Universidade Estadual de Londrina

JÉSSICA FERNANDA BERNARDES RODA

ECOTOXICIDADE DOS MICROPLÁSTICOS (ISOLADO E COMBINADOS COM O COBRE) EM DISTINTAS ESPÉCIES DE ANIMAIS DULCÍCOLAS

Londrina
2023

JÉSSICA FERNANDA BERNARDES RODA

ECOTOXICIDADE DOS MICROPLÁSTICOS (ISOLADO E COMBINADOS COM O COBRE) EM DISTINTAS ESPÉCIES DE ANIMAIS DULCÍCOLAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez.

Londrina
2023

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

R685e Roda, Jéssica Fernanda Bernardes.
Ecotoxicidade dos microplásticos (isolado e combinados com o cobre) em distintas espécies de animais dulcícolas / Jéssica Fernanda Bernardes Roda. - Londrina, 2023.
127 f. : il.

Orientador: Claudia Bueno dos Reis Martinez.
Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Ecotoxicologia aquática - Tese. 2. Biomarcadores - Tese. 3. Poluentes - Tese. 4. Microplásticos - Tese. I. Martinez, Claudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 574

JÉSSICA FERNANDA BERNARDES RODA

ECOTOXICIDADE DOS MICROPLÁSTICOS (ISOLADO E COMBINADOS COM O COBRE) EM DISTINTAS ESPÉCIES DE ANIMAIS DULCÍCOLAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito obrigatório à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

_____
Orientador: Prof ª Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina – UEL

_____
Prof. Dr. Carlos Eduardo Delfino Vieira
Universidade da São Paulo - USP

_____
Prof. Dr. Guilherme Malafaia Pinto
Instituto Federal de Goiás - IFG

_____
Prof ª Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha
Universidade Estadual de Londrina – UEL

_____
Prof ª Dra. Marta Marques de Souza
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Londrina, 15 de dezembro de 2023.

201913090007

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Discente: Jéssica Fernanda Bernardes Roda

Título: Ecotoxicidade dos microplásticos (isolado e combinados com o cobre) em distintas espécies de animais dulcícolas

Data da Defesa: 15 de dezembro de 2023 – 13:00hs, por via remota (Google Meet)

Banca Examinadora

PRESIDENTE:

Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez -UEL

TITULARES:

Dr. Carlos Eduardo Delfino Vieira – USP
Dr. Guilherme Malafaia Pinto – IFG
Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha – UEL
Dra. Marta Marques de Souza – FURG

PARECER	
APROVADO	**REPROVADO**
X	
X	
X	
X	
X	

Parecer Final APROVADA

[redacted]
Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez

[redacted]
Dr. Carlos Eduardo Delfino Vieira

gov.br Documento assinado digitalmente
GUILHERME MALAFAIA PINTO
Data: 15/02/2024 17:37:50-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br
Dr. Guilherme Malafaia Pinto

[redacted]
Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha

[redacted]
Dra. Marta Marques de S

Ao *Ricardo*, meu parceiro de vida, por todo apoio e por ter me alimentado nos dias em que eu não consegui parar nem mesmo para fazer o básico!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à Deus, pela vida e por cuidar do caminho que segui trilhar. Pelas pessoas incríveis que Ele colocou na minha jornada, e que tornaram tudo mais leve.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB), a Universidade Estadual de Londrina (UEL) e a todos os professores que fizeram parte da minha formação. Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

À profa. Dra. Claúdia Bueno dos Reis Martinez por ter me aceito no LEFA mesmo sem me conhecer, encarando o desafio de me orientar no mestrado e no doutorado. Obrigada pela oportunidade que moldou a pessoa que sou hoje, por todos os ensinamentos científicos e ensinamentos da vida que levarei para sempre, com muito carinho. Prof, você é um grande exemplo para nós como professora e pesquisadora fantástica que é, tenho muito orgulho de ter sido sua orientada. Muito obrigada por tudo!

Aos membros da banca da examinadora, prof. Dr. Carlos Eduardo Delfino Vieira, prof. Dr. Guilherme Malafaia, profa. Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha e profa. Dra. Marta Marques de Souza, pela disponibilidade em colaborar com o nosso trabalho. Agradeço também, aos membros da banca da qualificação, profa. Dra. Caroline Santos, profa. Dra. Luciana Fernandes de Oliveira e prof. Dr. Paulo Cesar Meletti pelas contribuições ao trabalho.

Ao pesqueiro Toca do Jacaré (Londrina, PR) e ao pesqueiro Acqua Norte (Cambará, PR) pelo fornecimento dos animais.

Ao prof. Dr. Paulo Meletti por disponibilizar o Bioensaio com sistema de recirculação, nos ensinar e permitir que trabalhássemos com os *Danio rerio*.

Agradeço a profa. Dra. Juliana Simonato pelo apoio e pelas palavras de conforto quando parecia que tudo ia desabar.

Ao Dr. Wagner Ezequiel Risso, vulgo Wagnão, técnico de laboratório do LEFA, obrigada por toda ajuda como as minhas amostragens, análises e por estar sempre presente quando precisei.

Ao Dr. Marcos Letaif Gaeta e prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior pela parceria e disponibilidade em analisar nossas amostras no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

Ao prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto e ao Dr. Lucas Bragança Carvalho pela parceria e análises da caracterização do microplástico.

Aos amigos Angélica, Tiago, Carol, Millena, Mari Lauer e Jheimison, que fizeram parte de toda a minha jornada e que foram responsáveis por tonar meus dias no LEFA mais coloridos. Obrigada por toda ajuda com as inúmeras análises e amostragens e também por manterem a minha sanidade. Vocês são especiais e tem um lugarzinho no meu coração.

Aos amigos do LEFA Will, Milena, Carol e Raquel por toda ajuda com os experimentos e pela disponibilidade sempre que precisei. Vocês são o Futuro do LEFA, assumam com carinho e responsabilidade. Que vocês fortaleçam a amizade e a parceria que é tão importante durante o nosso processo.

Aos amigos Outliers Jamille, Felipe, Heloisa, Jaiana, Letícia, João, Ephraim e Iago que tive a honra de conhecer na disciplina Bio de Campo e que tornaram meus dias na pós mais felizes.

Às amigas (os) Jéssica, Mari, Ana, Mo, Lud, Jhotinha e Tiago pela amizade e companheirismo nesses anos. Eu amo vocês.

Aos amigos de Maringá Thaisa, Marco, Dani, Chales, Fer e Ruzzi pela parceria e apoio. Vocês tornaram a minha vinda pra Maringá mais feliz.

Agradeço a minha equipe doTERRA, principalmente a Clara, Luciana e Tati por suportarem o processo e segurarem as pontas enquanto eu estive ausente. Também quero agradecer aos meus líderes por todo apoio e por me mostrar onde eu sou capaz de chegar. Muito obrigada!

Ao Ricardo, meu parceiro de vida, parceiro de negócios e que me apoio em cada decisão e empreitadas que eu invento participar. Obrigada por ter se tornado a pessoa essa pessoa incrível que cuida de mim e está comigo em todos os momentos. Te amo!

Agradeço a minha família, em especial meus pais Rose e Marcos, vó Lia, vô Toninho, minha irmã Amanda e aos meus sobrinhos amados Neto e Ravi, tia Lê, tio Frik, Analu, Nasser e tia Maria, e minha segunda família Márcia, Débora e Antônio Carlos, por todo amor e apoio durante esses anos.

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

"This study was financed in part by the Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001".

