



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JÉSSICA FERNANDA BERNARDES RODA

**EFEITOS DE MICROPLÁSTICO E SUA ASSOCIAÇÃO COM
O COBRE EM BIOMARCADORES GENOTÓXICOS,
BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DO TELEÓSTEO
*PROCHILODUS LINEATUS***

JÉSSICA FERNANDA BERNARDES RODA

**EFEITOS DE MICROPLÁSTICO E SUA ASSOCIAÇÃO COM
O COBRE EM BIOMARCADORES GENOTÓXICOS,
BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DO TELEÓSTEO
*PROCHILODUS LINEATUS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Roda, Jéssica Fernanda Bernardes.

EFEITOS DE MICROPLÁSTICO E SUA ASSOCIAÇÃO COM O COBRE EM BIOMARCADORES GENOTÓXICOS, BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DO TELEÓSTEO *Prochilodus lineatus* / Jéssica Fernanda Bernardes Roda. - Londrina, 2019.

72 f. : il.

Orientador: Cláudia Bueno dos Reis Martínez.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Ecotoxicologia - Tese. 2. Microplástico de polietileno - Tese. 3. Metais - Tese. 4. Biomarcadores - Tese. I. Martínez, Cláudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

JÉSSICA FERNANDA BERNARDES RODA

**EFEITOS DE MICROPLÁSTICO E SUA ASSOCIAÇÃO COM O
COBRE EM BIOMARCADORES GENOTÓXICOS, BIOQUÍMICOS E
FISIOLÓGICOS DO TELEÓSTEO *PROCHILODUS LINEATUS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Claudia Bueno dos Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Marta Marques de Souza
Universidade Federal do Rio Grande – UFRGS

Prof^a. Dr^a. Mariana Machado Lauer
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 25 de fevereiro de 2019.

À minha família, pelo amor e suporte
ao me ajudar trilhar meu caminho;

Ao Ricardo, por todo amor e
dedicação em me fazer feliz, você faz do
meu mundo um lugar mais azul;

Em especial a Dona Lia, a pessoa
mais incrível e bondosa que tive a honra
de conhecer, te amo para sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular e a Universidade Estadual de Londrina (UEL).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À professora Dra. Claudia por aceitar me orientar e caminhar ao meu lado durante a pesquisa. Obrigada por estar sempre presente e pela dedicação em fazer com que tudo ocorresse bem. Prof obrigada por todo ensinamento, conselho e exigências para que eu fizesse o meu melhor, estou realmente feliz em poder contar com você novamente no doutorado. Tenho muito orgulho de fazer parte do LEFA e ser sua orientanda, você é um exemplo de pesquisadora e nos faz encantar cada dia mais pelo nosso trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Mariana Machado Lauer e Dra. Marta Marques de Souza, pela disponibilidade em colaborar com nosso trabalho.

À Aquicultura Venites (Toledo – PR) pelo fornecimento dos peixes utilizados nesse trabalho e principalmente ao sr. Adilar, pelo cuidado e preocupação para que os animais chegassem bem até Londrina.

Ao técnico de laboratório, Wagner E. Risso, por colaborar com as análises de metais, disponibilidade em nos auxiliar nas amostragens e sempre que necessário.

À Angélica, minha amiga e companheira de laboratório, por me ajudar desde os primeiros dias do mestrado. Você é simplesmente uma pessoa incrível e dedicada, sempre disposta a ajudar todos ao seu redor. Obrigada por me acompanhar durante os experimentos e por cada ensinamento, não se importando em deixar muita coisa de lado para me ajudar, até mesmo aos finais de semana. Amiga obrigada por sempre estar comigo, por cada experimento e análises, pelas incontáveis caronas e por participar de todas as minhas empreitadas.

Aos amigos Tiago e Carol, pelos ensinamentos e por sempre poder contar com os dois pra tudo. Obrigada por serem meus mestres na genética, dispostos a tirar dúvidas, ajudar com os cometas e me fazer querer espelhar em vocês. Vocês dois e a Gés fizeram da minha jornada aqui em Londrina uma caminhada mais tranquila e cheia de alegria, que sorte a minha estar sempre com vocês.

À Mari Lauer, pelas contribuições com meu trabalho e apoio durante o projeto do doutorado. Obrigada por ter se tornado uma amiga e ser a menina com a felicidade contagiante que me ajudaria a chegar até aqui.

Ao Carlos, Luciana e Millena, por todos os ensinamentos e apoio. Mi, obrigada me ajudar durante a interminável semana das ATPases.

A todos os amigos do LEFA, Hellen, Kathya, Jheimison, Laís, Laura Fernanda, Laura Lui, Maria Eduarda, Thais, Vanessa e Willian, pelo trabalho em equipe e apoio durante esses dois anos. Nossas pesquisas não aconteceriam sem a coletividade e parceria de todos.

As minhas amigas Mari, Mozinha, Ana, Jhota, Lud e Same pelo apoio e parceria de sempre, mantendo minha sanidade, estando próximas ou distante. Vocês sempre serão minhas biólogas preferidas.

Ao Ricardo, meu parceiro da vida, por me apoiar e compreender os meus dias de ausência. Sempre preocupado com minha felicidade e em me deixar bem, mesmo que seja com uma simples mensagem de carinho pra me fazer sentir importante e passar pelos dias difíceis. Obrigada por tudo o que você faz por nós, te amo.

Finalmente, a minha família, por não medir esforços em me apoiar e ajudar. A minhas irmãs Amanda e Ana Julia, aos meus amorzinhos Analu, Kauan e Nasser, aos meus pais Rose, Marcos, aos meus avós/pais Lia e Toninho e aos meus tios Alê, Alex, Maria, Erick, Dalva e Sérgio que contribuíram com a minha história. "Ohana quer dizer família. Família quer dizer nunca abandonar ou esquecer!", obrigada por fazerem parte da minha família.

“Todos temos luz e trevas dentro de nós. O que nos define é o lado com o qual escolhemos agir”.

Sirius Black

RODA, Jéssica Fernanda Bernardes. **Efeitos de microplástico e sua associação com o cobre em biomarcadores genotóxicos, bioquímicos e fisiológicos do teleósteo *Prochilodus lineatus***. 2019. 72 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2019.

RESUMO

A contaminação aquática por microplásticos (MPs) teve crescente aumento nos últimos anos devido à ampla utilização de plásticos pela sociedade. Os microplásticos caracterizam-se por partículas menores que 5 mm, divididos em dois tipos, os MPs primários que são aqueles fabricados em tamanho reduzido para utilização em aplicações industriais, fármacos, entre outros, e os MPs secundários, que resultam da degradação do plástico. Além da toxicidade do MP, há uma crescente preocupação quanto à capacidade de adsorção e potencialização de outros contaminantes, como o cobre (Cu), sobre o qual informações de toxicidade para teleósteos dulcícolas já são conhecidas. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do microplástico de polietileno e de sua associação ao cobre (Cu) em biomarcadores genotóxicos, bioquímicos e fisiológicos do teleósteo neotropical *Prochilodus lineatus*. Os peixes foram expostos durante 24 e 96 h ao MP ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) e ao Cu ($10 \mu\text{g L}^{-1}$), isolados e em mistura. Os resultados mostraram que o MP e o Cu, tanto isolados como em combinação, promoveram danos no DNA de eritrócitos (96 h) e células hepáticas (24 e 96h), interferiram na ionorregulação diminuindo o Na^+ e Ca^{2+} plasmáticos (24 h). Já as exposições ao MP e ao MP+Cu resultaram na diminuição da atividade da Ca^{2+} -ATPase branquial (24 h). Além disso, houve diminuição na peroxidação lipídica no fígado dos peixes expostos ao Cu (96 h), apesar do decréscimo no conteúdo da glutathiona, indicando a atuação eficiente de outras defesas antioxidantes. Estes resultados indicam que tanto o MP quanto o Cu são genotóxicos, sendo que os efeitos do MP podem ser atribuídos principalmente a danos oxidativos, enquanto que os efeitos do Cu provavelmente resultam da ação direta do metal na molécula de DNA. Nos peixes expostos à combinação MP+Cu, a concentração de Ca^{2+} plasmático foi ainda menor que aquelas apresentadas pelos peixes expostos aos contaminantes isolados, indicando uma possível interação sinérgica entre o MP e o metal. Entretanto, a presença do MP não influenciou no acúmulo de Cu nos tecidos, tampouco nos outros efeitos do Cu. Por fim, estes resultados mostram claramente que o MP causa danos genotóxicos e alterações bioquímicas e fisiológicas em um peixe neotropical, além de aumentar o efeito do cobre na regulação de cálcio, mesmo não interferindo no acúmulo do metal nos tecidos.

Palavras-chave: Microplástico de polietileno. Metal. Ionorregulação. Estresse oxidativo. Água doce.

RODA, Jéssica Fernanda Bernardes. **Effects of microplastic and its association with copper on genotoxic, biochemicals and physiological biomarkers of teleost *Prochilodus lineatus***. 2019. 72 p. Dissertation (Master in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2019.

ABSTRACT

Aquatic contamination by microplastics (MPs) has increased in recent years due to the widespread use of plastics by society. Microplastics are characterized as particles smaller than 5 mm, divided into two types, primary MPs, that are those manufactured in small size for usage in industrial applications, pharmaceuticals, among others, and secondary MPs, which have their size diminished by the degradation of plastics. In addition to the toxicity of MP itself, there is a growing concern about the adsorption of other contaminants on MPs, such as copper (Cu), which toxicity to freshwater teleosts is already known. In this context, the aim of this study was to investigate the effects of polyethylene microplastic and its association with copper (Cu) on genotoxic, biochemical and physiological biomarkers of the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*. Fish were exposed for 24 and 96 h to MP ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) and Cu ($10 \mu\text{g L}^{-1}$), isolated and in mixture. The results showed that MP and Cu, both isolated and in combination, promoted DNA damage in erythrocytes (96 h) and liver cells (24 and 96 h), interfered on ion regulation by decreasing plasma Na^+ and Ca^{2+} (24 h). Exposure to MP and MP+Cu resulted in decreased activity of Ca^{2+} -ATPase (24 h). In addition, there was a decrease in lipid peroxidation in the liver of fish exposed to Cu (96 h), despite the decrease in glutathione content, indicating the efficacy of other antioxidant defenses. The results of the present study indicate that both MP and Cu are genotoxic and the MP effects may be attributed mainly to oxidative damage, while the Cu effects probably result from the direct action of the metal on the DNA molecule. In fish exposed to MP+Cu, plasma Ca^{2+} concentration was even smaller than in fish exposed to both contaminants alone, indicating a possible synergism between MP and the metal. However, MP did not interfere on Cu accumulation in fish tissues, neither on the other Cu effects. Taken together, these results clearly show that MP promotes genotoxic damage and biochemical and physiological changes in a neotropical fish, and it leads to an increase in the effects of copper on calcium regulation, even without interfering on the metal accumulation in the tissues.

Keywords: Microplastic polyethylene. Metal. Ion regulation. Oxidative stress. Freshwater.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Sistema padronizado de classificação de tamanho e cores (SCS). Fonte: adaptado de Crawford; Quinn, 2017.....17
- Figura 2** - Microplásticos recuperados do ambiente aquático. (A) Microplásticos primários. (B) Microplásticos secundários. Fonte: adaptado de Crawford; Quinn, 201717
- Figura 3** - Diagrama conceitual de fontes e fluxos de microplásticos entre compartimentos antrópicos, terrestres, de água doce e ambientais marinhos. Fonte: adaptado de Horton et al., 2017.....19
- Figura 4** – Modelo de célula de cloreto branquial, ilustrando os principais transportadores de íons em teleósteo de água doce. Linhas contínuas indicam transporte ativo; linhas tracejadas indicam difusão ou troca através de canais de membrana ou através da célula; círculos sólidos representam ATPases; círculos sem preenchimento representam co-transportadores e trocadores; e linhas paralelas representam canais iônicos. Fonte: adaptado de Marshall, 2002.....27
- Figura 5** - Exemplar de *P. lineatus* Valenciennes, 1836. Fonte: José Luís Olivan Birindelli. Universidade Estadual de Londrina29
- Figura 1** - Concentração de Cu (média \pm EP; n = 8) em tecidos de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 20 $\mu\text{g MP L}^{-1}$ (MP), 10 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$ (Cu) e 20 $\mu\text{g MP L}^{-1}$ mais 10 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$ (MP+Cu) por 24 h (A) e 96 h (B). Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos para cada tecido em cada tempo experimental ($p < 0,05$)51
- Figura 2** – Escore de danos no DNA (média \pm EP; n = 8) em eritrócitos (A), fígado (B) e brânquias (C) de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 20 $\mu\text{g MP L}^{-1}$ (MP), 10 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$ (Cu) e 20 $\mu\text{g MP L}^{-1}$ mais 10 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$ (MP+Cu) por 24 e 96 h. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo experimental ($p < 0,05$). Fotomicrografia mostrando as diferentes classes de cometa consideradas no cálculo do escore de danos no DNA em eritrócitos (D).....53

- Figura 3** – Frequência de AENs (A) e de MN (B) em eritrócitos de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 20 µg MP L⁻¹ (MP), 10 µg Cu L⁻¹ (Cu) e 20 µg MP L⁻¹ mais 10 µg Cu L⁻¹ (MP+Cu) por 24 e 96 h. Valores representam média ± EP (n = 8). Foram considerados significativos valores de p < 0,05. Fotomicrografia de núcleo normal (N) e alterações representadas: micronúcleo (MN), núcleo em forma de rim (NR), núcleo segmentado (NS), núcleo lobulado (NL) e célula binucleada (CB) (coloração com laranja de acridina) (C). Notar as diferenças nas escalas dos gráficos.....54
- Figura 4** – Conteúdo de glutathiona (GSH) em fígado (A) e lipoperoxidação (LPO) em brânquias (B) e fígado (C) de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 20 µg MP L⁻¹ (MP), 10 µg Cu L⁻¹ (Cu) e 20 µg MP L⁻¹ mais 10 µg Cu L⁻¹ (MP+Cu) por 24 e 96 h. Valores representam média ± EP (n = 8). Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo experimental (p < 0,05). Notar as diferenças nas escalas dos gráficos.....56
- Figura 5** – Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em cérebro (A) e músculo (B) de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 20 µg MP L⁻¹ (MP), 10 µg Cu L⁻¹ (Cu) e 20 µg MP L⁻¹ mais 10 µg Cu L⁻¹ (MP+Cu) por 24 e 96 h. Valores representam média ± EP (n = 8). Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo experimental (p < 0,05)57
- Figura 6** – Concentrações plasmáticas de Na⁺ (A) e Ca²⁺ (B) e atividade branquial da enzima NKA (C), CaATP (D) e HATP (E), e anidrase carbônica (F) em *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 20 µg MP L⁻¹ (MP), 10 µg Cu L⁻¹ (Cu) e 20 µg MP L⁻¹ mais 10 µg Cu L⁻¹ (MP+Cu) por 24 e 96 h. Valores representam média ± EP (n = 8). Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo experimental (p < 0,05). Notar as diferenças nas escalas dos gráficos.....58

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Concentrações de Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$) total e dissolvido na água dos aquários de cada rodada experimental, sendo controle (CTR), microplástico $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (MP), cobre $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cu) e microplástico $20 \mu\text{g L}^{-1}$ + cobre $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (MP+Cu) nos tempos de 24 e 96 h. Os dados foram expressos como média \pm EP (n = 8).....50
- Tabela 2** – Valores de hematócrito (Hct), hemoglobina (Hb) e número de eritrócitos (RBC) e concentração plasmática de glicose de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo $20 \mu\text{g MP L}^{-1}$ (MP), $10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ (Cu) e $20 \mu\text{g MP L}^{-1}$ mais $10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ (MP+Cu) por 24 e 96 h. Valores representam média \pm EP (n = 8). Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$ 55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Contaminação de ambientes aquáticos no Brasil	14
2.2	Contaminação aquática por microplástico	15
2.3	Contaminação aquática por cobre	20
2.4	Interação entre contaminantes	21
2.5	Biomarcadores.....	22
2.5.1	Biomarcadores Genotócos	23
2.5.2	Biomarcadores Bioquímicos	24
2.5.3	Biomarcadores fisiológicos	25
2.6	Modelo experimental <i>Prochilodus lineatus</i>	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo geral.....	29
3.2	Objetivos específicos	29
	REFERÊNCIAS	30
	MANUSCRITO	37
	RESUMO	38
	ABSTRACT	39
1	INTRODUÇÃO	40
2	MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1	Delineamento experimental e exposição aos contaminantes	44
2.2	Amostragem de material biológico.....	45
2.3	Acúmulo de cobre (Cu) nos tecidos.....	46
2.4	Danos no DNA – Ensaio alcalino do cometa	46

2.5	Frequência de micronúcleo (MN) e alterações eritrocíticas nucleares (AENs)	47
2.6	Glutathiona (GSH)	47
2.7	Lipoperoxidação (LPO)	47
2.8	Acetilcolinesterase (AChE)	48
2.9	Análises hematológicas	48
2.10	Análises plasmáticas	48
2.11	Análises das enzimas envolvidas no transporte iônico	48
2.12	Análises estatísticas	49
3	RESULTADOS	50
3.1	Acúmulo de Cu nos tecidos	50
3.2	Genotoxicidade	52
3.3	Parâmetros hematológicos e glicemia	54
3.4	Glutathiona (GSH) e lipoperoxidação (LPO)	55
3.5	Acetilcolinesterase (AChE)	56
3.6	Íons plasmáticos e enzimas envolvidas no transporte iônico	57
4	DISCUSSÃO	59
	REFERÊNCIAS	65
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72

1 INTRODUÇÃO

Os plásticos, em sua maioria, são derivados de combustíveis fósseis como o gás natural, petróleo e carvão, e utilizados em uma ampla variedade de aplicações desde a construção civil até a produção de utensílios domésticos (PLASTICSEUROPE, 2017). Levantamentos realizados de 2015 a 2017 apontaram que cerca de 6.300 milhões de toneladas de plásticos foram produzidos, dos quais 9% foram reciclados, 12% foram incinerados e 79% foram acumulados em aterros sanitários e no ambiente natural (GEYER; JAMBECK; LAW, 2017).

Grande parte do material poluente no ambiente está presente como microplástico (MP), partículas menores que 5 mm, que assim como outros tipos de plástico são motivo de preocupação quando se trata de poluição ambiental aquática (BROWNE et al., 2015). Os MPs são divididos em dois tipos: os microplásticos primários são aqueles utilizados em cosméticos, fármacos, roupas sintéticas, entre outros produtos que são intencionalmente fabricados em tamanho menor que 5 mm pela indústria (ALOMAR; ESTARELLAS; DEUDERO, 2016; CASTAÑEDA et al., 2014), e os microplásticos secundários são peças irregulares formadas a partir da degradação de macropolásticos (ANDRADY, 2011; BARNES et al., 2009).

A poluição aquática por MP tem sido relatada em todo mundo no ambiente marinho (COLE et al., 2011; COLE et al., 2015; DAVARPANAH; GUILHERMINO, 2015; RIBEIRO et al., 2017; TOSETTO et al., 2017), e mais recentemente em ambientes dulcícolas (BARBOZA et al., 2018; DING et al., 2018; LI; LIU; CHEN, 2018; STRUNGARU et al., 2019; WINDSOR et al., 2019). Diferentes estudos têm demonstrado a presença de MP em tecidos dos organismos aquáticos (DE SÁ; LUÍS; GUILHERMINO, 2015; DING et al., 2018), bem como efeitos físicos, químicos e biológicos que podem ser acarretados devido à sua presença (DAVARPANAH; GUILHERMINO, 2015; DING et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2013). Luís et al. (2015) mostrou que a exposição do peixe *Pomatoschistus microps* ao MP de polietileno resultou diminuição do desempenho predatório, aumento de lipoperoxidação e diminuição da atividade da acetilcolinesterase (AChE) cerebral. Já exposição da espécie *Oreochromis niloticus* ao MP de poliestireno causou acúmulo de MP em intestino, brânquias, fígado e cérebro, redução na atividade da AChE no cérebro, potencial envolvimento das enzimas do citocromo P450 (CYP450) no

metabolismo dos MPs no fígado e indução na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) no fígado (DING et al., 2018).

