativo, alterando a atividade de AChE, GST e LDH. Além disso, eles também inibiram a liberação de amônia tóxica, levando a uma alteração no metabolismo de *zebrafish*. Todavia, essas alterações não foram suficientes para provocar genotoxicidade e citotoxicidade, e após 14 dias de recuperação em água livre do contaminante, os peixes não conseguiram se recuperar totalmente do estresse.

CAPÍTULO III – ENSAIOS COM O CARAMUJO *BIOMPHALARIA GLABRATA*

15. Cultivo e manutenção de *Biomphalaria glabrata*

Uma amostra de adultos de *Biomphalaria glabrata* (n = 20) foi obtidos no Laboratório Ecotoxicologia da EMBRAPA Cerrados (Planaltina - DF). Os animais foram mantidos em aquários de acrílico, ou de vidro sempre fechados, com tampa ou com tecido do tipo tule para evitar a fuga e a deposição de ovos por insetos. Eles foram mantidos em água mole sintética (200 mL da solução 1 [CaSO₄.2H₂O] para 100 mL da solução 2 [NaHCO₃ + MgSO₄.7H₂O + KCl] diluídos em 10 mL), conforme padronizado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2022b) para ensaios de toxicidade com organismos aquáticos.

A fim de aumentar o número de organismos, ao longo do tempo percebeu-se a necessidade de introdução de uma alimentação suplementar para que os caramujos aumentassem a demanda de desova. Pois apenas a alface (*Lactuca sativa* L.) *ad libitum* não foi o suficiente para aumentar a quantidade de massa ovígera. Com isso, se baseando em Freitas e Santos (1995) foram oferecidos outros tipos alimentares: ração para peixe do tipo folha, ração para camundongo embebida com água destilada, leite em pó, além da alface fresca *ad libitum*.

A limpeza dos aquários foi feita a cada três semanas com água declorada, quando a água ficava turva ou com mal cheiro. Para isso, evitou-se alimentar os caramujos com o talo da alface ou com pedaços grandes, para que a alface não apodrecesse no aquário e sempre fosse oferecida alface fresca. O excesso de limpeza pode interferir na microbiota dos aquários, ademais, também se observou que de fato um grande número de bionfálias em um mesmo aquário pode interferir na sobrevivência deles, por isso, a densidade populacional deve ser controlada, conforme cita Ministério da Saúde (2008). Neste contexto, apesar de não ter sido quantificado foi perceptível que essa rotina aumentou a demanda de desova pelos caramujos.

Para a coleta da massa ovígera utilizou-se pedaços de isopor (fig. 40), de preferencial o com a superfície mais rugosa e menos lisa. Com relação a essas desovas, um cuidado semanal foi necessário, elas foram coletadas semanalmente e passadas para um aquário novo com água mole denominado berçário. Após a

eclosão, os juvenis foram alimentados com alface e com leite em pó até que estivessem em tamanho apropriado para a exposição (> 1 cm).

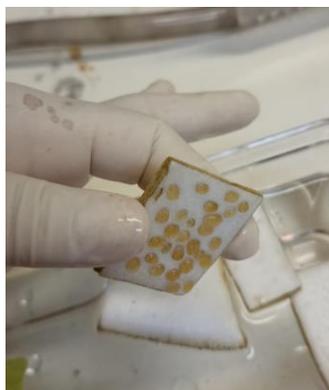


Figura 40. Desova de *Biomphalaria glabrata*.

Além disso, um manejo entre caramujos de diferentes aquários foi feito e com o tempo a introdução de novos caramujos também foi realizada, $n = 05$, para evitar um alto índice de endogamia. Ao longo do cultivo os caramujos apresentaram buracos na concha em virtude da deficiência de cálcio (Ca), todavia, isso foi corrigido com a adição de conchas, casca de ovo seca e triturada, e a mudança da marca do sulfato de cálcio utilizado no preparo da água mole.

16. Delineamento experimental com *Biomphalaria glabrata*

16.1 Ensaio de depuração em juvenis de *B. glabrata*

O ensaio de depuração em juvenis foi realizado em juvenis de 5 mm de tamanho, mantidos em aquários com água mole sintética (ABNT, 2022b), fotoperíodo 16 horas claro/ 14h escuro, em temperatura de + 25 °C. Cinco caramujos ($n = 05$) foram expostos a 100 mg.L^{-1} de MPs em água mole sintética, em frascos com capacidade de 160 mL e vedados com tecido do tipo tule. Eles foram monitorados ao longo das semanas até total eliminação dos MPs. Não foram feitas outras análises com juvenis.

16.2 Ensaio com adultos de *B. glabrata*

Com caramujos adultos, duas exposições foram realizadas: ensaio agudo, 96 horas de exposição, e outra de recuperação dependente.

Para os ensaios caramujos adultos, selvagens da espécie *B. glabrata* foram selecionados conforme tamanho, adultos com mais de 1 cm de diâmetro e no mínimo 2 meses de vida, mantidos em aquários com água mole sintética (ABNT, 2022b), fotoperíodo 16 horas claro/ 14h escuro, em temperatura de + 25 °C. Para isso, uma amostra de sete (n = 07) foi estabelecida para cada tempo de exposição, em frascos de vidro com 120 mL de água mole sintética, conforme estabelecido pela ABNT (2022b) e respeitando a densidade populacional por mL, de acordo com protocolo de manutenção de *B. glabrata* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008), conforme apresentado na figura 41. Além disso, ao longo dos experimentos a cada 48 horas os caramujos foram alimentados apenas com alface fresca.



Figura 41. Desenho experimental do ensaio com *Biomphalaria glabrata* expostos à diferentes concentrações do microplástico de polietileno. Vinte e um (21) animais foram distribuídos em sete (07) frascos de vidro com 120 mL de água mole sintética, Tween 80 % ou nas concentrações de microplásticos de polietileno. Fonte: (AUTORIA PRÓPRIA, 2023).

16.2.1 Ensaio agudo

No ensaio agudo, 96 horas de exposição, as seguintes concentrações foram utilizadas: 12,5 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹, um grupo controle água mole e outro com controle *Tween* 80 %, o mesmo estabelecido para *zebrafish*. Para essa exposição um total de 21 animais por grupo de exposição foram inicialmente selecionados. Ao término da exposição, 7 animais (n = 07), foram selecionados ao acaso para as análises de marcadores bioquímicos: proteína total, glicose, lactato desidrogenase (LDH), acetilcolinesterase (AChE) e glutathione-S-transferase (GST). Os demais animais permaneceram para o ensaio de recuperação.

16.2.2 Ensaio de recuperação

Após 96 horas de exposição aguda os animais foram transferidos para frascos com água mole sintética limpa, livres de MPs, vedados com tecido do tipo tule. A cada 96 horas a água de manutenção era trocada e os caramujos foram higienizados com água declorada. A alimentação ocorreu a cada 72 horas, com alface fresca.

O ensaio de recuperação ocorreu em função do tempo que os animais levaram para eliminar as micropartículas, recuperação dependente. Depois disso, as análises bioquímicas foram novamente realizadas e a porcentagem de depuração, ou eliminação dos PE MPs também foi avaliada.

16.3 Preparo das amostras

Algumas referências bibliográficas (MELLO-SILVA et al. 2010; SILVA, 2014; WEBER et al. 2021) que elas utilizavam hemolinfa como amostra biológica ou utilizam um *pool* de três a cinco animais. Todavia, o volume de hemolinfa obtido para cada caramujo chega ao máximo de 100 µL, quando se consegue obter muita hemolinfa. Isso delimita o uso dos animais, pois cada biomarcador exige uma quantidade mínima de amostra biológica, isso quando não é necessário repetir as análises. Tudo isso exige um número maior de animais para o experimento em virtude do número de marcadores, pois para cada marcador é utilizado uma amostra de cinco ou sete caramujos. Em contrapartida, da forma que foi realizado neste trabalho, utilizou-se uma amostra de apenas sete caramujos para cinco marcadores. E para isso foi

realizado uma adaptação da metodologia utilizada para *zebrafish* com o Sobrenadante Pós-Mitocondrial (SPM). Metodologia semelhante para a obtenção do SPM foi realizada por outros autores (KORIEM; SHAMSURI; UBAIDILLAH, 2016; SONG et al., 2019).

Após as 96 horas de exposição aos MPs, n = 07 foram lavados com água deionada e eutanasiados, colocando-os no congelador. Após verificada a morte, os caramujos foram descongelados, a concha foi removida, e o corpo mole lavado com água deionada e devidamente pesado. Foi importante deixar que descongelasse por total para evitar a perda de partes do corpo mole, figura 42.



Figura 42. Fotografia da manipulação e retirada da concha de *Biomphalaria glabrata*.

As amostras do corpo mole foram então armazenadas em tubo de microcentrifuga (Eppendorf®) com 1 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,2, trituradas com o auxílio tesoura e armazenadas a - 20 °C, sendo posteriormente sonicadas com três pulsos de 20 segundos a 99 Hz em disruptor de célula Ultra-sônico (UNIQUE®), com intervalos de mesmo tempo, sob béquer com gelo para evitar a perda do material. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 RPM, a 4 °C, por 20 minutos, e o sobrenadante pós-mitocondrial distribuído em placa de 96 poços, em quadruplicata, e congelado a - 20 °C até posterior análise em Multiskan FC Thermo Scientific®.

O mesmo procedimento foi realizado nas amostras do ensaio de recuperação e para cada biomarcador a determinação com a hemolinfa foi comparada ao do SPM em um ensaio piloto.

17. Marcadores

17.1 Parâmetros físico-químicos da água de *B. glabrata*

A variável pH foi determinada por meio de medidor de pH de bancada, modelo Orion Star A211 (*Thermo Fisher Scientific*®, EUA). Condutividade elétrica foi determinada por meio de condutivímetro portátil, modelo SensION 156 (*Hach*®, EUA). A dureza total foi realizada por meio de titulação através do método titulométrico EDTA-Na (APHA, 2018).

Os cátions amônio, cálcio (Ca) e magnésio (Mg) foram determinados por cromatografia iônica por meio de Cromatógrafo de Íons 761 Compact IC, Metrohm (*Herisau*®, Suíça). Para isso foi utilizada uma coluna de troca iônica Metrosep C4 e como eluente uma solução tampão de 4,0 mM de ácido tartárico e 0,75 mM de Ácido Dipicolínico (ácido 2,6-piridinodicarboxílico) (ISO, 1998).

17.2 Concentração de proteína total

A concentração de proteínas totais foi obtida utilizando o kit de proteínas totais veterinário BioTécnica®, através da reação de Biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949). A concentração de proteínas totais ocorreu por meio da reação de 5 µL de amostras com 250 µL de reagente R1 (sulfato de cobre ≥ 5 mmol/L, tartarato de sódio e potássio ≥ 20 mmol/L, iodeto de potássio ≥ 10 mmol/L, hidróxido de sódio $\geq 0,1$ mol/L), com o padrão (250 µL do reagente R1 e 5 µL do reagente STD [tampão fosfato ≥ 20 mmol/L; albumina bovina em concentração equivalente a 5,0 g/dL]) frente ao branco, 250 µL de R1. A metodologia foi adaptada para microplacas em quadruplicata. Após 10 minutos de reação em temperatura ambiente foi realizada a leitura em espectrofotômetro, absorvância de 595 nm. O resultado foi obtido pela média da absorvância das amostras dividido pela absorvância do padrão, multiplicado pela concentração do reagente STD e pelo peso do corpo mole de cada animal.

17.3 Concentração de glicose

A concentração de glicose (TRINDER,1969) foi determinada por meio da metodologia descrita em kit de diagnóstico laboratorial BioTécnica®. 05 µL do sobrenadante pós-mitocondrial (SPM) foram homogeneizados à 250 µL do reagente colorimétrico R1 (tampão fosfato ≥ 40 mmol/L; 4-aminoantipirina $\geq 0,2$ mmol/L; fenol $\geq 1,0$ mmol/L. peroxidase ≥ 500 U/L; glicose oxidase ≥ 5000 U/L), medido junto à absorbância do padrão (5 µL do reagente STD [100 mg/dL de glicose] homogeneizados com 250 µL do reagente R1, frente ao branco (250 µL do reagente R1).

As amostras foram incubadas por 10 minutos a 37 °C em banho-maria, em placa de 96 poços, realizada em quadruplicata e em seguida a absorbância foi lida a 450 nm em espectrofotômetro.

O resultado foi dado por meio da média da absorbância das amostras dividida pela média do padrão multiplicado por 200 (fator de divisão diluição), em função do peso do corpo mole de cada animal.

17.4 Atividade de lactato desidrogenase

O protocolo para a determinação da atividade de LDH foi obtido a partir do documento técnico do kit de diagnóstico laboratorial veterinário BioTécnica®. Para isso, foi preparado o reagente de trabalho na proporção de 4 partes do reagente R1 (tampão TRIS ≥ 50 mmol/L; piruvato de sódio $\geq 0,5$ mmol/L) para 1 parte do reagente 2 (tampão carbonato ≥ 2 mmol/L; NADH $\geq 0,5$ mmol/L), esse reagente foi aquecido por 3 minutos à 37 °C em banho-maria. Em placa de 96 poços 10 µL de amostra do SPM foram homogeneizados a 250 µL do reagente de trabalho, e após um 1 minuto de reação foram feitas 4 leituras com intervalos de 1 minuto cada, totalizando 3 minutos, à 340 nm.

Os resultados foram obtidos através da média da variação da absorbância por minutos, multiplicado por um fator, em função do peso do corpo mole de cada animal.

17.5 Atividade de acetilcolinesterase

Para a determinação da atividade da AChE, primeiramente, foi quantificado a concentração de proteínas totais pelo método de Bradford (1976), toda a análise foi determinada em quadruplicata a 595 nm, utilizando a γ -globulina como padrão e a concentração de proteínas utilizada para a realização da determinação da atividade de acetilcolinesterase foi de 0,3 – 0,5 mg/mL.

A atividade enzimática foi determinada através do aumento da cor amarela proveniente da produção de 5-mercaptop-2-nitrobenzoato pela reação do substrato tiocolina com 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) ou DTNB.

A atividade da acetilcolinesterase foi expressa em nanomol de substrato hidrolisado por minuto por mg de proteína. Para isso, foram utilizados 50 μ l de PMS e 250 μ l de solução de reação (acetilcolina (ACh) e propioniltiocolina (75 mM) e DTNB (10 mM)) em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) contra o branco, 50 μ l de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) e 250 μ l de solução de reação. A absorbância foi mensurada em 405 nm, lido de imediato, com intervalos de 40 segundo num total de 5 minutos, conforme protocolo de Ellman et al. (1961), adaptado para microplacas (GUILHERMINO et al. 1996).

17.6 Atividade de glutathiona-S-transferase

A avaliação do estresse oxidativo por meio da atividade da GST seguiu as metodologias descritas por Monteiro et al. (2006). A atividade da GST foi medida de acordo com 1-cloro-2, 4 dinitrobenzeno (CDNB) como substrato (HABIG et al. 1974). A formação de adutos glutathiona S-2 ,4-dinitrofenil foi acompanhada pelo aumento da absorbância a 340 nm contra o branco. O coeficiente de extinção molar utilizado para CDNB foi de $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. A atividade foi expressa como a quantidade de enzima que catalisa a formação de um nanomols de produto formado por minuto por miligrama de proteína, cuja a concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford (1976), na concentração de 0,3 a 0,5 mg/mL em quadruplicata a 595 nm, utilizando a γ -globulina como padrão.

A atividade foi determinada usando 100 μ l de PMS, 200 μ l de solução de reação (glutathiona (10 mM), diluída em tampão fosfato (0,1 M, pH 6,5, e CDNB (10 mM)) em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) contra o branco, 100 μ l de tampão fosfato (0,1 M, pH

7,2) e 200 µl de solução de reação, lido de imediato com intervalos de 40 segundos, em um total de 5 minutos, ou 8 leituras.

18. Resultado do ensaio de depuração com juvenis de *B. glabrata*

Após 96 horas de exposição aos MPs de polietileno a 100 mg. L⁻¹ os juvenis foram acompanhados ao longo de semanas até a total depuração dos microplásticos de polietileno, em água mole sintética livre de MPs. Observa-se nas figuras 43 a 45 que a maioria dos MPs se depositaram na porção intestinal dos juvenis. Já no vigésimo (20^o) dia de recuperação foi observada a total eliminação dos MPs, conforme figura 48. Logo, essa total eliminação ocorreu depois do 12^o dia de depuração.

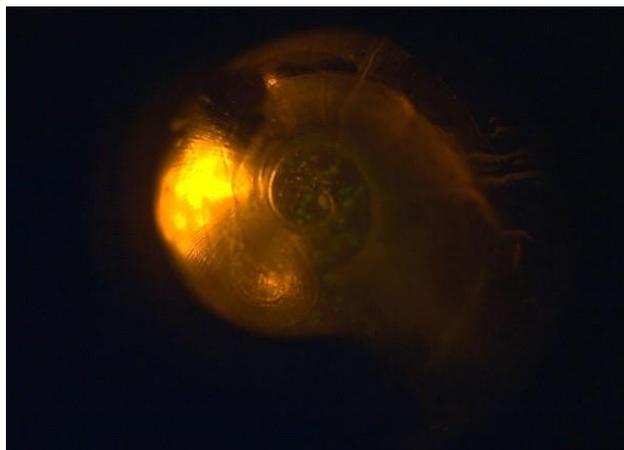


Figura 43. Fotomicrografia de fluorescência de *Biomphalaria glabrata* juvenil após 96 horas de exposição. Concentração de 100 mg.L⁻¹. Aumento 400X. Com detecção de microplásticos de polietileno.

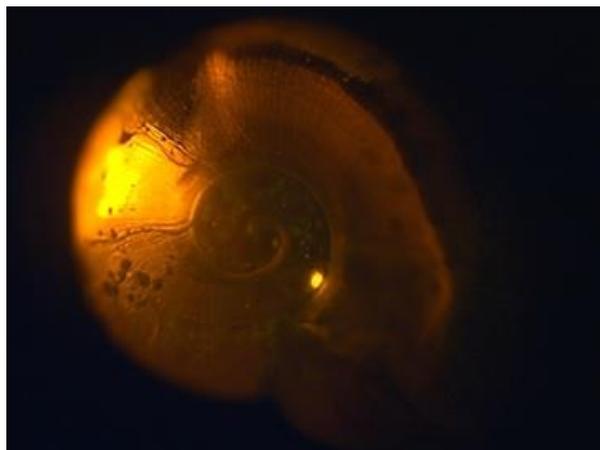


Figura 44. Fotomicrografia de fluorescência de *Biomphalaria glabrata* juvenil após 96 horas de exposição. Concentração de 100 mg.L⁻¹. Aumento 400X. Com detecção de microplásticos de polietileno.

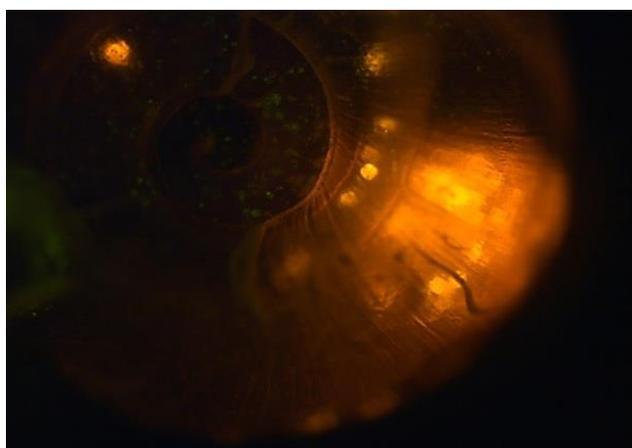


Figura 45. Fotomicrografia de fluorescência de *Biomphalaria glabrata* juvenil após 96 horas de exposição. Concentração de 100 mg.L⁻¹. Aumento 400X. Com detecção de microplásticos de polietileno.