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

Cora Coralina

RODA, Jéssica Fernanda Bernardes. **Ecotoxicidade dos microplásticos (isolado e combinados com o cobre) em distintas espécies de animais dulcícolas**. 2023. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

Os microplásticos (MP < 5 mm) são poluentes emergentes amplamente encontrados no ambiente aquático. Os rios são os principais responsáveis pelo transporte dos MPs do ambiente terrestre até os oceanos. Além de causar efeitos toxicológicos para organismos aquáticos, os MPs são capazes de adsorver outros xenobióticos, como o cobre (Cu), influenciando na biodisponibilidade e toxicidade do metal. Os efeitos dos poluentes podem variar de acordo com as características de cada espécie, além de variar quanto aos seus hábitos alimentares, sexo, tamanho e desenvolvimento ontogenético. Pensando nisso, para este estudo foram escolhidos três organismos modelos: i) embrião de *Danio rerio*; ii) o peixe neotropical *Prochilodus lineatus*, uma espécie com hábitos; iii) o bivalve *Anodontites trapesialis*, uma espécie nativa encontrada em bacias hidrográficas e tanques de pisciculturas próximos aos centros urbanos. Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos da exposição aguda (96 h) ao microplástico isolado e de sua associação ao cobre nos embriões de *D. rerio*, em juvenis de *P. lineatus* e no molusco *A. trapesialis* a partir da análise de múltiplos biomarcadores. As três espécies foram distribuídas em quatro grupos e expostas apenas à água desclorada (CTR) ou aos poluentes isolados (20 µg L^{-1} de MP e 10 µg L^{-1} de Cu) e em mistura (20 µg L^{-1} de MP+10 µg L^{-1} de Cu). Após as exposições, nos embriões foi observado a afinidade do MP ao córion embrionário e diminuição da frequência cardíaca (MP e MP+Cu), diminuição da taxa de eclosão e aumento da concentração de Cu nos tecidos (Cu e MP+Cu). A exposição do peixe *P. lineatus* acarretou no acúmulo de metal nas brânquias e no músculo (Cu e MP+Cu), alterações nos parâmetros hematológicos, iônicos e metabólicos (Cu e MP+Cu), alterações na atividade das defesas antioxidantes (Cu), aumento de danos oxidativos (MP+Cu) e genotóxicos (MP, Cu e MP+Cu). Já a exposição dos bivalves *A. trapesialis* resultou na alteração dos parâmetros iônicos (MP+Cu) e metabólicos (Cu e MP+Cu), alteração nas defesas antioxidantes não enzimáticas (MP+Cu), aumento de danos oxidativos (MP, Cu e MP+Cu) e danos no DNA (MP e MP+Cu) e neurotoxicidade (Cu e MP+Cu). As partículas de MPs apresentaram efeito toxicológico nos três organismos de água doce estudados. Ainda, o MP demonstrou potencial interação com o cobre, um metal presente no ambiente aquático e amplamente estudado na toxicologia. Os efeitos observados sugerem, predominantemente, uma possível interação sinérgica, resultando no aumento da toxicidade dos poluentes quando em mistura.

Palavras-chave: Biomarcadores; *Anodontites trapesialis; Danio rerio; Prochilodus lineatus;* estresse oxidativo.

RODA, Jéssica Fernanda Bernardes. **Ecotoxicity of microplastics (isolated and combined with copper) in different freshwater animal species**. 2023. 127 p. Thesis (Doctorate degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

ABSTRACT

Microplastics (MP < 5 mm) are emerging pollutants widely found in the aquatic environment. Rivers are the main carriers of MPs from the terrestrial environment to the oceans. Apart from causing toxicological effects on aquatic organisms, MPs can adsorb other xenobiotics, such as copper (Cu), influencing the bioavailability and toxicity of the metal. The effects of pollutants can vary according to the characteristics of each species, including their feeding habits, sex, size, and ontogenetic development. With this in mind, three model organisms were chosen for this study: i) *Danio rerio* embryos; ii) the neotropical fish *Prochilodus lineatus*, a species with benthic habits; iii) the bivalve *Anodontites trapesialis*, a native species found in hydrographic basins and fish farming tanks near urban centers. Thus, this work aimed to evaluate the effects of acute exposure (96 h) to isolated microplastics and their association with copper in *D. rerio* embryos, *P. lineatus* juveniles, and *A. trapesialis* mollusks through the analysis of multiple biomarkers. The three species were distributed into four groups and exposed only to dechlorinated water (CTR) or isolated pollutants (20 μg L^{-1} of MP and 10 μg L^{-1} of Cu) and in a mixture (20 μg L^{-1} of MP+10 μg L^{-1} of Cu). Following the exposures, in embryos, MP affinity to the embryonic chorion was observed along with decreased heart rate (MP and MP+Cu), decreased hatching rate, and increased Cu concentration in tissues (Cu and MP+Cu). Exposure of *P. lineatus* resulted in metal accumulation in the gill and muscle (Cu and MP+Cu), alterations in hematological, ionic, and metabolic parameters (Cu and MP+Cu), changes in antioxidant defense activity (Cu), increased oxidative (MP+Cu), and genotoxic damage (MP, Cu, and MP+Cu). Exposure of *A. trapesialis* led to changes in ionic (MP+Cu) and metabolic parameters (Cu and MP+Cu), alterations in non-enzymatic antioxidant defenses (MP+Cu), increased oxidative damage (MP, Cu, and MP+Cu), DNA damage (MP and MP+Cu), and neurotoxicity (Cu and MP+Cu). The particles of MPs showed toxicological effects on the three studied freshwater organisms. Furthermore, the MP demonstrated potential interaction with copper, a metal present in the aquatic environment and widely studied in toxicology. The observed effects predominantly suggest a possible synergistic interaction, resulting in increased toxicity of pollutants when mixed.

Key-words: Biomarkers; *Anodontites trapesialis*, *Danio rerio*, *Prochilodus lineatus*; Oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	acetilcolinestese
AFM	Microscopia de Força Atômica
ATP	adenosina trifosfato
BOD	demanda bioquímica de oxigênio
Bpm	batimentos por minuto
$CaCl_2$	cloreto de cálcio
$CaCO_3$	carbonato de cálcio
CAT	catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
Céls	células
CL_{50}	concentração letal média
CO_2	dióxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CTR	controle
Cu	cobre
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DTNB	5,5’-ditiobis-ácido-nitrobenzóico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
Em	emissão
EPA	Agência de Proteção Animal
ERO	espécies reativas de oxigênio
Ex	excitação
FET	Toxicidade Aguda em Embriões de Peixes
GPX	glutationa peroxidase
GSH	glutationa
GST	glutationa S-transferase
H_2O	água
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
Hb	hemoglobina
Hct	hematócrito

Hg	mercúrio
HNO_3	ácido nítrico
HPAs	hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
Hpf	horas pós fertilização
Hz	hertz
K^+	potássio
KCl	cloreto de potássio
KDa	unidade de massa atômica
LEFA	Laboratório de Ecofisiologia Animal
LEMM	Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise
L-MPP	grandes partículas microplásticas
LPO	lipoperoxidação ou peroxidação lipídica
MDA	malondialdeído
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
$MgSO_4$	sulfato de magnézio
MP	Microplástico
MPs	Microplásticos
MP + Cu	mistura de microplástico + cobre
mS cm^{-1}	milliSiemens por centímetro
MT	metalotioneína
MXR	multixenobióticos
Na^+	sódio
NaCl	cloreto de sódio
NAD^+	nicotinamida adenina dinucleotídeo
$NaHCO_3$	bicarbonato de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NTU	unidade nefelométrica de turbidez
O_2	oxigênio
ºC	graus celsius
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PA	poliamida
PCBs	bifenilas policloradas
PCO	proteínas carboniladas
PE	polietileno