Além disso, outra característica agravante do microplástico é a capacidade dessas micropartículas em adsorver outros compostos como o cobre, (ASHTON; HOLMES; TURNER, 2010; DAVARPANAH; GUILHERMINO, 2015), tornando-se um vetor capaz de alterar a biodisponibilidade e toxicidade de outros contaminantes (SYBERG et al., 2015). Embora os estudos sobre MPs em ambiente de água doce tenham aumentado significativamente, o conhecimento sobre seus efeitos ainda é limitado (DE SÁ et al., 2018).

O cobre (Cu) é um metal encontrado em diversos minerais, conhecido por sua alta condutividade térmica e elétrica. Sua concentração no meio aquático dulcícola tem aumentado muito, grande parte por seu uso em fertilizantes, fungicidas e outros agrotóxicos, como também em pisciculturas para controle de algas e patógenos (CARVALHO; FERNANDES, 2008). O cobre pertence ao grupo dos metais essenciais, é fundamental para funções biológicas, operando como cofator de várias enzimas na defesa antioxidante e respiração celular. Porém, quando em altas concentrações, torna-se tóxico (CARVALHO; FERNANDES, 2008; EYCKMANS et al., 2011), podendo acarretar danos à saúde dos seres vivos e se acumular em diferentes tecidos (MONTEIRO et al., 2009). Assim como outros metais, a toxicidade do cobre está relacionada aos parâmetros físicos e químicos da água, que influenciam diretamente na sua biodisponibilidade (DI TORO et al., 2001; PAQUIN et al., 2000; SANTORE et al., 2001). Além disso, o cobre pode se aderir a partículas em suspensão (PAQUIN et al., 2000), levando a uma maior preocupação quanto à sua adsorção ao microplástico (HOLMES; TURNER; THOMPSON, 2014). Tais interações demonstram grande relevância sobre as avaliações de risco no ambiente, porém poucos estudos retratam a interação entre os microplásticos e os metais, principalmente em peixes de água doce.

A necessidade de informações ecotoxicológicas sobre os efeitos de contaminantes em espécies nativas da América Latina tem aumentado recentemente (ACA; GONZALEZ; CARRIQUIRIBORDE, 2018). O peixe neotropical *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836) caracteriza-se como uma espécie iliófaga bentônica (REVALDAVES; RENESTO; MACHADO, 1997), e devido ao seu hábito detritívoro, torna-se exposto aos contaminantes tanto pela brânquia, quanto durante a alimentação, sendo o MP e o Cu capazes de se aderir ao sedimento. A utilização do *P. lineatus* em estudos toxicológicos deve-se ao fato desta ser uma

espécie nativa, de ampla distribuição geográfica na região neotropical, de biologia e fisiologia conhecidas e susceptível aos efeitos de diferentes classes de contaminantes, entre eles o cobre (CARVALHO; FERNANDES, 2008; CARVALHO; BERNUSSO; FERNANDES, 2015; SIMONATO et al., 2016).

Neste contexto, a exposição a produtos químicos tem preocupado quanto a seus efeitos e riscos causados aos ecossistemas. Com isso, o uso de biomarcadores em testes de toxicidade tem sido importante para fornecer informações relativamente precoces sobre os efeitos causados por poluentes, indicando alterações desde níveis moleculares até ecossistemas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Dentre os principais biomarcadores destacam-se os bioquímicos (glutathiona, lipoperoxidação e AChE), genotóxicos (danos no DNA, micronúcleo e alterações eritrocíticas nucleares), fisiológicos (análises hematológicas, análises plasmáticas e análises enzimáticas) e acumulação de contaminantes em tecidos animais, que foram empregados a fim de avaliar os efeitos do microplástico de polietileno (< 90 µm) e de sua associação com o cobre para o peixe *P. lineatus*, causados pela exposição aos contaminantes isolados e em mistura.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Contaminação de ambientes aquáticos no Brasil

Atualmente, o Brasil está entre os países que mais poluem o ambiente (WORLD RESOURCES INSTITUTE, 2015). Devido à urbanização, à expansão de atividades agrícolas e ao desenvolvimento industrial, diversos contaminantes como as micropartículas plásticas, fármacos, metais e agrotóxicos, têm sido inseridos no ambiente resultando em uma grande preocupação quanto aos seus efeitos adversos e a sua toxicidade.

Os contaminantes atingem os corpos d'água por diferentes fontes, seja por processos naturais como lixiviação do solo e decomposição de matéria orgânica, ou pela atividade humana, entre elas a liberação de esgoto nos corpos hídricos, uso de agrotóxicos, descarte de resíduos industriais, derramamento acidental ou intencional de produtos químicos de navios e liberação de substâncias tóxicas por produtos anteriormente descartados, afetando o meio ambiente e sobretudo os organismos aquáticos (NIKINMAA, 2014).

Uma vez no ambiente, estes contaminantes podem ser ingeridos pelos organismos ali presentes, causar alterações significativas em relação à alimentação, reprodução, predação, interações sociais, trazendo danos à saúde do organismo ou até mesmo serem transferidos a níveis tróficos mais elevados (CLOTFELTER; BELL; LEVERING, 2004; SÖFFKER; TYLER, 2012 TOSETTO; WILLIAMSON; BROWN, 2017).

Os Critérios de Qualidade da Água propõem definir as concentrações de produtos químicos específicos na água, visando proteger não só a biota aquática como também a saúde humana, uma vez que é necessário o controle da qualidade da água para garantir a vida no ambiente aquático (PAQUIN et al., 2002). Vale ressaltar que para metais os critérios de qualidade irão depender das características físicas e químicas da água, podendo influenciar na toxicidade e biodisponibilidade do metal, sendo importante a implementação de mecanismos de controle para regiões específicas (PAQUIN et al., 2002).

2.2 Contaminação aquática por microplástico

Os plásticos (polímeros sintéticos) são amplamente utilizados na sociedade em vários processos industriais, construção civil, produtos domésticos, aplicações médicas, embalagens, entre outros produtos. Em 2016, a produção global de plástico ultrapassou 335 milhões de toneladas e continua aumentando exponencialmente a cada ano devido à demanda (PLASTICSEUROPE, 2017). Anualmente, cerca de 16 % dos produtos produzidos no mundo são compostos de plástico (MUENMEE; CHIEMCHAI SRI; CHIEMCHAI SRI, 2015), destes 33 % não são reutilizáveis e são descartados em até 12 meses após sua fabricação (KOELMANS, 2014).

Os plásticos podem ser divididos em categorias de acordo com seu tamanho (Fig. 1). Os macrolásticos (MAP) são os pedaços de plásticos iguais ou maiores que 25 mm. Os mesoplásticos (MEP) são os pedaços menores que 25 mm até 5 mm. Já as micropartículas plásticas (PLT) são aquelas menores que 5 mm, que por sua vez também podem ser categorizadas de acordo com o seu tamanho, em microplástico (MP), mini-microplástico (MMP) e nanoplástico (NP). São considerados microplásticos as partículas menores que 5 mm até 1 μm , porém as partículas entre 1 mm a 1 μm também podem ser denominadas de mini-microplástico. Por fim, os nanoplásticos são todas as partículas menores que 1 μm (CRAWFORD; QUINN, 2017).

Os MPs de acordo com sua origem são divididos em dois tipos, os primários e os secundários (ARTHUR; BAKER; BAMFORD, 2009; BARNES et al., 2009; FENDALL; SEWELL, 2009). Entre os microplásticos primários, incluem-se aqueles utilizados como abrasivos em aplicações industriais, cosméticos, produtos esfoliantes, fármacos, produtos de higiene pessoal e na produção de roupas sintéticas, que são intencionalmente fabricados pela indústria em tamanhos menores que 5 mm (Fig. 2A) (ALOMAR; ESTARELLAS; DEUDERO, 2016; CASTAÑEDA et al., 2014; COLE et al., 2011; FENDALL; SEWELL, 2009). Já os microplásticos secundários são peças irregulares formadas a partir de macrolásticos que tiveram seu tamanho reduzido por meio da fragmentação por abrasão mecânica e exposição prolongada à radiação ultravioleta (UV) (Fig. 2B) (ANDRADY, 2011; BARNES et al., 2009; FENDALL; SEWELL, 2009).

Além da diferenciação pelo tamanho, os MPs podem ser categorizados de acordo com sua cor (preto, azul, verde, laranja, vermelho, metálico, transparente, claro, escuro, e etc.), morfologia (pellets, fragmentos, fibras, membranas, esponjas, microesferas, micro fragmentos, microfibras, micro membranas e micro esponjas) e tipo de polímero (polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), policloreto de vinila (PVC), poliamida (PA), polietileno tereftalato (PET), álcool polivinílico (PVA) e etc.). Para isso, foi estabelecido o sistema padronizado de classificação de tamanho e cores (SCS), que permite classificar e categorizar qualquer peça de plástico (Fig. 1) (CRAWFORD; QUINN, 2017). Tais características podem influenciar na adsorção de contaminantes à superfície dos MPs, como a capacidade do MP de polietileno em adsorver fármacos (OLIVEIRA et al., 2013) e metais (DAVARPANA; GUILHERMINO, 2015). A adsorção de contaminantes tem sido relacionada também com a cor do MP, tendo alguns pesquisadores relatado uma maior ocorrência de adsorção em MPs amarelos e pretos, por exemplo (ENDO et al., 2005; FRIAS; SOBRAL; FERREIRA, 2010). Além disso, a cor dos MPs também pode influenciar na probabilidade de ingestão de MPs por animais aquáticos, devido a confusão e semelhança com alimentos naturais (SÁ; LUÍS; GUILHERMINO, 2015).

Figura 1 – Sistema padronizado de classificação de tamanho e cores (SCS). Fonte: adaptado de Crawford; Quinn, 2017.

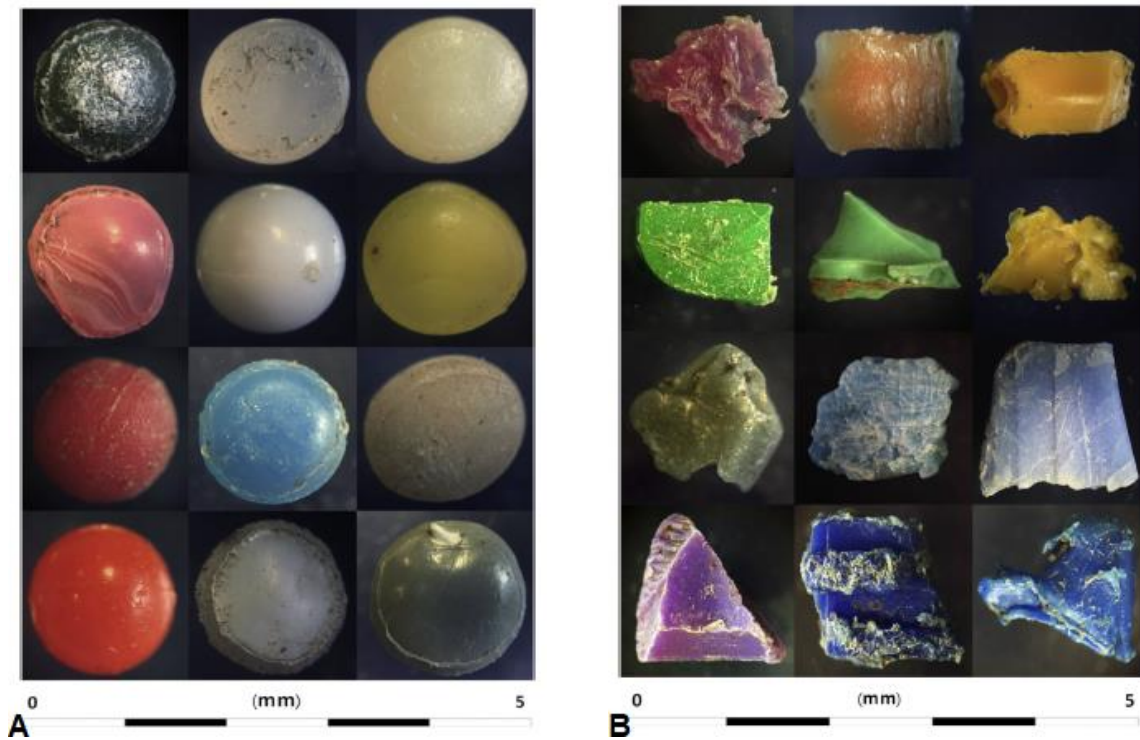
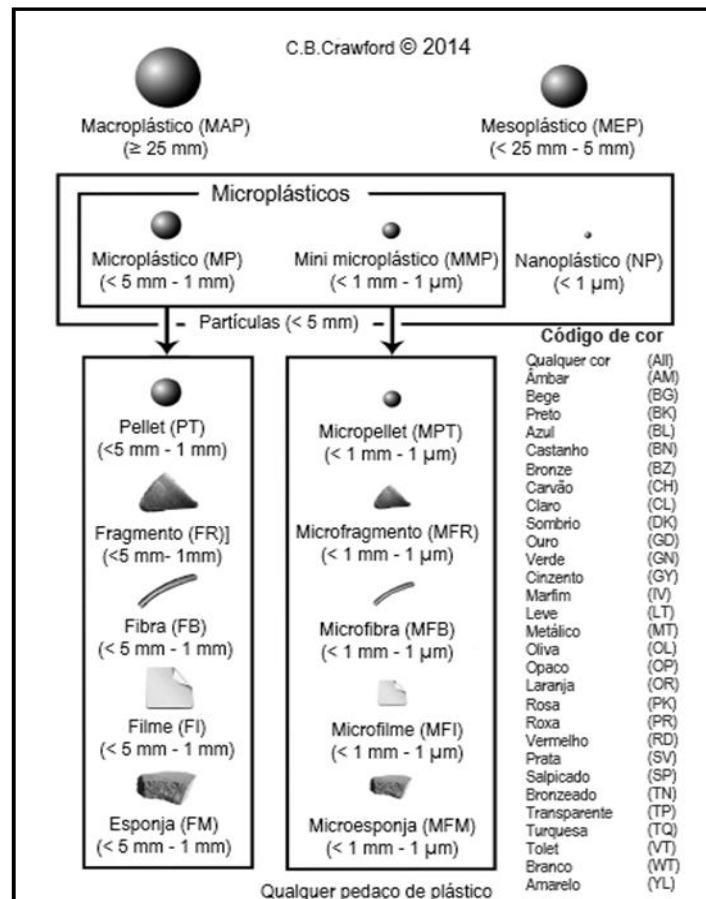


Figura 2 - Microplásticos recuperados do ambiente aquático. (A) Microplásticos primários. (B) Microplásticos secundários. Fonte: adaptado de Crawford; Quinn, 2017.



Ainda, as peças plásticas podem se diferenciar quanto à densidade (g cm^3), influenciando no seu posicionamento no ambiente aquático, de modo que os polímeros mais densos que a água tendem a afundar, enquanto aqueles com menor densidade tendem a flutuar na coluna d'água e superfície (AVIO; GORBI; REGOLI, 2017).

Quanto à poluição por plástico, grande parte do material poluente está presente no ambiente como microplástico, que assim como os outros tipos de plástico, é motivo de preocupação quando se trata de poluição aquática marinha e dulcícola, cujos efeitos toxicológicos têm despertado o interesse dos pesquisadores (BROWNE et al., 2015).

No ambiente, inúmeras fontes de MPs são resultado da destinação incorreta do lixo, mau processamento, aterramento, liberação indevida no ambiente, e a conseqüente degradação de MAP em MP, resultando em uma grande deposição de MP no solo. Outro fator é a aplicação do lodo de estações de tratamento de esgoto como adubo em produções agrícolas, contendo MP (HORTON et al., 2017; ZUBRIS; RICHARDS, 2005). Por sua vez, as partículas que não são retidas no lodo ou removidas durante o processo de tratamento sanitário são liberadas nos efluentes de águas residuais junto com a água tratada (Fig. 3). Ainda, MPs acumulados no solo podem ser transportados para os corpos hídricos pela dispersão pelo vento, escoamento ou erosão do solo. Contudo, cabe destacar que os MPs não são apenas transportados da terra para os rios e oceanos, mas os MPs presentes no ambiente aquático também podem retornar à terra durante a maré alta e em inundações (HORTON et al., 2017).

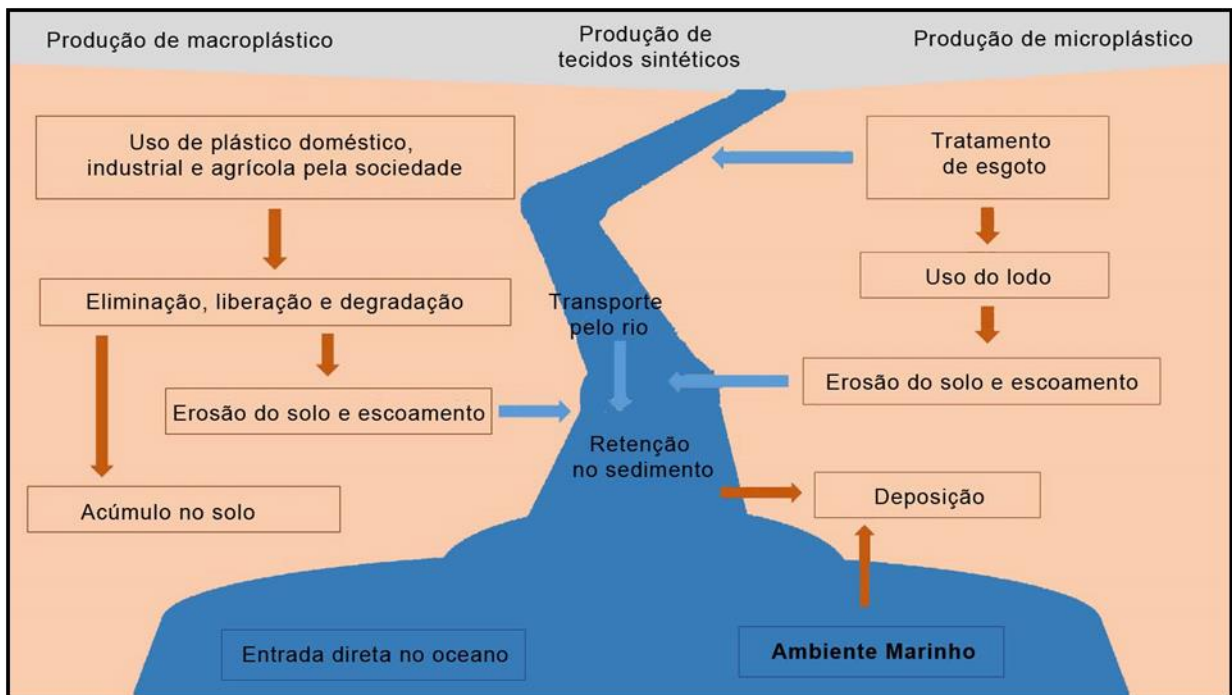


Figura 3 - Diagrama conceitual de fontes e fluxos de microplásticos entre compartimentos antrópicos, terrestres, de água doce e ambientais marinhos. Fonte: adaptado de Horton et al., 2017.

Uma vez dispostos no ambiente aquático, os MPs podem ser acidentalmente ingeridos ou confundidos com alimentos por muitos organismos (TOSETTO; WILLIAMSON; BROWN, 2017). Devido às suas características, comumente tornam-se biodisponíveis e podem ser transferidos a níveis tróficos mais elevados (CASTAÑEDA et al., 2014).

Os efeitos do MP em espécies de peixes são controversos e dependentes de diferentes fatores, como tamanho das partículas, tipo de microplástico, presença ou não de outros contaminantes químicos e também entre diferentes espécies e estágio de vida (RAINIERI et al., 2018). Estudos têm registrado os efeitos dos MPs em organismos, incluindo diminuição da capacidade predatória e redução da eficiência digestiva (DE SÁ; LUÍS; GUILHERMINO, 2015; OLIVEIRA et al., 2013; SANCHEZ; BENDER; PORCHER, 2014), estresse oxidativo, danos genotóxicos e neurotóxicos (LU et al., 2016; LUÍS et al., 2015), interferência na reprodução e até mesmo a morte de animais (ROCHMAN et al., 2017).