Figura 46. Fotomicrografia de fluorescência de *Biomphalaria glabrata* juvenil após 72 horas de depuração em água mole sintética. Concentração de 100 mg.L⁻¹. Aumento 400X.

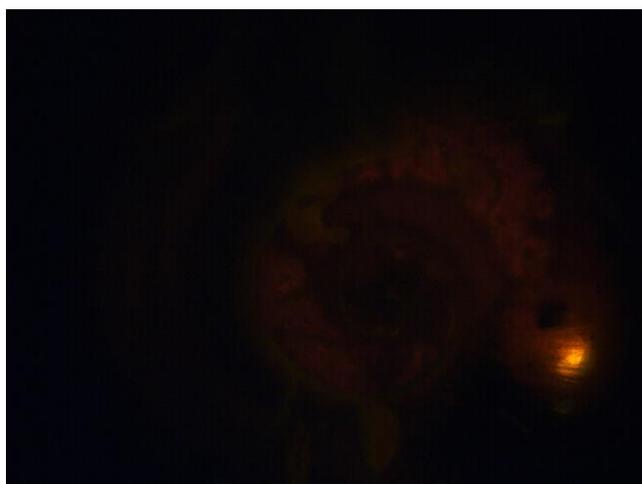


Figura 47. Fotomicrografia de fluorescência de *Biomphalaria glabrata* juvenil após 11 dias de depuração. Concentração de 100 mg.L⁻¹. Aumento 400X. Com detecção de microplásticos de polietileno.



Figura 48. Fotomicrografia de fluorescência de *Biomphalaria glabrata* juvenil após 20 dias de depuração. Concentração de 100 mg.L⁻¹. Aumento 400X. Com detecção de microplásticos de polietileno.

19. Resultados dos ensaios com adultos de *B. glabrata*

19.1 Resultados do ensaio de depuração com adultos de *B. glabrata*

Após 49 dias de monitoramento da eliminação das MPs, por depuração natural, ainda foram observados MPs em alguns caramujos adultos, e que alguns caramujos não iriam conseguir eliminar 100 % os MPs. Por isso, foi decidido finalizar o experimento e realizar as análises bioquímicas.

Quando se observou os caramujos após as 96 horas da exposição aguda foi evidenciado que as micropartículas se concentraram sobretudo no estômago e na porção intestinal, figuras 49 a 51. E ao longo de 49 dias de depuração, foram registradas a eliminação dos MPs pelos caramujos *B. glabrata*, conforme figuras: com 07 dias de depuração (fig. 52), 14 dias de depuração (fig. 53), 25 dias de eliminação (fig. 54). As figuras 55 a 56 mostram o registro de um caramujo que teve a concha quebrada justamente na região onde concentrou mais MPs, possivelmente em virtude da exposição. Mesmo com a concha quebrada ele não conseguiu eliminar totalmente as MPs, e com 49 dias de recuperação ele foi eutanasiado, sua concha foi removida e o corpo mole foi higienizado com água de clorada. Em análise do corpo mole, quando se incidiu a luz-UV sob a amostra observou-se que as MPs não haviam sido adsorvidas no corpo mole, elas estavam entre a massa mole e a concha, pois após esse processo de limpeza elas não foram observadas no animal, figuras 57 e 58. Na figura 58, do lado direito em baixo (seta), foram adicionados MPs para evidenciar que se houvessem MPs no corpo mole ele refletiria com a luz-UV, assim como a amostra colocada ao lado.

Além disso, todos os caramujos da exposição estavam com a concha mole, todavia, não se pôde afirmar que a moleza da concha foi em virtude da exposição a MPs.

Ao término do ensaio de recuperação também foram quantificadas a presença de MPs nos caramujos, que foram de: 7,69% (1:13), na concentração de 12,5 mg.L⁻¹, 7,14% (1:14) na concentração de 50 mg.L⁻¹, e na concentração de 100 mg.L⁻¹, foi de 31,25% (1:16). Os animais mortos não foram considerados.

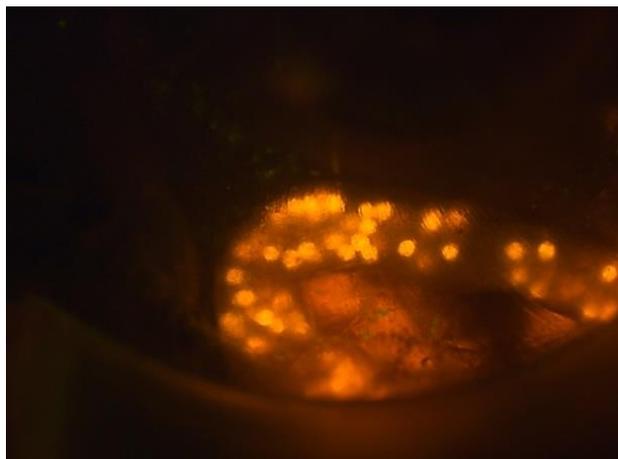


Figura 49. Fotomicrografia de fluorescência de *Biomphalaria glabrata* adulto após 96 horas de exposição. Concentração de 50 mg.L⁻¹. Aumento 400X. Com detecção de microplásticos de polietileno.

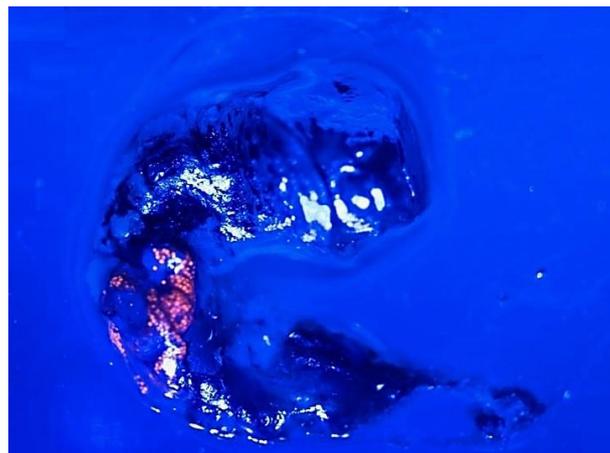


Figura 50. Fotomicrografia de fluorescência do corpo mole de *Biomphalaria glabrata* adulto após 96 horas de exposição. Concentração de 100 mg.L⁻¹. Aumento 63X. Nota-se a presença de MPs no estômago e na porção intestinal dos caramujos.



Figura 51. Fotomicrografia de fluorescência de *Biomphalaria glabrata* adulto após 48 horas de exposição. Concentração de 50 mg.L⁻¹. Aumento 400X. Com detecção de microplásticos de polietileno.

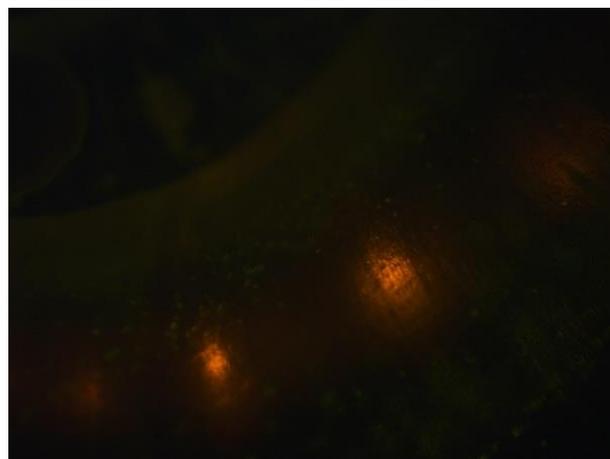


Figura 52. Fotomicrografia de fluorescência de *Biomphalaria glabrata* adulto após 07 dias de depuração. Concentração de 100 mg.L⁻¹. Aumento 400X. Com detecção de microplásticos de polietileno.

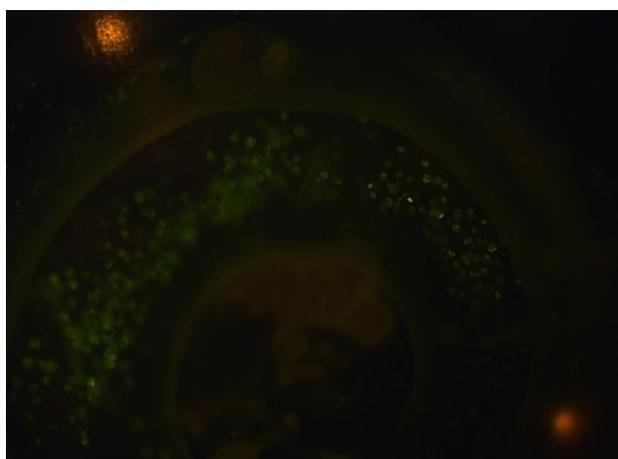


Figura 53. Fotomicrografia de fluorescência de *Biomphalaria glabrata* adulto após 14 dias de depuração. Concentração de 50 mg.L⁻¹. Aumento 400X. Com detecção de microplásticos de polietileno.



Figura 54. Fotomicrografia de fluorescência de *Biomphalaria glabrata* adulto após 25 dias de depuração. Concentração de 100 mg.L⁻¹. Aumento 400X. Com detecção de microplásticos de polietileno.

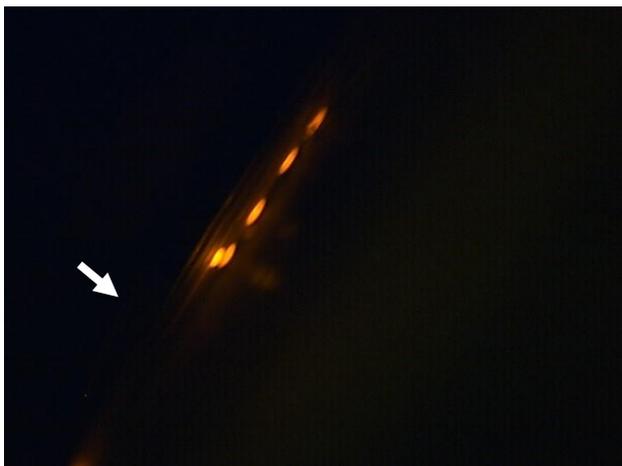


Figura 55. Fotomicrografia de fluorescência de *Biomphalaria glabrata* adulto após 49 dias de depuração. Concentração de 100 mg.L⁻¹. Aumento 400X. A seta indica a concha quebrada. Com detecção de microplásticos de polietileno.



Figura 56. Fotomicrografia de fluorescência de *Biomphalaria glabrata* adulto após 49 dias de depuração. Concentração de 100 mg.L⁻¹. Aumento 400X. A seta indica a concha quebrada. Com detecção de microplásticos de polietileno.



Figura 57. Fotomicrografia do corpo mole de *Biomphalaria glabrata* adulto após 49 dias de depuração. Concentração de 100 mg.L⁻¹. Aumento 63X. Após a retirada da concha não foram mais observados microplásticos de polietileno.

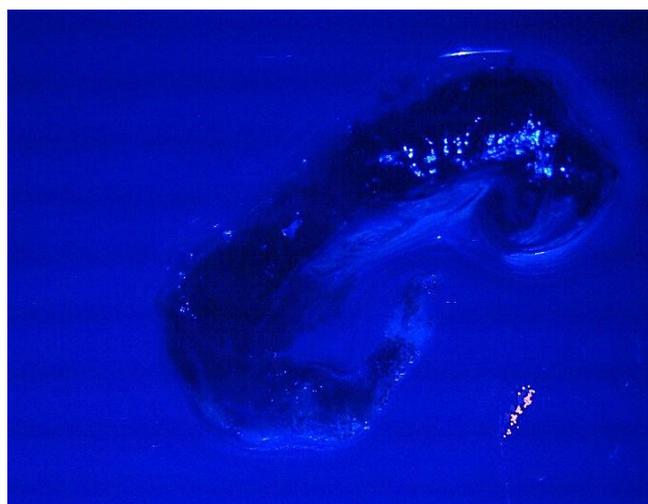


Figura 58. Fotomicrografia sob luz-UV do corpo mole de *Biomphalaria glabrata* adulto após 49 dias de depuração. Concentração de 100 mg.L⁻¹. Aumento 63X. Uma pequena porção de microplástico de polietileno (seta) foi adicionada para indicar que a amostra estava livre de microplásticos.

Os caramujos que eliminaram totalmente os MPs foram separados dos que ainda continham os MPs, dentro dos respectivos grupos de exposição, e dentre eles, os caramujos foram selecionados ao acaso para a realização dos marcadores bioquímicos.

19.2 Avaliação dos parâmetros físico-químicos da água de *B. glabrata*

A tabela 5, que se segue, compara os resultados obtidos no primeiro dia de exposição ^(a), linhas realçadas) e no último dia, após 96 horas ^(b). Conforme se vê, os valores de pH variaram ± 1 tanto no início ^(a) quanto no término da exposição ^(b). A condutividade, a dureza, o cálcio e o magnésio aumentaram em relação ao controle após 96 horas de exposição a MPs de polietileno. Com relação à amônia aproximada, o resultado da cromatografia é dado em amônio e na conversão obtivemos a amônia aproximada. Esse último parâmetro não apresentou diferenças evidentes, sendo que resultado semelhante foi obtido no início da exposição.

Tabela 5. Parâmetros físico-químicos da água após 96 horas de exposição de microplásticos em *Biomphalaria glabrata*.

Amostra	pH	Condutividade elétrica $\mu\text{S/cm}$	Dureza total (mg/L CaCO_3)	Cálcio (mg/L)	Magnésio (mg/L)	Amônia aproximada (mg/L)
Controle ^(a)	7,91	37,9	48,57	8,002	6,069	4,982
<i>Tween</i> 80% ^(a)	7,86	33,6	46,09	8,443	5,151	1,891
12,5 mg.L ⁻¹ ^(a)	7,60	40,1	49,30	7,832	6,368	2,204
50 mg.L ⁻¹ ^(a)	7,93	34,9	56,28	8,675	7,460	2,953
100 mg.L ⁻¹ ^(a)	7,53	33,1	45,21	7,980	5,268	3,554
Controle ^(b)	6,90	30,7	38,31	6,964	4,321	5,715
<i>Tween</i> 80 % ^(b)	7,42	29,0	54,87	7,572	7,907	2,132
12,5 mg.L ⁻¹ ^(b)	6,52	29,2	54,96	8,053	7,584	3,783
50 mg.L ⁻¹ ^(b)	6,77	34,4	58,22	8,839	7,814	3,658
100 mg.L ⁻¹ ^(b)	7,89	40,1	55,46	9,006	7,023	3,896

Os valores se referem aos dados brutos. Em ^(a) são representados dos dados o início da exposição, e em ^(b), os dados após 96 horas de exposição.

19.3 Concentração de proteína total

Não foram observadas diferenças significativas quando se comparou os grupos expostos ao controle água mole na exposição aguda de 96 horas ($p = 0,665$), assim como no ensaio de recuperação, $p = 0,415$, conforme figura 59.

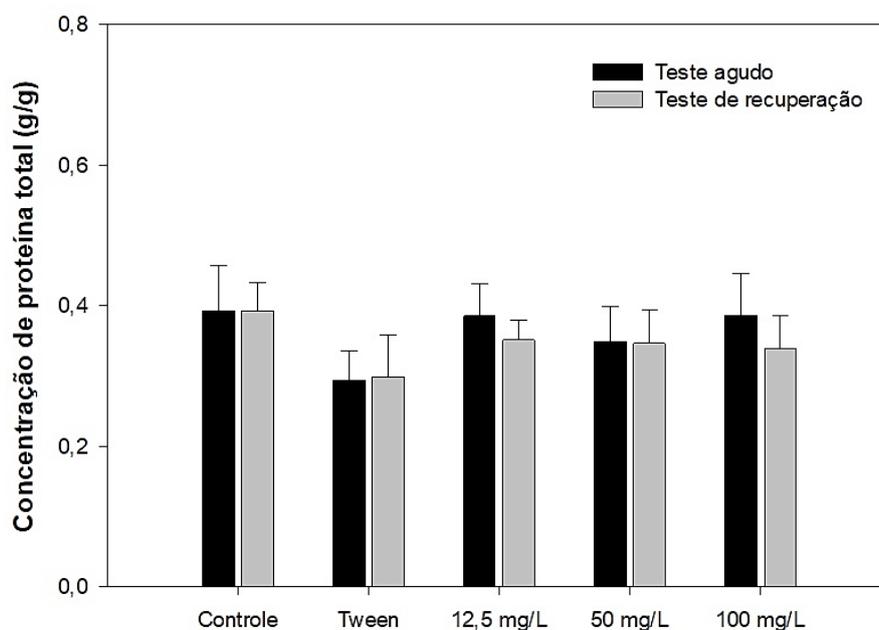


Figura 59. Concentração de proteína total em sobrenadante pós-mitocondrial em amostras de caramujos selvagens da espécie *Biomphalaria glabrata*. Os dados estão representados pela média da concentração de proteína total \pm erro padrão. O grupo controle foi comparado aos tratados com microplásticos de polietileno (12,5 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹) e ao grupo Tween 80 %, $p > 0,05$.

19.4 Concentração de glicose

Não foram observadas diferenças estatísticas na concentração de glicose em amostras do corpo mole de *B. glabrata* na exposição aguda a MPs de polietileno e na exposição de recuperação, $p = 0,712$ e $p = 0,403$, respectivamente (fig. 60).

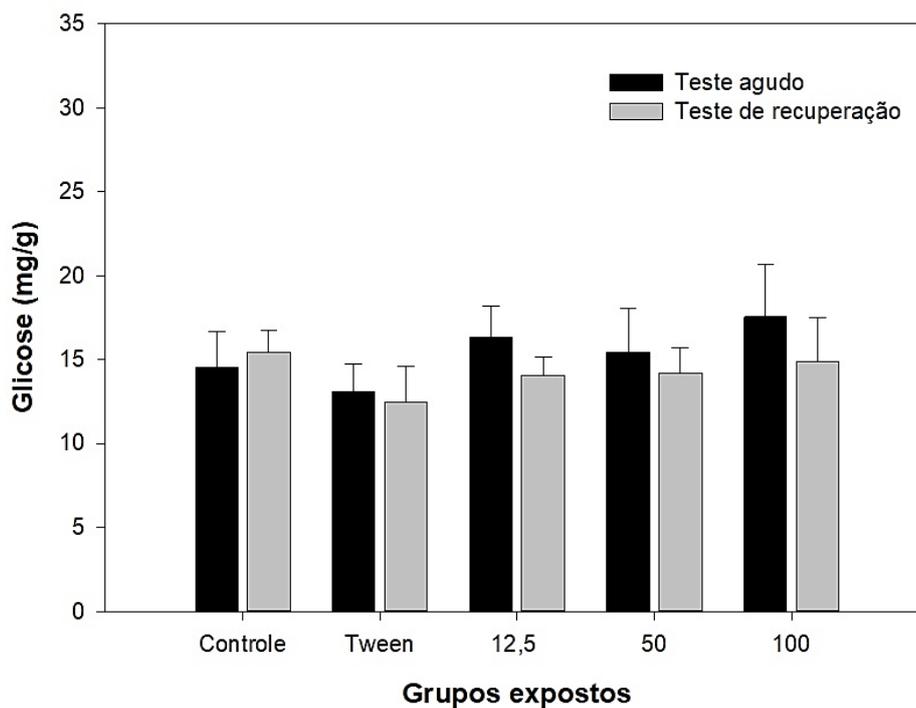


Figura 60. Concentração de glicose em sobrenadante pós-mitocondrial em amostras de caramujos selvagens da espécie *Biomphalaria glabrata*. Os dados estão representados pela média da concentração de glicose \pm erro padrão. O grupo controle foi comparado aos tratados com microplásticos de polietileno ($12,5 \text{ mg.L}^{-1}$, 50 mg.L^{-1} e 100 mg.L^{-1}) e ao grupo Tween 80 %, $p > 0,05$.