PET	polietileno tereftalato
pH	potencial hidrogeniônico
POPs	poluentes orgânicos persistentes
PP	polipropileno
ppm	partículas por milhões
PS	poliestireno
PVC	policloreto de vinil
PYR	pireno
RBC	número de eritrócitos
RNA	ácido ribonucleico
SBF	soro bovino fetal
S-MPP	pequenas partículas microplásticas
SOD	superóxido dismutase
sp	espécie
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
UEL	Universidade Estadual de Londrina
ZET	*The zebrafish embryotoxicity test*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 19
1.1 Contextualização 19
1.2 Justificativa 27
1.3 Hipóteses 28
1.4 Objetivos 28
1.4.1 Objetivo geral 28
1.4.2 Objetivos específicos 29

REFERÊNCIAS 30

MANUSCRITO I 37

1 INTRODUÇÃO 39

2 MATERIAL E MÉTODOS 41
2.1 Delineamento experimental e exposição aos poluentes 41
2.2 Determinação do cobre no meio de exposição 43
2.3 Acúmulo de cobre nas larvas 43
2.4 Caracterização do microplástico 44
2.4.1 Microscopia de força atômica (AFM) 44
2.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 44
2.4.3 Detecção do microplástico por fluorescência no córion embrionário e em larvas 44
2.4.4 Avaliação ultraestrutural do córion dos embriões e superfície das larvas 45
2.5 Biomarcadores de toxicidade 45
2.5.1 Teste de Embriotoxicidade do *Zebrafish* - ZET 45
2.5.2 Danos no DNA - ensaio cometa realizado em condições alcalinas 45
2.6 Análise estatística 46

3 RESULTADOS 46

3.1 **Concentração de cobre na água** 46
3.2 **Caracterização e interação do microplástico** 47
3.2.1 Micrografias por microscopia de força atômica 47
3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura 48
3.2.3 Interação do microplástico na superfície do córion embrionário e larvas 50
3.3 **Teste de embriotoxicidade do *Zebrafish* - ZET** 51
3.3.1 Taxa de mortalidade e eclosão 51
3.3.2 Formação de somito, alterações morfológicas e desprendimento da cauda 51
3.3.3 Cardiotoxicidade 52
3.4 **Acumulação de cobre nas larvas** 52
3.5 **Genotoxicidade** 53

4 **DISCUSSÃO** 54

5 **CONCLUSÃO** 58

REFERENCIAS 59

MANUSCRITO II 66

1 **INTRODUÇÃO** 68

2 **MATERIAL E MÉTODOS** 71
2.1 ***Prochilodus lineatus*** 71
2.2 **Delineamento experimental** 71
2.3 **Amostragem** 72
2.4 **Quantificação de cobre** 73
2.4.1 Amostras de água 73
2.4.2 Amostras de tecido de *P. lineatus* 73
2.5 **Caracterização do microplástico - microscopia eletrônica de varredura** 73
2.6 **Biomarcadores fisiológicos** 74

2.6.1 Análises hematológicas 74
2.6.2 Análises plasmáticas 74
2.6.3 Glicogênio 74
2.7 Biomarcadores bioquímicos 75
2.7.1 Glutationa S-transferase 75
2.7.2 Catalase 75
2.7.3 Glutationa 75
2.7.4 Lipoperoxidação 75
2.7.5 Proteína Carbonilada 76
2.8 Biomarcador genotóxico – ensaio cometa alcalino 76
2.9 Análise Estatística 77

3 RESULTADOS 77
3.1 Caracterização do microplástico - microscopia eletrônica de varredura 77
3.2 Concentração de cobre na água 78
3.3 Acúmulo de cobre nos tecidos 79
3.4 Biomarcadores fisiológicos 79
3.5 Biomarcadores Bioquímicos 81
3.6 Biomarcador Genotóxico 82

4 DISCUSSÃO 83

5 CONCLUSÃO 88

REFERÊNCIAS 89

MANUSCRITO III 96

1 INTRODUÇÃO 98

2 MATERIAL E MÉTODOS 100
2.1 *Anodontites trapesialis* – coleta e aclimatação 100
2.2 Delineamento experimental 101

2.3 **Quantificação de cobre** ... 102
2.3.1 Amostras de água ... 102
2.3.2 Amostras de tecido de *A. trapesialis* ... 102
2.4 **Biomarcadores fisiológicos** ... 102
2.4.1 Análises na hemolinfa ... 102
2.4.2 Glicogênio ... 103
2.5 **Biomarcadores bioquímicos** ... 103
2.5.1 Glutationa S-transferase ... 103
2.5.2 Catalase ... 103
2.5.3 Concentração de glutationa ... 104
2.5.4 Lipoperoxidação ... 104
2.5.5 Proteína carbonilada ... 104
2.6 **Biomarcador genotóxico – ensaio cometa alcalino** ... 104
2.7 **Biomarcador de neurotoxicidade – acetilcolinesterase** ... 105
2.8 **Análise estatística** ... 106

3 **RESULTADOS** ... 106
3.1 **Concentração de cobre no meio de exposição** ... 106
3.2 **Bioacumulação de cobre no tecido** ... 107
3.3 **Parâmetros fisiológicos** ... 108
3.4 **Defesas antioxidantes** ... 109
3.5 **Dano oxidativo** ... 110
3.6 **Danos genotóxicos** ... 111
3.7 **Atividade da acetilcolinesterase (AChE)** ... 112

4 **DISCUSSÃO** ... 112

5 **CONCLUSÃO** ... 117

REFERÊNCIAS ... 119

CONSIDERAÇÕES FINAIS ... 126

APRESENTAÇÃO

A tese está redigida na forma de manuscritos, de acordo com as normas aceitas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina – UEL. No início está apresentada uma **Introdução Geral**, contextualizando o tema abordado pela autora, com ênfase em contaminação aquática por microplástico e cobre, biomarcadores de contaminação aquática, modelos biológicos estudados, justificativas, hipóteses e objetivos e referencias. Em seguida, serão apresentados três capítulos com manuscritos abordando cada um, um modelo biológico distinto. O **Capítulo I** refere-se aos experimentos com embriões de *Danio rerio*, que gerou o manuscrito intitulado "**Toxicidade de microplástico isolado e associado ao cobre para embrião de *Danio rerio***", no qual estão apresentados os efeitos dos poluentes no desenvolvimento dos embriões e a afinidade do microplástico ao córion embrionário. O **Capítulo II** refere-se ao manuscrito com o peixe *Prochilodus lineatus* intitulado "**Efeitos toxicológicos do microplástico e do cobre em uma espécie de teleósteo de água doce**" apresentando os efeitos à exposição aos poluentes em diferentes biomarcadores, além da interação entre eles. Já no **Capítulo III** consta o manuscrito com o bivalve *Anodontites trapesialis* intitulado "**Respostas de biomarcadores no bivalve dulcícola *Anodontites trapesialis* após exposições isoladas e combinadas ao microplástico e cobre**", com os principais resultados ecotoxicológicos após exposição dos indivíduos aos poluentes. Por fim, são apresentadas as considerações finais integrando os resultados do trabalho proposto com a sua relevância e sugestões futuras.

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A poluição por plástico, principalmente por partículas menores que 5 mm (microplásticos - MP), tornou-se um grave problema ambiental, pois está atingindo globalmente os ecossistemas aquáticos, até mesmo os habitats mais remotos, despertando assim o interesse dos pesquisadores que visam a proteção dos ambientes aquáticos (WANG et al., 2020). A produção global de plástico em 2021 chegou a 390,7 milhões de toneladas (PLASTICS EUROPE, 2022), sendo grande parte de todo lixo plástico descartado de forma incorreta e encontrando-se acumulado em aterros sanitários e no ambiente natural (GEYER et al., 2017), onde tornam-se biodisponíveis para organismos de diferentes níveis tróficos (CASTRO-CASTELLON et al., 2023; KALČÍKOVÁ, 2023).