Além dos compostos químicos presentes na composição dos MPs (OLIVEIRA et al., 2013), os microplásticos têm capacidade de adsorver diversos contaminantes, como os poluentes orgânicos persistentes (POPs) (AVIO et al., 2015; RIOS et al., 2007; ROCHMAN et al., 2013), agrotóxicos (MATO et al., 2001) e metais, como o cobre (ASHTON; HOLMES; TURNER, 2010; DAVARPANAH;

GUILHERMINO, 2015), frequentemente alterando a toxicidade e biodisponibilidade destes. Uma vez adsorvidos, os compostos químicos podem ser liberados para os organismos aquáticos após contato ou ingestão das micropartículas plásticas (LI; LIU; CHEN, 2018) desencadeando efeitos toxicológicos. A adsorção do Cu ao MP-PE já foi confirmada no ambiente marinho por Davarpanah e Guilhermino (2015) em um estudo de crescimento populacional com a microalga *Tetraselmis chuii*.

Embora as investigações sobre o microplástico tenham aumentado nos últimos tempos, existe uma lacuna sobre os conhecimentos dos seus efeitos, principalmente em relação aos organismos de água doce (DE SÁ et al., 2018). Portanto, os microplásticos precisam ser reconhecidos como ameaça emergente, sendo necessário reavaliar os riscos ecotoxicológicos e ecológicos que representam para o ecossistema (AVIO; GORBI; REGOLI, 2017).

2.3 Contaminação aquática por cobre

O cobre (Cu) é um dos metais de transição mais abundantes no ambiente, encontrado em diversos minerais, conhecido por sua elevada condutividade térmica e elétrica. É essencial para função de algumas enzimas e proteínas específicas, como a citocromo c oxidase, onde atua como cofator enzimático na respiração celular em eucariotos (LINDER et al., 1998).

A concentração de cobre no ambiente aquático dulcícola tem aumentado nos últimos anos devido à sua utilização em atividades antrópicas, industriais e agrícolas, tais como na composição de tintas anti-incrustantes, fertilizantes, fungicidas, atividades de mineração, processos de combustão e tratamento de esgoto, resultando na exposição dos animais aquáticos a níveis exacerbados do metal (SAMPAIO et al., 2008).

Apesar do cobre pertencer ao grupo dos metais essenciais, quando em concentrações acima do necessário torna-se tóxico aos organismos, devido à sua capacidade de agir em reações de oxirredução (CARVALHO; FERNANDES, 2008; EYCKMANS et al., 2011) produzindo efeitos adversos, como danos oxidativos e acúmulo em diferentes tecidos (MONTEIRO et al., 2009). Em peixes dulcícolas, por exemplo, o Cu pode causar inibição da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ e o decréscimo na concentração plasmática de sódio (CARVALHO; FERNANDES, 2008), sendo considerado assim um tóxico iônico e osmorregulatório.

Assim como outros metais, a toxicidade do cobre está relacionada a diversos parâmetros físicos e químicos da água, como pH, temperatura e dureza, que influenciam diretamente na sua biodisponibilidade (DI TORO et al., 2001; PAQUIN et al., 2000; SANTORE et al., 2001;), sendo a toxicidade deste metal relacionada à sua concentração livre no meio (CAMPBELL, 1995).

Ainda, o cobre é um metal capaz de se aderir a partículas em suspensão (PAQUIN et al., 2000), levando a uma maior preocupação quanto à sua possível adsorção ao microplástico, uma vez que essas partículas são capazes de adsorver diferentes substâncias orgânicas e inorgânicas.

2.4 Interação entre contaminantes

Diferentes contaminantes são utilizados diariamente e parte dessas substâncias químicas são introduzidas no ambiente acidentalmente ou intencionalmente, como os agrotóxicos (BACKHAUS; FAUST, 2012). No ambiente natural, os organismos estão expostos aos contaminantes isolados ou em mistura (NIKINMAA,2014). Quando em mistura, os xenobióticos podem sofrer interações acarretando no aumento ou na diminuição das respostas toxicológicas nos organismos em decorrência da combinação de suas substâncias tóxicas (KLAASEN; WATKINS, 2015).

As interações entre duas substâncias químicas podem resultar em:

- a) efeito aditivo: quando em combinação, o efeito dos contaminantes não influenciam sobre o efeito um do outro;
- b) efeito sinérgico: quando em mistura, os efeitos da combinação dos contaminantes são maiores que os efeitos atribuídos isoladamente;
- c) potencialização: quando uma substância que não causa efeito tóxico é administrada simultaneamente com uma substância tóxica, sendo o efeito desta última maior do que quando administrada sozinha;
- e, d) antagonismo: quando as substâncias interferem uma com a outra resultando na diminuição ou inativação dos efeitos tóxicos (KLAASEN; WATKINS, 2015).

É sabido que os MPs são capazes de adsorver diferentes xenobióticos, possivelmente alterando sua biodisponibilidade e toxicidade (SYBERG et al., 2015). Alguns autores relatam a capacidade de adsorção de metais como alumínio (Al), ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), chumbo (Pb), zinco (Zn) e prata (Ag) (ASHTON; HOLMES; TURNER, 2010). Em um estudo realizado por Luís

et al. (2015), foi observada a influência do MP de polietileno ($0,184 \text{ mg L}^{-1}$) na toxicidade aguda do cromo (VI) ($3,9 \text{ mg L}^{-1}$), acarretando em diminuição na atividade da acetilcolinesterase (AChE) e aumento de danos oxidativos em lipídeos (LPO) nos peixes *P. microps*. Ainda, outros poluentes como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), diclorodifeniltricloroetano (DDTs) e bifenilas policloradas (PCBs) também já foram relados adsorvidos às micropartículas plásticas (MATO et al., 2001; RIOS; MOORE; JONES, 2007). Contudo, pesquisas sobre os efeitos combinados do MP com outras substâncias químicas ainda são escassos, principalmente com relação ao ambiente e organismos de água doce.

2.5 Biomarcadores

Os biomarcadores são alterações biológicas no organismo em resposta a um agente estressor, que normalmente não se apresentam em um organismo com funções normais intactas (NIKINMAA, 2014). Podem ser definidos por respostas celulares ou bioquímicas que indicam a exposição do indivíduo a um contaminante (SARKAR et al., 2006). Os biomarcadores têm se destacado em estudos ecotoxicológicos por antecipar mudanças em níveis de organização biológica superiores, estimando os possíveis riscos para as populações, comunidades ou ecossistemas, sendo possível identificar um dano subletal precoce, possibilitando uma ação preventiva antes da ocorrência de danos irreversíveis (CAJARAVILLE et al., 2000; MOUNEYRAC; AMIARD-TRIQUET, 2013; NIKINMAA, 2014).

Para ser considerado um bom biomarcador, o teste deve ser confiável, facilmente medido, ter um bom custo benefício e ser sensível à exposição ao poluente, servindo como um parâmetro de alarme antecipado. Além disso, deve ter parâmetros de comparação bem definidos que possibilitem distinguir entre uma característica natural e um estresse provocado pelo contaminante (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Diversos efeitos nos organismos aquáticos podem ser avaliados por meio de biomarcadores, envolvendo indicadores biológicos bioquímicos, fisiológicos, genéticos e histológicos, que ocorrem devido a exposição a um agente tóxico (VAN DER OOST BEYER; VERMEULEN, 2003). Os peixes desempenham importante papel

ecológico, sendo considerado com bom modelo para o monitoramento da poluição aquática (VAN DER OOST BEYEY; VERMEULEN, 2003).

Torna-se necessário considerar que a aplicação ou a interpretação incorreta dos resultados obtidos por meio dos biomarcadores podem resultar em falsas conclusões. Ainda, os resultados obtidos para uma determinada espécie podem não ser válida para espécies diferentes (VAN DER OOST; BEYEY; VERMEULEN, 2003).

2.5.1 BIOMARCADORES GENOTÓXICOS

As moléculas de DNA e RNA são responsáveis por conter as informações genéticas de todos os organismos vivos. Tais informações são conservadas e transmitidas para cada célula durante as gerações seguintes (COSSU-LEGUILLE; VASSEUR, 2013).

Os danos genotóxicos são utilizados na avaliação de risco ambiental, pelos possíveis danos no DNA que são causados pela exposição à contaminantes, capazes de acarretar alterações na estrutura do DNA, devido os danos oxidativos em bases nitrogenadas ou as quebras de fita simples e duplas das cadeias de DNA, como também devido a expressão de genes que contenham regiões de danos resultando em mutações gênicas (SHUGART, 1996).

A quebra dos filamentos de DNA é considerada uma lesão pré-mutagênica, passível de reparo, sendo um marcador sensível para análise de efeitos genotóxicos. O ensaio alcalino do cometa, é a principal técnica para detecção de danos no DNA celular estimando quebras de fita simples e duplas em células individuais, assim como ligações cruzadas de proteínas, lesões álcali lábeis e reparo incompleto de danos no DNA (OHE; WATANABE; WAKABAYASHI, 2004). A técnica é realizada com tampão de eletroforese alcalino (pH > 13), onde os fragmentos de DNA migram do núcleo para o sentido ânodo, sendo o tamanho da cauda correspondente à classe de danos (OHE; WATANABE; WAKABAYASHI, 2004), ou seja, quanto maior a cauda maior o nível de dano no DNA.

O teste do micronúcleo (MN) é uma técnica utilizada para avaliar danos no DNA à nível cromossômico, é considerado uma lesão mutagênica, irreversível. O teste analisa a frequência de micronúcleos celulares decorrente de cromossômicos inteiros ou fragmentos cromossômicos, que se perderam durante a divisão celular e após a telófase não foram incorporados ao núcleo das células

filhas, permanecendo no citoplasma das células interfásicas (ALMEIDA; MELETTI; MARTINEZ, 2005; SCHMID, 1975). Os micronúcleos podem ser formados de duas maneiras: a) devido a alterações no aparato do fuso mitótico, que causa a perda de um cromossomo inteiro (micronúcleos de origem aneugênica); ou b) pela indução de quebra cromossômica, que causa a perda de um fragmento cromossômico (micronúcleos de origem clastogênica) (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011).

Por sua vez, a frequência de alterações eritrocíticas nucleares (AENs) são caracterizadas por imperfeições na membrana nuclear, que também podem ser utilizadas para avaliação de danos genotóxicos (SHIMIZU et al., 1998). Tais alterações foram classificadas em: a) núcleo segmentado; b) núcleo lobulado; c) núcleo com constrição ou em forma de rim; e d) células binucleadas (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990).

2.5.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Com relação aos biomarcadores bioquímicos, são frequentemente analisados enzimas de biotransformação, defesas antioxidantes e parâmetros de estresse oxidativo alterados pela exposição a um agente estressor. A biotransformação é um processo no qual os xenobióticos são transformados em compostos hidrossolúveis para ser mais facilmente excretado do organismo (LECH; VODICNIK, 1985). Ao sofrer biotransformação o contaminante pode ter sua toxicidade alterada, seja diminuindo (desintoxicação) ou aumentando (bioativação) a toxicidade do composto (VAN DER OOST; BEYEY; VERMEULEN, 2003). Sabe-se que a exposição a determinados contaminantes podem causar danos em lipídios, proteínas, DNA, inativação de enzimas e morte celular, atribuídos à formação de espécie reativas de oxigênio (ERO), que apesar de também serem formadas naturalmente durante a respiração celular, são capazes de causar estresse oxidativo em biomoléculas (MONTEIRO et al., 2009).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) é um dano causado à bicamada lipídica da membrana celular, ocasionado pelo aumento na concentração de ERO. A LPO está entre as principais causas de diminuição da integridade da membrana, aumento da fluidez transmembrana, ruptura da bicamada lipídica resultando em patologias, injúrias ou até mesmo morte celular (MANDUZIO et al., 2005).

Os organismos aeróbicos desenvolveram um sistema de defesa antioxidante, para combater os danos causados pelas ERO, incluindo a glutathiona (GSH), um antioxidante não enzimático, que atua na primeira linha de defesa contra à desintoxicação de xenobióticos, sendo cofator para várias enzimas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

2.5.3 BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS

Diferentes parâmetros hematológicos, como hematócrito, hemoglobina e número de células vermelhas, são utilizados para demonstrar o estado de saúde e fisiologia geral dos animais, considerados biomarcadores promissores (BEYER, 1996).

Indicativos de neurotoxicidade tem sido analisado a fim de se obter informações sobre possíveis danos neurotóxicos e comportamentais ocasionados pela exposição aos xenobióticos. A acetilcolinesterase (AChE), por exemplo, é uma enzima presente nas fendas sinápticas, responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético, impedindo a ocorrência de impulsos nervosos contínuos, fundamental no funcionamento normal dos sistemas neurais e neuromusculares. A exposição a determinados xenobióticos pode resultar em danos neurotóxicos decorrentes da inibição da atividade da AChE, causando mudanças comportamentais em peixes (OLIVEIRA et al., 2013).

Teleósteos de água doce são hiperosmóticos em relação ao ambiente, ou seja, são mais concentrados que o meio em que vivem. Esses animais precisam lidar constantemente com o ganho excessivo de água por osmose e perda de íons por difusão na brânquia, em razão disso, eles realizam a excreção de grande quantidade de urina diluída e a tomada de íons pelas brânquias, a fim de manter a osmo e ionorregulação (BLANCHARD; GROSELL, 2006). A exposição a contaminantes pode resultar na alteração da atividade de enzimas envolvidas na osmo e ionorregulação, o uso de biomarcadores possibilita a análise da atividade da Na^+/K^+ -ATPase (NKA), da H^+ -ATPase (HATP), da Ca^{2+} -ATPase (CaATP) e da anidrase carbônica (AC), que quando alteradas podem causar alterações nas funções biológicas dos organismos (CARVALHO; FERNANDES, 2008; BALDISSEROTTO, 2013).

As brânquias possuem adaptações a fim de reduzir a perda de íons. O muco produzido pelas células mucosas, por exemplo, apresenta radicais com carga elétrica que atraem íons para a superfície da célula, formando um gradiente

iônico para reduzir a perda de íons. Além disso, os filamentos branquiais apresentam células de cloreto, que por sua vez são responsáveis pela absorção de grande parte dos íons sódio (Na^+) e cloreto (Cl^-) (BALDISSEROTTO, 2013). As células de cloreto possuem diferentes transportadores e bombas dispostos na membrana apical e basolateral (Fig. 4). O Na^+ é captado na membrana apical por canais de Na^+ , devido ao gradiente favorável na célula que é formado pela bomba de NKA, localizada na membrana basolateral, responsável por transportar três íons Na^+ do interior da célula para o plasma e dois íons potássio (K^+) do plasma para o interior celular (BALDISSEROTTO, 2013). Na membrana apical, existe uma bomba de próton (H^+), a HATP, que elimina H^+ favorecendo a entrada de Na^+ devido ao aumento do gradiente elétrico (BALDISSEROTTO, 2013).

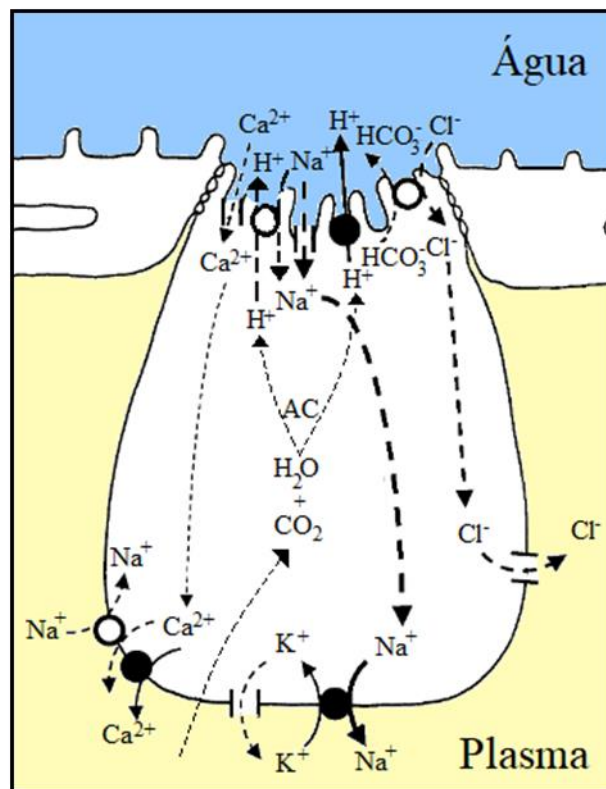


Figura 4 – Modelo de célula de cloreto branquial, ilustrando os principais transportadores de íons em teleosteo de água doce. Linhas contínuas indicam transporte ativo; linhas tracejadas indicam difusão ou troca através de canais de membrana ou através da célula; círculos sólidos representam ATPases; círculos sem preenchimento representam co-transportadores e trocadores; e linhas paralelas representam canais iônicos. Fonte: adaptado de Marshall, 2002.

A anidrase carbônica é uma enzima responsável por catalisar a conversão de dióxido de carbono (CO_2) em H^+ e bicarbonato (HCO_3^-), atuando no equilíbrio ácido-base (CEYHUN et al., 2011; BALDISSEROTTO, 2013). O HCO_3^- formado durante a reação da AC é utilizado na captação de Cl^- , que ocorre devido

ao antiporte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, na membrana apical. Já a saída do Cl^- para o meio plasmático irá ocorrer por meio de canal de Cl^- , localizado na membrana basolateral (BALDISSEROTTO, 2013).

Quanto a absorção de cálcio (Ca^{2+}), ocorre devido a atividade da enzima Ca^{2+} -ATPase e do antiporte $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$, que transportam Ca^{2+} do interior celular para o plasma, favorecendo um gradiente de concentração para a entrada de Ca^{2+} do meio externo para o interior da célula por meio de canais de Ca^{2+} (BALDISSEROTTO, 2013).

2.6 Modelo experimental *Prochilodus lineatus*

A espécie de peixe neotropical *P. lineatus* (Valenciennes, 1836) (Fig. 5) pertencente à família Prochilodontidae representa peixes de água doce popularmente conhecidos como curimba ou curimbatá. Tem sua localidade tipo no rio da Prata, Buenos Aires – Argentina (CASTRO; VARI, 2004), além de ser amplamente distribuída nas bacias do rio Paraná, São Francisco, Solimões, Tocantins, Paraíba do Sul e Uruguai (SIVASUNDAR; BERMINGHAM; ORTÍ, 2001).



Figura 5 - Exemplar de *P. lineatus* Valenciennes, 1836. Fonte: José Luís Olivan Birindelli. Universidade Estadual de Londrina.

Os peixes *P. lineatus* são descritos como animais de médio a grande porte, corpo alto, aproximadamente fusiforme, lábios desenvolvidos, presença de pequenos dentes e coloração prateada (SHIBATTA et al., 2002). Além disso, são peixes que possuem hábitos migratórios, capazes de percorrer grandes distâncias (MACHADO; FORESTI, 2012; SIVASUNDAR; BERMINGHAM; ORTÍ, 2001).

Sabe-se que a espécie *P. lineatus* apresenta hábitos alimentares

detritívoros, sendo significativamente importante no fluxo de energia dos ecossistemas aquáticos os quais habitam (CASTRO; VARI, 2004; REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003). Devido à essa característica alimentar, aumentou-se a preocupação quanto à contaminação desses animais, assim como de outras espécies detritívoras, uma vez que estas podem ingerir substâncias químicas presentes no sedimento (MARTINEZ; CÓLUS, 2002).

A espécie *P. lineatus* tem sido utilizada em diferentes estudos ecotoxicológicos, sendo um modelo biológico adequado nas avaliações dos efeitos tóxicos de diversos contaminantes (MARTINEZ et al., 2004), como em estudos realizados com a exposição ao cobre (CARVALHO; FERNANDES, 2008), ao herbicida Roundup® (CAVALCANTE; MARTINEZ; SOFIA, 2008) e ao inseticida imidaclopride (VIEIRA et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos genotóxicos, bioquímicos e fisiológicos do microplástico de polietileno e de sua associação com o cobre no peixe *Prochilodus lineatus*.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar os efeitos do microplástico (MP) e do cobre (Cu), isolados e em mistura, no peixe *P. lineatus* após exposições agudas de 24 e 96 h, nos seguintes parâmetros:
 - Danos no DNA em células branquiais, sanguíneas e hepáticas utilizando o teste do cometa, e micronúcleo (MN) e alterações eritrócíticas nucleares (AENs) em eritrócitos;
 - Danos oxidativos em lipídios (LPO) e alterações no conteúdo de glutathiona (GSH) em brânquias e fígado;
 - Indícios de neurotoxicidade, analisando a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em cérebro e músculo;
 - Alterações em parâmetros hematológicos (hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos) e na concentração plasmática de glicose;
 - Alterações nos íons plasmáticos e na atividade branquial de enzimas envolvidas no transporte iônico (Na⁺/K⁺-ATPase, H⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase e anidrase carbônica).
- Investigar se a presença do microplástico interfere no acúmulo de cobre nos tecidos;
- Analisar se os contaminantes microplástico e cobre quando em mistura, apresentam efeitos interativos;
- Fornecer dados relevantes sobre os efeitos do microplástico para um teleósteo de água doce e suas possíveis interações com o cobre.