19.5 Atividade de lactato desidrogenase

Não foram observadas diferenças estatísticas na atividade de LDH em amostras *B. glabrata*, tanto na exposição aguda, $p = 0,712$, quanto na de recuperação, $p = 0,403$, respectivamente (fig. 61).

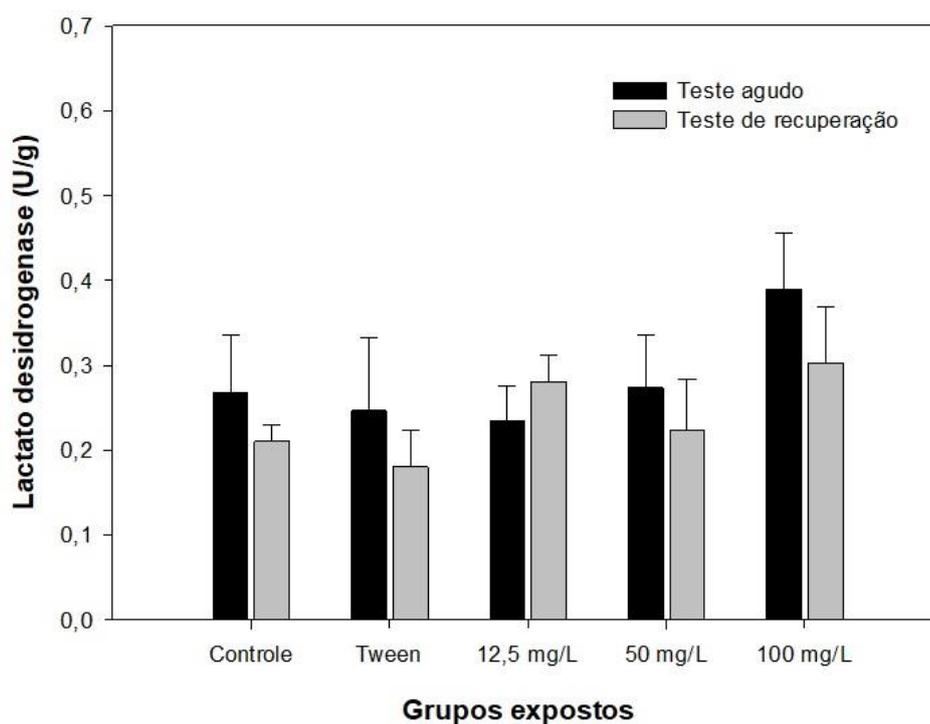


Figura 61. Concentração de lactato desidrogenase (LDH) em sobrenadante pós-mitocondrial em amostras de caramujos selvagens da espécie *Biomphalaria glabrata*. Os dados estão representados pela média da concentração de LDH \pm erro padrão. O grupo controle foi comparado aos tratados com microplásticos de polietileno (12,5 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹) e ao grupo Tween 80 %, $p > 0,05$.

19.6 Atividade de acetilcolinesterase

Assim como nos demais marcadores não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas na atividade enzimática de AChE, no ensaio agudo ($p = 0,087$) e no ensaio de recuperação, $p = 0,950$ (fig. 62).

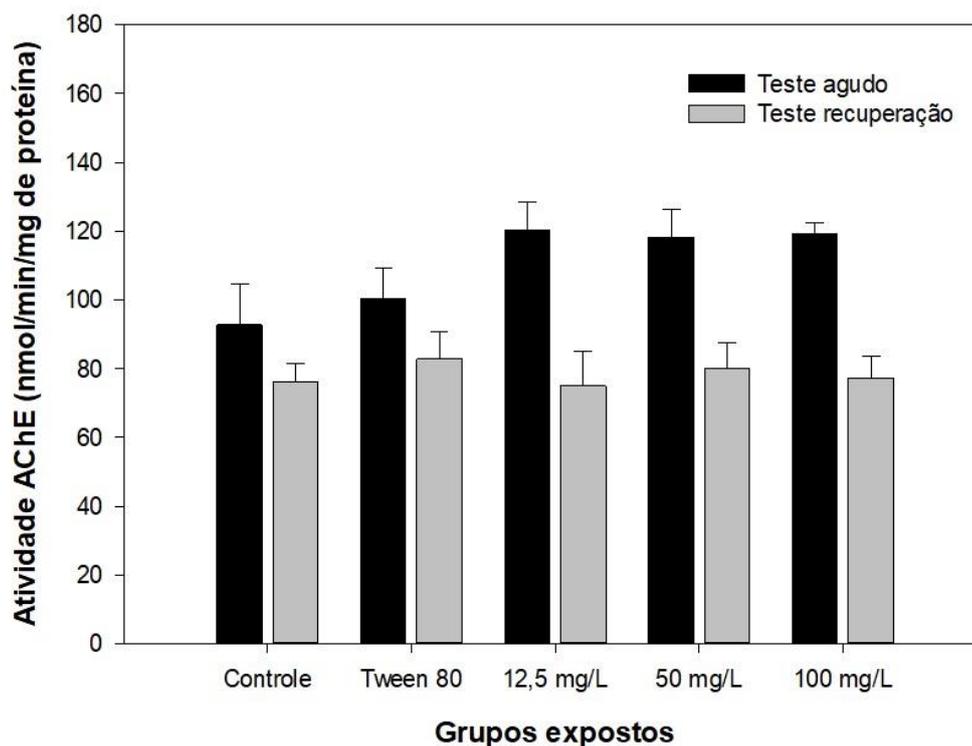


Figura 62. Acetilcolinesterase (AChE) em sobrenadante pós-mitocondrial em amostras de caramujos selvagens da espécie *Biomphalaria glabrata*. Os dados estão representados pela média da atividade de AChE \pm erro padrão. O grupo controle foi comparado aos tratados com microplásticos de polietileno (12,5 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹) e ao grupo Tween 80 %, $p > 0,05$.

19.7 Atividade de glutatona-S-transferase

Na exposição aguda, de 96 horas a MPs de polietileno, foi observada uma diminuição estatisticamente significativa na atividade de GST quando se comparou a concentração de 100 mg.L⁻¹ ao controle água mole, $p < 0,05$. Na recuperação não foram observadas diferenças significativas, $p > 0,05$, conforme figura 63.

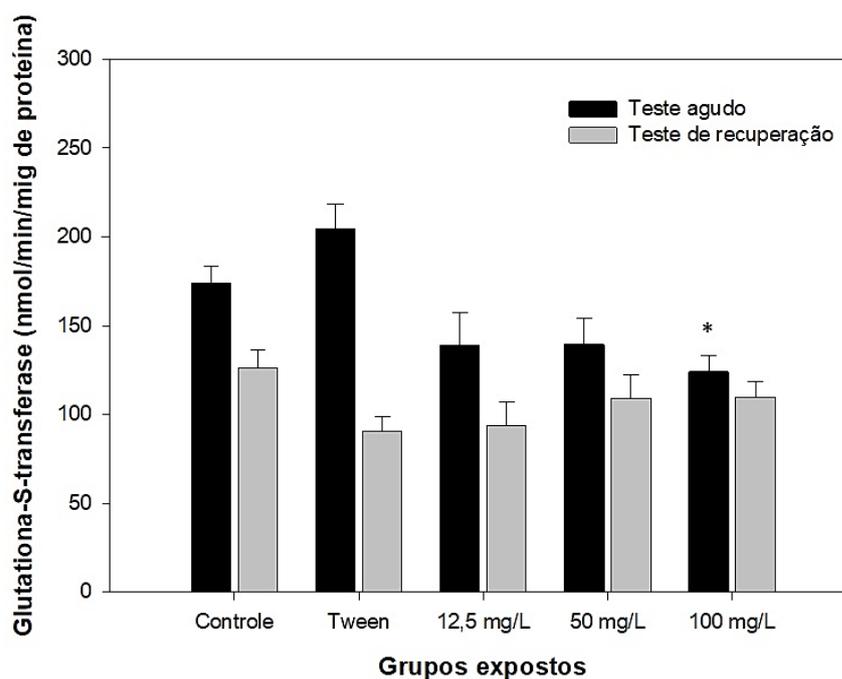


Figura 63. Glutaciona-S-transferase (GST) em sobrenadante pós-mitocondrial em amostras de caramujos selvagens da espécie *Biomphalaria glabrata*. Os dados estão representados pela média da atividade de GST \pm erro padrão. O grupo controle foi comparado aos tratados com microplásticos de polietileno (12,5 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹) e ao grupo Tween 80 %, * $p < 0,05$.

20. Discussão sobre os ensaios com *Biomphalaria glabrata*

Entender a dinâmica da água é um fator inerente a sobrevivência de animais aquáticos. O movimento e a mistura de materiais dissolvidos resultam em mecanismos de transporte físico que interferem no ambiente. O pH (potencial hidrogeniônico) possui efeitos sobre o metabolismo e processos fisiológicos dos peixes (LIMA et al. 2011). Os valores de pH na água de exposição de MPs a caramujos *Biomphalaria glabrata* não teve alterações perceptíveis, assim como os valores de amônia aproximada.

Segundo Lima et al. (2011), a condutividade elétrica está relacionada a quantidade de íons na água, pois quanto maior a quantidade deles maior a condutividade. Ela também está relacionada a concentração de sais disponíveis na água, uma vez que ela está diretamente ligada a quantidade de sólidos dissolvidos totais. Dessa forma, os aumentos nos valores da condutividade elétrica são justificados primeiramente pela presença das partículas de MPs nas águas das exposições, e pelo aumento nos valores de dureza total, cálcio e magnésio, percebido após as 96 horas de exposição (tabela 3, linhas não realçadas ^(b)).

A dureza da água está relacionada com a presença de metais alcalino-terrosos na água, principalmente com cálcio e magnésio. A dureza da água resulta da dissolução de minerais de solos e rochas ou da poluição de diferentes fontes antropogênicas (MUNIZ et al. 2020). As águas doces podem ser classificadas quanto ao seu grau de dureza $< 50 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ (água mole), de 50 a $150 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ (moderadamente dura), de 150 a $300 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ (água dura) e $> 300 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ (água muito dura) (APHA, 2018).

Após exposição aguda, de 96 horas, a dureza dos frascos com MPs aumentou, ultrapassando a valoração de água mole, de 50 a $150 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ (moderadamente dura). Esses valores refletem os níveis de cálcio e magnésio que também foram maiores do que no controle água mole. Conforme percebe-se na tabela 5, esses resultados refletem que a eliminação desses sais pelos caramujos aumentou após o início da exposição, tanto que o aumento foi pequeno, mas foi gradativo e de forma homogênea em ambos os parâmetros, cálcio e magnésio.

O aumento na liberação de cálcio pelos caramujos expostos a MPs sugere que esses animais passaram a eliminar o cálcio como forma de se desintoxicar do

poluente. De forma que, a taxa de eliminação foi maior que a absorção, e por isso, os caramujos ficaram com a concha fraca e quebradiça, o que justifica o caramujo apresentado nas figuras 55 a 56 ter tido a sua concha quebrada. Todavia, para confirmar que eles estavam com deficiência de cálcio nas conchas, um estudo de bioacumulação e de análise estatística seriam necessários.

O sistema imune e de desintoxicação de invertebrados respondem rapidamente a situações de estresse (SMINA et al. 2016). Sabe-se que análises da concentração de proteínas totais, de glicose e outros marcadores bioquímicos podem auxiliar no entendimento de respostas metabólicas desse molusco (SILVA, 2014). A glicose é o monossacarídeo mais comum na hemolinfa de gastrópodes e em situações de estresse seus níveis podem ser afetados (LIEBSCH; BECKER, 1990), pois eles podem acabar disponibilizando essa fonte de energia para a produção de outras substâncias.

Nos ensaios com marcadores de estresse oxidativo não foram observados efeitos nas concentrações de proteína total, glicose, lactato desidrogenase e acetilcolinesterase, mas uma diminuição significativa na atividade de glutathione-S-transferase em relação ao controle água (*) $p < 0,05$, foi observada na maior concentração. Nesse contexto, percebe-se que MPs de polietileno causam estresse oxidativo em *Biomphalaria glabrata*, mas em elevadas concentrações. Glutathione-S-transferase está associada a exposição a xenobióticos e a danos celulares e teciduais. É possível que em uma exposição mais prolongada, de 14 ou 28 dias, como foi feito em *zebrafish*, pudéssemos encontrar efeitos de toxicidade mais significativos.

Weber et al. (2021) também não encontraram efeitos significativos na concentração de proteínas, glicose, concentração de lipídeos, na atividade dos hemócitos e no teor de malondialdeído quando expôs o caramujo *Lymnaea stagnalis* à MPs de poliestireno. Colpaert e colaboradores (2022), testaram MPs de polietileno de baixa densidade (LDPE) de diferentes tamanhos, e perceberam que elas provocaram estresse oxidativo diminuindo a concentração de malondialdeído em caracóis terrestres da espécie *Cantareus aspersus*. Porém, esse estresse não foi o suficiente para induzir citotoxicidade e genotoxicidade, por meio dos ensaios de viabilidade celular e do micronúcleo, assim como foi observado nos resultados com *zebrafish*.

Um estudo no caramujo africano-gigante (*Achatina fulica*), expostos a microfibras plásticas verificou que esse material reduziu a atividade de glutathione

peroxidase, outra enzima da família da glutathione, a capacidade antioxidante, e V (SONG et al. 2019).

Wang et al. (2022) expuseram *B. glabrata* a microesferas plásticas de produtos de limpeza facial em diferentes concentrações e verificaram a bioacumulação desses MPs nos tecidos, sugerindo uma agregação dos MPs no intestino deles, além disso foi observado também a eliminação de microplástico nas fezes dos caramujos. No ambiente, esses resultados mostram que esses MPs continuam biodisponíveis para outros organismos.

A sugestão de Wang et al. (2022) que os MPs podem se agregar no intestino foi confirmada nesse estudo, conforme se vê nos juvenis nas figuras 43 – 45, e nas figuras de adultos figuras 49 a 51, e a eliminação delas nas fezes também foi observada neste trabalho. Além disso, um caramujo adulto exposto a 100 mg.L^{-1} (figuras 53 - 58), teve a região da concha quebrada justamente no local que acumulava as MPs. A quebra ocorreu no período de recuperação, em água mole sintética e esse foi o único indivíduo que teve a concha quebrada, possivelmente devido ao acúmulo de MPs. *A priori* um efeito casual, pois para se fazer uma associação causa-efeito uma análise de bioacumulação no corpo mole poderia ser realizada.

Nossos resultados corroboram outros estudos onde coletaram, em um lago na China, caramujos da espécie *Bellamya aeruginos*, e verificaram que mais de 90 % das amostras coletadas continham de 1 a 4 tipos de MPs (XU et al. (2020b). Ou seja, quando expostos em um ambiente onde a contaminação é constante os animais não conseguem eliminar esse poluente por completo.

Weber et al. (2021) expuseram gastrópodes de água doce da espécie *Lymnae stagnalis* à esferas de poliestireno de tamanho inferior as utilizadas neste estudo, e verificaram que a deposição nos tecidos depende do tamanho da partícula, do tipo de exposição e do período de depuração, excreção em 7 dias. Aqui, verificamos que ao longo de 49 dias de recuperação nem todos os caramujos adultos conseguiram eliminar os MPs de polietileno, sobretudo na maior concentração (25,57 % ou 5/16). Nossas partículas tinham em média $59 \mu\text{m}$ de diâmetro, e mesmo na menor concentração ($12,5 \text{ mg.L}^{-1}$) 7,69% dos *B. glabrata* adultos expostos ainda retinham MPs, e mesmo no estudo com juvenis, eles demoraram no mínimo 12 dias para eliminar totalmente as MPs. Essa divergência no tempo de depuração entre juvenis e adultos deve-se, possivelmente, a morfologia dos juvenis, que talvez não seja totalmente desenvolvida, ou ao tamanho amostral dos juvenis, $n = 05$.

O muco produzido por gastrópodes bentônicos, usado na locomoção também serve para a retenção de partículas suspensas na água como bactérias e algas. Recentemente foi descoberto que esse muco também retém MPs suspenso na água e que caramujos do gênero *Littonia* se alimentam do muco contaminado (GUTOW et al., 2019). Isso enfatiza que esses organismos possuem um hábito alimentar diversificado e sistema digestório completo (CANTINHA, 2012). Além disso, se a quantidade de muco produzida por adultos for maior do que a produzida por juvenis isso também pode estar associado aos achados no ensaio de depuração em juvenis e adultos.

Apesar disso, alguns dados ainda nos chamam a atenção. O fato de não termos encontrado os mesmos resultados em marcadores que testamos em ambas as espécies (AChE, GST e LDH), reflete que caramujo *B. glabrata* é mais resistente a esse poluente do que o *zebrafish*. Oliveira-Filho et al. (2004) em outros estudos, demonstraram que eles de fato, são mais resistentes à certos poluentes do que outras espécies aquáticas.

Caramujos estão frequentemente expostos a contaminantes ambientais (OLIVEIRA-FILHO; NAKANO; TALLARICO, 2017) como o plástico, por serem bentônicos e por também estarem na superfície ou na coluna d'água. Logo, eles naturalmente conseguem alcançar MPs disponíveis, assim como nesse estudo, ingeri-los e passá-los a outras espécies por efeito de biomagnificação.

21. Conclusão

Dessa forma, conclui-se que os MPs de polietileno com fluorocromo laranja causaram estresse oxidativo em caramujos adultos, pois alteraram a atividade enzimática de glutathiona-S-transferase. Juvenis de caramujo *B. glabrata*, com duas semanas de eclosão, têm uma capacidade maior de eliminar xenobióticos quando comparados a caramujos adultos, tendo em vista que com 20 dias de recuperação eles já tinham eliminado todas os MPs do seu organismo, e os adultos não conseguiram eliminar todos eles em 49 dias de recuperação. Apesar disso, acredita-se que a presença desse poluente interferiu no metabolismo desses animais alterando as taxas de eliminação de compostos como cálcio e magnésio. Desta forma, sugere-se ainda que a taxa de eliminação de cálcio foi maior do que a absorção dele, e por isso, suas conchas ficaram fragilizadas e quebradiças. Entretanto, para que esse resultado seja confirmado um estudo de bioacumulação e devida análise estatística seriam necessários.

22. Considerações finais

Em comparação ao peixe da espécie *Danio rerio* (zebrafish), constatou-se que esta espécie de caramujo selvagem, *Biomphalaria glabrata*, é mais resistente aos MPs, pois eles causaram menos alterações nos marcadores de toxicidade. Mas ao contrário disso, os peixes parecem ser mais rápidos na eliminação dos MPs do que os caramujos, mesmo os caramujos sendo considerados organismos filtradores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPLAST. **Perfil 2017**. São Paulo, 2017. Disponível em: <<https://www.abiplast.org.br/wp-content/uploads/2019/03/Perfil-2017.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2023.