Os microplásticos são classificados de acordo com o seu tamanho, composição, forma e origem se diferenciando em dois tipos: MP primário (Fig. 1A) e MP secundários (Fig. 1B). Os MPs primários são aqueles que de acordo com as aplicações, são produzidos para utilização como abrasivo em aplicações industriais, produtos de higiene pessoal e cosméticos, esfoliantes, fármacos, produtos da industrial têxtil, entre outros (FENDALL; SEWELL, 2009; COLE et al., 2011; CASTAÑEDA et al., 2014; ALOMAR et al., 2016). Já os MPs secundários são aqueles advindos da degradação de itens plásticos maiores, que tiveram seu tamanho reduzido por fragmentação, fragilização ou fotodegradação (BARNES et al., 2009; COLE et al., 2011; BOUCHER; FRIOT, 2017; LIN et al., 2023).

Dentro da categoria dos MPs é considerado uma subdivisão de acordo com o tamanho: as grandes partículas microplásticas (L-MPP, 1 – 5 mm) e as pequenas partículas microplásticas (S-MPP, < 1 mm) (NAJI et al., 2019; LIM et al., 2022). Com relação ao formato dos MPs, existem as mais variadas formas como pellets, fibras, fragmentos irregulares e filmes (VETRIMURUGAN et al., 2020), de cores diversas como amarelo, verde, vermelho, azul, branco, preto, rosa, lilás, entre outros (CRAWFORD; QUINN, 2017). Quanto à composição polimérica os principais tipos são polietileno (PE), poliamida (PA), polipropileno (PP), polietileno tereftalato (PET) e poliestireno (PS) (LIN et al., 2023).

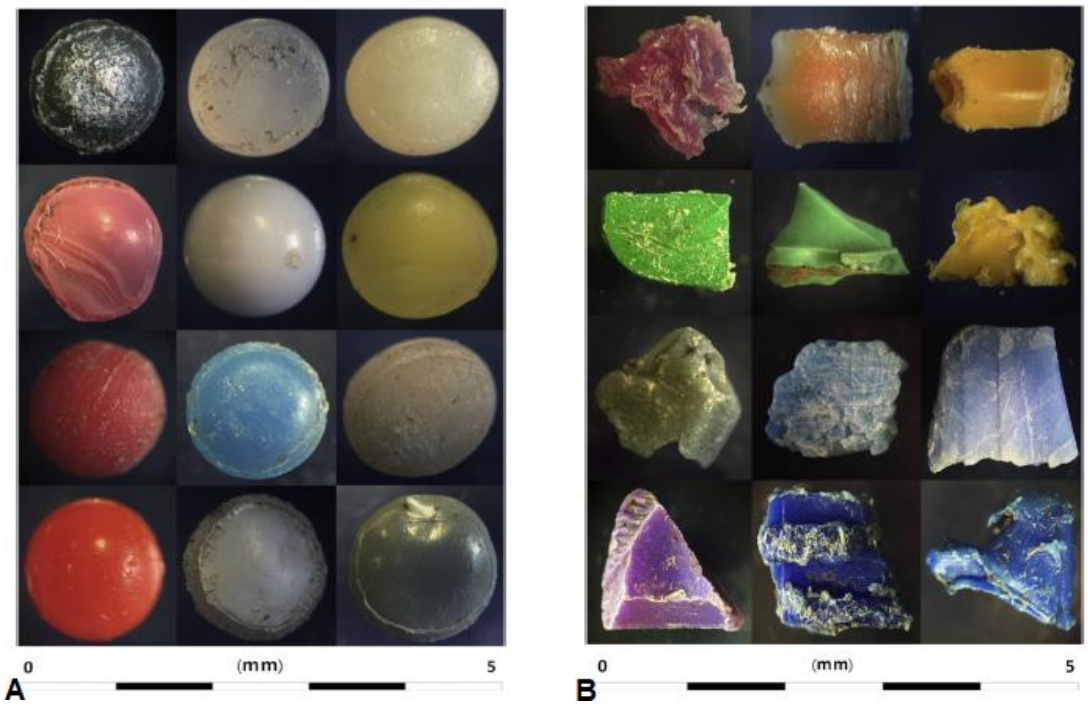

Figura 1 - Microplásticos recuperados do ambiente aquático. (A) Microplásticos primários. (B) Microplásticos secundários. Fonte: adaptado de Crawford; Quinn, 2017.

Os MPs são considerados poluentes emergentes onipresentes e encontram-se amplamente distribuídos em sistemas naturais de água como os rios, lagos, oceanos, regiões polares e em sistemas artificiais, como estações de tratamento de águas residuais e até mesmo na água potável (WANG et al, 2022). Ainda que 80% dos MPs marinhos sejam transportados pelos rios (ALIMI et al., 2018), muitos estudos restringiram-se a investigações no ambiente marinho, onde há muitos mais estudos envolvendo os organismos marinhos do que os dulcícolas (CASTRO-CASTELLON et al., 2022).

Quando no ambiente aquático, a biodisponibilidade e efeitos biológicos dos MPs podem variar de acordo com diferentes fatores como características da própria micropartícula, entre elas a densidade, o tamanho, a forma, a cor e o tipo do plástico (WRIGHT et al., 2013; CINCINELLI et al., 2019), bem como com atividades antropogênicas e fatores ambientais como a característica e qualidade da água ao qual se encontram (TALBOT; CHANG, 2022). Muitas vezes os organismos entram em contato com as micropartículas involuntariamente, ou de forma voluntária por meio da ingestão acidental e/ou por confundir os MPs com alimentos (TOSETTO, 2017). Em estudo anterior Jabeen et al. (2017) relataram a ingestão de MPs em aproximadamente 150 espécies de peixes, incluindo animais marinhos e dulcícolas. Já Zhang et al. (2020) relataram a presença de MPs ingeridos por mais de 690

espécies marinhas. A ingestão das micropartículas é influenciada pelo nível de poluição por plástico no local, além do hábito e estratégia alimentar de cada espécie (ROMEO et al., 2015; BATTAGLIA et al., 2016). Recentemente, um estudo realizado com 220 indivíduos pertencentes a 14 espécies em um rio urbano da Bacia do Alto Paraná, relatou a presença de microplástico no conteúdo alimentar de três espécies estudadas, *Astyanax fasciatus* (onívora), *Rhamdia quelen* (iliófagos) e *Hoplosternum littorale* (iliófagos) demonstrando que peixes dulcícolas de áreas urbanas são mais suscetíveis a exposição ao MP (OLIVEIRA et al., 2020).

Além do efeito toxicológico acarretado pela própria micropartícula, os MPs são capazes de adsorver outros compostos tóxicos, sendo considerado um vetor de poluentes orgânicos, como os poluentes orgânicos persistentes (POPs), agrotóxicos, bifenilas policloradas (PCBs) (AVIO et al., 2015; ARIAS et al., 2023; SUBARAMANIYAM et al., 2023; WANG et al., 2023), fármacos (HUANG et al., 2021b; SANTOS et al., 2021) e poluentes inorgânicos, como os metais (ASHTON et al., 2010; DAVARPANAH; GUILHERMINO, 2015; MARŠIĆ-LUČIĆ et al., 2018; TURNER, 2021), frequentemente alterando a biodisponibilidade e a toxicidade destes (SYBERG et al., 2015).