REFERÊNCIAS

- ACA, V.L.; GONZALEZ, P.V.; CARRIQUIRIBORDE, P. Lethal and sublethal responses in the fish, *Odontesthes bonariensis*, exposed to chlorpyrifos alone or under mixtures with endosulfán and lambda-cyhalothrin. **Ecotoxicology**, p. 1-12, 2018.
- ALMEIDA, J.S.; MELETTI, P.C.; MARTINEZ, C.B.R. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 140, p. 356-363, 2005.
- ALOMAR, C.; ESTARELLAS, F.; DEUDERO, S. Microplastics in the Mediterranean Sea: Deposition in coastal shallow sediments, spatial variation and preferential grain size. **Marine Environmental Research**, v. 115, p. 1-10, 2016.
- ANDRADY, A.L. Microplastics in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 1596-1605, 2011.
- ARTHUR, C.; BAKER, J.; BAMFORD, H. **Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Microplastic Marine Debris**. 2008. University of Washington Tacoma, Washington, 2009.
- ASHTON, K.; HOLMES, L.; TURNER, A. Association of metals with plastic production pellets in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, p. 2050-2055, 2010.
- 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**, v. 198, p. 211-222, 2015.
- AVIO, C.G.; GORBI, S.; REGOLI, F. Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. **Marine Environmental Research**, v. 128, p. 2-11, 2017.
- BACKHAUS, T.; FAUST, M. Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: a conceptual framework. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 2564-2573, 2012.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura**. 3. ed. Santa Maria: EditoraUFSM, 2013.
- BARBOZA, L.G.A.; VIEIRA, L.R.; BRANCO, V.; FIGUEIREDO, N.; CARVALHO, F.; CARVALHO, C.; GUILHERMINO, L. Microplastics cause neurotoxicity, oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). **Aquatic Toxicology**, v. 195, p. 49-57, 2018.
- BARNES, D.K.; GALGANI, F.; THOMPSON, R.C.; BARLAZ, M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 364, p. 1985-1998, 2009.
- BEYER, J. **Fish biomarkers in marine pollution monitoring: Evaluation and validation in laboratory and field studies**. 1996. Academic thesis, University of Bergen, Norway, 1996.
- BLANCHARD, J.; GROSELL, M. Copper toxicity across salinities from freshwater to seawater in the euryhaline fish *Fundulus heteroclitus*: is copper an ionoregulatory toxicant in high salinities? **Aquatic Toxicology**, v. 80, p. 131-139, 2006.

- BROWNE, M.A.; UNDERWOOD, A.J.; CHAPMAN, M.G.; WILLIAMS, R.; THOMPSON, R.C.; VAN FRANEKER, J.A. Linking effects of anthropogenic debris to ecological impacts. **Proceedings Biological Sciences**, v. 282, p. 20142929, 2015.
- CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295-311, 2000.
- CAMPBELL, P.G.C. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. In: TESSIER, A.; TURNER, D.R. **Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems**, IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems: Chichester, 1995. p. 45-102.
- CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, p. 2123-2136, 1990.
- CARVALHO, C.S.; BERNUSO, V.A.; FERNANDES, M.N. Copper levels and changes in pH induce oxidative stress in the tissue of curimbata (*Prochilodus lineatus*). **Aquatic Toxicology**, v. 167, p. 220-227, 2015.
- CARVALHO, C.S.; FERNANDES, M.N. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 151, p. 437-442, 2008.
- CASTAÑEDA, R.A.; AVLIJAS, S.; SIMARD, M.A.; RICCIARDI, A. Microplastic pollution in St. Lawrence River sediments. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 71, p. 1767-1771, 2014.
- CASTRO, R.; VARI, R.P. Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study. **Smithsonian Contributions to Zoology**, p.1-189, 2004.
- CAVALCANTE, D.G.S.M.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 655, p. 41-46, 2008.
- CEYHUN, S.B.; ŞENTÜRK, M.; YERLIKAYA, E.; ERDOĞAN, O.; KÜFREVİOĞLU, Ö.İ.; EKINCI, D. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the teleost fish *Dicentrarchus labrax* (European seabass) liver and toxicological effects of metals on enzyme activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 69-74, 2011.
- CLOTFELTER, E.D.; BELL, A.M.; LEVERING, K.R. The role of animal behaviour in the study of endocrine-disrupting chemicals. **Animal Behaviour**, v. 68, p. 665-676, 2004.
- COLE, M.; LINDEQUE, P.; FILEMAN, E.; HALSBAND, C.; GALLOWAY, T.S. The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. **Environmental Science & Technology**, v. 49, p. 1130-1137, 2015.
- COLE, M.; LINDEQUE, P.; HALSBAND, C.; GALLOWAY, T.S. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 2588-2597, 2011.

- COSSU-LEGUILLE, C.; VASSEUR, P. Aquatic biomarkers. In: **Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology**. Springer Netherlands, 2013. p. 49-66.
- CRAWFORD, C.B.; QUINN, B. **Microplastic Pollutants**. Elsevier, 2017.
- DAVARPANA, E.; GUILHERMINO, L. Single and combined effects of microplastics and copper on the population growth of the marine microalgae *Tetraselmis chuii*. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 167, p. 269-275, 2015.
- DE SÁ, L.C.; LUÍS, L.G.; GUILHERMINO, L. Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions. **Environmental Pollution**, v. 196, p. 359-362, 2015.
- DE SÁ, L.C.; OLIVEIRA, M.; RIBEIRO, F.; ROCHA, T.L.; FUTTER, 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? **Science of The Total Environment**, v. 645, p. 1029-1039, 2018.
- DI TORO, D.M.; ALLEN, H.E.; BERGMAN, H.L.; MEYER, J.S.; PAQUIN, P.R.; SANTORE, R.C. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 2383-2396, 2001.
- DING, J.; ZHANG, S.; RAZANAJATOVO, R.M.; ZOU, H.; ZHU, W. Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Pollution**, v. 238, p. 1-9, 2018.
- ENDO, S.; TAKIZAWA, R.; OKUDA, K.; TAKADA, H.; CHIBA, K.; KANEHIRO, H.; OGI, H.; YAMASHITA, R.; DATA, T. Concentration of polychlorinated biphenyls (PCBs) in beached resin pellets: variability among individual particles and regional differences. **Marine pollution bulletin**, v. 50, p. 1103-1114, 2005.
- EYCKMANS, M.; CELIS, N.; HOREMANS, N.; BLUST, R.; DE BOECK, G. Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species. **Aquatic Toxicology**, v. 103, p. 112-120, 2011.
- FENDALL, L.S.; SEWELL, M.A. Contributing to marine pollution by washing your face: microplastics in facial cleansers. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, p. 1225-1228, 2009.
- FRIAS, J.P.G.L.; SOBRAL, P.; FERREIRA, A.M. Organic pollutants in microplastics from two beaches of the Portuguese coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, p. 1988-1992, 2010.
- GEYER, R.; JAMBECK, J.R.; LAW, K.L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, p. e1700782, 2017.
- HOLMES, L.A.; TURNER, A.; THOMPSON, R.C. Interactions between trace metals and plastic production pellets under estuarine conditions. **Marine Chemistry**, v. 167, p. 25-32, 2014.
- HORTON, A.A.; WALTON, A.; SPURGEON, D.J.; LAHIVE, E.; SVENDSEN, C. Microplastic in freshwater and terrestrial environments. Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 127-141, 2017.
- KIRSCH-VOLDERS, M.; PLAS, G.; ELHAJOUJI, A.; LUKAMOWICZ, M.; GONZALEZ, L.; LOOCK, K. V.; DECORDER, I. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 85, p. 873-899, 2011.

- KLAASEN, C.D.; WATKINS, J.B. **Fundamentos em Toxicologia de Casaret e Doull**. Porto Alegre: AMGH, 2012.
- KOELMANS, A.A. ET & C perspectives. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, p. 5-10, 2014.
- LECH, J.J.; VODICNIK, M.J. Biotransformation. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**. Washington: Hemisphere Publishing Corporation, 1985. p 526-557.
- LI, J.; LIU, H.; CHEN, J.P. Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. **Water Research**, v. 137, p. 362-374, 2018.
- LINDER, M.C.; WOOTEN, L.; CERVEZA, P.; COTTON, S.; SHULZE, R.; LOMELI, N. Copper transport. **The American journal of Clinical Nutrition**, v. 67, p. 965S-971S, 1998.
- 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. **Environmental Science & Technology**, v. 50, p. 4054-4060, 2016.
- LUÍS, L.; FERREIRA, P.; FONTE, E.; OLIVEIRA, M.; GUILHERMINO, L. Does the presence of microplastics influence the acute toxicity of chromium (VI) to early juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*)? A study with juveniles from two wild estuarine populations. **Aquatic Toxicology**, v. 164, p. 163-174, 2015.
- MACHADO, M.R.F.; FORESTI, F. Morphometric characteristics of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1847), of the migratory and resident stocks of the river Mogí-Guaçu, São Paulo State, Brazil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 34, p. 341-346, 2012.
- MANDUZIO, H.; ROCHER, B.; DURAND, F.; GALAP, C.; LÉBOULENGER, F. The point about oxidative stress in molluscs. **Invertebrate Survival Journal**, v. 2, p. 91-104, 2005.
- MARSHALL, W.S. Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, p. 264-283, 2002.
- MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. A bacia do Rio Tibagi. **Editora dos Editores**, Londrina, PR, Brazil, p. 551-577, 2002.
- MARTINEZ, C.B.R.; NAGAE, M.Y.; ZAIA, C.T.B.V.; ZAIA, D.A.M. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, p. 797-807, 2004.
- MATO, Y.; ISOBE, T.; TAKADA, H.; KANEHIRO, H.; OHTAKE, C.; KAMINUMA, T. Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. **Environmental Science & Technology**, v. 35, p. 318-324, 2001.
- MONTEIRO, S.M.; DOS-SANTOS, N.M.; CALEJO, M.; FONTAINHAS-FERNANDES, A.; SOUSA, M. Copper toxicity in gills of the teleost fish, *Oreochromis niloticus*: Effects in apoptosis induction and cell proliferation. **Aquatic Toxicology**, v. 94, p. 219-228, 2009.
- MOUNEYRAC, C.; AMIARD-TRIQUET, C. Biomarkers of Ecological Relevance. In: FÉRARD, J.S.; BLAISE, C. **Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology**. Berlin: Springer, 2013. p. 222–236.

- MUENMEE, S.; CHIEMCHAI SRI, W.; CHIEMCHAI SRI, C. Microbial consortium involving biological methane oxidation in relation to the biodegradation of waste plastics in a solid waste disposal open dump site. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 102, p. 172-181, 2015.
- NIKINMAA, M. **An Introduction to Aquatic Toxicology**. Elsevier, 2014.
- OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 567, p. 109-149, 2004.
- OLIVEIRA, M.; RIBEIRO, A.; HYLLAND, K.; GUILHERMINO, L. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). **Ecological Indicators**, v. 34, p. 641-647, 2013.
- PAQUIN, P.R.; GORSUCH, J.W.; APTE, S.; BATLEY, G.E.; BOWLES, K.C.; CAMPBELL, P.G.C.; DELOS, C.G.; DI TORO, D.M.; DWYER, R.L.; GALVEZ, F.; GENSEMER, R.W.; GOSS, G.G.; HOGSTRAND, C.; JANSSEN, C.R.; MCGEER, J.C.; NADDY, R.B.; PLAYLE, R.C.; SANTORE, R.C.; SCHNEIDER, U.; STUBBLEFIELD, W.A.; WOOD, C.M.; WU, K.B. The biotic ligand model: a historical overview. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 133, p. 3-35, 2002.
- PAQUIN, P.R.; SANTORE, R.C.; WU, K.B.; KAVVADAS, C.D.; DI TORO, D.M. The biotic ligand model: a model of the acute toxicity of metals to aquatic life. **Environmental Science & Policy**, v. 3, p. 175-182, 2000.
- PLASTICSEUROPE. Plastics – the Facts 2017: An analysis of European plastics production, demand and waste data. **PlasticsEurope**, 2017.
- RAINIERI, S.; CONLLEDO, N.; LARSEN, B.K.; GRANBY, K.; BARRANCO, A. Combined effects of microplastics and chemical contaminants on the organ toxicity of zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental research**, v. 162, p. 135-143, 2018.
- REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Editora Universitária da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2003.
- REVALDAVES, E.; RENESTO, E.; MACHADO, M.F.P.S. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, 1997.
- RIBEIRO, F.; GARCIA, A.R.; PEREIRA, B.P.; FONSECA, M.; MESTRE, N.C.; FONSECA, T.G.; BEBIANNO, M.J. Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 122, p. 379-391, 2017.
- RIOS, L.M.; MOORE, C.; JONES, P.R. Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, p. 1230-1237, 2007.
- ROCHMAN, C.M.; HOH, E.; KUROBE, T.; TEH, S.J. Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. **Scientific Reports**, v. 3, p. 3263, 2013.
- ROCHMAN, C.M.; PARNIS, J.M.; BROWNE, M.A.; SERRATO, S.; REINER, E.J.; ROBSON, M.; YOUNG, T.; DIAMOND, M.L.; TEH, S.J. Direct and indirect effects of different types of microplastics on freshwater prey (*Corbicula fluminea*) and their predator (*Acipenser transmontanus*). **Plos One**, v. 12, p. e0187664, 2017.

- SAMPAIO, F.G.; DE LIMA BOIJINK, C.; OBA, E.T.; DOS SANTOS, L.R.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 147, p. 43-51, 2008.
- SANCHEZ, W.; BENDER, C.; PORCHER, J.M. Wild gudgeons (*Gobio gobio*) from French rivers are contaminated by microplastics: preliminary study and first evidence. **Environmental Research**, v. 128, p. 98-100, 2014.
- SANTORE, R.C.; DI TORO, D.M.; PAQUIN, P.R.; ALLEN, H.E.; MEYER, J.S. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 2397-2402, 2001.
- SARKAR, A.; RAY, D.; SHRIVASTAVA, A.; SARKER, S. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology**, v. 15, p. 333-340, 2006.
- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 31, p. 9-15, 1975.
- SHIBATTA, O.A.; ORSI, M.L.; BENNEMANN, S.T.; SILVA-SOUZA, A.T. Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. **A Bacia do Rio Tibagi**. Londrina: ME Medri, 2002. p. 403-423.
- SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G.M.I. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **The Journal of Cell Biology**, v. 140, p. 1307-1320, 1998.
- SIMONATO, J.D.; MELA, M.; DORIA, H.B.; GUILOSKI, I.C.; RANDI, M.A.; CARVALHO, P.S.; MELETTI, P.C.; ASSIS, H.C.S.; BIANCHINI, A.; MARTINEZ, C.B. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 31-41, 2016.
- SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 407-417, 2001.
- SÖFFKER, M.; TYLER, C.R. Endocrine disrupting chemicals and sexual behaviors in fish—a critical review on effects and possible consequences. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 42, p. 653-668, 2012.
- STRUNGARU, S.A.; JIJIE, R.; NICOARA, M.; PLAVAN, G.; FAGGIO, C. Micro-(nano) plastics in freshwater ecosystems: Abundance, toxicological impact and quantification methodology. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 110, p. 116-128, 2019.
- SHUGART, L.R. Molecular markers to toxic agents. **Ecotoxicology: A Hierarchical Treatment**, p. 133-161, 1996.
- SYBERG, K.; KHAN, F.R.; SELCK, H.; PALMQVIST, A.; BANTA, G.T.; DALEY, J.; DUHAIME, M.B. Microplastics: addressing ecological risk through lessons learned. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, p. 945-953, 2015.
- TOSETTO, L.; WILLIAMSON, J.E.; BROWN, C. Trophic transfer of microplastics does not affect fish personality. **Animal Behaviour**, v. 123, p. 159-167, 2017.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

- VIEIRA, C.E.D.; PÉREZ, M.R.; ACAYABA, R.D.A.; RAIMUNDO, C.C.M.; MARTINEZ, C.B.R. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 195, p. 125-134, 2018.
- WINDSOR, F.M.; TILLEY, R.M.; TYLER, C.R.; ORMEROD, S.J. Microplastic ingestion by riverine macroinvertebrates. **Science of the Total Environment**, v. 646, p. 68-74, 2019.
- WORLD RESOURCES INSTITUTE. **Infographic: What do your country's emissions look like?**. World Resources Institute, 2015.
- ZUBRIS, K.A.V.; RICHARDS, B.K. Synthetic fibers as an indicator of land application of sludge. **Environmental Pollution**, v. 138, p. 201-211, 2005.

MANUSCRITO

Este manuscrito foi preparado de acordo com as normas da revista *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

[<https://www.journals.elsevier.com/ecotoxicology-and-environmental-safety>]

EFEITOS DE MICROPLÁSTICO E SUA ASSOCIAÇÃO COM O COBRE EM BIOMARCADORES GENOTÓXICOS, BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DO TELEÓSTEO *Prochilodus lineatus*

Jéssica Fernanda Bernardes Roda, Claudia Bueno dos Reis Martinez

Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, km 380, Londrina, Paraná 86057-970, Brasil.

RESUMO

Microplásticos (MP) são contaminantes emergentes amplamente encontrados em ecossistemas aquáticos. Além da toxicidade do MP, há uma crescente preocupação quanto à capacidade de adsorção e potencialização de outros contaminantes, como o cobre. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do microplástico de polietileno e de sua associação ao cobre (Cu) em biomarcadores genotóxicos, bioquímicos e fisiológicos do teleósteo neotropical *Prochilodus lineatus*. Os peixes foram expostos durante 24 e 96 h ao MP (20 µg L⁻¹) e ao Cu (10 µg L⁻¹), isolados e em mistura. Os resultados mostraram que o MP e o Cu, isolados e em combinação, promoveram danos no DNA de eritrócitos (96 h) e células hepáticas (24 e 96 h), interferiram na ionorregulação diminuindo o Na⁺ e Ca²⁺ plasmático (24 h) e apenas a exposição ao MP e ao MP+Cu resultaram em diminuição na atividade da Ca²⁺-ATPase branquial (24 h). Além disso, foi observado decréscimo na peroxidação lipídica no fígado dos peixes expostos ao Cu (96 h), apesar da diminuição no conteúdo da glutathiona, indicando atuação eficiente de outras defesas antioxidantes. Estes resultados indicam que tanto o MP quanto o Cu são genotóxicos, sendo os efeitos do MP atribuídos principalmente a danos oxidativos, enquanto os efeitos do Cu provavelmente resultam da ação direta do metal na molécula de DNA. A presença do MP não influenciou a concentração de Cu nos tecidos, tampouco nos efeitos agudos do Cu, não havendo indícios de sinergismo entre os dois contaminantes, exceto pelo decréscimo de Ca²⁺ plasmático na mistura.

Palavras-chave: Microplástico de polietileno; Metal; Ionorregulação; Estresse oxidativo; Água doce.