ABIPLAST. **Perfil 2018**. São Paulo, 2018. Disponível em: <<https://www.abiplast.org.br/wp-content/uploads/2019/08/perfil-2018-web.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2023.

ABIPLAST. **Perfil 2021**. A indústria de transformação e reciclagem de plástico no Brasil. São Paulo, 2021. Disponível em: <<http://www.abiplast.org.br/wp-content/uploads/2022/10/Perfil-2021-PT-vs2.pdf>>. Acesso em: 24 jan. 2023.

ABNT NBR15499, 2022a. *Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com peixes*.

ABNT NBR12713, 2022b. *Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera)*.

ALCON. Labcon test amônia tóxica água doce. [202?]. <<https://alconpet.com.br/produto/labcon-test-amonia-toxica-agua-doce>>. Acesso em: 15 abr. 2023.

ALFARO-NÚÑEZ, A.; ASTORGA, D.; CÁCERES-FARÍAS, L.; BASTIDAS, L. VILLEGAS, C.S.; MACAY, K.; CHRISTENSEN, J.H. Microplastic pollution in seawater and marine organisms across the Tropical Eastern Pacific and Galápagos. Scientific report, 6424, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85939-3>

ALMEIDA, A.R.; JESUS, F.; HENRIQUE, J.F.; ANDRADE, T.S.; BARRETO, A.; Koba, O.; GIANG, P.T.; SOARES, A.M.V.M. OLIVEIRA, M.; DOMINGUES, I. The role of humic acids on gemfibrozil toxicity to zebrafish embryos. **Chemosphere**, 220, 556-564, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.133>

ALMEIDA, M.P. ET AL. The Complex Dynamics of Microplastic Migration through Different Aquatic Environments: Subsidies for a Better Understanding of Its Environmental Dispersion. **Microplastics**, 2, 1, 62-77, 2023. <https://doi.org/10.3390/microplastics2010005>

AMELIA, T.S.M.; KHALIK, W.M.A.W.M.; ONG, M.C.; SHAO, Y.T.; PAN, H. Marine microplastics as vectors of major ocean pollutants and its hazards to the marine ecosystem and humans. **Progress in earth and planetary science**, 8, 12, 2021. <https://10.1186/s40645-020-00405-4>

AMIN, R.M.; SOHAIMI, E.S.; ANUAR, S.T.; BACHOK, Z. Microplastic ingestion by zooplankton in Teregganu coastal waters, southern South China Sea. **Marine pollution bulletin**, 150, 110616, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110616>

ANIFOWOSHE, A.T.; ROY, D.; DUTTA, S.; NONGTHOMBA, U. Evaluation of cytogenotoxic potential and embryotoxicity of KRS-Cauvery River water in zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 233, 113320, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113320>

AMATO-LOURENÇO, L.F.; CARVALHO-OLIVEIRA, R.; RIBEIRO JÚNIOR, G.; GALVÃO, L.S.; ANDO, R.S.; MAUAD, T. Presence of airborne microplastics in human lung tissue. **J. Hazard Mater.**, 416, 126124, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126124>

ANDRADY, A.L. Microplastics in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, 62, 1596-1605, 2011.
 ANSALDO, M. et al. Potential use of glycogen level as biomarker of chemical stress in *Biomphalaria glabrata*. **Toxicology**, 224, 119-127, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.04.037>

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 2018. **Standard methods for the examination of water and wastewater** (23rd ed.). Method 2340C – Hardness EDTA Titrimetric Method. Washington: American Public Health Association.

ARAÚJO, A.P.C.; VIEIRA, J.E.A.; MALAFAIA, G. Toxicity and trophic transfer of polyethylene microplastics from *Poecilia reticulata* to *Danio rerio*. **Science of the Total Environment**, 742, 140217, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140217>

ARAÚJO, A.P.C.; LUZ, T.M.; ROCHA, T.L.; AHMED, M.A.I.; MELO E SILVA, D.; RAHMAN, M.M. Toxicity evaluation of the combination of emerging pollutants with polyethylene microplastics in zebrafish: Perspective study of genotoxicity, mutagenicity, and, redox unbalance. **J. Hazard. Mat.**, 432, 128691, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128691>

AVES, A. R.; REVELL, L.E.; GAW, S.; RUFFELL, H.; SCHUDEBOOM, A.; WOTHERSPOON, N.E.; LARUE, M.; MCDONALD, A.J. First evidence of microplastics in Antarctic snow. **The Cryosphere**, 16, 2127–2145, 2022.
<https://doi.org/10.5194/tc-16-2127-2022>

AVIO, C.G.; GORBI, S.; MILAN, M.; BENEDETTI, M.; FATTORINI, D.; d'ERRICO, G.; PAULETTO, M.; BARGELLONI, L.; REGOLI, F. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. **Environmental Pollution**, 198, 211-222, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.021>

BADEA, M.A.; BALAS, M.; DINISCHIOTU, A. Microplastics in freshwaters: implications for aquatic autotrophic organisms and fauna health. **Microplastics**, 2, 1, 39-59, 2023. <https://doi.org/10.3390/microplastics2010003>

BALAKRISHNAN, G. et al. Towards more realistic reference microplastics and nanoplastics: preparation of polyethylene micro/nanoparticles with a biosurfactant. **Environmental Science Nano**, 6, 315-324, 2019.
<https://doi.org/10.1039/C8EN01005F>

BAUER, B.; MALLY, A.; LIEDTKE, D. Zebrafish embryos and larvae as alternative animal models for toxicity testing. **Int. J. Mol. Sci.**, 22, 13417, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms222413417>.

BARNES, D.K.A.; GALGANI, F.; THOMPSON, R.C.; BARLAZ, M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. **Philos. Trans. Biol. Sci.**, 364, 1985–1998, 2009. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205>.

BEHRA, M. et al. Acetylcholinesterase Is Required for Neuronal and Muscular Development in the Zebrafish Embryo. **Nature Neuroscience**, 5, 2, 111-8, 2002. <https://doi.org/10.1038/nn788>

BERGMANN, M.; WIRZBERGER, V.; KRUMPEN, T.; LORENZ, C.; PRIMPKE, S.; TEKMAN, M.B.; GERDTS, G. High quantities of microplastic in Arctic deep-sea sediments from the HAUSGARTEN observatory. **Environmental Science & technology**, 51, 11000-11010, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03331>

BHUYAN, S. Effects of microplastics on fish and in human health. **Frontiers Environ. Sci.**, 10, 827289, 1-17, 2022. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.827289>

BLETTER, M.C.M. et al. Massive plastic pollution in a mega-river of a developing country: Sediment deposition and ingestion by fish (*Prochilodus lineatus*). **Environmental pollution**, 255, 3 113348, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113348>

BOSKOVIC, N.; JOKSIMOVIC, D.; BAJT, O. Microplastic in mussels from the Boka Kotorska Bay (Adriatic Sea) and impact on human health. **Food and chemical toxicology**, 173, 113641, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113641>

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248–254, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BRASIL. **Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002**. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção [...] e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm. Acesso em: 10 abr. 2023.

BRASIL. **Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcdaltrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf> Acesso em: 10 abr. 2023.

BRASIL. **Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010.** Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm>. Acesso em: 10 abr. 2023.

CÁCERES-VÉLEZ, P.R.; FASCINELLI, M.L.; GRISOLIA, C.K.; LIMA, E.C.O.; SOUSA, M.H.; MORAIS, P.C.; AZEVEDO, R.B. Genotoxic and histopathological biomarkers for assessing the effects of magnetic exfoliated vermiculite and exfoliated vermiculite in *Danio rerio*. **Science of The Total Environmental**, 551-552, 228-237, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.048>

CAI, Y.; ZHAO, J.; LI, W.; SONG, W.; ZHANG, D.; PAN, X. Retention of polystyrene particles of different sizes in zebrafish gills and their effect on toxicity of anthracene to gill cells. **Chinese Journal of Applied & Environmental Biology**, 23, 6, 1154-1158, 2017. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1145.2016.12051>

CALLISTO, M.; GONÇALVES, JF.; MORENO, P. Invertebrados Aquáticos como Bioindicadores. In GOULART, EMA. (Eds.). **Navegando o Rio das Velhas das Minas aos Gerais**, 555-567, 2005.

CANEDO, A.; JESUS, L.W.O.; BAILÃO, E.F.L.C.; ROCHA, T.L. Micronucleus teste and nuclear abnormality assay in zebrafish (*Danio rerio*): past, present, and future trends. **Environmental pollution**, 290, 118019, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118019>

CANEDO, A.; ROCHA, T.L. Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: Historical review, current status and trends. **Science of the total environmental**, 762, 144084, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144084>

CANTINHA, R.D. **Estudo da resposta do caramujo *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) frente a estímulos ambientais estressores, com enfoque na proteína HSP70.** 2012. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear - Aplicações), Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2012.

CARPENTER, D.O. Polychlorinated biphenyls (PCBs): routes of exposure and effects on human health. **Rev Environ Health**, 1, 1-23, 2006. <https://doi.org/10.1515/reveh.2006.21.1.1>

CARVALHO, OS., et al. Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil. In: CARVALHO, OS., COELHO, PMZ., and LENZI, HL. (Org). **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar [online]**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, 393-418. <https://books.scielo.org/id/37vww/pdf/carvalho-9788575413708-13.pdf>

CASILLAS, G. et al. Microplastic scoping review of environmental and human exposure data. **Microplastic**, 2, 1, 78-92, 2023. <https://doi.org/10.3390/microplastics2010006>

CASTRO, N. S. **Evolução molecular adaptativa dos genes da família LDH em teleósteos**. 2015. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônica – INPA, Manaus, 2015. Disponível em: https://repositorio.inpa.gov.br/bitstream/1/37608/1/tese_inpa.pdf Acesso em 26 abr 2023.

CASTANIA, V.A.; SILVEIRA, J.W.S.; ISSY, A.C.; PITOL, D.L.; CASTANIA, M.L.; DORIGAN NETO, A.; DEL BEL, E.A.; DEFINO, H.L.A. Advantages of a combined method of decalcification compared to EDTA. **Microsc. Res. Tech.**, 78, 2, 111-118, 2015. <https://doi.org/10.1002/jemt.2245>

CETESB. **Mortanda de peixes. Oxigênio dissolvido**. [202-?a]. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/mortandade-peixes/alteracoes-fisicas-e-quimicas/oxigenio-dissolvido/#>

CETESB. **Mortanda de peixes. pH**. [202-?b]. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/mortandade-peixes/alteracoes-fisicas-e-quimicas/ph/>

CHACON, J.O. Adaptação de açudes para a piscicultura. In: FAO. **Manual sobre manejo de reservatórios para a produção de peixes**. Brasília, 1988. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/AB486P/AB486P01.htm>>. Acesso em: 27 mai. 2023.

CHAKRABORTY, P.; CHANDRA, S.; DIMMEN, M.V.; HURLEY, R.; MOHANTY, S.; BHARAT, G.K.; STEINDAL, E.H.; OLSEN, M. NIZZETTO, L. Interlinkage between persistent organic pollutants and plastic in the waste management system of India: an overview. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 109, 927-936, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00128-022-03466-x>

CHAMAS, A.; MOON, H.; ZHENG, J.; QIU, Y.; TABASSUM, T.; JANG, J.H.; ABU-OMAR, M.; SCOTT, S. Degradation rates of plastics in the environment. **ACS Sustainable Chem. Eng.**, 8, 9, 3494–3511, 2020. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06635>

CHIANG, P. K. et al. Histochemical distribution of acetylcholinesterase in the nervous system of the snail, *Biomphalaria glabrata*. **Intern. J. Neuroscience**, 3, 47-60, 1972. <https://doi.org/10.3109/00207457209147013>

CHOI, T.Y.; CHOI, T.I.; LEE, Y.R.; CHOE, S.K.; KIM, C.H. Zebrafish as an animal model for biomedical research. **Experimental & Molecular Medicine**, 53, 310-317, 2021. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00571-5>
COLPAERT, R.; GREZERIAT, L.P.; LOUZON, M.; VAUFLEURY, A.; GIMBERT, F. Polyethylene microplastic toxicity to the terrestrial snail *Cantareus aspersus*: size matters. **Environmental science and pollution research**, 29, 29258-29267, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15824-z>

COLE, M.; LINDEQUE, P.; HALSBAND, C.; GALLOWAY, T.S. Microplastic as contaminants in the marine environment: A review. **Marine Pollution Bulletin**, 62, 2588-2597, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>

COLE, M.; LINDEQUE, P.; FILEMAN, E.; HALSBAND, C.; GOODHEAD, R. Microplastic Ingestion by zooplankton. **Environmental Science & Technology**, 47, 6646-6655, 2013. 2013. <https://doi.org/10.1021/es400663f>

COLLINS, A.R.; AI-GUO.; DUTHIE, S.J. The Kinetics of Repair of Oxidative DNA Damage (Strand Breaks and Oxidised Pyrimidines) in Human Cells. **Mutation Research**, 336, 69-77, 1995. [https://doi.org/10.1016/0921-8777\(94\)00043-6](https://doi.org/10.1016/0921-8777(94)00043-6)

COSTA, L.G. The neurotoxicity of organochlorine and pyrethroid pesticides. **Handb Clin Neurol.**, 131, 135-148, 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62627-1.00009-3>

DAMMSKI, A.P.; MÜLLER, B.R.; GAYA, C.; REGONATO, D. **Zebrafish Manual de criação em biotério**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1ª Ed. 2011.

DIAMANTINO, T.C.; ALMEIDA, E.; SOARES, A.M.V.M.; GUILHERMINO, L. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* Straus. **Chemosphere**, 45, 553-560, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00029-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00029-7)

DIAS, J.C. **Rotas de destinação dos resíduos plásticos e seus aspectos ambientais: uma análise da potencialidade da biodegradação**. 2016. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://www.ppe.ufrrj.br/images/publica%C3%A7%C3%B5es/mestrado/Juliana_de_Carvalho_Dias.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2023.

DING, J.; ZHANG, S.; RAZANAJATOVO, R.M.; ZOU, H. Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Pollution**, 238, 1-9, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.001>

DRABINSKI, T.L. et al. Microplastics in Freshwater River in Rio de Janeiro and Its Role as a Source of Microplastic Pollution in Guanabara Bay, SE Brazil. **Micro**, 3, 1, 208-223. 2023. <https://doi.org/10.3390/micro3010015>

EBERT, D. *Daphnia* as a versatile model system in ecology and evolution. **EvoDevo**, 13, 16, 2022. <https://doi.org/10.1186/s13227-022-00199-0>

EXPÓSITO, N.; ROVIRA, J.; SIERRA, J.; GIMENEZ, G.; DOMINGO, J.L.; SCHUHMACHER, M. Levels of microplastics and their characteristics in molluscs from North-West Mediterranean Sea: human intake. **Marine pollution bulletin**, 181, 113843, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113843>

FACKELMANN, G.; PHAM, C.K.; RODRIGUEZ, Y.; MALLORY, M.; PROVENCHER, J. F.; BAAK, J.E.; SOMMER, S. Current levels of microplastic pollution impact wild seabird gut microbiomes. **Nature Ecology & Evolution**, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41559-023-02013-z>

FAURE, F. et al. Plastic pollution in Swiss surface waters: nature and concentrations, interaction with pollutants. **Environmental chem.**, 12, 582-591, 2015.

<http://dx.doi.org/10.1071/EN14218>

FENDALL, L.S.; SEWELL, M.A. Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. **Marine Pollution Bulletin**, 58, 1225-1228, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.04.025>

FENECH, M. The *in vitro* Micronucleus Technique. **Mutation Research**, 455, 81-95, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)

FERNANDES, A.C.M. **Macroinvertebrados bentônicos como indicadores biológicos de qualidade de água: proposta para elaboração de um índice de integridade biológica.** Tese (Doutorado em Ecologia), Universidade de Brasília- UnB, Brasília, 2007.

FERNANDES, A.N. et al. Microplastics in Latin America ecosystems: a critical review of the current stage and research needs. **J. Braz. Chem. Soc.**, 33, 04, 2022.

<https://doi.org/10.21577/0103-5053.20220018>

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, Jr. V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, 7, 88-95, 1961. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

FISNER, M. **Grânulos plásticos em praias arenosas: avaliação de um método amostral quantitativo e da contaminação química.** 2012. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

<https://doi.org/10.11606/T.21.2012.tde-28032013-112545>

FRANCHETTI, S.M.M.; MARCONATO, J.C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, 29, 4, 811-816, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000400031>

FREIRE, I.S. **Avaliação da genotoxicidade, citotoxicidade e da hematotoxicidade do complexo esporo-cristal de estirpes recombinantes de *Bacillus thuringiensis* em organismos não-alvo.** 2012. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular), Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

FREIRE, I.S.; FASCINELLI, M.L.; PIAU, T.B.; PEREIRA, B.F.; GRISOLIA, C.K. Multilevel Toxicity Evaluations of Polyethylene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*). **Int. J. Environ. Res. Public Health**, 20, 4, 3617, 2023.

<https://doi.org/10.3390/ijerph20043617>

FREITAS, J. M.; SANTOS, M.B.L. **Técnicas malacológicas.** In: BARBOSA, FS., org. Tópicos em malacologia médica [online]. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1995. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/np7z/pdf/barbosa-9788575414019-22.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2019.

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

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.11.022>

GERDES, Z. et al. Microplastic-mediated transport of PCBs? A depuration study with *Daphnia magna*. **PLoS ONE**, 14, 2: e0205378.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205378>

GEYER, R. Production, use, and fate of synthetic polymers. In: Letcher, T.M. (Org.) **Plastic waste and recycling**. Academic Press, 13-32, 2020,
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817880-5.00002-5>

GIL-SOLSONA, R. et al. A holistic assessment of the sources, prevalence, and distribution of bisphenol A and analogues in water, sediments, biota and plastic litter of the Ebro Delta (Spain). **Environmental pollution**, 314, 120310, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120310>

GIULIO, R.T.; NEWMAN, M.C. **Ecotoxicology**. In: Casarett and Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons. 9^a Ed. 2019.

GONÇALVES, C.; MARTINS, M.; COSTA, M.H.; COSTA, P.M. Development of a method for the detection of polystyrene microplastics in paraffin-embedded histological sections. **Histochem. Cell. Biol.**, 149, 187-191, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00418-017-1613-1>

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of biological chemistry**, 177, 751-766, 1949. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)57021-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)57021-6)

GUTOW, L.; BARTL, K.; SABOROWSKI, R.; BEERMANN, J. Gastropod pedal mucus retains microplastic and promotes the uptake of particles by marine periwinkles. **Environmental pollution**, 246, 688-696, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.097>

GRAZEFTE, V.S. et al. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutation Research**, 654, 58-63, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.05.007>

GRISOLIA, C.K. A versatilidade do *Danio rerio* (Zebrafish) para estudos de mutagênese, genômica, carcinogênese e teratogênese, 293. In: SALVADORI, D.M.F. et al. (Eds) **Da toxicogenética à toxicogenômica**. Ed. Atheneu, Rio de Janeiro, 2021.

GUILHERMINO, L.; LOPES, M.C.; CARVALHO, A.P.; SOARES, A.M.V.M. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute test with juvenile *Daphnia magna*. **Chemosphere**, 32, 727-738, 1996. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(95\)00360-6](https://doi.org/10.1016/0045-6535(95)00360-6)

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione-s-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, 249, 7130-7139, 1974.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)

HAWAII.GOV. Aquatic Invasive Species. **Ballast Water**. 2017.