Entre os metais com afinidade ao MP encontra-se o cobre (Cu), que é um metal essencial para as funções biológicas, mas que em altas concentrações torna-se tóxico para a biota dulcícola devido à sua ação em reações de oxirredução (FLEMMING; TREVORS, 1989; KELLER et al., 2017). Sabe-se que o Cu, assim como outros metais, tem sua toxicidade relacionada às condições físicas e químicas da água que influenciam na sua biodisponibilidade (PAQUIN et al., 2000). Ainda, o Cu é um metal que possui característica de se aderir em partículas em suspensão (PAQUIN et al., 2000), bem como se aderir aos microplásticos (DAVARPANAH; GUILHERMINO, 2015). Os MPs podem atuar como um transportador de Cu, que após ser adsorvido podem ser liberados nos órgãos e tecidos, aumentando a toxidade do metal para os animais (CHEN et al., 2023). Em peixes dulcícolas, é sabido que o Cu pode se acumular em diferentes órgãos dos animais e acarretar efeitos fisiológicos como danos em proteínas, lipídeos, DNA e até mesmo nos tecidos, através da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) além de interferir na atividade de diferentes enzimas como anidrase carbônica, Na^+/K^+ - ATPase, citocromo C oxidase, superóxido dismutase, entre outras (MONTEIRO et al., 2009; SIMONATO et al., 2016; TESSER et al., 2020; DE PAULA et al., 2021; DE PAULA et al., 2022; SANTOS et al., 2022; LIAO et al., 2023).

As ERO também são formadas naturalmente durante a respiração celular e causam estresse oxidativo ao oxidar as biomoléculas. A principal causa de danos oxidativos em membranas celulares é a lipoperoxidação (LPO), que pode alterar a permeabilidade e a fluidez das membranas celulares, sendo uma das principais causas de lesões e morte celular (GIORGIO et al., 2007). Nas proteínas, o principal dano oxidativo é a carbonilação de proteína (PCO), que pode ser irreversível ou reversível dependendo do alvo e da forma de dano nos aminoácidos (TRACHOOTHAM et al., 2008). Já no DNA, pode induzir a danos oxidativos nas bases nitrogenadas, devido à oxidação direta dos ácidos nucleicos ou então resultar em quebra simples ou dupla das cadeias do DNA (AVIO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017). Sabe-se que o Cu e o MP podem causar danos no DNA através de danos oxidativos ocasionados pela formação de ERO (HAMED et al., 2021; SUN et al., 2021). Caso não ocorra reparo, as lesões podem acarretar injúrias, morte celular ou induzir mutações gênicas, sendo transmitidas a gerações futuras (BERRA et al., 2006). Os efeitos do MP em organismos aquáticos ainda são controversos. Segundo Huang et al. (2021a) a exposição de mexilhões *Perna perna* ao microplástico de PVC (0,1–1,0 µm; 0,125 g L^{-1}; 90 dias) não resultou em alterações significativas quanto a estresse oxidativo em lipídeos e no DNA. Por outro lado, Avio et al. (2015) relataram que a exposição de mexilhões *Mytilus galloprovincialis* ao MP (PE e PS; 20 g L^{-1}) isolado e em mistura com Pireno (PYR 50 µg L^{-1}) resultou no aumento de dano no DNA (MP PE) em hemócitos, diminuiu a atividade da acetilcolinesterase (MP-PE e MP-PS, MP-PE + PYR e MP-PS + PYR), mas não revelou variação na concentração de glutationa e nas atividades da glutationa S-transferases, catalase e na peroxidação lipídica.

Para combater as ERO e proteger as células dos danos oxidativos, os organismos aeróbicos desenvolveram um sistema de defesa antioxidante composto por moléculas antioxidantes, como a glutationa reduzida (GSH), e enzimas, entre elas a glutationa S-transferase (GST) e a catalase (CAT). A GST, juntamente com as enzimas do sistema de oxidases de função mista, também atua na biotransformação, que é um processo que visa a conversão de xenobióticos orgânicos lipossolúveis em compostos hidrossolúveis que podem ser mais facilmente excretados (VAN DER OOST et al., 2003). Na busca por neutralizar a produção de ERO e proteger as células de danos oxidativos, as CAT por sua vez, são mobilizadas para realizar a degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio ($2\ H_2O_2 \Rightarrow 2\ H_2O + O_2$) que não são prejudiciais ao organismo (CARVALHO et al., 2015). Em um estudo realizado com

o bivalve *Corbicula fluminea*, Oliveira et al. (2018b) observaram que após 8 dias de exposição ao MP (0,13 mg L^{-1}) + mercúrio (Hg: 30 µg L^{-1}) isolados e em mistura, os bivalves apresentaram aumento de danos oxidativos em lipídeos (MP, Hg e MP + Hg), redução na atividade de colinesterases (MP), aumento na atividade da CAT (Hg e MP + Hg) e aumento na atividade da GST (Hg).

Com relação a via metabólica, a glicólise é considerada uma via metabólica importante, processo em que a glicose é convertida em piruvato através de uma série de reações enzimáticas. O glicogênio armazenado nos tecidos também fornece substrato para a glicólise e para a via pentose fosfato, que é responsável pela produção da ribose-5-fosfato necessária para a síntese de RNA e DNA. Apesar do número de moléculas de ATP produzido pela glicólise ser muito menor do que pela fosforilação oxidativa, esta via é importante pois recicla NAD^+ ao produzir lactato quando a disponibilidade de oxigênio está diminuída. A fosforilação oxidativa, no entanto, é um processo dependente de oxigênio (CAMPBELL; FARRELL, 2006).

Considerando o exposto acima, fica claro que os organismos aquáticos estão expostos ao MP e ao Cu, assim como aos seus efeitos tóxicos. Embora os rios sejam considerados uma importante rota para o transporte de MP até os oceanos, o banco de dados sobre a ocorrência de MPs em rios e seus efeitos aos organismos ainda são escassos (WANG et al., 2017). Ainda, nem toda partícula plástica que chega aos corpos d'água dulcícola tem como destino final o ambiente marinho. Parte dos detritos plásticos são retidos por armadilhas de lixo, ou acabam se prendendo na vegetação às margens do rio ou submersos na água (KOOI et al., 2018), afetando o ecossistema e os organismos ali presente (BARBOZA et al., 2018).

A toxicidade do MP isolado ou em mistura com outros poluentes, como o Cu, e suas implicações para os organismos aquáticos, continuam a ser uma lacuna de conhecimento. As alterações toxicológicas causadas pela exposição aos poluentes podem ser avaliadas por meio de biomarcadores, que são importantes ferramentas capazes de fornecer informações relativamente precoces em resposta a um agente estressor, que normalmente não se apresentariam em um organismo com funções normais intactas, indicando mudanças desde níveis moleculares até a ecossistemas (VAN DER OOST et al., 2003; NIKINMAA, 2014).

Os efeitos causados pelos poluentes podem variar de acordo com as características de cada espécies, como o tamanho, o sexo e o desenvolvimento ontogenético. "Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test" (Organização para a

Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OECD 236), teste de toxicidade aguda em embriões de peixe, é um teste padronizado e normatizados, que tem sido amplamente realizado com embriões da espécie *Danio rerio* (Hamilton, 1822), a fim de determinar a toxicidade aguda dos poluentes ambientais que podem interferir no desenvolvimento dos organismos (OECD, 2013). A espécie *D. rerio*, popularmente conhecidos com *zebrafish* ou paulistinha, é um peixe tropical dulcícola, de origem sul Asiática, mundialmente conhecido na prática de aquarismo (BRIGGS, 2002; MEYERS, 2018; LOPES-FERREIRA, 2021). Os *D. rerio* são animais de pequeno tamanho (4 a 5 cm quando adultos), permitindo a acomodação de vários animais no biotério; com taxa de reprodução elevada, reproduzindo centenas de ovos em uma única desova; com ciclo de vida curto, atingindo a maturidade sexual em 3 a 6 meses; com embriões transparente, permitindo analisar o desenvolvimento embrionário ainda dentro do ovo; de rápido desenvolvimento embrionário (Fig. 2); de fácil manutenção em laboratório e baixo custo, quando comparado a outros modelos; e, as larvas com até 120 h pós fertilização (hpf) são consideradas modelos *in vitro* e não estão protegidas pela legislação de ética e bem-estar animal (SPENCE et al., 2008; LAMMER et al., 2009; LOPES-FERREIRA, 2021). Os embriões de *D. rerio* são excelentes organismos modelo para estudos toxicológicos, e o uso de embriões dessa espécie permite avaliar como o ambiente poluído pode interferir na reprodução e posteriormente na taxa de sobrevivência e desenvolvimento de embriões e larvas numa população.