ABSTRACT

Microplastics (MP) are emerging contaminants widely found in aquatic ecosystems. In addition to MP toxicity, there is increasing concern about the adsorption capacity and potentiation of other contaminants, such as copper. The objective of this research was to investigate the effects of polyethylene microplastic and its association with copper (Cu) in genotoxic, biochemical and physiological biomarkers of the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*. Fish were exposed for 24 and 96 h to MP ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) and Cu ($10 \mu\text{g L}^{-1}$), isolated and in mixture. The results showed that MP and Cu, both isolated and in combination, promoted DNA damage in erythrocytes (96 h) and liver cells (24 and 96 h), interfered on ion regulation by decreasing plasma Na^+ and Ca^{2+} (24 h). Exposures to MP and MP+Cu resulted in a decreased activity of Ca^{2+} -ATPase (24 h). In addition, there was a decrease in lipid peroxidation in the liver of fish exposed to Cu (96 h), despite the decrease in glutathione content, indicating the efficiency of other antioxidant defenses. These results indicate that both MP and Cu are genotoxic, MP effects can be attributed primarily to oxidative damage, while the Cu effects are probably due to the direct action of the metal on the DNA molecule. MP presence did not influence Cu concentration in tissues, nor in the acute effects of Cu, and there was no evidence of synergism between the two contaminants except for the decrease of plasma Ca^{2+} in the mixture.

Keywords: Microplastic polyethylene; Metal; Ion regulation; Oxidative stress; Freshwater.

1 INTRODUÇÃO

A presença de plástico no ambiente aquático está cada dia mais frequente, devido ao consumo maciço de produtos plásticos pela sociedade, em embalagens de alimentos, móveis, equipamentos eletrônicos, construção civil, entre outros, que muitas vezes são descartados em ambientes terrestres e aquáticos, atingindo até mesmo habitats mais remotos, como a Antártica (Waller et al., 2017). Em 2016, a produção global de plástico ultrapassou 335 milhões de toneladas e continua aumentando exponencialmente a cada ano devido à demanda (PlasticsEurope, 2017), sendo os compostos plásticos 16% de todos os resíduos produzidos no mundo (Muenmee et al., 2015). Entre as resinas plásticas mais utilizadas em 2016 na Europa encontram-se as do tipo polipropileno (PP), polietileno (PE), policloreto de vinila (PVC), polietileno tereftalato (PET) e poliestireno (PS) (PlasticsEurope, 2017).

Parte do plástico no ambiente está presente como microplástico (MP), polímeros sintéticos menores que 5 mm, que assim como outros tipos de plástico, são motivo de preocupação quando se trata de poluição ambiental aquática (Browne et al., 2015). Os microplásticos (MPs) são divididos em dois tipos, de acordo com sua origem, os MPs primários e os MPs secundários (Barnes et al., 2009; Cole et al., 2011). Os MPs primários são fabricados em tamanho inferior a 5 mm, utilizados como abrasivos em aplicações industriais, fármacos, produtos de higiene pessoal e na produção de roupas sintéticas (Cole et al., 2011; Alomar et al., 2016). Os MPs secundários são peças irregulares formadas da degradação de macropolásticos (redes de pesca, detritos plásticos descartados, entre outros), por meio da fragmentação por abrasão mecânica e exposição prolongada à radiação ultravioleta (UV) (Andrady, 2011; Barnes et al., 2009).

A poluição aquática por MP tem sido relatada no mundo todo nos ambientes marinhos (Cole et al., 2011; Cole et al., 2015; Davarpanah e Guilhermino, 2015; Ribeiro et al., 2017; Tosetto et al., 2017), e mais recentemente em ambientes dulcícolas (Barboza et al., 2018; Ding et al., 2018; Li et al., 2018; Strungaru et al., 2019; Windsor et al., 2019). O transporte por estações de tratamento de água residuais, dispersão pelo vento, escoamento ou erosão do solo resultam na entrada dos MPs em diferentes habitats (Horton et al., 2017). Devido a grande variedade dos

polímeros plásticos, a composição, a densidade, o tamanho e a forma dos MPs encontrados no ambiente variam consideravelmente (Strungaru et al., 2019).

Os MPs têm características, como tamanho reduzido e diferentes formatos, que contribuem para sua biodisponibilidade para organismos de diferentes níveis tróficos (Castañeda et al., 2014; Ribeiro et al., 2017). Além disso, devido à densidade das partículas plásticas e sua possível interação com plâncton e sedimentos, os polímeros tornam-se disponíveis tanto para os organismos que se alimentam na coluna d'água de partículas em suspensão, quanto para os organismos detritívoros que se alimentam no fundo (Avio et al., 2017; Lusher, 2015).

Os efeitos do MP em espécies de peixes são controversos e dependentem de diferentes fatores, como tamanho das partículas, tipo de microplástico, presença ou não de outros contaminantes químicos, variando também entre diferentes espécies e estágio de vida (Rainieri et al., 2018). A preocupação quanto aos impactos causados pela exposição aos MPs vai além de danos físicos. Existe também grande preocupação quanto aos danos químicos e biológicos que podem desencadear efeitos toxicológicos nos organismos. De Sá et al. (2015) demonstraram que os teleósteos estuarinos *Pomatoschistus microps* são capazes de ingerir partículas de MP-PE, resultando na diminuição da capacidade predatória dos peixes, bem como a exposição durante as primeiras fases de desenvolvimento do animal pode influenciar na capacidade do peixe distinguir presas reais de MP. Em uma pesquisa conduzida por Ding et al. (2018), os peixes de água doce *Oreochromis niloticus* foram expostos a MP-PS, resultando no acúmulo de MP em intestino, brânquias, fígado e cérebro, redução na atividade da acetilcolinesterase (AChE), potencial envolvimento das enzimas do citocromo P450 (CYP) no metabolismo dos MPs no fígado e indução na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) no fígado.

Além dos compostos químicos presentes na composição dos MPs (Oliveira et al., 2013), os polímeros plásticos têm a capacidade de adsorver outros contaminantes presente no ambiente, como o cobre (Ashton et al., 2010; Davarpanah e Guilhermino, 2015), um metal capaz de se aderir a partículas em suspensão (Paquin et al., 2000), frequentemente alterando a biodisponibilidade e toxicidade do metal. Uma vez adsorvido na superfície do MP, o cobre, como outros compostos químicos, pode ser desorvido dentro dos organismos aquáticos após contato ou ingestão das micropartículas plásticas (Li et al., 2018) desencadeando efeitos

toxicológicos como danos oxidativos, danos genotóxicos e neurotoxicidade. Um estudo conduzido por Barboza et al. (2018) demonstrou a diminuição significativa da atividade cerebral da AChE e aumento da peroxidação lipídica (LPO) no cérebro e no músculo de peixes *Dicentrarchus labrax* expostos ao MP isolado e em interação com mercúrio. Já a adsorção do Cu ao MP-PE foi confirmada no ambiente marinho por Davarpanah e Guilhermino (2015) em um estudo de crescimento populacional com a microalga *Tetraselmis chuii*.

O cobre (Cu) é um dos metais de transição mais abundantes no ambiente, essencial para função de algumas enzimas e proteínas específicas, como a citocromo c oxidase, onde atua como cofator enzimático na respiração celular em eucariotos (Linder et al., 1998). A contaminação por cobre no ambiente aquático dulcícola tem aumentado nos últimos anos devido ao crescente uso em atividades antrópicas, industriais e agrícolas, como conservantes de madeira, fungicidas, fertilizantes, tratamento de esgoto e atividades de mineração (Simonato et al., 2016).

Apesar do cobre pertencer ao grupo de metais essenciais, quando em concentrações excessivas torna-se tóxico aos organismos, devido à sua capacidade de agir em reações de oxirredução (Carvalho e Fernandes, 2008; Eyckmans et al., 2011) produzindo efeitos adversos em peixes dulcícolas como peroxidação lipídica no fígado, indução de mudanças comportamentais em decorrência da diminuição da atividade da AChE muscular (Simonato et al., 2016), acúmulo em diferentes tecidos (Paschoalini et al., 2019), inibição da enzima Na⁺/K⁺-ATPase e o decréscimo na concentração plasmática de sódio (Carvalho e Fernandes, 2008), sendo considerado um tóxico iônico e osmorregulatório.

Considerando o acima exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do microplástico de polietileno (tamanho: 10-90 µm e densidade: 1,337 g cm³) e de sua associação ao cobre no peixe *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), analisando os efeitos ecotoxicológicos e potenciais riscos do microplástico e de sua associação com o cobre para uma espécie de teleosteo de água doce. *P. lineatus* foi selecionado como modelo biológico para este estudo por se tratar de uma espécie sensível a efeitos de diferentes classes de contaminantes, como o cobre (Carvalho e Fernandes, 2008; Carvalho et al., 2015; Simonato et al., 2016) e possuir hábitos detritívoros, podendo ser expostas aos contaminantes tanto pela brânquia quanto pela alimentação, sendo o MP e o Cu capazes de se aderir ao sedimento. Além disso, a LC₅₀ 96 h de cobre já é estabelecida para a espécie *P.*

lineatus, 29 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu (Mazon e Fernandes, 1999). Portanto, os efeitos da exposição aos contaminantes isolados e em mistura foram avaliados utilizando biomarcadores de estresse oxidativo (glutathiona e lipoperoxidação), genotoxicidade (danos no DNA, micronúcleo e alterações eritrocíticas nucleares), neurotoxicidade (acetilcolinesterase), fisiológicos (análises hematológicas, plasmáticas e enzimáticas) e acumulação do Cu nos tecidos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental e exposição aos contaminantes

Foram utilizados exemplares juvenis de *P. lineatus* ($n = 64$; $13,01 \pm 0,07$ cm e $25,61 \pm 1,17$ g; média \pm EP), fornecidos pela Aquicultura Venites, Toledo (PR). No laboratório, os peixes foram aclimatados durante sete dias em tanque de 500 L contendo água desclorada, aeração constante, fotoperíodo de 12 h claro: 12 h escuro, sendo os parâmetros físicos e químicos da água (média \pm EP) monitorados (temperatura $24,36 \pm 0,23$ °C; pH $7,85 \pm 0,14$; condutividade $2,02 \pm 0,52$ mS cm^{-1} ; turbidez $6,45 \pm 1,27$ NTU; oxigênio dissolvido $6,90 \pm 0,37$ mg O_2 L^{-1} ; total de sólidos dissolvidos $1,29 \pm 0,33$ g L^{-1}). Durante a aclimação, os animais foram alimentados com ração comercial de peixe com 36% de proteína (Guabi-Brasil) a cada 48 horas. A alimentação foi suspensa 24 horas antes do início dos experimentos e os peixes não foram alimentados durante as exposições.

As exposições foram realizadas com microplástico de polietileno (microesferas brancas fornecidas na forma de pó seco, composição: polietileno 50-99% e dióxido de titânio 1-49%; tamanho: 10-90 μm e densidade: $1,337$ g cm^3 ; Cospheric LLC) na concentração de 20 μg L^{-1} , estabelecida de acordo com dados encontrados na literatura, referente a concentrações relevantes na biota aquática (Horton et al., 2017; Oliveira et al., 2013). A concentração de cobre (Copper(II) dihydrate, ACROS Organics™) testada foi de 10 μg L^{-1} e baseia-se nos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005 para água doce de classe 1 e 2 que é de 9 μg L^{-1} de Cu dissolvido. Deste modo, foi utilizado uma concentração ambientalmente relevante, porém abaixo da CL_{50} 96 h estimada para *P. lineatus*, que é de 29 μg L^{-1} de Cu (Mazon e Fernandes, 1999).

Após o período de aclimação, os exemplares de *P. lineatus* foram divididos em quatro grupos ($n = 8$ em cada condição), sendo expostos apenas à água desclorada (CTR), ao MP 20 μg L^{-1} (MP), ao Cu 10 μg L^{-1} (Cu) e à mistura de MP 20 μg L^{-1} e Cu 10 μg L^{-1} (MP+Cu) nos diferentes tempos de exposição (24 e 96 h). Durante as exposições, os peixes foram mantidos em aquários de 10 L, contendo um peixe por aquário, com renovação parcial (80%) da água após 48 h, apenas para o experimento de 96 h.

Durante as exposições, os parâmetros físicos e químicos da água (média \pm EP) foram monitorados: temperatura $23,82 \pm 0,53$ °C; pH $7,96 \pm 0,15$; condutividade $0,10 \pm 0,006$ mS cm⁻¹; turbidez $4,30 \pm 1,73$ NTU; oxigênio dissolvido $6,75 \pm 0,18$ mg O₂ L⁻¹; $0,06 \pm 0,004$ g L⁻¹ e dureza $32,20 \pm 0,13$ mg CaCO₃ L⁻¹. As concentrações dos íons na água (média \pm EP) também foram mensuradas: Na⁺ $2,37 \pm 0,50$ mM; K⁺ $0,82 \pm 0,09$ mM e Ca²⁺ $4,22 \pm 0,02$ mM.

Além disso, amostras de água não filtradas e filtradas (filtro de 0,45 μ m, Millipore Millex HV/PVDF) foram coletadas de cada aquário para a análise de cobre total e dissolvido, respectivamente, nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 h, sendo que em 48 h foram coletadas ao início e ao final da renovação. As amostras de água de cada experimento também foram analisadas para a determinação de titânio. Para a determinação dos metais, as amostras foram acidificadas com HNO₃ (65%) e armazenadas a 4 °C para a análise das concentrações de cobre e titânio por espectrometria de absorção atômica (PerkinElmer A700) em forno de grafite, com um limite de detecção para o cobre de 0,014 μ g L⁻¹ e para o titânio de 0,35 μ g L⁻¹.

2.2 Amostragem de material biológico

Após as exposições, os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1 g L⁻¹) para a pesagem, medição e coleta de sangue pela veia caudal, para as análises genotóxicas, hematológicas e plasmáticas. Em seguida, os animais foram sacrificados por secção medular para a remoção das brânquias, fígado, trato digestório, rim posterior, cérebro e músculo, que foram utilizados para análises genotóxicas, bioquímicas, fisiológicas e de acúmulo de cobre. As amostras de tecido de brânquia, fígado, cérebro e músculo foram homogeneizadas (1:10 w/v) em solução tampão fosfato (0,1 M; pH 7,0 ou 7,5 para análise de AChE), centrifugadas (20280 g, 20 min, 4 °C) e os sobrenadantes foram armazenados a -80 °C até o momento das análises. O conteúdo de proteína das amostras utilizadas para GSH, LPO e AChE foram determinados de acordo com Bradford (1976). Os experimentos realizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (protocolo CEUA nº18039.2017.43).

2.3 Acúmulo de cobre (Cu) nos tecidos

Os tecidos foram completamente secos a 60 °C e digeridos em ácido nítrico ultrapuro 5N por 48 h a 60 °C, de acordo com Alves e Wood (2006). Os tecidos digeridos foram submetidos à análise em espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (Perkin Elmer A700) e comparados a soluções padrão de referência (Specsol, Brasil). Os resultados foram expressos em mg de Cu g de tecido seco⁻¹.

2.4 Danos no DNA – Ensaio alcalino do cometa

O ensaio alcalino do cometa foi realizado com eritrócitos, células branquiais e hepáticas de acordo com por Singh et al. (1988), com modificações descritas por Alvim e Martinez (2019). Amostras de brânquias e fígado foram dissociadas mecanicamente de acordo com Cavalcante et al. (2008), filtradas (malha de 30 µm) e armazenadas refrigeradas (4 °C) por até 48 h. Uma alíquota de suspensão de cada amostra foi misturada em agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), colocada em lâminas pré-recobertas com agarose de ponto de fusão normal (1%), cobertas com lamínulas e mantidas refrigeradas (4 °C) por 50 min. Posteriormente, as lâminas foram submetidas às seguintes etapas: a) lise celular: 2 h a 4 °C, protegidas da luz, em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, 1% de N-lauril sarcosinato de sódio, 10% de DMSO, 1% de Triton X-100, pH 10,0); b) desnaturação do DNA: 30 min no escuro em tampão de eletroforese (NaOH 0,3 N, EDTA 1 mM, pH > 13, a 4 °C); c) eletroforese: 20 min, 300 mA, 25 V, 1 V cm⁻¹; e d) neutralização: três lavagens com tampão (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 min cada. As lâminas foram fixadas com etanol absoluto por 10 min e armazenadas refrigeradas até a análise. Posteriormente, as lâminas foram coradas com gelRed e submetidas à análise por meio de teste cego em microscópio Leica (DM 2500) adaptado para fluorescência com ampliação de 400x. O dano ao DNA foi quantificado em cada amostra visualmente em 100 células aleatoriamente selecionadas e não sobrepostas pelo comprimento da cauda formada pela migração de fragmentos de DNA e classificadas em quatro classes de cometas (de 0 a 3), segundo Vieira et al. (2016). Para o cálculo do score de dano, o número de células em cada classe foi multiplicado pela classe de dano, variando de 0 (todas não danificadas) a 300 (todas com dano máximo). Os resultados do dano ao DNA foram

expressos pelo valor médio do escore de dano obtido para cada grupo experimental em cada tempo de exposição.

2.5 Frequência de micronúcleo (MN) e alterações eritrocíticas nucleares (AENs)

A análise de MN e AENs foi realizada de acordo com o método descrito por Ueda et al. (1992). Foi realizado um esfregaço em lâminas de vidro com uma alíquota de sangue, secas em temperatura ambiente *overnight*, fixadas com metanol P.A. (100%) e armazenadas sob refrigeração (4 °C). Para a análise, as lâminas foram coradas com Laranja de Acridina (0,003%) em tampão Sorenson (KH₂PO₄, NaHPO₄, pH 6,8) e examinadas em microscópio Leica (DM 2500) acoplado à fluorescência com ampliação de 1000x. Para cada peixe, foram analisados 3.000 eritrócitos, avaliando a ocorrência de MN e AENs de acordo com a técnica descrita por Carrasco et al. (1990). As AENs foram classificadas em três categorias: núcleo segmentado (NS), núcleo lobulado (NL), núcleo em forma de rim (NR), além da presença de células binucleadas (CB). A frequência média de MN, NS, NL, NR e CB para cada grupo, em cada tempo experimental, foi calculada e expressa por 1000 células (‰).

2.6 Glutationa (GSH)

A concentração do tripeptídeo GSH foi medida em brânquia e fígado utilizando 5,5'-ditiobis-ácido-nitrobenzóico (DTNB), a 412 nm contra uma curva padrão de GSH, conforme descrito por Beutler et al. (1963). A concentração de GSH foi expressa em µg de GSH mg de proteína⁻¹.

2.7 Lipoperoxidação (LPO)

A LPO foi determinada em brânquia e fígado pelo ensaio de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), por uma curva padrão de malondialdeído (MDA), com leitura de fluorescência (ex/em: 535/590 nm) segundo o protocolo descrito por Camejo et al. (1998). A concentração de TBARS foi expressa em nmol de MDA mg de proteína⁻¹.

2.8 Acetilcolinesterase (AChE)

Homogeneizados de amostras de cérebro e músculo foram utilizados para determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE) de acordo com o método de Ellman et al. (1961) e adaptado para microplacas (Costa et al., 2007). A quantificação da atividade da AChE foi determinada em 415 nm e expressa em $\text{nmol min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$.

2.9 Análises hematológicas

Para determinar o hematócrito (Hct), amostras de sangue foram centrifugadas (1200 g e 7 min) em centrífuga de microcapilares (Luguimac – S.R.C, modelo LC-5) e as leituras foram realizadas utilizando um cartão de leitura padronizado (FANEM LTDA, Brasil). A dosagem de hemoglobina (Hb) foi realizada segundo o método do cianeto de meta-hemoglobina utilizando kit comercial (Labtest Diagnostica) e a leitura foi realizada a 540 nm em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom). O número de glóbulos vermelhos por mm^3 de sangue (RBC) foi determinado utilizando câmara de Neubauer em microscópio de luz.

2.10 Análises plasmáticas

O sangue total foi centrifugado (3000 g, 10 min) e as amostras de plasmas foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A concentração de glicose (Gli) plasmática foi determinada utilizando o teste enzimático colorimétrico (Laborclin, linha Bioliquid) pelo método da glicose oxidase a 505 nm (Victor³, Perkin Elmer). As concentrações plasmáticas de sódio (Na^+) e potássio (K^+) foram determinadas usando fotômetro de chama (DM-62, Digimed). A concentração de cloreto (Cl^-) foi determinada utilizando kit comercial (Labtest Diagnostica e BioClin) a 490 nm (Victor³, Perkin Elmer). A dosagem de cálcio (Ca^{2+}) foi realizada pelo método de atomização em espectrômetro de absorção atômica (Perkin Elmer A700).