HIRAI, H. et al. Organic micropollutants in marine plastic debris from the open ocean and remote and urban beaches. **Marine Pollution Bulletin**, 62, 1683-1692, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.06.004>

HOOFTMAN, R.N.; RAAT, W.K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, 104, 147-152, 1982. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(82\)90136-1](https://doi.org/10.1016/0165-7992(82)90136-1)

IMHOF, H.K.; IVLELA, N.P.; SCHMID, J.; NIESSNER, R.; LAFORSCH, C. Contamination of beach sediments of a subalpine lake with microplastic particles. **Current Biology**, 23, R867-R868, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.001>

ISMIÑO-ORBE, R.A.; ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M.; GOMES, L.C. Excreção de amônia por tambaqui (*Colossoma macropomum*) de acordo com variações na temperatura da água e massa do peixe. **Pesq. agropec. bras.**, 38, 10, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003001000015>

ISO - INTERNATIONAL STANDARTIZATION ORGANIZATION. 1998. **Water quality - Determination of dissolved Li⁺, Na⁺, NH⁴⁺, K⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Sr²⁺ and Ba²⁺ using ion chromatography**. Method for water and waste water (ISO Standard No. 14911:1998). Disponível em: <<https://www.iso.org/standard/25591.html>>.

ISO/TR 21960:2020. **Plastic – Environmental aspects – State of knowledge and methodologies**. 1ª Ed. Suíça. 2020. Disponível em: <https://webstore.ansi.org/preview-pages/ISO/preview_ISO+TR+21960-2020.pdf>. Acesso em: 11 abr. 2023.

JALOSZYŃSKI, P.; KUJAWSKI, M.; CZUB-SWIERCZEK, M.; MARKOWSKA, J.; SZYFTER, K. Bleomycin-Induced DNA damage and Its Removal in Lymphocytes of Breast Cancer Patients Studied by Comet Assay. **Mutation Research**, 385, 223-233, 1997.

JIN, Y.; WU, S.; ZENG, Z.; FU, Z. Effects of environmental pollutants on gut microbiota. **Environ. Pollut.**, 222, 1–9, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.045>

JIN, Y.; XIA, J.; PAN, Z.; YANG, J.; WANG, W.; FU, Z. Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adults zebrafish. **Environ. Pollut.**, 235, 322-329, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.088>

JONES, P.W.; MARTIN, D.M.; HARDY, J.D. Acipenseride through Ictaluridae. In: **Development of fishes of the mid-Atlantic bight: An atlas of Egg, Larval, and Juvenile Stages; Fish and Wildlife Services**. ashington, DC, USA, 1978.

JONSSON, C.M. **Fosfatase ácida da microalga *Selenastrum capricornutum*: extração, caracterização e efeito de poluentes de origem agrícola**. Embrapa 50 anos. 2005. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/14311/fosfatase-acida-da-microalga-selenastrum-capricornutum>>

[extracao-caracterizacao-e-efeito-de-poluentes-de-origem-agricola](#)>. Acesso em: 20 mai. 2023.

JOVANOVIĆ, B. Ingestion of microplastic by fish and its potential consequences from a physical perspective. **Integrated Environmental Assessment and Management**, 13, 510-515, 2017. <https://doi.org/10.1002/ieam.1913>

KATARE, Y. et al. Microplastic in aquatic environmental: sources, ecotoxicology, detection & remediation. **Biointerface research in applied chemistry**, 12, 3, 3407-3428, 2022. <https://doi.org/10.33263/BRIAC123.34073428>

KIMMEL, Charles B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental dynamics**, 203, 3, 253-310, 1995. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>

KNUTSEN, H.; CYVIN, J.B.; TOTLAND, C.; LILLEENG, O.; WADE, E.J.; CASTRO, V.; PETERSEN, A.; LAUGESEN, J.; MOSKELAND, T.; ARP, H.P.H. Microplastic accumulation by tube-dwelling, suspension feeding polychaetes from the sediment surface: a case study from the Norwegian Continental Shelf. **Marine Environmental research**, 161, 105073, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105073>

KORIEEM, K.M.M.; SHAMSURI, R.B.; UBAIDILLAH, A.M. Evaluation of sodium fluoride toxicity in Schistosoma infected snails: assessment of antioxidants, antiapoptotic, hypoprotein and hypocholesterol activities. **J Parasit Dis.**, 40,4, 1451–1458, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12639-015-0711-z>

LAW, K.L.; MORÉ-T-FERGUSON, S.; AXIMENKO, N.A.; PROSKUROWSKI, G.; PEACOCK, E.E.; HAFNER, J.; REDDY, C. Plastic accumulation in the north Atlantic subtropical gyre. **Science**, 329, p. 1185-1188, 2010. <https://doi.org/10.1126/science.1192321>

LEBRETON, L., VAN DER ZWET, J., DAMSTEEG, JW. ET AL. River plastic emissions to the world's oceans. **Nat Commun**, 8, 15611, 2017. <https://doi.org/10.1038/ncomms15611>

LEMOINE, C.M.R.; KELLEHER, B.M.; LEGARDE, R.; NORTHAM, C.; ELEBUTE, O.O.; CASSONE, B.J. Transcriptional effects of polyethylene microplastics ingestion in developing zebrafish (*Danio rerio*). **Environ. Pollut.**, 243, 591- 600, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.084>

LETRAS, M.C. **Reciclagem de plásticos: identificação de contaminantes e estratégias de valorização dos resíduos industriais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente, Perfil de Engenharia Sanitária), Universidade Nova Lisboa, Lisboa, 2008. Disponível em: <https://run.unl.pt/bitstream/10362/1398/1/Letras_2008.pdf>. Acesso em: 17 abr. 2023.

LI, J.; ZHANG, K.; ZHANG, H. Adsorption of antibiotics on microplastics. **Environmental pollution**, 237, 460 - 467, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.050>

LIEBSCH, M.; BECKER, W. Comparative glucose tolerance studies in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*: influence of starvation and infection with the trematode *Schistosoma mansoni*. **J Comp Physiol B.**, 160, 1, 41-50, 1990.

<https://doi.org/10.1007/BF00258761>

LIMA, V.T.A. et al. Análise da condutividade elétrica e do pH em água salobra no cultivo de tilápias. Embrapa publicações. 2011. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/905670/1/66Valdivia.pdf>>.

LIMA, C.D.M. et al. Zooplankton exposure to microplastic contamination in a estuarine plume-influenced region, in Northeast Brazil. **Environmental pollution**, 322, 121072, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121072>

LIMONTA, G. et al. Microplastics induce transcriptional changes, immune response and behavioral alterations in adult zebrafish. **Scientific Reports**, 9, 1577, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52292-5>

LOUREIRO, A.O. **Bioplásticos e plásticos biodegradáveis: revisão bibliográfica dos principais materiais e seus impactos ambientais**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR, São Carlos, 2021.

<https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/15259/TCC%20-%20Amanda%20Oriani%20Loureiro%20%281%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

LU, Y. et al. Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver. **Environmental Science & Technology**, 50, 7, 4054-4060, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00183>

MACHADO, M.J.; DEXTRO, R.B.; CRUZ, R.B.; COTTA, S.R.; FIORE, M.F. Response of two cyanobacterial strains to non-biodegradable glitter particles. **Aquatic toxicology**, 106590, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106590>

MAGALHÃES, D.; FERRÃO FILHO, A.S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, 12, 03, 2008. <https://doi.org/10.4257/oeco.2008.1203.02>

MALAFAIA, G.; SOUZA, A.M.; PEREIRA, A.C.; GONÇALVES, S.; ARAÚJO, A.P.C.; RIBEIRO, R.X.; ROCHA, T.L. Developmental toxicity in zebrafish exposed to polyethylene microplastics under static and semi-static aquatic systems. **Sci. Total Environ.**, 700, 134867, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134867>

MANUEL, P.; ALMEIDA, M.; MARTINS, M.; OLIVEIRA, M. Effects of nanoplastics on zebrafish embryo-larval stages: A case study with polystyrene (PS) and polymethylmethacrylate (PMMA) particles. **Environ. Res.**, 213, 113584, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113584>

MANOLAKI, S.M. et al. Microplastic Contamination in Cultured Mussels and Pearl Oysters in Greece. **Microplastic**, 2, 2, 168-181, 2023. <https://doi.org/10.3390/microplastics2020013>

MANTOVANNI, M.S. et al. Teste de micronúcleos: in vitro e in vivo.139. In: SALVADORI, D.M.F. et al. (Eds) **Da toxicogenética à toxicogenômica**. Ed. Atheneu, Rio de Janeiro, 2021.

MCNEISH, R.E.; KIM, L.K.; BARRET, H.A.; MASON, S.A.; KELLY, J.J.; HOELLEIN, T.J. Microplastic in riverine fish is connected to species traits. **Scientific reports**, 8, 11639, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29980-9>

MEDRIANO, C.A.; BAE, S. Acute exposure to microplastics induces metabolic disturbances and gut dysbiosis in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and environmental safety**, 245, 114125, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114125>

MELLO-SILVA, C.C. et al. Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopian* látex. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 105, 4, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000400024>

MENDES, C.L.T.; SOARES-GOMES, A. Circulação nos oceanos correntes oceânicas e massas d'água. 2007. Disponível em: <<http://ole.uff.br/wp-content/uploads/sites/290/2017/11/Correntes.pdf>>

McCORMICK, A.; HOELLEIN, T.J.; MASON, S.A.; SCHLUEP, J.; KELLY, J.J. Microplastic is an abundant and distinct microbial habitat in an urban river. **Environmental Science & Technology**, 48, 11863-11871, 2014. <https://doi.org/10.1021/es503610r>

MILLER, M.E.; KROON, F.J. Bioaccumulation and biomagnification of microplastics in marine organisms: a review and meta-analysis of current data. **PLoS One**, 15, 10, e0240792, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240792>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica**. Diretrizes técnicas: programa de vigilância e controle de esquistossomose (PCE), 2ªEd., Brasília, 2008.

MONTAGNER, C.C.; DIAS, M.A.; PAIVA, E.M. VIDAL, C. Microplásticos: ocorrência ambiental e desafios analíticos. **Quim. Nova**, 44, 10, 1328-1352, 2021. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170791>

MONTEIRO, D.A.; DE ALMEIDA, J.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, 143, 141-149, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.01.004>

MOORE, C.J.; MOORE, S.L; LEECASTER, M.K.; WEISBERG, S.B. A comparison of plastic and plankton in the North Pacific Central Gyre. **Marine Pollution Bulletin**, 42, 12, 1297-1300, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00114-X](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00114-X)

MUNIZ, D.H.F.; MALAQUIAS, J.V.; LIMA, J.E.F.W.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. Proposal of an irrigation water quality index (IWQI) for regional use in the Federal District,

Brazil. Environmental monitoring and assessment, 192, 607, 2020.
<https://doi.org/10.1007/s10661-020-08573-y>

NASCIMENTO, T.S.R.; BOIJINK, C.L.; PÁDUA, D.M.C. **Efeito do pH da água no equilíbrio iônico de alevinos de *Piaractus mesopotamicus***. 2007. Disponível em:
<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/115054/1/QAGUA-06.pdf>

NELMS, S.E.; BARNETT, J.; BROWNLOW, A.; DAVISON, N.J.; DEAVILLE, R.; GALLOWAY, T.S.; LINDEQUE, P.K.; SANTILLO, D.; GODLEY, B.J. Microplastics in marine mammals stranded around the British coast: ubiquitous but transitory? **Scientific Reports**, 9, 1075, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37428-3>

NOAA MARINE DEBRIS PROGRAM. Invasive species. Marine debris as a potential pathway for invasive species. 2017.
<https://marinedebris.noaa.gov/file/4168/download?token=SkOSYDWE>

NUGNES, R.; RUSSO, C.; LAVORGNA, M.; ORLO, E.; KUNDI, M.; ISIDORI, M. Polystyrene microplastic particles in combination with pesticides and antiviral drugs: Toxicity and genotoxicity in *Ceriodaphnia dubia*. **Environ. Pollut.**, 313, 120088, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120088>

OECD. *Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*. iLibrary: Berlin. Germany, 2013. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>

OECD. *Test No. 204: Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study*. iLibrary: Berlin. Germany, 2014. <https://doi.org/10.1787/9789264069985-en>

OECD. *Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test*; OECD iLibrary: Berlin. Germany, 2019. <https://doi.org/10.1787/9789264069961-en>

OKOYE, C.O. et al. Toxic Chemicals and Persistent Organic Pollutants Associated with Micro-and Nanoplastics Pollution. **Chemical engineering journal advances**, 11, 100310, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.100310>

OLIVEIRA, A.C.; FASCINELI, M.L.; ANDRADE, T.S.; SOUSA-MOURA, D.; DOMINGUES, I.; CAMARGO, N.S.; OLIVEIRA, R.; GRISOLIA, C.K. VILLACIS, R.A.R. Exposure to tricyclic antidepressant nortriptyline affects early-life stages of zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and environmental safety**, 2010, 111868, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111868>

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; LOPES, R. M.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. **Chemosphere**, 56, 4, 369-374, 2004.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.026>

OLIVEIRA-FILHO; E.C.; NAKANO, E.; TALLARICO, L.F. Bioassays with freshwater snails *Biomphalaria* sp.: from control of hosts in public health to alternative tools in ecotoxicology. **Invertebrate Reproduction & Development**, 61, 1, 49-57, 2017.
<http://dx.doi.org/10.1080/07924259.2016.1276484>

OLIVEIRA-FILHO, E.C.; MUNIZ, D.H.F.; CARVALHO, E.L.; CÁCERES-VELEZ, P.R.; FASCINELI, M.L.; AZEVEDO, R.B.; GRISOLIA, C.K. Effects of AgNPs on the snail *Biomphalaria glabrata*: survival, reproduction and silver accumulation. **Toxics**, 7, 12, 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/toxics7010012>

PALHARES, D., GRISOLIA, C.K.,. Comparision between the micronucleus frequencies of Kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Genetics and Molecular Biology** 25, 281-284, 2002. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/gmb/a/rjZftvn4jfvFQb5FC5nK7pQ/?lang=en&format=pdf>>.

PARENTE, R.A. **Elementos estruturais de plástico reciclado. 2006**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Estruturas) - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006. https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18134/tde-19072006-095941/publico/2006ME_RicardoAParente.pdf

PARICHY, D.M.; ELIZONDO, M.R.; MILLS, M.G.; GORDON, T.N.; ENGESZER, R.E. Norma table of post-embryonic zebrafish development: Staging by externally visible anatomy of the living fish. **Dev. Dyn.**, 238, 2975–3015, 2011. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22113>

PASSOS, A. L.L. et al. Critérios para avaliação da qualidade de água no Brasil, In: Fronteiras: **Journal of Social, Technological and Environmental Science**, 7, 2, 290-303, 2018.

PIAU, T.B.; FASCINELI, M.L.; MOURA, D.S.; ALBERNAZ, L.C.; ESPINDOLA, L.S.; GRISOLIA, C.K. In the screening of alternative insecticides to control *Aedes aegyptu* larvae 2-methylanthraquinone showed no genotoxicity and low toxicity to zebrafish (*Danio rerio*). **Genet. Mol. Biol.**, 45, 1, e20210307. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2021-0307>

PIERONI, M.C.; LEONEL, J.; FILLMANN, G. Retardantes de chama bromados: uma revisão. **Química Nova**, 40, 3, 2017. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20160176>

PIRES, N.L.; ARAUJO, E.P.; OLIVEIRA-FILHO, E.C.; CALDAS, E.C. Na ultrasensitive LC-MS/MS method for the determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in water – analysis of surface and groundwater from a hydriographic basin in the Midwestern region of Brazil. **Science of the total environment**, 875, 162499, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162499>

PITT, J.A. et al. Uptake, tissue distribution, and toxicity of polystyrene nanoparticles in developing zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic toxicology**, 194, 185-194, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.11.017>

PORTALCORREIO. Cagepa pede que população não jogue adereços e glitter na rede. **PORTALCORREIO**, João Pessoa. 2020. Disponível em: <<https://portalcorreio.com.br/aderecos-brilhos-poluir-saneamento/>>. Acesso em: 11 abr. 2023.

PRÜSTT, M.; MEIJER, J.; WESTERINK, R.H.S. The plastic brain: Neurotoxicity of micro- and nanoplastics. **Part. Fibre Toxicol.**, 17, 24, 2020.

<https://doi.org/10.1186/s12989-020-00358-y>

QIANG, L.; CHENG, J. Exposure to microplastics decreases swimming competence in larval zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 176, 226-233, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.088>

QUEIRÓS, L. et al. *Caenorhabditis elegans* as a tool for Environmental Risk Assessment – emerging and promising applications for a “nobelized worm”. **Crit Rev Toxicol.**, 49, 5, 411–429, 2019. <https://doi.org/10.1080/10408444.2019.1626801>

RAGUSA, A. et al. Platicenta: first evidence of microplastics in human placenta. **Environ. Int.** 146, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106274>

RAMOS, T.R.; SOUZA, K.A.; LEWANDOWSKI, V.; PRADO, R.M.; ORGAGHI, M.G.; VITAL, A.C.P. ALVEZ, L.F.S.; RIBEIRO, R.P. P. I.N. Animal development, liver histology, and antioxidante activity in the muscle of zebrafish (*Danio rerio*) fed with natural additives in the diets. **Research, Society and Development**, 11, 4, e41111427326, 2022. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27326>

REDONDO-HASSELERHARM, P.E.; GORT, G.; PEETERS, E.T.H.M.; KOELMANS, A.A. Nano- and microplastics affect the composition of freshwater benthic communities in the long term. **Science Advances**, 6, 5, 2020.

<https://doi.org/10.1126/sciadv.aay4054>

RIBEIRO, A.V. et al. Atividade de lactato desidrogenase e malato desidrogenase de *Astyanax bimaculatus* (lambari) da bacia hidrográfica do rio Uma como bioindicadoras de impacto ambiental. **Rev. Ambient. Água**, 10, 4, 2015.

<https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1615>

RIST, S.; BAUN, A.; HARTMANN, N.B. Ingestion of micro- and nanoplastic in *Daphnia magna* – Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. **Environmental Pollution**, 228, 398-407, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.048>

RIVER-AUTY, J.; BOND, A.L.; GRANT, M.; LAVERS, J. The one-two punch of plastic exposure: Macro- and micro-plastics induce multi-organ damage in seabirds. **Journal of Hazardous Materials**, 442, 130117, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130117>

RIVERO, C.; BARBOSA, A.; FERREIRA, M., DOREA, J.; GRISOLIA, C. Evaluation of genotoxicity and effects on reproduction of nonylphenol in *Oreochromis niloticus* (Pisces: cichlidae). **Ecotoxicology** 17, 732-737, 2008.

<https://doi.org/10.1007/s10646-008-0222-0>

RODRIGUES, A.C.; SALLA, R.F.; ROCHA, T.L. Bioaccumulation and ecotoxicological impact of micro(nano)plastics in aquatic and land snails: Historical review, current research and emerging trends. **Journal of Hazardous Materials**, 444, 130382, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130382>

SANT'ANNA, M.C.B. **Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo para estudo da toxicidade induzida pelo ferro**. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. Disponível em: <<https://tede2.pucrs.br/tede2/bitstream/tede/5353/1/416908.pdf>>.

SANTOS, R.A.; GOULART, M.O.; PIRES, L.M.; ANDRADE, V.M. Ensaio cometa. 117. In: SALVADORI, D.M.F. et al. (Eds) **Da toxicogenética à toxicogenômica**. Ed. Atheneu, Rio de Janeiro, 2021a.