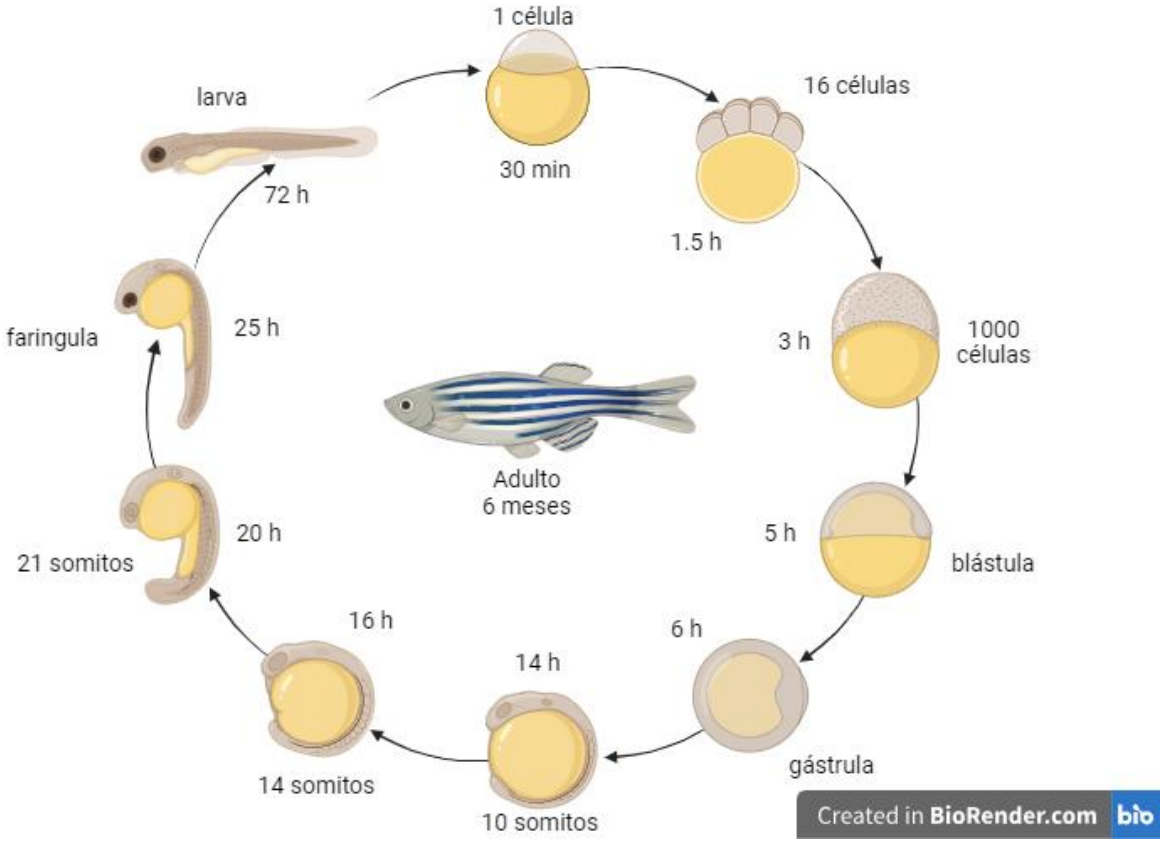

Figura 2 – Imagem ilustrativa dos estágios de desenvolvimento do peixe *Danio rerio*. Fonte: Jéssica Fernanda Bernardes Roda, Universidade Estadual de Londrina.

Entre os modelos biológicos mais utilizados em estudos sobre os efeitos do MP estão os peixes e os moluscos bivalves, porém a maioria destes são marinhos (DE SÁ et al., 2018). Os estudos em laboratório com animais de água doce ainda são escassos, principalmente quando se trata de estudos utilizando espécies nativas da América Latina (LÓPEZ ACA et al., 2018; CAMPOS et al., 2023). O teleósteo neotropical *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Fig. 3) popularmente conhecido como curimba ou curimbatá, é uma espécie de peixe dulcícola nativo. Tem sua localidade tipo no rio da Prata, Buenos Aires – Argentina, amplamente distribuído nas bacias dos rios Paraná e Paraíba do Sul (LAJMANOVICH et al., 2023), onde já foi detectado a presença de MP no conteúdo estomacal de outras espécies, indicando que esta problemática já está afetando a biota local (OLIVEIRA et al., 2020). Pertencentes a família Prochilodontidae, os *P. lineatus* são animais de piracema com hábitos migratórios, de médio a grande porte, com coloração prateada, corpo alto e fusiforme, lábios desenvolvidos e dentes pequenos (SHIBATTA et al., 2002). O peixe *P. lineatus* é uma espécie iliófaga bentônica de grande relevância ecológica e econômica, suscetível à contaminação presente no ambiente tanto por contato direto com a água

ou quanto por meio dos sedimentos (MARTINEZ; CÓLUS, 2002; LAJMANOVICH et al., 2023). Ainda, é considerado um bom modelo biológico para avaliação dos efeitos toxicológicos do MP e Cu por ser uma espécie nativa, de fácil manutenção no laboratório e sensível aos poluentes (MARTINEZ et al., 2004; RODA et al., 2020).

Figura 3 - Exemplar de *P. lineatus* Valenciennes, 1836. Fonte: José Luís Olivan Birindelli. Universidade Estadual de Londrina

O molusco bivalve *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) (Fig. 4A) pertence à família Mycetopodidae, é uma espécie nativa do Brasil, exclusiva da América do Sul. *A. trapesialis* vivem quase totalmente enterrados em fundo lodoso ou lodoso-arenoso (Fig. 4B), em rios, lagos e represas, em locais de poucas corredeiras, e se alimentam de partículas em suspensão (HEBLING, 1976). Quando jovens, vivem nas margens em locais mais rasos (10 cm), conforme vão se desenvolvendo, os animais se deslocam para locais mais profundos (80 cm). Embora sejam considerados animais sedentários, na época de seca, os bivalves se deslocam para locais com maiores níveis de água (HEBLING, 1976). Ainda que poucos estudos tenham utilizado os *A. trapesialis* em análises ecotoxicológicas, esta espécie tem se demonstrado como um importante modelo biológico, para avaliar o efeito de poluentes distintos (LOPES et al., 1992; TOMAZELLI et al., 2003; JACOMINI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018a; TESSER et al., 2022) por serem bivalves autobrânquios, comedores de suspensão, com ctenídios modificados com cílios, utilizados não somente para trocas gasosas mas também para filtração. Assim, a espécie de peixe *P. lineatus* e o bivalve *A. trapesialis* apresentam potencial como modelos biológicos para a avaliação dos efeitos decorrentes do MP e do Cu por serem espécies nativas, com diferentes hábitos alimentares, de fácil manutenção em laboratório e sensíveis a poluentes (OLIVEIRA et al., 2018a; RODA et al., 2020).