2.11 Análises das enzimas envolvidas no transporte iônico

Subamostras de filamentos branquiais foram homogeneizadas em tampão (Sacarose 150 mM, EDTA 10 mM, Imidazol 50 mM, Deoxicolato de sódio 2,4 mM, pH 7,5) e centrifugadas (7500 g, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) para utilização dos

sobrenadantes nas análises da Na^+/K^+ -ATPase (NKA), H^+ -ATPase (HATP), Ca^{2+} -ATPase (CaATP) e anidrase carbônica (AC). A atividade das enzimas NKA e HATP foram determinadas segundo McCormick (1993), pela oxidação do NADH, proveniente da quebra de ATP, em um ensaio enzimático com leitura em 340 nm em espectrofotômetro. A atividade da CaATP foi determinada através da quantificação do P_i pela quebra do ATP por meio da utilização de ácido ascórbico e molibdato de amônio, sendo a absorbância final lida em 620 nm (Vijayavel et al., 2007). A atividade da AC foi determinada de acordo com Vitale et al. (1999) baseando-se na catálise de uma solução saturada de CO_2 com liberação de H^+ e correspondente diminuição do pH medida através de pHmetro. A atividade de cada enzima foi expressa pela concentração de proteínas (Bradford, 1976).

2.12 Análises estatísticas

Os resultados dos biomarcadores obtidos nos diferentes tratamentos (CTR x MP x Cu x MP+Cu) foram comparados separadamente para cada tempo experimental (24 e 96 h), por meio de teste paramétrico (ANOVA) ou não paramétrico (Kruskal-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homocedasticidade), seguidos por testes de comparações múltiplas (Student Newman Keuls ou Dunn) quando indicado. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

Durante os experimentos não houve mortalidade de peixe em nenhum grupo experimental.

As concentrações de Cu total e dissolvido para cada experimento (24 h e 96 h) apresentaram-se dentro do esperado (Tabela 1). As concentrações de Cu nos aquários dos grupos controle e microplástico, sem adição de Cu na água, variaram entre 0,54 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 2,29 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cu total e 0,41 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 1,99 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cu dissolvido. Já as concentrações de Cu nos grupos Cu (Cu e MP+Cu) variaram entre 8,26 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 9,33 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cu total e 7,07 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 8,16 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cu dissolvido. Não foi detectada a presença de titânio nas águas analisadas.

Tabela 1 – Concentrações de Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$) total e dissolvido na água dos aquários de cada rodada experimental, sendo controle (CTR), microplástico 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MP), cobre 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu) e microplástico 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ + cobre 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MP+Cu) nos tempos de 24 e 96 h. Os dados foram expressos como média \pm EP (n = 8).

	Concentração de Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	24 h		96 h	
	Total	Dissolvido	Total	Dissolvido
CTR	2,29 \pm 0,08	1,98 \pm 0,09	0,86 \pm 0,05	0,73 \pm 0,08
MP	2,09 \pm 0,15	1,99 \pm 0,12	0,54 \pm 0,03	0,41 \pm 0,04
Cu	8,29 \pm 0,19	7,51 \pm 0,16	9,33 \pm 0,14	8,16 \pm 0,34
MP+Cu	8,30 \pm 0,16	7,49 \pm 0,30	8,26 \pm 0,24	7,07 \pm 0,24

3.1 Acúmulo de Cu nos tecidos

Nos peixes submetidos às exposições com cobre, foi evidenciado aumento na concentração deste metal apenas em dois dos órgãos analisados: brânquias e trato digestório. As concentrações de Cu nas brânquias apresentaram aumento significativo em ambos os tempos experimentais. Após 24 h houve aumento ($p < 0,001$) de Cu nas brânquias dos peixes dos grupos Cu e MP+Cu, quando comparados aos grupos CTR e MP (Fig. 1A). Já após 96 h, os peixes dos grupos Cu e MP+Cu apresentaram aumento ($p = 0,006$) apenas em relação ao grupo CTR (Fig. 1B).

Quanto ao acúmulo de Cu no trato digestório, em 96 h de exposição houve aumento ($p < 0,001$) de Cu em peixes dos grupos Cu e MP+Cu quando comparados aos peixes dos grupos CTR e MP (Fig. 1B).

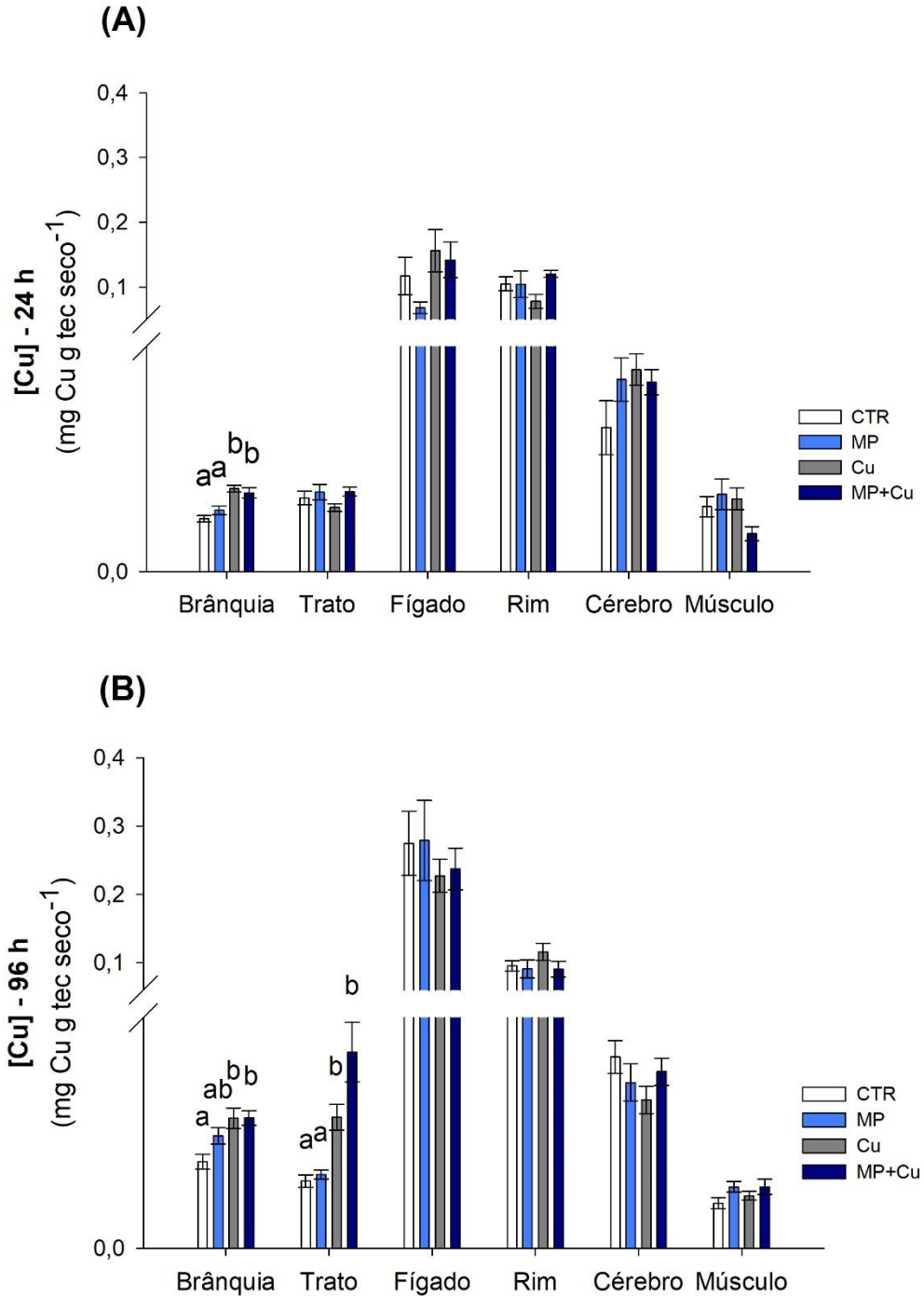


Figura 1 - Concentração de Cu (média \pm EP; n = 8) em tecidos de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 20 μg MP L⁻¹ (MP), 10 μg Cu L⁻¹ (Cu) e 20 μg MP L⁻¹ mais 10 μg Cu L⁻¹ (MP+Cu) por 24 h (A) e 96 h (B). Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos para cada tecido em cada tempo experimental ($p < 0,05$).

3.2 Genotoxicidade

Somente os eritrócitos dos peixes expostos por 96 h aos tratamentos MP, Cu e MP+Cu apresentaram escore de danos no DNA significativamente maior ($p = 0,003$) em relação ao grupo CTR (Fig. 2A).

Quanto às análises de dano nas células hepáticas, os peixes apresentaram aumentos significativos em ambos os tempos experimentais. Após 24 h houve aumento ($p = 0,001$) nos peixes dos grupos MP, Cu e MP+Cu quando comparados ao grupo CTR, e após 96 h de exposição, os peixes do grupo MP e Cu apresentaram aumento ($p < 0,001$) em relação aos do grupo CTR (Fig. 2B).

O escore de dano em células branquiais mantiveram-se sem alterações significativas para ambos os tempos testados (24 e 96 h) (Fig. 2C). Diferentes classes de cometa observados em eritrócitos de *P. lineatus* são mostrados nas Fig. 2D.

Em relação à frequência de AENs (NR + NS + NL + CB) (Fig. 3A), bem como à frequência de MN (Fig. 3B), não foram detectadas variações significativas entre os grupos experimentais nos dois tempos testados. Núcleo normal (NN), micronúcleo (MN) e alterações eritrocíticas nucleares (NR, NS, NL e CB) são mostrados na Fig. 3C.

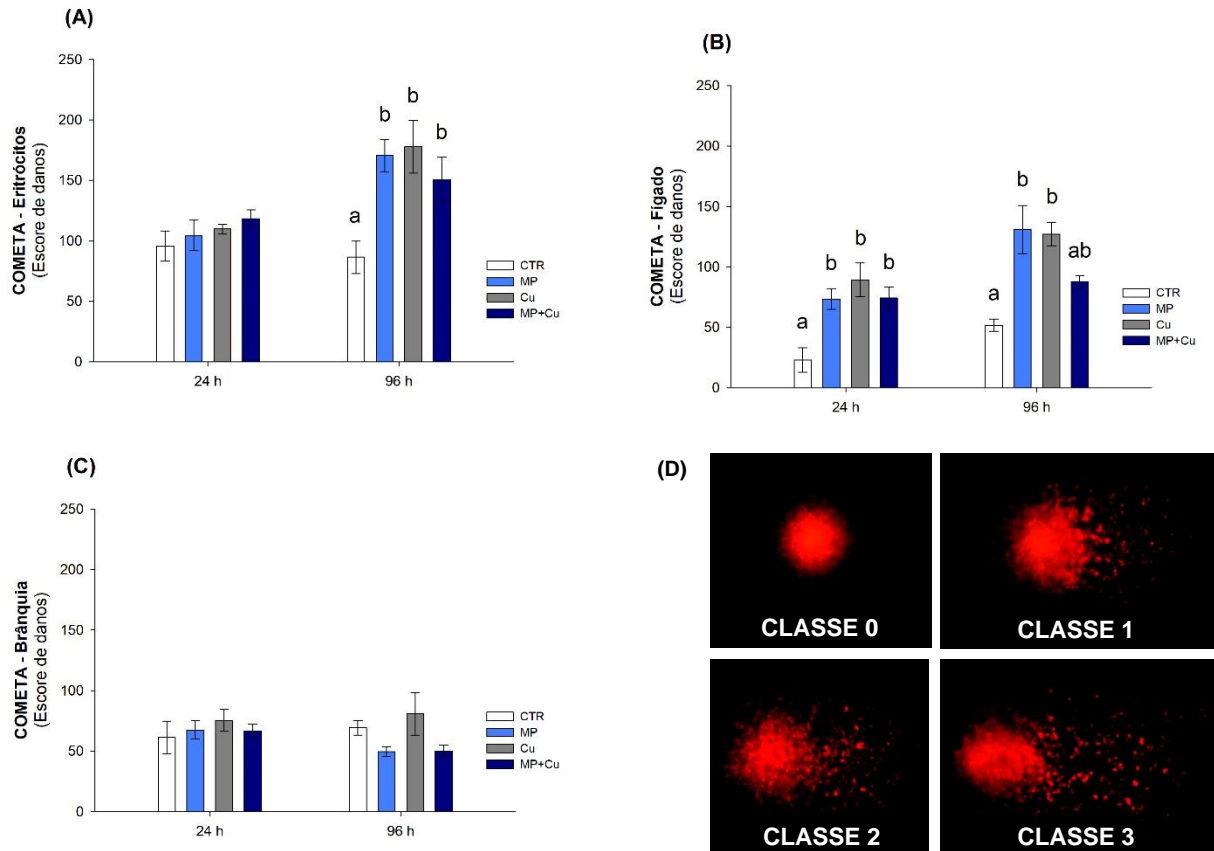


Figura 2 – Escore de danos no DNA (média \pm EP; n = 8) em eritrócitos (A), fígado (B) e brânquias (C) de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 20 μg MP L⁻¹ (MP), 10 μg Cu L⁻¹ (Cu) e 20 μg MP L⁻¹ mais 10 μg Cu L⁻¹ (MP+Cu) por 24 e 96 h. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo experimental ($p < 0,05$). Fotomicrografia mostrando as diferentes classes de cometa consideradas no cálculo do escore de danos no DNA em eritrócitos (D).

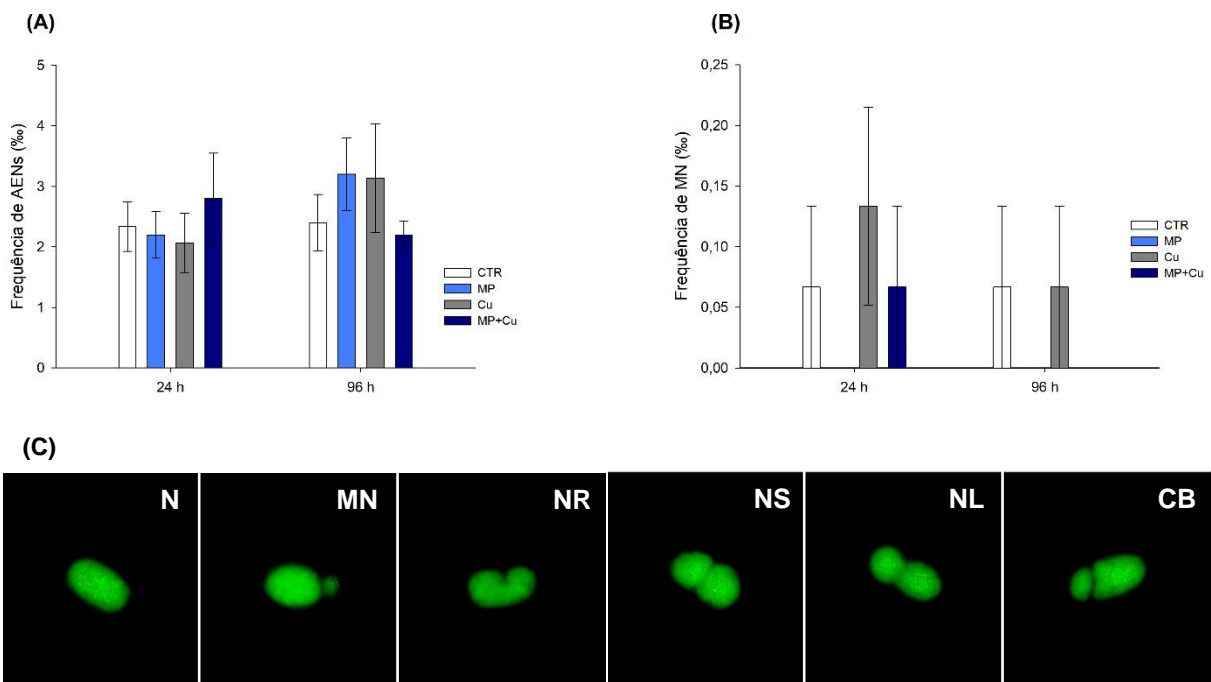


Figura 3 – Frequência de AENs (A) e de MN (B) em eritrócitos de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 20 µg MP L⁻¹ (MP), 10 µg Cu L⁻¹ (Cu) e 20 µg MP L⁻¹ mais 10 µg Cu L⁻¹ (MP+Cu) por 24 e 96 h. Valores representam média ± EP (n = 8). Foram considerados significativos valores de p < 0,05. Fotomicrografia de núcleo normal (N) e alterações representadas: micronúcleo (MN), núcleo em forma de rim (NR), núcleo segmentado (NS), núcleo lobulado (NL) e célula binucleada (CB) (coloração com laranja de acridina) (C). Notar as diferenças nas escalas dos gráficos.

3.3 Parâmetros hematológicos e glicemia

Os parâmetros hematológicos analisados, Hct, Hb e RBC não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais nos dois tempos testados (Tabela 2).

Após 24 h de exposição, a concentração plasmática de glicose dos peixes dos grupos MP+Cu foi significativamente menor (p = 0,024) em relação ao grupo CTR (Tabela 2). Já no experimento de 96 h, verificou-se um menor valor de glicemia (p = 0,008) nos peixes do grupo MP, mas apenas em relação aos grupos Cu e MP+Cu (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de hematócrito (Hct), hemoglobina (Hb) e número de eritrócitos (RBC) e concentração plasmática de glicose de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 20 µg MP L⁻¹ (MP), 10 µg Cu L⁻¹ (Cu) e 20 µg MP L⁻¹ mais 10 µg Cu L⁻¹ (MP+Cu) por 24 e 96 h. Valores representam média ± EP (n = 8). Foram considerados significativos valores de p < 0,05.

Análises hematológicas e glicose					
Tempo	Grupo	Hct (%)	Hb (mg dL ⁻¹)	RBC (cels 10 ⁶ mm ³)	Glicose (mg dL ⁻¹)
24 h	CTR	47,75±2,14	7,59±0,20	3,30±0,27	60,90±7,37 ^a
	MP	47,50±1,21	7,01±0,26	2,50±0,35	51,54±2,59 ^{ab}
	Cu	43,43±1,46	6,92±0,19	2,90±0,20	46,91±2,74 ^{ab}
	MP+Cu	42,75±1,37	6,76±0,22	2,60±0,16	40,58±1,78 ^b
96 h	CTR	44,13±1,89	7,62±0,45	2,40±0,12	36,58±2,01 ^{ab}
	MP	40,63±2,15	7,36±0,21	2,50±0,23	33,28±1,38 ^a
	Cu	37,57±2,00	6,81±0,25	2,40±0,18	42,56±1,68 ^b
	MP+Cu	40,50±1,68	7,09±0,27	2,60±0,15	42,46±2,96 ^b

3.4 Glutathione (GSH) e lipoperoxidação (LPO)

O conteúdo de glutathione (GSH) branquial foi menor que a curva padrão de GSH, não apresentando leitura entre os peixes dos grupos experimentais. O conteúdo de glutathione (GSH) hepática foi menor (p = 0,011) nos peixes dos grupos Cu e MP+Cu em relação ao grupo CTR, somente em 96 h de exposição (Fig. 4A).

Quanto à peroxidação lipídica, não foi evidenciada alteração significativa no tecido branquial (Fig. 4B). Entretanto, no fígado, foi constatado decréscimo (p= 0,036) nos peixes expostos ao Cu em relação ao CTR, apenas em 96 h de exposição (Fig. 4C).