SANTOS, B.; ANDRADE, T.; DOMINGUES, I.; RIBEIRO, R.; SOARES, A.M.V.M.; LOPES, I. Influence of salinity on the toxicity of copper and cadmium to Zebrafish embryos. **Aquatic toxicology**, 241, 106003, 2021b. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.106003>

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R. SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.**, 175, 184-191, 1988.

SINGH, V.; CORTES-RAMIREZ, J.; TOMS, L.M.; SOORIYAGODA, T. KARATELA, S. Effects of polybrominated diphenyl ethers on hormonal and reproductive health in e-waste-exposed population> a systematic review. **Int. J Environ Res Public Health**, 19, 13, 7820, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijerph19137820>

SINGLEMAN, C.; HOLTZMAN, N.G. Growth and maturation in the zebrafish, *Danio rerio*: a staging tool for teaching and research. **Zebrafish**, 11, 4, 396-406, 2014. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.0976>

SILVA, V. C.L. **Avaliação do emprego das enzimas Glutathione S-Transferase (GST) e Glutathione Peroxidase (GPx) como biomarcadores no monitoramento da qualidade de água no rio Guandu**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro – RJ, 2012. Disponível em: <http://www.uezo.rj.gov.br/tcc/cb/Val%C3%A9ria-Cristiane-Lucas-da-Silva.pdf> Acesso em: 26 abr. 2023.

SILVA, L.D. **Influência da exposição ao carbonato de cálcio no metabolismo de compostos orgânicos e inorgânicos em *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro de *Schistosoma mansoni***. 2014. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública), Universidade Federal do Goiás – UFG, Goiânia, 2014.

SILVA, S.R. **Quantificação de substâncias com atividade estrogênica e caracterização da toxicidade embrionária em *Zebrafish (Danio rerio)* nos efluentes das Estações de tratamento de esgotos Sul e Norte e no Lago Paranoá, Brasília-DF**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Universidade de Brasília-UnB, Brasília, 2015.

SILVA, D.C.V.R.; POMPÊO, M.; PAIVA, T.C.B. A ecotoxicologia no contexto atual no Brasil. In: Pompêo et al. (Orgs.) **Ecologia de reservatórios e interfaces**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - USP, 2015. Cap. 22: Ecotoxicologia. Disponível em: <http://ecologia.ib.usp.br/reservatorios/PDF/Cap. 22 Ecotoxicologia.pdf>

SILVA, E.M. **Acetilcolinesterase do cérebro e músculo esquelético do peixe-zebra (Danio rerio) – purificação e caracterização da enzima cerebral**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso – TCC, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, 2016. Disponível em: <<http://www.cbiotec.ufpb.br/ccbiotec/contents/tccs/2016.1/tcc-elizanete.pdf>>. Acesso em 24 abr 2023

SMINA, A.H.; SAMIRA, B.; MOHAMED, D.; HOURIA, B. Evaluation of acetylcholinesterase, glutathione S-transferase and catalase activities in the land snail *Helix aspersa* exposed to thiamethoxam. **Journal of entomology and zoology studies**, 4, 5, 369-374, 2016. Disponível em: <https://www.entomoljournal.com/archives/2016/vol4issue5/PartF/4-4-124-520.pdf>

SOBRAL, P.; FRIAS, J.; MARTINS, J. Microplásticos nos oceanos – um problema sem fim à vista. **Ecologi@**, 3, 12-21, 2011.

SÖKMEN, T.O. et al. Polystyrene Nanoplastics (20 nm) are able to bioaccumulate and cause oxidative DNA damages in the brain tissue of zebrafish embryo (*Danio rerio*). **NeuroToxicology**, 77, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.12.010>

SONG, Y. et al. Uptake and adverse effects of polyethylene terephthalate microplastics fibers on terrestrial snails (*Achatina fulica*) after soil exposure. **Environmental pollution**, 250, 447-455, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.066>

SOUSA, C.S.M.; BARATA, T.Q.F.; LINHARES, F.O. **Polímeros termoplásticos: principais tipos, características, aplicações e processos de transformação**. Faculdade de Arquitetura e Urbanismo. 2020. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5820708/mod_resource/content/1/2020_2_AUT_2025_AULA_04%20%28Polimeros%20-%20Termopl%C3%A1sticos%29.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2023.

SOUZA, T.D.S.; FONTANETTI, C.S., Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 605, 87-93, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.02.010>

SPINACE, M.A.S.; PAOLI, M.A. The technology of polymer recycling. **Química Nova**, 1, 28. 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100014>

SRIPADA, K. et al. A children's health perspective on nano-and microplastics. **Environmental Health Perspectives**, 130, 1, 2022. <https://doi.org/10.1289/EHP9086>

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Ann. Clin. Biochem.**, 6, 24-27, 1969.

VARGHESE, J.V.; SEBASTIAN, E.M.; IQBAL, T.; TOM, A.A. Pesticide applicators and cancer: a systematic review. **Rev Environ Health**, 36, 4, 467-476, 2020. <https://doi.org/10.1515/reveh-2020-0121>

VASSAULT, A. Methods of enzymatic analysis, enzymes I: Oxidoreductases, transferases Vol. III. **Verlag Chemie**, Basel, 118-126, 1983.

VEDOLIN, M.C. **Estudo da distribuição de metais em plásticos no litoral de São Paulo: avaliação da poluição por meio da análise de pellets**. 2014. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Química), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
VENDEL, A.; BESSA, F.; ALVES, V.E.N.; AMORIM, A.L.A.; PATRÍCIO, J.; PALMA, A.R.T. Widespread microplastic ingestion by fish assemblages in tropical estuaries subjected to anthropogenic pressures. **Mar. Pollut. Bull.**, 117, 448–455, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.081>

VENTURINI, F.P. **Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) exposto a concentração sub-letal de triclorfon e recuperação**. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2010.

WAGNER, M. et al. Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. **Environmental Science Europe**, 26, 12, 2014.
<https://doi.org/10.1186/s12302-014-0012-7>

WALLER, C.L. et al. Microplastics in the Antarctic marine system: An emerging area of research. **Science of the total environmental**, 598, 220-227, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.283>

WALKINSHAW, C.; TOLHURST, T.J.; LINDEQUE, P.K.; THOMPSON, R.; COLE, M. Detection and characterization of microplastic and microfibrils in fishmeal and soybean meal. **Marine pollution bulletin**, 185, 114189, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114189>

WANG, Y.; QIAN, H. Phthalates and their impacts on human health. **Healthcare**, 9, 5, 603, 2021. <https://doi.org/10.3390/healthcare9050603>

WANG, Y. et al. Uptake, elimination and effects of cosmetic microbeads on the freshwater Gastropod *Biomphalaria glabrata*. **Toxics**, 10, 87, 2022.
<https://doi.org/10.3390/toxics10020087>

WARD, J.E.; KACH, D.J. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. **Marine Environmental Research**, 68, 137-142, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.05.002>

WEAVER, C. **O que é glitter? Conheça uma das principais fábricas do produto nos EUA**. Folha UOL. 2019. Disponível em:
<<https://www1.folha.uol.com.br/mercado/2019/01/o-que-e-glitter-conheca-uma-das-principais-fabricas-do-produto-nos-eua.shtml>>. Acesso em: 28 nov. 2019

WEBB, H.; ARNOTT, J.; CRAWFORD, R.J.; IVANOVA, E.P. Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly (ethylene terephthalate). **Polymers**, 5, 1, 1-18, 2013. <https://doi.org/10.3390/polym5010001>

WEBER, A.; RANDOW, M.; VOIGT, A.L.; AU, M.; FISHER, E.; MEERMANN, B.; WAGNER, M. Ingestion and toxicity of microplastics in the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*: No microplastic-induced effects alone or in combination with copper. **Chemosphere**, 263, 128040, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128040>

WENDT, C.L.G.R. **Avaliação toxicológica do hormônio 17 alfa metiltestosterona em espécies aquáticas**. Tese de doutorado (doutorado em Biologia Animal), Universidade de Brasília – UnB. Brasília, 2013. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/14661/1/2013_CarlaLeticiaGedielRiveroWendt.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2023.

WEGNER, A.; BESSELING, E.; FOEKEMA, E.M.; KAMERMANS, P.; KOELMANS, A.A. Effects of nanopolystyrene on the feeding behavior of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, p. 2490-2497, 2012.

WERNER, I.; HITZFELD, B. 50 Years of Ecotoxicology since Silent Spring – a review. In: **GAIA – Ecological Perspectives on science and society**, 21, 3, 2012. <https://doi.org/10.14512/gaia.21.3.13>

WINSTON, J. et al. Encrusters, epibionts, and other biota associated with pelagic plastic: a review of biogeographical, environmental, and conservation issues. **Marine Debris**, p. 81-97, 1997.

WORM, B.; LOTZE, H.K.; JUBINVILLE, I.; WILCOX, C.; JAMBECK, J. Plastic as a persistent marine pollutant. **Annual Reviews**, 42, 1-26, 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ102016-060700>

WU, L.; PATEL, L.; ZANDIEH, M.; LIU, J. Promotion of DNA adsorption onto microplastics by transition metal ions. **Microplastics**, 2, 1, 158-67, 2023. <https://doi.org/10.3390/microplastics2010012>

WWF. **Brasil é o 4º país do mundo que mais gera lixo plástico**. 2019. Disponível em: <<https://www.wwf.org.br/?70222/Brasil-e-o-4-pais-do-mundo-que-mais-gera-lixo-plastico>>. Acesso em: 11 abr. 2023.

XU, S.; MA, J.; JI, R.; PAN, K.; MIAO, A.J. Microplastics in aquatic environments: Occurrence, accumulation, and biological effects. **Sci. Total Environ**, 703, 134699, 2020a. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134699>

XU, Q.; DENG, T.; LEBLANC, G.; AN, L. An effective method for evaluation of microplastic contaminant in gastropod from Tiahu lake, China. **Environmental science and pollution research**, 22, 22878-22887, 2020b. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08747-8>

YAN, Z.; LIU, Y.; ZHANG, T.; ZHANG, F.; REN, H.; ZHANG, Y. Analysis of microplastics in human feces reveals a correlation between fecal microplastics and inflammatory bowel disease status. **Environ. Sci. Technol.**, 56, 1, 414-421, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c03924>

YU, H.; PENG M. J.; CAO, X.; WANG, Y.; ZHANG, Z.; XU, Y.; QI, W. Effects of microplastics and glyphosate on growth rate, morphological, and oxidative stress in the aquatic species *Salvinia cucullata*. **Environmental Pollution**, 279, 116900, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116900>

YURTSEVER, M. Glitters as source of primary microplastics: an approach to environmental responsibility and ethics. **Journal of agricultural and environmental ethics**, 32, 459-478, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10806-019-09785-0>

ZAVALA-ALARCON, F.L.; HUCHIN-MIAN, J.P.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, M.D.P.; KOZAK, E.R. In situ microplastic ingestion by neritic zooplankton of the central Mexican Pacific. **Environ. Pollut.**, 319, 120994, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120994>

ZETTLER, E. et al. Life in the “Plastisphere”: Microbial communities on plastic marine debris. **Environ, Sci. Technol.**, v. 47, n. 13, p. 7137-7146, 2013

ZHANG, H. et al. Occurrences of organophosphorus esters and phthalates in the microplastics from the coastal beaches in north China. **Science of the total environment**, 616-617, 1505-1512, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.163>

ZHANG, T.; YAN, Z.; ZHENG, X.; WANG, S.; FAN, J.; LIU, Z. Effects of acute ammonia toxicity on oxidative stress, DNA damage and apoptosis in digestive gland and gill of Asian clam (*Corbicula fluminea*). **Fish & shellfish immunology**, 99, 514-525, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.02.046>

ZHU, L.; ZHU, J.; ZUO, R.; QIAN, Y.; AN, L. Identification of microplastics in human placenta using laser direct infrared spectroscopy. **Sci. Total Environ.** 856, 159060, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159060>

Apoio Financeiro

CNPq, CAPES e Programa de Pós-graduação em Biologia Animal –
Univiersidade de Brasília – UnB.

ANEXO I – Formulário Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA)**Universidade de Brasília**Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 18 de dezembro de 2019.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "IMPACTOS ECOTOXICOLÓGICOS EM MACROINVERTEBRADOS E VERTEBRADOS AQUÁTICOS DE MICRO E NANOPARTÍCULAS DE PLÁSTICO ORIUNDAS DO LAGO PARANOÁ" Protocolo n.º 112/2019, sob responsabilidade do Professor César Koppe Grisolia foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Danio rerio*, 84 animais. A presente aprovação é válida pelo período de: 18/12/2019 a 01/08/2021.



Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.



Article

Multilevel Toxicity Evaluations of Polyethylene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*)

Ingrid de Souza Freire ¹, Maria Luiza Fascineli ¹ , Tathiana Benetis Piau ¹, Bruno Fiorelini Pereira ²
and Cesar Koppe Grisolia ^{1,*}

¹ Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília 70910-900, Brazil

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Paulo—UNIFESP, São Paulo 05468-901, Brazil

* Correspondence: grisolia@unb.br

Abstract: Microplastics in freshwater environments pose a serious threat to living beings. Polyethylene microplastics (PE-MP) are the type most used around the world as microbeads in personal care products, and they have been found in aquatic organisms. The behavior and toxicity of fluorescent PE-MP spheres with an average diameter of 58.9 μm were studied in adult, juvenile and embryo zebrafish (*Danio rerio*). The adults were studied for genotoxicity, cytotoxicity, histology and biochemical markers. Juveniles underwent a follow-up in the gastrointestinal (GI) tract with histologic observations, and embryos were studied for embryotoxicity with the FET-test. In adults, micronucleus test and comet assays found neither genotoxicity after acute exposure for 96 h at concentrations of 0.0, 12.5, 50 and 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, nor cytotoxicity through the nuclear abnormalities test. Acetylcholinesterase (AChE), Glutathione-S-Transferase (GST) and Lactate Dehydrogenase (LDH) activities were measured in adults exposed for 96 h. The AChE and GST activities were significantly changed, while no changes occurred for LDH. In conclusion, these PE-MP spheres did not cause serious toxic effects in zebrafish because there was no internalization. The observed biochemical changes in AChE and GST may be associated with GI microbiological dysbiosis, previously reported. The PE-MP spheres in the intestine of juveniles remained present for 12–15 days on average after the post-exposure clearance study, showing a slow depuration. The histological analysis, in adults, found no internalization of these microbeads, with complete depuration. The PE-MP spheres did not cross the chorion barrier, showing no embryotoxic effects after exposures at 0.0, 6.25, 12.5, 50.0 or 100.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for 96 h.

Keywords: microplastics; ecotoxicology; zebrafish; polyethylene; biomarkers



Citation: de Souza Freire, I.; Fascineli, M.L.; Piau, T.B.; Pereira, B.F.; Grisolia, C.K. Multilevel Toxicity Evaluations of Polyethylene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*). *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2023**, *20*, 3617. <https://doi.org/10.3390/ijerph20043617>

Academic Editor: Paul B. Tchounwou

Received: 22 January 2023

Revised: 11 February 2023

Accepted: 14 February 2023

Published: 17 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Plastics in the environment are degraded, producing fragments, microplastics and nanoplastics, which have been found at different trophic levels. They are considered major emerging pollutants around the world, and their toxicities are not completely understood [1]. In the process of fragmentation, a variety of shapes and sizes have been found, such as pellets, fibers, films and spheres [2,3]. Microplastics (MPs) have been found in almost all marine organisms, and due to the huge concern regarding their end point and effect on marine biota, many studies have been published [4]. On the other hand, the ecotoxicity of microplastics in freshwater environments should also be further investigated, because this water is used as a drinking water resource [5]. MPs in freshwater have not yet been investigated as much as in oceans. In both cases, MPs enter the food chains, reaching top-chain organisms. The differences in size and shape of MPs influence their uptake and accumulation in tissues in many animal species, as already found in zebrafish. Due to their poor degradation and persistence, MPs remain available in aquatic environments for a long time [6].

Plastic pellets are manufactured as microbeads for use in cosmetic and personal care products. Over 90% of microbeads used in cosmetics consist of spherical particles of polyethylene with size varying from 0.4 nm to 1.24 mm [7]. Most microbeads have been found in waters near large cities, especially in developing countries with limited waste treatment systems [8]. European countries and many other countries around the world have banned plastic microbeads in personal care products, and in Brazil, some states have followed a federal law on solid residues, which they use to prohibit the use of non-biodegradable plastic bags in local stores [9]. Although these measures have been adopted, significant levels of polyethylene microbeads still remain in the environment due to their low degradation [10]. In Brazil, among plastic polymers, low- and high-density polyethylenes are the type most produced by chemical industries [11].

In Brazil, studies have revealed the presence of polyethylene in coastal sediments [12] and on the seacoast of several states [13,14]. Another study states that polyethylene plastics are also widely found in the digestive tract of different aquatic or terrestrial species, such as fish, amphibians and microcrustaceans. As for the size of these particles, there is great diversity, and they are also present in freshwater, seawater and estuary environments [15]. Plastic thus achieves entry into different levels of the food chain, becoming one of the most worrying pollutants today [16].

The zebrafish *in vivo* model was used in this study due to its high similarity with mammals, including human beings. Zebrafish have been used for ecotoxicological studies with numerous emerging pollutants, such as endocrine disruptors, pharmaceuticals, pesticides and nanomaterials. In addition, zebrafish share high homology with the human genome, having approximately 70% orthologue human genes [17,18]. The purpose of this study was not only to investigate the toxicity and genotoxicity of polyethylene MP beads in zebrafish, but also to examine their interaction and behavior when ingested.

2. Materials and Methods

2.1. Polyethylene Microplastics (PE-MP)

Fluorescent orange PE-MPs with diameter of 53–73 μm on average were acquired from Cospheric (Goleta, CA, USA). The PE-MPs were documented using scanning electron microscopy (SEM—Jeol JSM-7001F at 15 kV, Tokyo, Japan). The samples were previously coated with gold powder for their analysis and imaging performed using an electron microscope. The composition of the PE-MPs was analyzed using energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). Using the software FijiJ, 500 PE-MPs were scored, exhibiting $58.9 \pm 4.52 \mu\text{m}$ average diameter (Figure 1A,B). Orange fluorescence was demonstrated under a Axioskop 2—Zeiss (Jena, Germany) epifluorescence microscope with magnification of 100 \times using a 510–530 nm filter (Figure 1C). In the pilot test, this MP agglomerated in water, after which Tween 80% was used in all tests as a dispersant.

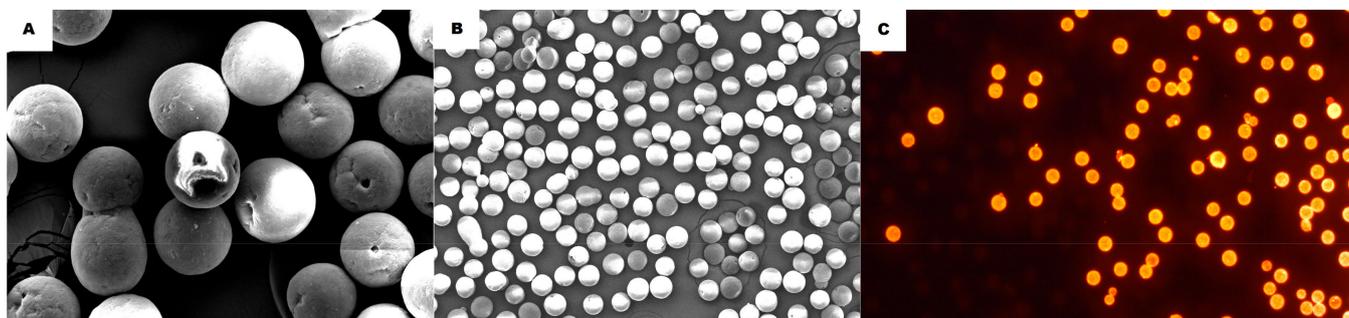


Figure 1. (A,B) images from SEM showing the morphology of the PE-MPs (magnification (A)—500 \times , (B)—370 \times). (C) shows the fluorescence of the PE-MPs in shape of beads (magnification 100 \times).