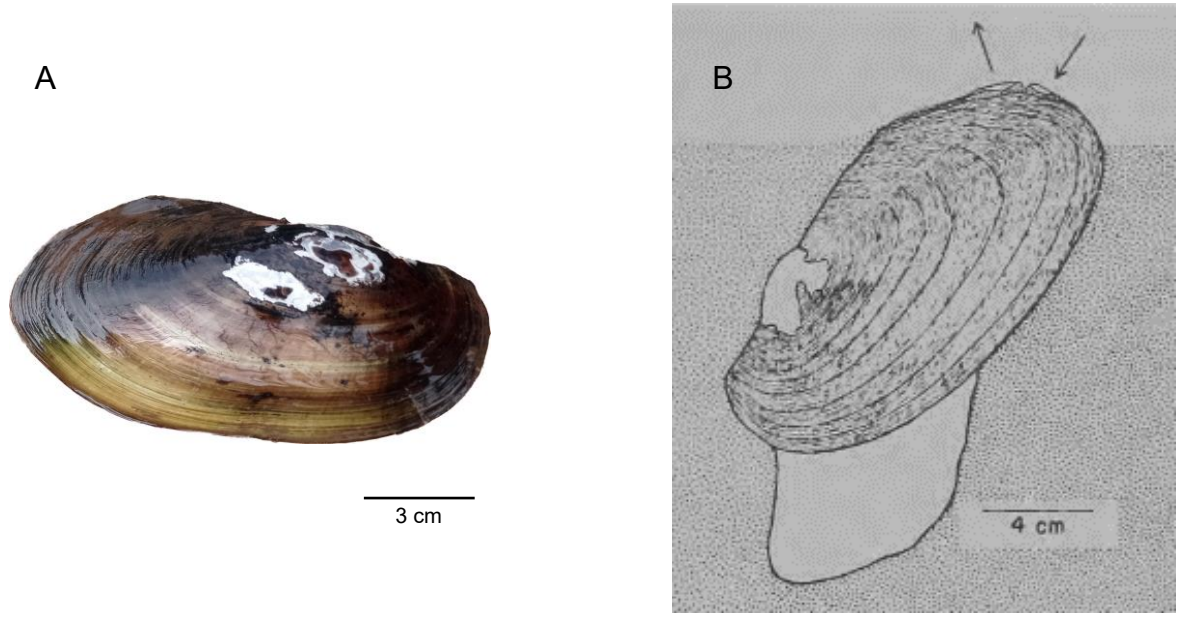

Figura 4 – (A) Exemplar de *Anodontites trapesialis* Lamarck, 1819. Fonte: Jéssica Fernanda Bernardes Roda, Universidade Estadual de Londrina. (B) Imagem ilustrativa de *Anodontites trapesialis* em seu habitat natural. As setas indicam a direção das correntes inalante e exalantes. Fonte: adaptado de Hebling, 1976.

1.2 JUSTIFICATIVA

Como apresentado acima, o microplástico e o Cu são poluentes amplamente distribuídos no ecossistema aquático, tanto no ambiente marinho quanto no ambiente de água doce. Apesar dos crescentes trabalhos com MP no ambiente dulcícola, apenas uma pequena parte são voltados para os efeitos da micropartícula nos organismos.

Os efeitos tóxicos do MP ainda não são bem estabelecidos, no entanto, é sabido que o MP é capaz de acarretar efeitos bioquímicos, genotóxicos e fisiológicos. Além dos efeitos causados pela sua própria toxicidade, os MPs são capazes de adsorver outros poluentes presentes no ambiente, muitas vezes alterando a biodisponibilidade e toxicidade destes, o que aumenta a preocupação quanto a sua ocorrência simultânea com outros xenobióticos.

Os efeitos toxicológicos do Cu para animais já são bem documentados e sabe-se que o Cu pode se aderir a partículas em suspensão, incluindo os MP. Sabendo que o MP é capaz de adsorver outros poluentes e que o Cu de se aderir a partículas em suspensão, torna-se importante investigar os efeitos causados por ambos, tanto isolado quanto em mistura, a fim de investigar uma possível interação.

O presente estudo abordou os efeitos do MP e Cu, isolado e em mistura, em concentrações ambientalmente relevantes e em três organismos distintos. O primeiro, embriões de *Danio rerio*, é um excelente modelo biológico para estudos dos efeitos embriotoxicológicos. Os outros dois modelos, o peixe *Prochilodus lineatus* e o bivalve *Anotontites trapesialis*, ambas espécies neotropicais nativas sensíveis aos poluentes e com hábitos distintos.

Diante do exposto, o presente estudo irá contribuir com dados significativos sobre a toxicidade dos poluentes e informações relevantes para que níveis seguros de MP no meio ambiente sejam estabelecidos.

1.3 HIPÓTESES

- A exposição aguda ao MP e ao cobre, isoladamente e em mistura, provoca alterações toxicológicas durante o desenvolvimento embriolarval e danos no DNA de embriões de *D. rerio;*

- A exposição dos embriões de *D. rerio* aos poluentes, isolados e em mistura, apresenta menor interferência quando comparados ao estágio das larvas após a eclosão;
- O córion embrionário é uma barreira efetiva contra a absorção de MP para o fluído periovular;
- A exposição aguda ao MP e ao cobre, isoladamente e em mistura, causa alterações distintas nos múltiplos biomarcadores analisados em *P. lineatus* e em *A. trapesialis;*
- Haverá um aumento na concentração de cobre em embriões de *D. rerio* e nos tecidos de *P. lineatus* e de *A. trapesialis* expostos agudamente ao cobre, de maneira isolada e em mistura com o MP;
- Para as três espécies, as exposições apresentaram maiores interferências toxicológicas conforme a seguinte ordem: MP + Cu > Cu > MP.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da exposição aguda (96 h) ao MP e ao cobre, isoladamente e em mistura, no embrião do peixe *D. rerio*, no peixe neotropical *P.*

lineatus e no molusco bivalve *A. trapesialis* por meio da análise de múltiplos biomarcadores.

1.4.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da exposição aguda a diferentes concentrações de MP e ao cobre, isoladamente e em mistura, sobre o desenvolvimento embriolarval e no DNA de embriões de *D. rerio*;
- Avaliar os efeitos da exposição aguda ao MP e ao cobre, isolados e em mistura, a partir de biomarcadores genotóxicos (dano no DNA), bioquímicos (GST, CAT, GSH, LPO e PCO), fisiológicos (RBC, hemoglobina, hematócrito, glicose, glicogênio, lactato e concentração iônica) e de neurotoxicidade (AChE) em *P. lineatus* e em *A. trapesialis;*
- Analisar a concentração de cobre em embriões de *D. rerio* e nos tecidos de *P. lineatus* e de *A. trapesialis* expostos agudamente ao MP e ao cobre, de maneira isolada e em mistura;
- Verificar as diferenças e as semelhanças nos resultados apresentados em cada espécie estudada;
- Identificar possíveis interações entre os poluentes.

REFERÊNCIAS

ALIMI, O. S.; FARNER-BUDARZ, J.; HERNANDEZ, L. M.; TUFENKJI, N. Microplastics and nanoplastics in aquatic environments: aggregation, deposition, and enhanced contaminant transport. **Environmental Science & Technology**, v. 52, p. 1704-1724, 2018.

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.

ARIAS, A. H.; ALVAREZ, G.; POZO, K.; PRIBYLOVA, P.; KLANOVA, J.; PIRANI, L. S. R.; PICONE, A. L.; ALVAREZ, M.; TOMBESI, N. Beached microplastics at the Bahia Blanca Estuary (Argentina): Plastic pellets as potential vectors of environmental pollution by POPs. **Marine Pollution Bulletin**, v. 187, p. 114520, 2023.

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.