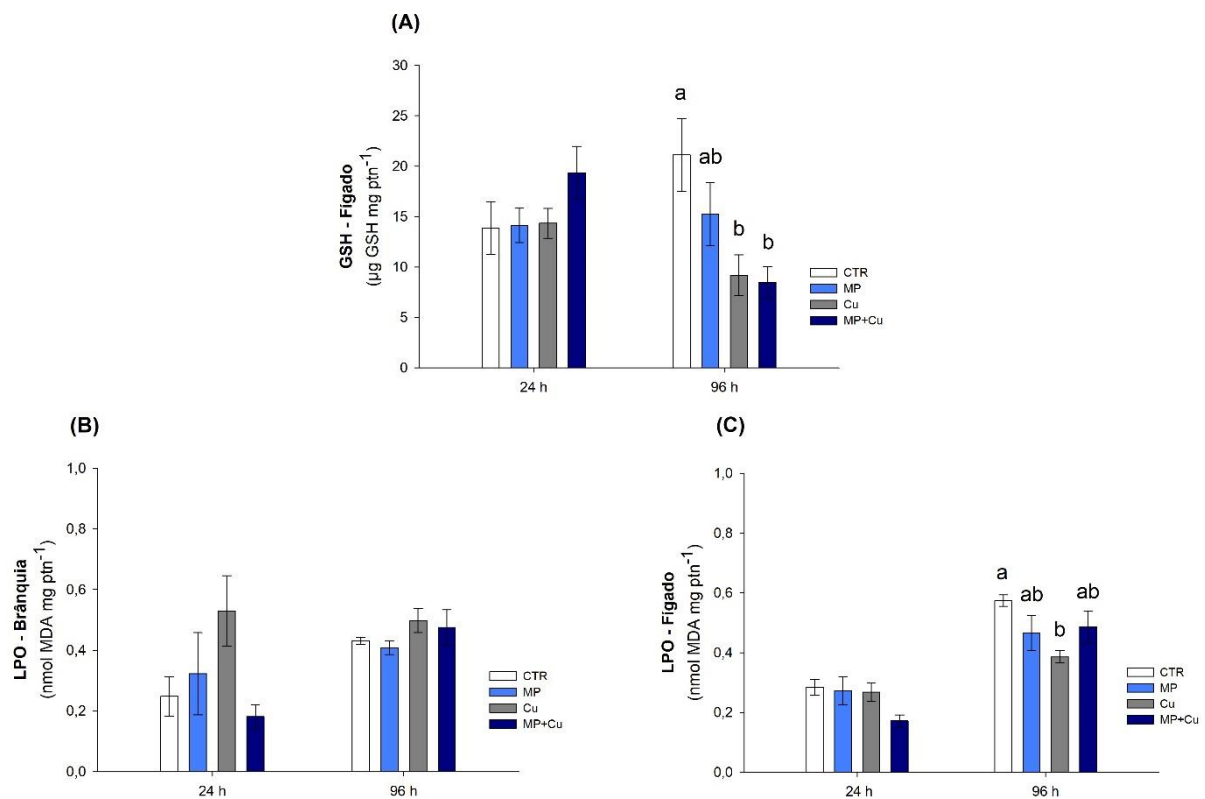


Figura 4 – Conteúdo de glutationa (GSH) em fígado (A) e lipoperoxidação (LPO) em brânquias (B) e fígado (C) de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 20 µg MP L⁻¹ (MP), 10 µg Cu L⁻¹ (Cu) e 20 µg MP L⁻¹ mais 10 µg Cu L⁻¹ (MP+Cu) por 24 e 96 h. Valores representam média ± EP (n = 8). Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo experimental (p < 0,05). Notar as diferenças nas escalas dos gráficos.

3.5 Acetilcolinesterase (AChE)

No que se refere à atividade da AChE no cérebro dos peixes, somente em 96 h de exposição houve diminuição (p < 0,001) em todos os grupos experimentais quando comparados ao grupo CTR (Fig. 5A). Já para o tecido muscular, não foram constatadas alterações significativas na atividade da AChE (Fig. 5B).

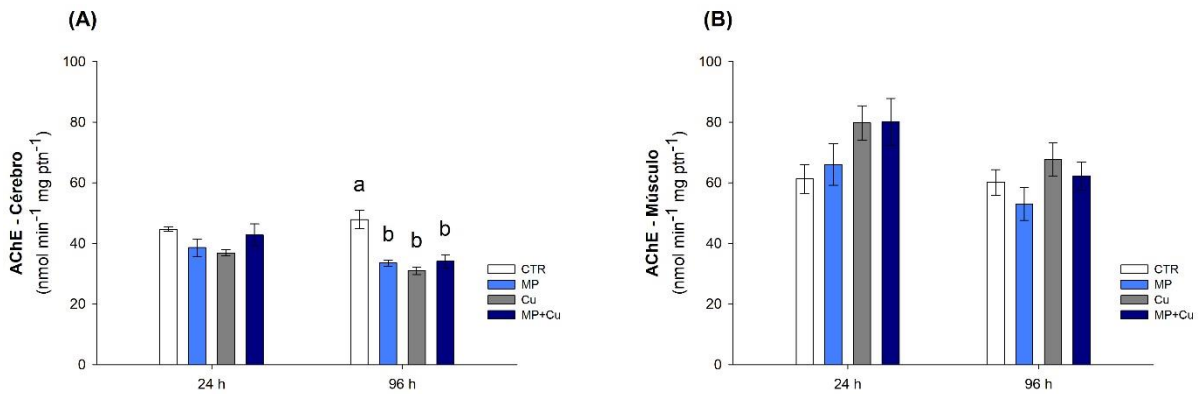


Figura 5 – Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em cérebro (A) e músculo (B) de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 20 µg MP L⁻¹ (MP), 10 µg Cu L⁻¹ (Cu) e 20 µg MP L⁻¹ mais 10 µg Cu L⁻¹ (MP+Cu) por 24 e 96 h. Valores representam média ± EP (n = 8). Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo experimental (p < 0,05).

3.6 Íons plasmáticos e enzimas envolvidas no transporte iônico

Quanto aos íons plasmáticos, menores valores de Na⁺ (p = 0,003) foram constatados em todos os grupos experimentais em relação ao grupo CTR (Fig. 6A), após 24 h de exposição. Já no experimento de 96 h, o Na⁺ mostrou-se menor (p = 0,013) apenas no grupo MP+Cu quando comparado ao grupo MP (Fig. 6A).

Assim como para o sódio, após exposição de 24 h, a concentração de Ca²⁺ foi significativamente menor (p = <0,001) nos peixes de todos os grupos experimentais, quando comparados ao grupo CTR (Fig. 6B), sendo que nos peixes do grupo MP+Cu a concentração plasmática de Ca²⁺ foi ainda menor. No entanto, após 96 h de exposição não houve variação significativa na concentração plasmática de cálcio (Fig. 6B).

As concentrações plasmáticas de K⁺ e Cl⁻ mantiveram-se sem alterações significativas nos peixes dos diferentes grupos e tempos experimentais em relação ao CTR (K⁺: 2,81 ± 0,70 mM e Cl⁻: 111,54 ± 1,49 mM; média ± EP).

Dentre as enzimas envolvidas no transporte iônico apenas a atividade branquial da CaATP apresentou variação significativa entre os tratamentos, com valores menores (p < 0,001) nos peixes dos grupos MP e MP+Cu em relação ao CTR, após 24 h de exposição (Fig. 6D).

A atividade das enzimas NKA (Fig. 6C), HATP (Fig. 6E) e AC (Fig. 6F) não apresentaram alterações significativas entre os grupos nos tempos testados.

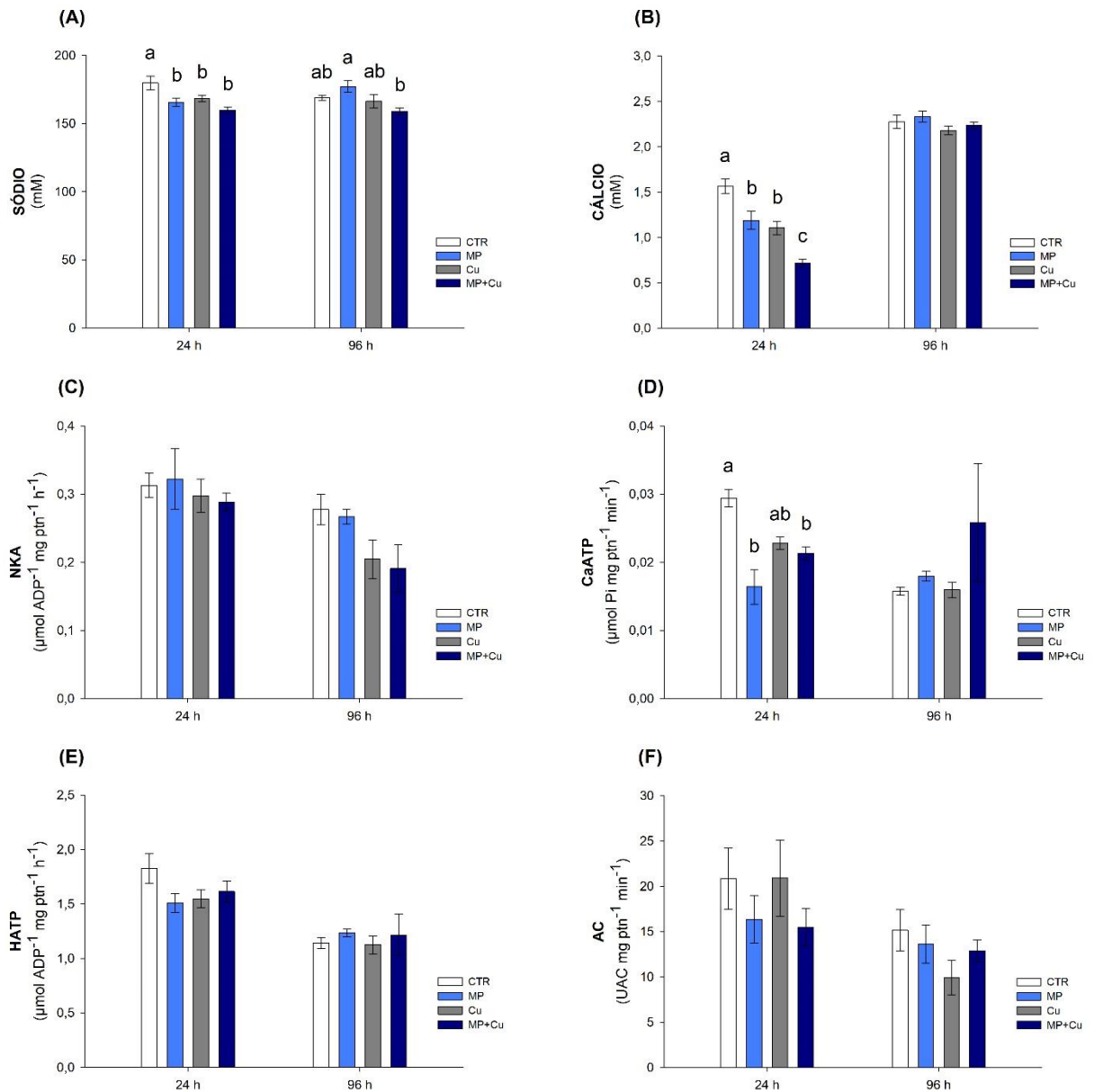


Figura 6 – Concentrações plasmáticas de Na^+ (A) e Ca^{2+} (B) e atividade branquial da enzima NKA (C), CaATP (D) e HATP (E), e anidrase carbônica (F) em *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo $20 \mu\text{g MP L}^{-1}$ (MP), $10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ (Cu) e $20 \mu\text{g MP L}^{-1}$ mais $10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ (MP+Cu) por 24 e 96 h. Valores representam média \pm EP (n = 8). Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo experimental (p < 0,05). Notar as diferenças nas escalas dos gráficos.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo buscou-se compreender os efeitos causados pela exposição ao microplástico de polietileno e sua interação com o cobre, na espécie neotropical *P. lineatus*. A exposição aos contaminantes resultou no acúmulo de cobre nas brânquias e no trato digestório, sendo estas as duas vias de captação de Cu estabelecidas para peixes (Nadella et al., 2007).

A brânquia é um tecido fundamental no processo respiratório, na regulação iônica e ácido-base (Gilmour e Perry, 2009). Por estar em contato com a água, as brânquias são expostas diretamente aos xenobióticos presentes no meio aquático, sendo a principal via de entrada para diferentes contaminantes no organismo, incluindo os metais (Ptashynski et al., 2002) como o cobre (Grosell e Wood, 2002; Nadella et al., 2007). Quando a concentração de cobre ultrapassa o sistema de regulação do metal ocorre o acúmulo. Embora tenha ocorrido aumento na concentração de Cu nas brânquias não houve aumento significativo nos danos no DNA nem em danos oxidativos. Além disso, por se tratar de um metal essencial, concentrações elevadas de Cu são comumente encontradas em diferentes tecidos como as brânquias, fígado e rim (Grosell e Wood, 2002).

Os animais não foram alimentados durante os experimentos, no entanto após exposição a 96 h, houve aumento no acúmulo de Cu no trato digestório nos peixes dos grupos Cu e MP+Cu. Os mecanismos de absorção de Cu pelo trato digestório não são esclarecidos (Nadella et al., 2007). Considerando que os peixes dulcícolas ingerem pouquíssima quantidade de água, os resultados obtidos no grupo MP+Cu podem estar associados à ingestão de MP contendo Cu adsorvido, visto que a densidade do MP utilizado fazia com que sedimentassem no fundo dos aquários, tornando-se disponíveis para animais detritívoros, como o *P. lineatus*. No entanto, quanto ao acúmulo em peixes expostos ao Cu isolado pode estar relacionado a presença de material particulado.

Embora não tenha sido possível realizar análises que identifiquem o acúmulo de microplástico nos tecidos, sabe-se que os MPs podem acumular em organismos de diferentes níveis tróficos, seja pela ingestão de alimento contaminado e/ou ingestão acidental de partículas da coluna d'água e sedimento (Anbumani e Kakkar, 2018; Tosetto et al., 2017), como também pelas brânquias em processos

respiratórios e de osmorregulação (Watts et al., 2014), resultando no acúmulo em diferentes tecidos (Avio et al., 2015; Browne et al., 2008; Ribeiro et al., 2017). Em um estudo realizado por Ding et al. (2018) foi observado acúmulo de MP-PS em brânquias, fígado, cérebro e intestino de *Oreochromis niloticus*, indicando que além da absorção do MP pela ingestão, também é possível o acúmulo em órgãos internos através da captação e transporte pelas membranas branquiais e circulação sanguínea. Acúmulo de MPs também foi relatado para a espécie *Danio rerio*, após exposição de 20, 200 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Lu et al., 2016), onde observou-se a absorção dependente do tamanho do MP utilizado e também o acúmulo de MP em diferentes tecidos, resultando em alterações histológicas, estresse oxidativo e alterações no metabolismo de lipídeos e energia no fígado dos animais expostos.

Além dos impactos físicos causados pela forma, cor e dimensão, os MPs são capazes de acarretar efeitos químicos, devido aos aditivos utilizados na sua composição e os diferentes contaminantes que podem ser adsorvidos em sua superfície, como os metais (Holmes et al., 2014; Rainieri et al., 2018), frequentemente alterando a toxicidade e biodisponibilidade destes contaminantes (Syberg et al., 2015). Possivelmente, os peixes expostos à mistura podem ter ingerido partículas de MP contendo alta concentração de Cu adsorvido, contribuindo com o aumento do acúmulo do metal. Quando em mistura com outros contaminantes químicos, os MPs são capazes de interferir nos efeitos tóxicos dos compostos, sendo necessário considerar que a interação irá depender do ambiente circundante e das características de cada contaminante (Rainieri et al., 2018).

O ensaio alcalino do cometa quando realizado em diferentes tecidos pode variar quanto aos danos no DNA, devido à diversidade de mecanismo na manutenção do reparo, como excisão de base, excisão de nucleotídeos e fotorreativação (Kienzler et al., 2013), bem como também pode variar devido à ação de antioxidantes e atividade metabólica de cada célula (Lee e Steinert, 2003). Em relação aos danos genotóxicos, ainda pouco se sabe sobre os efeitos dos microplásticos nos organismos. Danos no DNA já foram observados pela análise do cometa em hemócitos de moluscos marinhos expostos ao microplástico (Avio et al., 2015; Ribeiro et al., 2017), devido à ação de ERO. Provavelmente as quebras das fitas de DNA em peixe exposto ao MP, deve-se à produção de ERO e conseqüentemente aos danos oxidativos, capazes de causar danos por ligação covalente ao DNA, inibição da síntese de DNA ou até mesmo impedir processos

como a replicação e a transcrição (Alak et al., 2019; Avio et al., 2015; Ribeiro et al., 2017). A exposição de *P. lineatus* ao MP, Cu e MP+Cu causaram aumento de danos no DNA em células sanguíneas (96 h) e hepáticas (24 e 96 h) provavelmente devido à ação de ERO, resultando na quebra das fitas de DNA pela exposição ao MP. Em relação à genotoxicidade em eritrócitos, a ausência de danos no DNA em 24 h pode ser atribuída à cinética celular e à taxa de reposição das células sanguíneas, ocorrendo substituição de células danificadas por células saudáveis (Campana et al., 1999; Muranli e Güner, 2011). Quanto à ausência de danos no DNA em células branquiais, pode estar relacionado ao mecanismo de reparo de DNA que resulta em efeitos genotóxicos diferentes para cada tecido. Além disso, os diferentes tipos celulares assim como a atividade metabólica e capacidade de defesa antioxidante, também varia para cada tecido (Alvim e Martinez, 2019).

Com relação ao Cu, sabe-se que mesmo a exposição aguda em baixas concentrações, como $5 \mu\text{g Cu L}^{-1}$, são capazes de aumentar os danos no DNA em *P. lineatus* (Simonato et al., 2016). Além de causar danos em eritrócitos sanguíneos, a exposição a $10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ (24 e 96 h), também foi responsável pelo aumento de danos no DNA em células hepáticas, sendo o DNA dos peixes sensíveis à exposição ao Cu. Devido ao fígado ser o principal órgão na detoxificação, a sobrecarga de Cu pode induzir reações oxidativas aumentando a formação de ERO, resultando em diferentes danos no tecido hepático, incluindo danos no DNA (Yu, 1994). Além das ERO, o Cu pode se ligar diretamente ao DNA causando modificações estruturais e funcionais (Alak et al., 2019; Govindaraju et al., 2013). Muito provavelmente a maioria dos efeitos do MP no DNA foi causado por danos oxidativos devido a formação de ERO, enquanto os danos no DNA por exposição ao Cu atribuíram-se na grande maioria ao efeito direto do metal na molécula de DNA, uma vez que a exposição ao Cu não resultou em danos oxidativos em lipídeos no fígado, apesar da diminuição no conteúdo de GSH hepática observada na mesma exposição. Os resultados obtidos pelo ensaio do cometa mostraram que o MP possui efeito genotóxico, assim como o Cu. Entretanto, a presença dos dois contaminantes simultaneamente não apresentou indícios de sinergismo para esses efeitos.

A GSH é o tiol não proteico mais abundante nas células, sendo um dos principais antioxidantes não enzimáticos, fundamental nas reações redox, transporte de aminoácidos e eliminação de diversos contaminantes (Van Der Oost et

al., 2003). O decréscimo no conteúdo de GSH em *P. lineatus* foi causado pela exposição ao Cu, uma vez que o metal é capaz de interferir diretamente na síntese do antioxidante, além de causar inibição da enzima glutathiona redutase (GR, que catalisa a redução da glutathiona oxidada em glutathiona reduzida) e o uso da GSH como substrato para a enzima GST na reação contra as ERO (Gravato et al., 2006). A diminuição de GSH nos animais expostos à mistura foi devido à presença do Cu, uma vez que aqueles expostos ao MP isolado não apresentaram redução significativa.

Concomitantemente, observou-se a diminuição na peroxidação lipídica no fígado apenas em animais expostos ao Cu em relação aos animais do grupo controle. A exposição ao MP não resultou em alteração de danos em lipídios, corroborando os dados de Oliveira et al. (2013) sobre o estudo dos efeitos do MP-PE em juvenis de *Pomatoschistus microps*. A lipoperoxidação é o processo mediado pelas ERO, em que os principais ácidos graxos são oxidados interferindo na fluidez da bicamada lipídica da membrana celular. É sabido que a exposição ao Cu é capaz de causar aumento da peroxidação lipídica em peixes dulcícolas (Simonato et al., 2016; Vutukuru et al., 2006). No entanto, o contato com os contaminantes e a indução de estresses oxidativos podem ter desencadeado mecanismos de defesa antioxidante no animal, como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutathiona peroxidase (GPX) e a metalotioneína por exemplo, contribuindo na reação contra ERO e prevenção de lipoperoxidação.