2.2. Zebrafish (*Danio rerio*) as Test Organism

Zebrafish adults from a University of Brasilia facility (ZebTec—Tecniplast, Varese, Italy) were raised under controlled water parameters: temperature at 27.0 ± 1 °C, conductivity at 650 ± 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pH at 7.0 ± 0.5 and dissolved oxygen $\geq 95\%$ saturation. Zebrafish embryos were obtained using the Ispawn breeding system (Tecniplast, Italy).

2.3. Fish Embryo Toxicity Test (FET)

The FET test followed the OECD guideline Protocol 236 [19]. The embryos were exposed to 6.25, 12.5, 50.0 and 100.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of PE-MPs and Tween 80% at 0.01% for 96 h; there was also a control group. The embryos were collected using the Ispawn system after natural mating. Unfertilized eggs and those with cleavage irregularities or injuries were discarded. The test was performed using 60 embryos per treatment in 3 replicates, randomly selected and distributed in 24-well microplates in the climate chamber. Embryos and larvae were observed daily under a reverse microscope. The following parameters were evaluated: coagulation, otolith delay in development, eye and tail pigmentation, somite formation, heartbeat frequency alterations, edemas, detachment of the tail from the yolk sac, yolk sac absorption and hatching. Body malformations were evaluated and documented as recommended by the OECD protocol. In addition, larvae were observed for up to 7 days after fertilization to check whether their feeding habits would lead to ingestion of the particles.

2.4. Juveniles Test

To verify how long it took for particles to depurate, 40-day-old juveniles ($n = 8$) [20] were exposed for 72 h to 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of PMs. At the end of the exposure time, the water was renewed without microplastics (recovery), and the juveniles were monitored over the next days under a fluorescence microscope to check for the presence or absence of microparticles in the gastrointestinal tract.

2.5. Adult Toxicity Test: Histology, Micronucleus, Comet Assay and Biochemical Biomarkers

Eight-month-old zebrafish were exposed in groups of seven fish to MPs at concentrations of 12.5, 50 and 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, as well as Tween 80% (0.01%) and water (control) for 96 h for micronucleus, nuclear abnormalities, comet assay, histology and biochemical biomarkers. Fish were randomly chosen for each studied endpoint and then anesthetized using tricaine (5%), followed by spinal disruption. The tests were based on a modified version of OECD guideline Protocol n. 203 [21] and were carried out in triplicate. Tween 80% at 0.01% was used due to the hydrophobicity of polyethylene MPs [22,23]. In this study, zebrafish adults were exposed to MPs at concentrations of 12.5, 50 and 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for 96 h.

2.5.1. Histology

The fish were stored in Davidson fixative for 24 h and kept in 15 mL tubes with isopropyl alcohol 70%. Decalcification was performed with EDTA 4% for 7 days with total renewal of the solution after 4 days, following the literature [24]. Next, the samples were washed with ultrapure water and dehydrated in an increasing concentration gradient of isopropyl alcohol (70% for 30 min, 95% three times for 15 min, 100% three times for one hour). The fish were embedded in paraffin blocks. The blocks were chilled at 4 °C and cut with 5 μm thickness. To remove the rest of the paraffin, the slides were placed in an oven at 65–70 °C and then washed in isopropyl alcohol 100% until the paraffin was removed, as proposed in the literature [25].

2.5.2. Genotoxicity and Cytotoxicity

For micronucleus, nuclear abnormalities and comet assay, peripheral blood samples were homogenized in 200 μL of fetal bovine calf. From this sample, 50 μL were used for smear in the micronucleus (MN) and nuclear abnormalities (NA) study follow-

ing the literature [26,27]: 2000 erythrocytes were scored for MN and 3000 for NA at 1000× magnification, and they were evaluated under a blind code. Erythrocytes were also scored to classify nuclear abnormalities such as BB—blebbed, LB—lobed, NT—notched, BN—binucleated and NB—nuclear bud. For comet assay, exposures occurred at 12.5, 50, 100 mg.L⁻¹, Tween 80% (0.01%) and water control for 96 h. In the alkaline test, 20 µL of the blood sample was homogenized in 100 µL of LM agarose at 0.5% at 37 °C, then these samples were distributed on microscope slides, matte and polished tip, and covered with a coverslip of 60 mm. The slides were kept in lyse solution for 1 h at 4 °C, and electrophoresis occurred at 0.85 V/cm and 4 °C for 15 min. The cell (nucleoid) analysis for comet classifications followed the protocol developed by Sing et al. (1988) [28], with modifications. For positive control, H₂O₂ at 0.1% was used. One hundred nucleoids per fish were analyzed (blind analysis) and classified based on tail length. The damage index was measured as moderate damage (% MD), comets classified at levels 1 and 2, and high damage (% HD), comets levels 3 and 4 [29].

2.5.3. Biochemical Biomarkers

For acetylcholinesterase (AChE) measurement, samples from head and tail were used. The head was considered from mouth until operculum and tail were considered from anal pore until caudal fin tip. For the measurement of glutathione-S-transferase (GST) activity, gill and body samples were used. We took body samples, considering from operculum until anal pore. For LDH, only samples from the tail were used. The samples were stored in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.2, at −20 °C. Samples were defrosted on ice, triturated using scissors, homogenized using a sonicator, and centrifuged while refrigerated (4 °C) for 20 min at 10,000 g. The resulting post-mitochondrial supernatant (PMS) was isolated and placed in 96-well microplates for enzymatic determinations performed spectrophotometrically (Thermo, Waltham, MA, USA) in quadruplicate.

The Bradford method was used to quantify proteins [30]. The reactions were performed spectrophotometrically in quadruplicate, with the protocol adapted for microplates [31].

AChE activity was carried out using acetylthiocholine (ASCh) and propionylthiocholine (PSCh) as substrates. We followed the protocol described by Ellman and coworkers [32], with modifications (absorbance at 414 nm, every 40 s, for 5 min). AChE was expressed as nanomol of substrate hydrolyzed per minute and per mg of protein (U) after 10 min of absorbance reaction for measurement of enzymatic activity. Lactate Dehydrogenase (LDH) activity was performed using pyruvate as substrate and measuring the reduction of pyruvate and the oxidation of NADH at 340 nm, every 40 s, for 5 min. The determinations of the LDH activity followed the protocol described by Vassault [33]. The variations in Glutathione-S-Transferase (GST) activity were carried out according to the method of Habig and coworkers [34].

2.6. Statistical Analysis

The software SigmaPlot version 12.5 was used for ANOVA one-way testing, after the Shapiro–Wilk normality test was performed. The Kruskal–Wallis test was used for non-parametric analysis. The Dunnett test was used to compare differences among exposure concentrations with controls for both parametric and non-parametric tests at a level of 5%.

3. Results

3.1. Fish Embryo Toxicity Test (FET)

The polyethylene microplastics did not cause any alterations in zebrafish embryogenesis. There was no hatching delay, induction of malformations or increased mortality (Figure 2, ANOVA $p > 0.05$). Therefore, microbeads with average diameter of 58 µm do not cross the chorionic membrane, sticking to the outer side of the chorion (Figure 3A). In Figure 3B, the zebrafish larva gut is completely full of microbeads, showing that the contamination starts only after hatching.

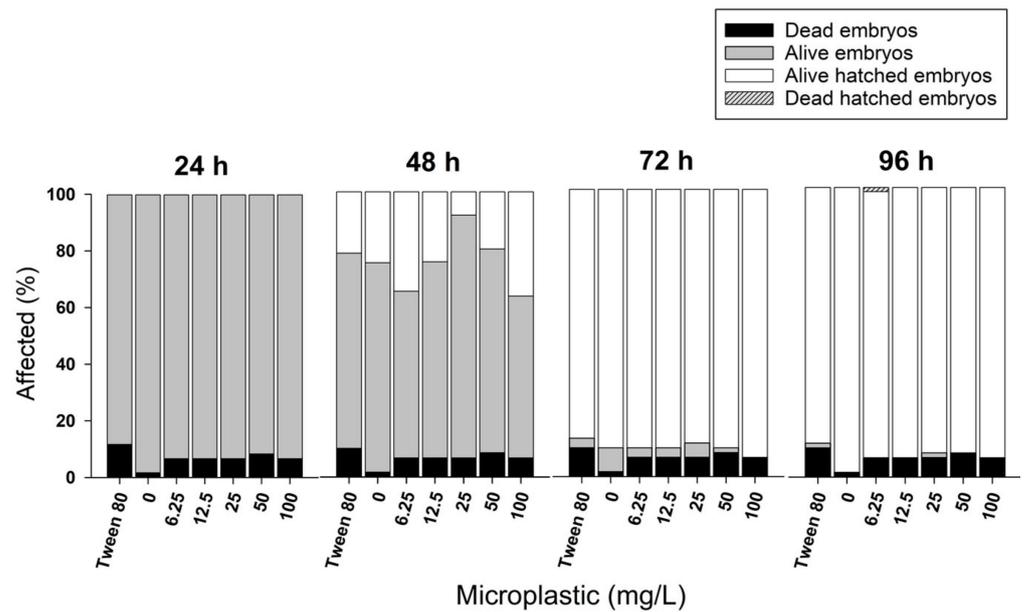


Figure 2. Results of the embryo toxicity test after 96 h of exposure, showing no alterations in the analyzed parameters compared with controls (ANOVA, $p > 0.05$).

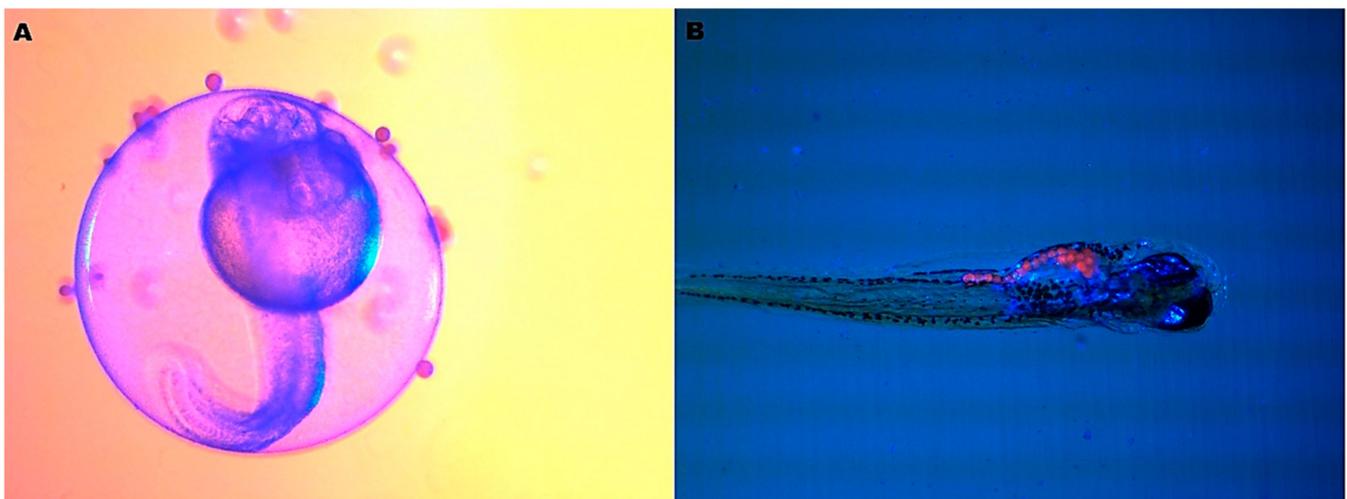


Figure 3. (A) Zebrafish embryo 36 hpf exposed at 50 mg.L⁻¹, showing plastic microbeads adhered on the outside of the chorionic membrane. (B) Microbeads shown in the gut of 7-day-old larva ((A)—25 \times and (B)—15 \times magnification, stereomicroscopy image).

3.2. Juveniles Test

After 15 days in clean water, post-exposure period, the agglomerate of MPs disappeared from the lumen, showing that the gastrointestinal (GI) tract slowly eliminated those MPs (recovery test, Figure 4).



Figure 4. (A) Juveniles exposed to 50 mg.L^{-1} for 24 h, deposition of particles in the gastrointestinal tract. (B) After 7 days of recovery, exposed only in water for depuration. (C) After 12 days, few particles are observed in the anal pore. Magnification $40\times$.

3.3. Histology

The histological analysis shows that PE-MPs strongly agglomerated with fecal content in the intestinal lumen (Figure 5B,E,F). Due to their fluorescence, they were clearly detectable in the lumen (Figure 5E), but not in the intestinal wall or villi. MP particles were not seen in the gill and liver (Figure 5C,D,F).

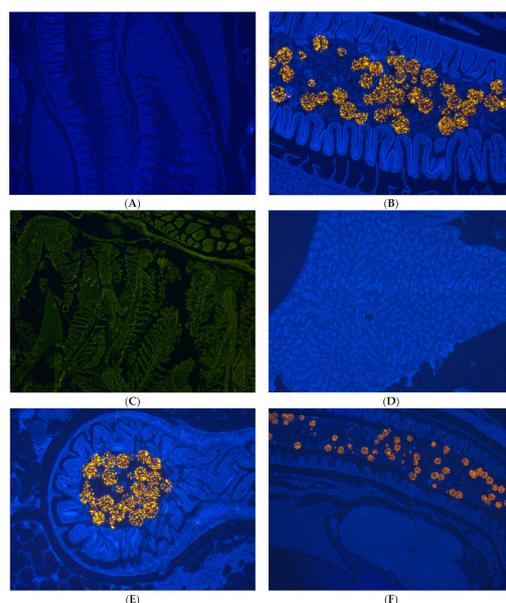


Figure 5. (A) Intestine of zebrafish, control. $40\times$ Magnification. (B) Polyethylene MPs in the intestine of adult zebrafish exposed to 50 mg.L^{-1} for 96 h, $80\times$ magnification. (C) MPs were not observed in gills of zebrafish exposed to 50 mg.L^{-1} , $40\times$ magnification. (D) Absence of polyethylene MPs in liver of zebrafish exposed 50 mg.L^{-1} , $40\times$ magnification. (E) Lumen of intestine of zebrafish full of MPs after exposure to 50 mg.L^{-1} for 96 h, $80\times$ magnification. (F) Presence of MPs in the intestine; MPs were not observed in the other organs. $60\times$ magnification.

3.4. Genotoxicity and Cytotoxicity

The MN-test did not evidence chromosome breaks or chromosome malsegregation, and nor were nuclear abnormalities seen for all exposure levels tested (Figure 6A, $p > 0.05$). In the comet test, with the tail length in the nucleoids analyzed for all exposure levels, no increased DNA break indices were observed (Figure 6B, $p > 0.05$), except for the positive control H_2O_2 at 0.1%, $p < 0.05$.

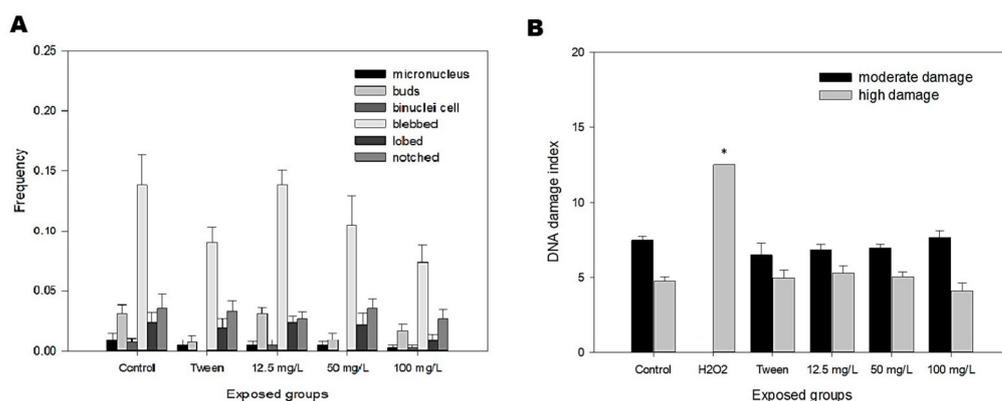


Figure 6. (A) Frequencies of micronucleus and nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of zebrafish adults. The result shows no statistical significance ($p > 0.05$). (B) Result of the comet assay. Moderate damage means tail length 1, 2 and high. H_2O_2 was highly positive ($* p < 0.05$).

3.5. Biochemical Biomarkers

The measurement of AChE activities in the zebrafish adult head demonstrated significant differences at the exposure levels of 50 and 100 $mg.L^{-1}$ compared with the control group ($*** p < 0.001$). The results in tail measurement did not show a difference in activity compared with the control ($p > 0.05$), as seen in Figure 7A. The polyethylene microplastics did not interfere with this neuronal transmitter. The LDH activity in the tail was not modified when compared with the control group (Figure 7B, $p > 0.05$).

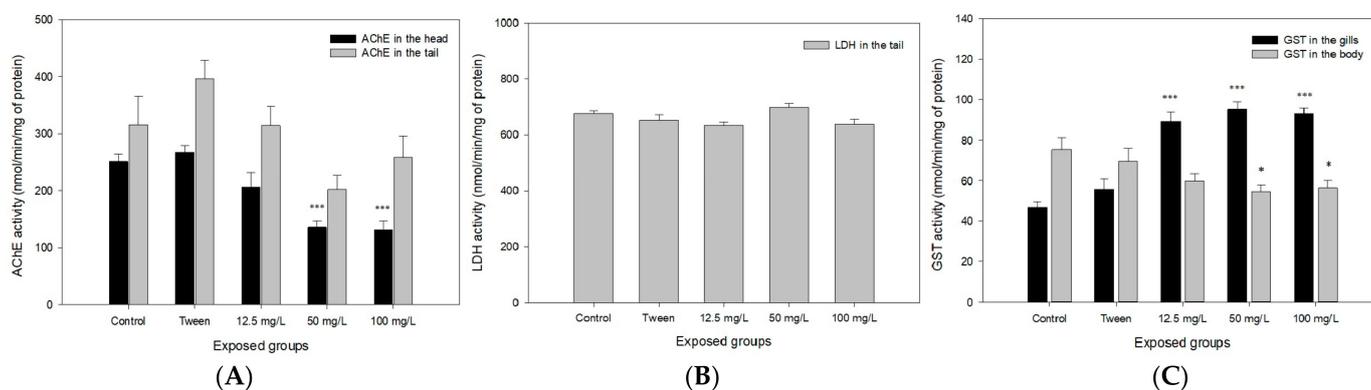


Figure 7. (A) AChE activity in the head and in the tail (mean values + standard error) of zebrafish adults after 96 h of exposure to polyethylene microplastics. Asterisks mean significantly different from the respective control ($p < 0.001$). (B) LDH activity in the tail ($p > 0.05$), and (C) GST activity in the gills ($*** p < 0.001$) and body ($* p < 0.05$).

The GST activity tests evidence a greater variation due to polyethylene microplastics exposures when compared among the other biochemical markers studied. In the body, a significant decrease was observed in GST activity at 50 and 100 $mg.L^{-1}$ ($* p < 0.05$). On the other hand, the activity measured in gills increased and demonstrated a concentration-effect relationship ($*** p < 0.001$), shown in Figure 7C.

4. Discussion

Industrial and domestic wastewater contains fragments, pellets and fibers of plastics that are not removed by wastewater treatment plants due to their small size and buoyancy [7]. Microplastics have been found around the world in soil, water and air, and sooner or later they end up in the human body. In an Indonesian population study, MPs were detected in the gastrointestinal tract, with an average of 10 $\mu g/g$ of feces [35]. Airborne MPs, commonly found in many cities, are inhaled and their presence in human lung tissues

has already been detected in autopsies [36]. Human placentas collected from physiological pregnancies and analyzed using Raman spectroscopy have shown the presence of MPs with different shapes [37]. Due to the fact that different types of MPs have already been reported in humans, more studies to understand the fate and toxicity of microplastics within the human body must be performed.

The zebrafish embryotoxicity test is recommended to assess the adverse potential of emerging aquatic pollutants, such as plastic, and this test aims to determine the toxicity of substances in the embryonic stages of the fish, evaluating the formation of the embryo or larvae during the development [19,38]. In this study, no embryotoxicity occurred from these MPs due to the protection of the chorion, acting as an effective barrier (Figure 3A, $p > 0.05$). The zebrafish chorion is a membrane with thickness of 3.5 μm with 0.5–0.7 μm diameter pores, allowing the passage of water, ions and some chemicals [39]. The chorion acts as a barrier, preventing compounds larger than 3 kDa from passing freely until the embryo hatches at around 72 hpf. When the mouth starts to open at 60 hpf, oral uptake gains importance as a route of exposure [40]. However, after hatching, larvae start feeding freely and are contaminated, as demonstrated in Figure 3B. This result contradicts the studies performed by Malafaia and coworkers [38], in which polyethylene particles with red fluorescence and an average diameter of 38.26 μm , smaller than those used in this study, provoked early hatching of embryos and altered their morphometric standards in static exposure. In contrast, another study [41] found that a polystyrene nanoplastic of 22 nm did not induce significant morphological alterations in zebrafish embryos, as was observed in our study.

In adults, these MPs were easily ingested and were found throughout the GI tract (Figure 4). Their gastrointestinal tract is similar to that of other vertebrates. All cyprinids lack a stomach, and the intestine is continuous, composed of stratified squamous epithelium [42]. Polystyrene MPs of 0.5 and 50 μm diameter caused microbiota dysbiosis and inflammation in the intestines of adult zebrafish [43]. Additionally, Jin et al. [44], studying MPs of 50 μm in zebrafish exposed for 14 days, did not observe histopathological changes in the intestine, but instead a significant change in the microbiota diversity leading to dysbiosis. Oxidative stress and cytotoxicity as a consequence of inflammatory processes have been found in zebrafish exposed to MPs. They can be absorbed by macrophages, contributing to enhancing reactive oxygen species and altering metabolic enzymes [45].

Microplastics of different sizes and shapes have been found in fish intestines around the world, causing several physiological disturbances. They can be accumulated and translocated within an organism or excreted through feces, depending on the size, shape or level of exposure. Spherical MPs (microbeads) cause less injury to the intestine and are retained for a shorter time than those with irregular shapes [46,47]. In our study, the spherical PE-MPs of 58 μm at 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for 96 h demonstrated an intestinal transit of 12–15 days on average, and we did not find these MPs in other zebrafish tissues. This supports other studies suggesting that the rapid removal of plastic from aquatic organisms is a strategy taken by these species to reduce potential biological effects [8].

Analyses of DNA damage have been efficient in detecting genotoxic environmental contaminants, even in low concentrations [48]. Araújo et al. [49] verified that polyethylene microplastics with a diameter of 36 μm induced DNA breaks in zebrafish after exposure of 15 days, using comet assay. However, their results from the micronucleus test and nuclear abnormalities were not statistically significant. The comet assay is a more sensitive endpoint than the micronucleus test. Considering the biochemical markers used, it is known that the assessment of AChE levels has been used as an indicator of *in vivo* neurotoxicity and the GST is involved with detoxification xenobiotics [50]. In the present study, MPs caused alterations in some biochemical biomarkers, such as AChE inhibition in the zebrafish head and GST increased activity in the gills. AChE activity measurement is a biomarker of neurologic adverse effects, and in this case, this could have occurred due to circulating pro-inflammatory cytokines, commonly seen in intestinal dysbiosis [51].

The GST enzymes exhibit different patterns of expression in tissues, and their main functions are the detoxification of xenobiotics. Environmental toxicants in water reach the gill first, and their higher activity in this tissue therefore makes sense, even being expressed also in other tissues of the fish body. The GST metabolic enzymes were already well-characterized in zebrafish by Glisica et al. [52], showing a comprehensive study of this gene family. The authors showed the involvement of seven different GST classes in adult zebrafish associated with the biotransformation of xenobiotics, as well as their functional similarity to the human orthologue xenobiotic metabolism. Taking into account that these microbeads remain in water, our results clearly showed their effects mainly on gill GST metabolism in adult zebrafish.

Lactate dehydrogenase (LDH) activity is commonly used to measure cytotoxicity caused by xenobiotics, leading to the disruption or lysis of cell membranes. When tissues are damaged, LDH is released in response to cell injuries [53]. Our results did not show increases in the LDH levels, from which it can be understood that there was no cell injury. In fact, this could be a survival strategy that fish have developed to eliminate pollutants quickly, in order to avoid other biological side-effects [8]. Our results clearly show the presence of PMs in the lumen of the intestine (Figure 5E) but not in the other organs, it means that there was not absorption (Figure 5C,D). The Figure 5B clearly shows MPs completely agglomerated, like pellets of MPs, which may make it difficult for the intestinal mucosa to absorb.

In a review article, Prüst et al. [54] affirmed that micro- and nanoplastics can inhibit the activity of AChE and increase GST. Araújo et al. [49] also confirmed alterations in biochemical stress markers, such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), in zebrafish after exposure of 15 days to polyethylene microplastics. Another work [41] found biochemical alterations in the markers AChE, GST and CAT in zebrafish exposed to polystyrene nanoplastics, with a diameter of 22 nm, in acute exposure, which corroborates our study.

5. Conclusions

Spherical MPs (microbeads) caused physiological disturbances in zebrafish after short-time exposures, mainly with AChE and GST activity changes. The alterations in GST activity may be associated with oxidative stress caused by a possible intestinal dysbiosis, which was not effective enough to induce genotoxicity and cytotoxicity. We also demonstrated that the chorion protects embryos against MPs of 58 μm , and the microparticle presents complete intestinal transit and is not absorbed, as it was not found in other tissues. Even with the high concentrations seen in the intestine, it was confirmed that the zebrafish manages to eliminate this type of MP.

Author Contributions: I.d.S.F.—comet assay, micronucleus, nuclear abnormalities, embryotoxicity, histological confection and biochemical tests, statistical analysis, project conception and manuscript writing. M.L.F.—project conception, comet assay, micronucleus, nuclear abnormalities, embryotoxicity, statistical analysis and article review. T.B.P.—embryotoxicity and histological confection, analysis of the results. B.F.P.—histological confection. C.K.G.—project conception, histological analysis, analysis of the results and manuscript writing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by CNPq (Project n. 304209/2019-8), CAPES, University of Brasilia—UnB, Brazil.

Institutional Review Board Statement: This study was approved by the ethics committee at the University of Brasilia (protocol n. 113/2019).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: CNPq; CAPES and University of Brasilia—UnB, Brazil.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Araújo, A.P.C.; Rocha, T.L.; Melo e Silva, D.M.; Malafaia, G. Micro(nano)plastics as an emerging risk factor to the health of amphibian: A scientometric and systematic review. *Chemosphere* **2021**, *283*, 131090. [CrossRef] [PubMed]
2. Cole, M.; Lindeque, P.; Halsband, C.; Galloway, T.S. Microplastic as contaminants in the marine environment: A review. *Mar. Pollut. Bull.* **2011**, *62*, 2588–2597. [CrossRef] [PubMed]
3. Sá, L.C.; Oliveira, M.; Ribeiro, F.; Rocha, T.R.; Fütter, M.N. Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future? *Sci. Total Environ.* **2018**, *645*, 1029–1039. [CrossRef] [PubMed]
4. Meaza, I.; Toyoda, J.H.; Wise Sr, J.P. Microplastics in sea turtles, marine mammals and humans: A one environmental health perspective. *front. Environ. Sci.* **2020**, *8*, 575614. [CrossRef] [PubMed]
5. Wagner, M.; Scherer, C.; Alvarez-Muñoz, D.; Brennholt, N.; Bourrain, X.; Buchinger, S.; Fries, E.; Grosbois, C.; Klasmeier, J.; Marti, T. Microplastics in freshwater ecosystems: What we know and what we need to know. *Environ. Sci. Eur.* **2014**, *26*, 12. [CrossRef] [PubMed]
6. Lu, Y.; Zhang, Y.; Deng, Y.; Jiang, W.; Zhao, Y.; Geng, J.; Ding, L.; Ren, H. Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver. *Environ. Sci. Technol.* **2016**, *50*, 4054–4060. [CrossRef] [PubMed]
7. Fendall, L.S.; Sewell, M.A. Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Mar. Pollut. Bull.* **2009**, *58*, 1225–1228. [CrossRef] [PubMed]
8. Xu, S.; Ma, J.; Ji, R.; Pan, K.; Miao, A.-J. Microplastics in aquatic environments: Occurrence, accumulation, and biological effects. *Sci. Total Environ.* **2020**, *703*, 134699. [CrossRef]
9. BRASIL. Lei nº 12.305, de 2 de Agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos. Available online: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/112305.htm (accessed on 12 December 2022).
10. Anagnosti, L.; Varvaresou, A.; Pavlou, P.; Protopapa, E.; Carayanni, V. Worldwide actions against plastic pollution from microbeads and microplastics in cosmetics focusing on european policies. Has the issue been handled effectively? *Mar. Pollut. Bull.* **2021**, *162*, 111883. [CrossRef]
11. ABIPLAST. Perfil 2020. A Indústria de Transformação e Reciclagem de Plástico no Brasil. Available online: http://www.abiplast.org.br/wp-content/uploads/2021/08/Perfil2020_abiplast.pdf (accessed on 1 June 2022).
12. Camargo, A.L.G.; Girard, P.; Sanz-Lazaro, C.; Silva, A.C.M.; Faria, E.; Figueiredo, B.R.S.; Caixeta, D.S.; Bletter, M.C.M. Microplastics in sediments of the Pantanal Wetlands, Brazil. *Front. Environ. Sci.* **2022**, *10*, 1–12. [CrossRef]
13. Silva, P.H.S.; Sousa, F.D.B. Microplastic pollution of Pato Lagoon, south of Brazil. *Environ. Chall.* **2021**, *4*, 100076. [CrossRef]
14. Drabinski, T.L.; Carvalho, D.G.; Gaylarde, C.C.; Lourenço, M.F.P.; Machado, W.R.T.V.; Fonseca, E.M.; Silva, A.L.C.; Baptista Neto, J.A. Microplastics in freshwater river in Rio de Janeiro and its role as a source of microplastic pollution in Guanabara Bay, SE Brazil. *Micro* **2023**, *3*, 208–223. [CrossRef]
15. Rani-Borges, B.; Martins, T.F.G.; Pompêo, M. Status of Brazilian Research on Microplastics Present in Aquatic Ecosystems: Freshwater. *PANAMJAS* **2021**, *16*, 106–117. Available online: [http://panamjas.org/pdf_artigos/PANAMJAS_16\(1\)_106-117.pdf](http://panamjas.org/pdf_artigos/PANAMJAS_16(1)_106-117.pdf) (accessed on 13 February 2023).
16. Avio, C.G.; Gorbi, S.; Regoli, F. Plastic and microplastic in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. *Mar. Environ. Res.* **2017**, *128*, 2–11. [CrossRef]
17. Howe, K.; Clark, M.D.; Torroja, C.F.; Torrance, J.; Berthelot, C.; Muffato, M.; Collins, J.E.; Humphray, S.; McLaren, K.; Matthews, L.; et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* **2013**, *496*, 498–503. [CrossRef]
18. Magyary, I. Recent advances and future trends in zebrafish bioassays for aquatic ecotoxicology. *Ecocycles* **2018**, *4*, 12–18. [CrossRef]
19. OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test; OECD iLibrary: Berlin, Germany, 2013. [CrossRef]
20. Parichy, D.M.; Elizondo, M.R.; Mills, M.G.; Gordon, T.N.; Engeszer, R.E. Norma table of post-embryonic zebrafish development: Staging by externally visible anatomy of the living fish. *Dev. Dyn.* **2011**, *238*, 2975–3015. [CrossRef]
21. OECD. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test; OECD iLibrary: Berlin, Germany, 2019. [CrossRef]
22. Rist, S.; Baun, A.; Hartmann, N.B. Ingestion of micro- and nanoplastic in *Daphnia magna*—Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. *Environ. Pollut.* **2017**, *228*, 398–407. [CrossRef]
23. Balakrishnan, G.; Déniel, M.; Nicolai, T.; Chassenieux, C.; Lagarde, F. Towards more realistic reference microplastics a nanoplastics: Preparation of polyethylene micro/nanoparticles with a biosurfactant. *Environ. Sci. Nano* **2019**, *6*, 315–324. [CrossRef]
24. Castania, V.A.; Silveira, J.W.S.; Issy, A.C.; Pitol, D.L.; Castania, M.L.; Dorigan Neto, A.; Del Bel, E.A.; Defino, H.L.A. Advantages of a combined method of decalcification compared to EDTA. *Microsc. Res. Tech.* **2015**, *78*, 111–118. [CrossRef]
25. Gonçalves, C.; Martins, M.; Costa, M.H.; Costa, P.M. Development of a method for the detection of polystyrene microplastics in paraffin-embedded histological sections. *Histochem. Cell Biol.* **2018**, *149*, 187–191. [CrossRef] [PubMed]
26. Fenech, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* **2000**, *455*, 81–95. [CrossRef] [PubMed]
27. Souza, T.D.S.; Fontanetti, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutat. Res.* **2006**, *605*, 87–93. [CrossRef] [PubMed]
28. Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **1988**, *175*, 184–191. [CrossRef]
29. Jałoszyński, P.; Kujawski, M.; Czub-Świerczek, M.; Markowska, J.; Szyfter, K. Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. *Mutat. Res.* **1997**, *385*, 223–233. [CrossRef]

30. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]
31. Guilhermino, L.; Lopes, M.C.; Carvalho, A.P.; Soares, A.M. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute test with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere* **1996**, *32*, 727–738. [[CrossRef](#)]
32. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres Jr., V.; Feather-Stone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95. [[CrossRef](#)]
33. Vassault, A. Lactate dehydrogenase. UV-method with pyruvate and NADH. *Methods Enzym. Anal.* **1983**, *3*, 118–126.
34. Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jakoby, W.B. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 7130–7139. [[CrossRef](#)]
35. Wibowo, A.T.; Nugrahapraja, H.; Wahyuono, R.A.; Islami, I.; Haekal, M.H.; Fardiansyah, Y.; Sugiyo, P.W.; Putro, Y.K.; Fauzia, F.N.; Santoso, H.; et al. Microplastic contamination in the human gastrointestinal tract and daily consumables associated with an Indonesian farming community. *Sustainability* **2021**, *13*, 12840. [[CrossRef](#)]
36. Amato-Lourenço, L.F.; Carvalho-Oliveira, R.; Ribeiro Júnior, G.; Galvão, L.S.; Ando, R.A.; Mauad, T. Presence of airborne microplastics in human lung tissue. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *416*, 126124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ragusa, A.; Svelato, A.; Santacroce, C. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environ. Int.* **2021**, *146*, 106274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Malafaia, G.; Souza, A.M.; Pereira, A.C.; Gonçalves, S.; Araújo, A.P.C.; Ribeiro, R.X.; Rocha, T.L. Developmental toxicity in zebrafish exposed to polyethylene microplastics under static and semi-static aquatic systems. *Sci. Total Environ.* **2020**, *700*, 134867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Jones, P.W.; Martin, D.M.; Hardy, J.D. Acipenseridae through Ictaluridae. In *Development of Fishes of the Mid-Atlantic Bight: An Atlas of Egg, Larval, and Juvenile Stages*; Fish and Wildlife Services: Washington, DC, USA, 1978.
40. Bauer, B.; Mally, A.; Liedtke, D. Zebrafish embryos and larvae as alternative animal models for toxicity testing. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13417. [[CrossRef](#)]
41. Manuel, P.; Almeida, M.; Martins, M.; Oliveira, M. Effects of nanoplastics on zebrafish embryo-larval stages: A case study with polystyrene (PS) and polymethylmethacrylate (PMMA) particles. *Environ. Res.* **2022**, *213*, 113584. [[CrossRef](#)]
42. Harder, W. *Anatomy of Fishes*, 2nd ed.; E. Schweizerbart: Stuttgart, Germany, 1975.
43. Jin, Y.; Xia, J.; Pan, Z.; Yang, J.; Wang, W.; Fu, Z. Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adults zebrafish. *Environ. Pollut.* **2018**, *235*, 322–329. [[CrossRef](#)]
44. Jin, Y.; Wu, S.; Zeng, Z.; Fu, Z. Effects of environmental pollutants on gut microbiota. *Environ. Pollut.* **2017**, *222*, 1–9. [[CrossRef](#)]
45. Bhuyan, S. Effects of microplastics on fish and in human health. *Front. Environ. Sci.* **2022**, *10*, 1–17. [[CrossRef](#)]
46. Barnes, D.K.A.; Galgani, F.; Thompson, R.C.; Barlaz, M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos. Trans. Biol. Sci.* **2009**, *364*, 1985–1998. [[CrossRef](#)]
47. Vendel, A.; Bessa, F.; Alves, V.E.N.; Amorim, A.L.A.; Patrício, J.; Palma, A.R.T. Widespread microplastic ingestion by fish assemblages in tropical estuaries subjected to anthropogenic pressures. *Mar. Pollut. Bull.* **2017**, *117*, 448–455. [[CrossRef](#)]
48. Frenzilli, G.; Nigro, M.; Lyons, B.P. The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat. Res.* **2009**, *681*, 80–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Araújo, A.P.C.; Luz, T.M.; Rocha, T.L.; Ahmed, M.A.I.; Melo e Silva, D.; Rahman, M.M. Toxicity evaluation of the combination of emerging pollutants with polyethylene microplastics in zebrafish: Perspective study of genotoxicity, mutagenicity, and redox imbalance. *J. Hazard. Mater.* **2022**, *432*, 128691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Piau, T.B.; Fascinelli, M.L.; Moura, D.S.; Albernaz, L.C.; Espindola, L.S.; Grisologia, C.K. In the screening of alternative insecticides to control *Aedes aegypti* larvae 2-methylantraquinone showed no genotoxicity and low toxicity to zebrafish (*Danio rerio*). *Genet. Mol. Biol.* **2022**, *45*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Deng, Y.; Zhang, Y.; Lemos, B.; Ren, H. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 46687–46710. [[CrossRef](#)]
52. Glisic, B.; Mihaljevic, I.; Popovic, M.; Zaja, R.; Loncar, J.; Fent, K.; Kovacevic, R.; Smital, T. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* **2015**, *158*, 50–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Bopp, S.K.; Lettieri, T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacol.* **2008**, *8*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Prüst, M.; Meijer, J.; Westerink, R.H.S. The plastic brain: Neurotoxicity of micro- and nanoplastics. *Part. Fibre Toxicol.* **2020**, *17*, 24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.