Sabe-se que a AChE é uma enzima presente nas fendas sinápticas, que atua na regulação da atividade neuronal impedindo a propagação contínua de impulsos nervosos. A exposição aos contaminantes provocaram a diminuição da atividade da AChE em células cerebrais, que por sua vez pode resultar em danos neurotóxicos e comportamentais, como afetar a orientação e o equilíbrio dos peixes (Oliveira et al., 2013). Resultados semelhantes também foram encontrados no trabalho de Ding et al. (2018) com o peixe de água doce *Oreochromis niloticus* expostos ao MP-PS, demonstrando a importância de investigar os danos neurotóxicos causados pelos MPs. Indicativos de neurotoxicidade também foram relatados em peixes submetidos a exposição ao MP-PE isolado e em combinação com pireno (Oliveira et al., 2013), com cefalexina (Fonte et al., 2016), com cromo (Luís et al., 2015), bem como na exposição de peixes ao Cu isolado (Simonato et al., 2016; Vieira et al., 2009).

Os níveis de glicose no sangue são mantidos pelo equilíbrio entre a produção de glicose (catabolizada pela glicólise) e o armazenamento de glicose como glicogênio, estabelecendo a homeostase (Polakof et al., 2012). Os resultados mostraram que a exposição dos peixes à mistura MP+Cu causou diminuição da glicemia em 24 h. Já em 96 h, o aumento da glicemia em peixes expostos à mistura e ao Cu isolado, em relação ao MP isolado, não demonstram resultados conclusivos, uma vez que esses três grupos não apresentaram diferença significativa em relação ao CTR. Entretanto, vale ressaltar que para ambos os tempos experimentais os animais foram alimentados pela última vez 24 h antes das exposições, justificando a diferença na concentração de glicose plasmática vista entre os dois grupos CTR.

Peixes de água doce lidam constantemente com o ganho de água por osmose e perda de íons por difusão, excretando grande quantidade de urina diluída e realizando a tomada de íons pelas brânquias, a fim de manter a osmorregulação (Blanchard e Grosell, 2006). É sabido que a exposição ao cobre causa desequilíbrio iônico em *P. lineatus*, assim como em outras espécies, diminuindo a concentração de íons plasmáticos devido à redução da absorção ativa e aumento da perda difusiva de íons, resultando em distúrbios osmo e ionorregulatórios (Grosell e Wood, 2002). Tanto a exposição ao Cu quanto a exposição ao MP, isolados e em mistura, levaram ao decréscimo de Na^+ plasmático. A inibição da atividade enzimática da NKA causa diminuição da concentração plasmática de Na^+ , uma vez que o gradiente favorável à entrada de Na^+ é diminuído (Blanchard e Grosell, 2006). No entanto não foram observadas alterações na atividade da enzima NKA, sugerindo que o decréscimo da concentração plasmática de Na^+ pode estar relacionada à competição do Cu pelo Na^+ nos canais de sódio na membrana apical das células branquiais, uma vez que não houve diminuição da atividade da NKA (Atli e Canli, 2011).

A captação de Ca^{2+} em peixes dulcícolas ocorre principalmente pela Ca^{2+} -ATPase basolateral e pelo trocador de $\text{Ca}^{2+} / \text{Na}^+$, localizados nas células de cloreto (Hwang et al., 2011), que transportam Ca^{2+} intracelular para o plasma, favorecendo a entrada de Ca^{2+} no meio intracelular pelos canais de Ca^{2+} apicais. Em um trabalho realizado por Watts et al. (2016) foi relatado que a absorção do MP de poliestireno nas câmaras branquiais dos caranguejos *Carcinus maenas* provocou diminuição de Na^+ e aumento de Ca^{2+} hemolinfático, alterando a regulação iônica nos animais. Em relação aos peixes, mais trabalhos precisam ser realizados para

que esses mecanismos sejam compreendidos. O decréscimo da concentração plasmática de Ca^{2+} após exposição ao MP isolado e em mistura com o Cu, deve-se à diminuição da atividade da Ca^{2+} -ATPase. Vale ressaltar que, nos peixes expostos à mistura de MP mais Cu, o decréscimo de Ca^{2+} plasmático foi maior do que a redução observada nos organismos expostos aos contaminantes isolados. Apesar do aumento nos estudos voltado aos efeitos toxicológicos dos MPs em organismos de água doce, processos de osmorregulação e balanço iônico ainda não são esclarecidos. No entanto, observou-se que o MP foi capaz de diminuir a concentração plasmática de Ca^{2+} e a atividade da enzima Ca^{2+} -ATPase influenciando na ionorregulação do *P. lineatus*, porém os mecanismos para que isso ocorra ainda são desconhecidos.

Em conclusão, os contaminantes apresentaram efeitos genotóxicos, neurotóxicos e fisiológicos em *P. lineatus*, tanto isolados quanto em mistura. O acúmulo de Cu nos tecidos não foi influenciado pela presença do microplástico. O MP mostrou-se um contaminante genotóxico, assim como o Cu, porém os danos no DNA decorrentes da exposição ao MP provavelmente estão associados à formação de ERO, enquanto os danos no DNA causados pelo metal podem ter resultado da ação direta do Cu na molécula de DNA. Animais expostos ao Cu tiveram redução na LPO, sugerindo efetividade dos mecanismos antioxidantes em peixes, apesar da diminuição na concentração de GSH. A diminuição de Ca^{2+} plasmático acentuada na mistura pode ser um indício de que está ocorrendo a adsorção de Cu pelo MP e possivelmente sinergismo em relação a esse efeito. No entanto, para os demais resultados obtidos isso não acontece. Embora estudos com MPs tenham avançado recente, o conhecimento sobre os efeitos toxicológicos em organismos de água doce ainda é escasso. Diante disso, o estudo contribui com informações sobre os efeitos do microplástico de polietileno em uma espécie de peixe dulcícola.

REFERÊNCIAS

- Alak, G.; Parlak, V.; Aslan, M. E.; Ucar, A.; Atamanalp, M.; Turkez, H. Borax supplementation alleviates hematotoxicity and DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to copper. **Biological Trace Element Research**, v. 187, p. 536-542, 2019.
- Alomar, C.; Estarellas, F.; Deudero, S. Microplastics in the Mediterranean Sea: Deposition in coastal shallow sediments, spatial variation and preferential grain size. **Marine Environmental Research**, v. 115, p. 1-10, 2016.
- Alves, L.C.; Wood, C.M. The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 217-232, 2006.
- Alvim, T.T.; Martinez, C.B.R. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 2018.
- Anbumani, S.; Kakkar, P. Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-24, 2018.
- Andrady, A.L. Microplastics in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 1596-1605, 2011.
- Ashton, K.; Holmes, L.; Turner, A. Association of metals with plastic production pellets in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, p. 2050-2055, 2010.
- Atli, G.; Canli, M. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 1884-1889, 2010.
- 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**, v. 198, p. 211-222, 2015.
- Avio, C.G.; Gorbi, S.; Regoli, F. Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. **Marine Environmental Research**, v. 128, p. 2-11, 2017.
- Barboza, L.G.A.; Vieira, L.R.; Branco, V.; Figueiredo, N.; Carvalho, F.; Carvalho, C.; Guilhermino, L. Microplastics cause neurotoxicity, oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). **Aquatic Toxicology**, v. 195, p. 49-57, 2018.

- Barnes, D.K.; Galgani, F.; Thompson, R.C.; Barlaz, M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 364, p. 1985-1998, 2009.
- Beutler, E.; Durom, O.; Kelly, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-888, 1963.
- Blanchard, J.; Grosell, M. Copper toxicity across salinities from freshwater to seawater in the euryhaline fish *Fundulus heteroclitus*: is copper an ionoregulatory toxicant in high salinities? **Aquatic Toxicology**, v. 80, p. 131-139, 2006.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- Browne, M.A.; Dissanayake, A.; Galloway, T.S.; Lowe, D.M.; Thompson, R.C. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). **Environmental Science & Technology**, v. 42, p. 5026-5031, 2008.
- Browne, M.A.; Underwood, A.J.; Chapman, M.G.; Williams, R.; Thompson, R.C.; Van Franeker, J.A. Linking effects of anthropogenic debris to ecological impacts. **Proceedings Biological Sciences**, v. 282, p. 20142929, 2015.
- Camejo, G.; Wallin, B.; Enojärvi, M. Analyses of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In: Armstrong, D. **Free Radical and Antioxidants Protocols**. Humana Press: New Jersey, 1998. p. 377-387.
- Campana, M.A.; Panzeri, A.M.; Moreno, V.J.; Dulout, F.N. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 438, p. 155-161, 1999.
- Carrasco, K.R.; Tilbury, K.L.; Myres, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 47, p. 2123-2136, 1990.
- Carvalho, C.S.; Bernusso, V.A.; Fernandes, M.N. Copper levels and changes in pH induce oxidative stress in the tissue of curimbata (*Prochilodus lineatus*). **Aquatic Toxicology**, v. 167, p. 220-227, 2015.
- Carvalho, C.S.; Fernandes, M.N. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 151, p. 437-442, 2008.

Castañeda, R.A.; Avlijas, S.; Simard, M.A.; Ricciardi, A. Microplastic pollution in St. Lawrence River sediments. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 71, p. 1767-1771, 2014.

Cavalcante, D.G.S.M.; Martinez, C.B.R.; Sofia, S.H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 655, p. 41-46, 2008.

Cole, M.; Lindeque, P.; Fileman, E.; Halsband, C.; Galloway, T.S. The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. **Environmental Science & Technology**, v. 49, p. 1130-1137, 2015.

Cole, M.; Lindeque, P.; Halsband, C.; Galloway, T.S. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 2588-2597, 2011.

Conama, Resolução. 357, de 17 de março de 2005. **Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA**, v. 357, 2005.

Costa, J.R.M.A.; Mela, M.; Assis, H.C.D.S.; Pelletier, É.; Randi, M.A.F.; Ribeiro, C.A.O. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 82-88, 2007.

Davarpanah, E.; Guilhermino, L. Single and combined effects of microplastics and copper on the population growth of the marine microalgae *Tetraselmis chuii*. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 167, p. 269-275, 2015.

De Sá, L.C.; Luís, L.G.; Guilhermino, L. Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions. **Environmental Pollution**, v. 196, p. 359-362, 2015.

Ding, J.; Zhang, S.; Razanajatovo, R.M.; Zou, H.; Zhu, W. Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Pollution**, v. 238, p. 1-9, 2018.

Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, J.R.V.; Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

Eyckmans, M.; Celis, N.; Horemans, N.; Blust, R.; De Boeck, G. Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species. **Aquatic Toxicology**, v. 103, p. 112-120, 2011.

Fonte, E.; Ferreira, P.; Guilhermino, L. Temperature rise and microplastics interact with the toxicity of the antibiotic cefalexin to juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): Post-exposure predatory behaviour, acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation. **Aquatic Toxicology**, v. 180, p. 173-185, 2016.

Gilmour, K.M.; Perry, S.F. Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, p. 1647-1661, 2009.

Govindaraju, M.; Shekar, H.S.; Sateesha, S.B.; Raju, P.V.; Rao, K.S.; Rao, K.S.J.; Rajamma, A. J. Copper interactions with DNA of chromatin and its role in neurodegenerative disorders. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, p. 354-359, 2013.

Gravato, C.; Teles, M.; Oliveira, M.; Santos, M.A. Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla anguilla* L.–the influence of pre-exposure to β -naphthoflavone. **Chemosphere**, v. 65, p. 1821-1830, 2006.

Grosell, M.; Wood, C.M. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, p. 1179-1188, 2002.
Holmes, L.A.; Turner, A.; Thompson, R.C. Interactions between trace metals and plastic production pellets under estuarine conditions. **Marine Chemistry**, v. 167, p. 25-32, 2014.

Horton, A.A.; Walton, A.; Spurgeon, D.J.; Lahive, E.; Svendsen, C. Microplastic in freshwater and terrestrial environments. Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 127-141, 2017.

Hwang, P.P.; Lee, T.H.; Lin, L.Y. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology Impact Factor**, v. 301, p. 28-47, 2011.

Kienzler, A.; Bony, S.; Devaux, A. DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: a review. **Aquatic Toxicology**, v. 134, p. 47-56, 2013.

Lee, R.F.; Steinert, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 544, p. 43-64, 2003.

Li, J.; Liu, H.; Chen, J.P. Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. **Water Research**, v. 137, p. 362-374, 2018.

Linder, M.C.; Wooten, L.; Cerveza, P.; Cotton, S.; Shulze, R.; Lomeli, N. Copper transport. **The American journal of Clinical Nutrition**, v. 67, p. 965S-971S, 1998.

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. **Environmental Science & Technology**, v. 50, p. 4054-4060, 2016.

Luís, L.G.; Ferreira, P.; Fonte, E.; Oliveira, M.; Guilhermino, L. Does the presence of microplastics influence the acute toxicity of chromium (VI) to early juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*)? A study with juveniles from two wild estuarine populations. **Aquatic Toxicology**, v. 164, p. 163-174, 2015.

Lusher, A. Microplastics in the marine environment: distribution, interactions and effects. In: **Marine Anthropogenic Litter**. Springer: Cham, 2015. p. 245-307.
McCormick, S.D. Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na⁺, K⁺-ATPase activity. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 50, p. 656-658, 1993.

Mazon, A.F.; Fernandes, M.N. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 63, 797-804, 1999.

Muenmee, S.; Chiemchaisri, W.; Chiemchaisri, C. Microbial consortium involving biological methane oxidation in relation to the biodegradation of waste plastics in a solid waste disposal open dump site. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 102, p. 172-181, 2015.

Muranli, F.D.G.; Güner, U. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 726, p. 104-108, 2011.

Nadella, S.R.; Grosell, M.; Wood, C.M. Mechanisms of dietary Cu uptake in freshwater rainbow trout: evidence for Na-assisted Cu transport and a specific metal carrier in the intestine. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 177, p. 433-446, 2007.

Oliveira, M.; Ribeiro, A.; Hylland, K.; Guilhermino, L. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). **Ecological Indicators**, v. 34, p. 641-647, 2013.

Paquin, P.R.; Santore, R.C.; Wu, K.B.; Kavvadas, C.D.; Di Toro, D.M. The biotic ligand model: a model of the acute toxicity of metals to aquatic life. **Environmental Science & Policy**, v. 3, p. 175-182, 2000.

Paschoalini, A.L.; Savassi, L.A.; Arantes, F.P.; Rizzo, E.; Bazzoli, N. Heavy metals accumulation and endocrine disruption in *Prochilodus argenteus* from a polluted neotropical river. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 539-550, 2019.

PlasticsEurope. Plastics – the Facts 2017: An analysis of European plastics production, demand and waste data. **PlasticsEurope**, 2017.

Polakof, S.; Panserat, S.; Soengas, J.L.; Moon, T.W. . Glucose metabolism in fish: a review. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 182, p. 1015-1045, 2012.

Ptashynski, M.D.; Pedlar, R.M.; Evans, R.E.; Baron, C.L.; Klaverkamp, J. F. Toxicology of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). **Aquatic Toxicology**, v. 58, p. 229-247, 2002.

Rainieri, S.; Conlledo, N.; Larsen, B.K.; Granby, K.; Barranco, A. Combined effects of microplastics and chemical contaminants on the organ toxicity of zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental research**, v. 162, p. 135-143, 2018.

Ribeiro, F.; Garcia, A.R.; Pereira, B.P.; Fonseca, M.; Mestre, N.C.; Fonseca, T.G.; Bebianno, M.J. Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 122, p. 379-391, 2017.

Silva, A.O.F.; Martinez, C.B.R. Acute effects of cadmium on osmoregulation of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*: Enzymes activity and plasma ions. **Aquatic Toxicology**. v. 156, p. 161-168, 2014.

Simonato, J.D.; Mela, M.; Doria, H.B.; Guiloski, I.C.; Randi, M.A.; Carvalho, P.S.; Meletti, P.C.; Assis, H.C.S.; Bianchini, A.; Martinez, C.B. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 31-41, 2016.

Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E. L. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1998.

Strungaru, S.A.; Jijie, R.; Nicoara, M.; Plavan, G.; Faggio, C. Micro-(nano) plastics in freshwater ecosystems: Abundance, toxicological impact and quantification methodology. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 110, p. 116-128, 2019.

Syberg, K.; Khan, F.R.; Selck, H.; Palmqvist, A.; Banta, G.T; Daley, J.; Sano, L.; Duhaime, M.B. Microplastics: addressing ecological risk through lessons learned. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, p. 945-953, 2015.

Tosetto, L.; Williamson, J.E.; Brown, C. Trophic transfer of microplastics does not affect fish personality. **Animal Behaviour**, v. 123, p. 159-167, 2017.

Ueda, T.; Hayashi, M.; Ohtsuka, Y.; Nakamura, T.; Kobayashi, J.; Sofuni, T. A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. **Water Science and Technology**, v. 25, p. 235-240, 1992.

Van Der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

- Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Lunardelli, B., de Oliveira, L. F., da Costa Cabrera, L., Risso, W. E.; Primel, E.G.; Meletti, P.C.; Fillmann, G.; Martinez, C. B.R. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 542, p. 44-56, 2016.
- Vieira, L.R.; Gravato, C.; Soares, A.M.V.M.; Morgado, F.; Guilhermino, L. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. **Chemosphere**, v. 76, p. 1416-1427, 2009.
- Vijayavel, K.; Gopalakrishnan, S.; Balasubramanian, M.P. Sublethal effect of silver and chromium in the green mussel *Perna viridis* with reference to alterations in oxygen uptake, filtration rate and membrane bound ATPase system as biomarkers. **Chemosphere**, v. 69, p. 979-986, 2007.
- Vitale, A.M.; Monserrat, J.M.; Castilho, P.; Rodriguez, E.M. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 122, p. 121-129, 1999.
- Vutukuru, S.S.; Chintada, S.; Madhavi, K.R.; Rao, J.V.; Anjaneyulu, Y. Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish, *Esomus danricus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 32, p. 221-229, 2006.
- Waller, C.L.; Griffiths, H.J.; Waluda, C.M.; Thorpe, S.E.; Loaiza, I.; Moreno, B.; Pacherres, C.O.; Hughes, K.A. Microplastics in the Antarctic marine system: an emerging area of research. **Science of the Total Environment**, v. 598, p. 220-227, 2017.
- Watts, A.J.; Lewis, C.; Goodhead, R.M.; Beckett, S.J.; Moger, J.; Tyler, C.R.; Galloway, T.S. Uptake and retention of microplastics by the shore crab *Carcinus maenas*. **Environmental Science & Technology**, v. 48, p. 8823-8830, 2014.
- Watts, A.J.; Urbina, M.A.; Goodhead, R.; Moger, J.; Lewis, C.; Galloway, T.S. Effect of microplastic on the gills of the shore crab *Carcinus maenas*. **Environmental Science & Technology**, v. 50, p. 5364-5369, 2016.
- Windsor, F.M.; Tilley, R.M.; Tyler, C.R.; Ormerod, S.J. Microplastic ingestion by riverine macroinvertebrates. **Science of the Total Environment**, v. 646, p. 68-74, 2019.
- Yu, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, p. 139-162, 1994.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho mostram que o MP é um contaminante capaz de causar efeitos toxicológicos em *P. lineatus*, tanto isolado como quando em combinação com o Cu. A exposição simultânea ao MP e Cu promoveu um efeito sinérgico apenas quanto a concentração de Ca^{2+} plasmático, resultando em um decréscimo maior na concentração de Ca^{2+} plasmático em peixes expostos à mistura quando comparados aos peixes expostos aos contaminantes isolados. A presença de MP não interferiu na concentração de Cu nos tecidos analisados. Danos no DNA foram observados nos diferentes tratamentos, no entanto, danos no DNA causados pela exposição ao MP foram atribuídos principalmente à formação de ERO, danos no DNA causados pela Cu foram associados especialmente à ação direta do metal na molécula de DNA.

Recentemente a presença de MP em corpos de água tem sido motivo de preocupação e os estudos que avaliam os seus efeitos em organismos de água doce ainda são escassos, principalmente quando se trata de estudos com espécies neotropicais. Diante disso, o presente trabalho contribui com informações relevantes sobre a capacidade do MP em promover danos genotóxicos em eritrócitos e células hepáticas, interferir na osmo e ionorregulação, reduzir a atividade enzimática da Ca^{2+} -ATPase e alterar a concentração plasmática da glicose em uma espécie de peixe de água doce. Tais efeitos ainda não haviam sido documentados para peixes dulcícolas, sendo necessário mais estudos que corroborem para avaliação da contaminação aquática por MP.