BARBOZA, L. G. A.; VETHAAK, A. D.; LAVORANTE, B. R.; LUNDEBYE, A. K.; GUILHERMINO, L. Marine microplastic debris: An emerging issue for food security, food safety and human health. **Marine Pollution Bulletin**, v. 133, p. 336-348, 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.

BATTAGLIA, P.; PEDÀ, C.; MUSOLINO, S.; ESPOSITO, V.; ANDALORO, F.; ROMEO, T. Diet and first documented data on plastic ingestion of *Trachinotus ovatus* L. 1758 (Pisces: Carangidae) from the Strait of Messina (central Mediterranean Sea). **Italian Journal of Zoology**, v. 83, p. 121-129, 2016.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, p. 1340-1344, 2006.

BOUCHER, J.; FRIOT, D. **Primary microplastics in the oceans: a global evaluation of sources**. Gland, Switzerland: Iucn, 2017.

BRIGGS, J. P. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, p. R3-R9, 2002.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. Electron transport and oxidative phosphorylation. **Biochemistry**, p. 540, 2006.

CAMPOS, J. M.; WINTRUFF, L. T. T.; SOUZA-BASTOS, L. R.; DAL-PONT, G.; DOLATTO, R. G.; WESTPHAL, G. G. C.; GRASSI, M. T.; OSTRENSKY, A.; SADAUSKAS-HENRIQUE, H. Osmoregulatory responses in the neotropical fish species *Astyanax lacustris*, exposed to single and combined microplastics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and their mixture. **Aquatic Toxicology**, v. 263, p. 106693, 2023.

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.

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-CASTELLON, A. T.; HORTON, A. A.; HUGHES, J. M.; RAMPLEY, C.; JEFFERS, E. S.; BUSSI, G.; WHITEHEAD, P. Ecotoxicity of microplastics to freshwater biota: Considering exposure and hazard across trophic levels. **Science of the Total Environment**, v. 816, p. 151638, 2022.

CHEN, Q.; ZHAO, H.; LIU, Y.; JIN, L.; PENG, R. Factors affecting the adsorption of heavy metals by microplastics and their toxic effects on fish. **Toxics**, v. 11, p. 490, 2023.

CINCINELLI, A.; MARTELLINI, T.; GUERRANTI, C.; SCOPETANI, C.; CHELAZZI, D.; GIARRIZZO, T. A potpourri of microplastics in the sea surface and water column of the Mediterranean Sea. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 110, p. 321-326, 2019.

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.

CRAWFORD, C. B.; QUINN, B. **Microplastic Pollutants**. Elsevier, 2017.

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 PAULA, A. A.; RISSO, W. E.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of copper on an omnivorous (*Astyanax altiparanae*) and a carnivorous fish (*Hoplias malabaricus*): A comparative approach. **Aquatic Toxicology**, v. 237, p. 105874, 2021.

DE PAULA, A. A.; RISSO, W. E.; MARTINEZ, C. B. R. What happens to *Hoplias malabaricus* fed on live prey (*Astyanax altiparanae*) previously exposed to copper? A multiple biomarker approach. **Aquatic Toxicology**, v. 252, p. 106315, 2022.

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.

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.

FLEMMING, C. A.; TREVORS, J. T. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 44, p. 143-158, 1989.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, p. e1700782, 2017.

GIORGIO, M.; TRINEI, M.; MIGLIACCIO, E.; PELICCI, P. G. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 722-728, 2007.

HAMED, M.; OSMAN, A. G.; BADREY, A. E.; SOLIMAN, H. A.; SAYED, A. E. D. H. Microplastics-induced eryptosis and poikilocytosis in early-juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 742922, 2021.

HEBLING, N. J. The functional morphology of *Anodontites trapezeus* (Spix) and *Anodontites trapesialis* (Lamarck) (Bivalvia: Mycetopodidae). **Boletim de**

Zoologia, v. 1, p. 265-298, 1976.

HUANG, W.; SONG, B.; LIANG, J.; NIU, Q.; ZENG, G.; SHEN, M.; DENG, J.; LUO, Y.; WEN, X.; ZHANG, Y. Microplastics and associated contaminants in the aquatic environment: A review on their ecotoxicological effects, trophic transfer, and potential impacts to human health. **Journal of Hazardous Materials**, v. 405, p. 124187, 2021.(a)

HUANG, Y.; DING, J.; ZHANG, G.; LIU, S.; ZOU, H.; WANG, Z.; ZHU, W.; GENG, J. Interactive effects of microplastics and selected pharmaceuticals on red tilapia: Role of microplastic aging. **Science of the Total Environment**, v. 752, p. 142256, 2021.(b)

JABEEN, K.; SU, L.; LI, J.; YANG, D.; TONG, C.; MU, J.; SHI, H. Microplastics and mesoplastics in fish from coastal and fresh waters of China. **Environmental Pollution**, v. 221, p. 141–149, 2017.

JACOMINI, A. E.; AVELAR, W. E. P.; MARTINÊZ, A. S.; BONATO, P. S. Bioaccumulation of atrazine in freshwater bivalves *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) and *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). **Archives os Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, p. 387–91, 2006.

KALČÍKOVÁ, G. Beyond ingestion: Adhesion of microplastics to aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 258, p. 106480, 2023.

KELLER, A. A.; ADELEYE, A. S.; CONWAY, J. R.; GARNER, K. L.; ZHAO, L.; CHERR, G. N.; HONG, J.; GARDEA-TORRESDEY, J. L.; GODWIN, H. A.; HANNA, S.; ZHAOXIA, J.; KAWEETEERAWAT, C.; LIN, S.; LENIHAN, H. S.; MILLER, R. J.; NEL, A. E.; PERALTA-VIDEA, J. R.; WALKER, S. L.; TAYLOR, A. A.; TORRES-DUARTE, A.; ZUVERZA-MENA, N. Comparative environmental fate and toxicity of copper nanomaterials. **NanoImpact**, v. 7, p. 28-40, 2017.

KOOI, M.; BESSELING, E.; KROEZE, C.; VAN WEZEL, A. P.; KOELMANS, A. A. Modeling the fate and transport of plastic debris in freshwaters: review and guidance. **Freshwater Microplastics: Emerging Environmental Contaminants?**, p. 125-152, 2018.

LAJMANOVICH, R. C.; REPETTI, M. R.; BOCCIONI, A. P. C.; MICHLIG, M. P.; DEMONTE, L.; ATTADEMO, A. M.; PELTZER, P. M. Cocktails of pesticide residues in *Prochilodus lineatus* fish of the Salado River (South America): First record of high concentrations of polar herbicides. **Science of The Total Environment**, v. 870, p. 162019, 2023.

LAMMER, E. CARR, G. J.; WENDLER, K.; RAWLINGS, J. M.; BELANGER, S. E.; BRAUNBECK, T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, p. 196-209, 2009.

LIAO, W.; ZHU, Z.; FENG, C.; YAN, Z.; HONG, Y.; LIU, D.; JIN, X. Toxicity mechanisms and bioavailability of copper to fish based on an adverse outcome pathway analysis. **Journal of Environmental Sciences**, v. 127, p. 495-507, 2023.

LIM, K. P.; LIM, P. E.; YUSOFF, S.; SUN, C.; DING, J.; LOH, K. H. A meta-analysis of the characterisations of plastic ingested by fish globally. **Toxics**, v. 10, p. 186, 2022.

LIN, X.; GOWEN, A. A.; PU, H.; XU, J. L. Microplastic contamination in fish: Critical review and assessment of data quality. **Food Control**, p. 109939, 2023.

LOPES, J. L. C.; CASANOVA, I. C.; DE FIGUEIREIDO, M. C. G.; NATHER, F. C.; PAIVA AVELAR, W. E. *Anodontites trapesialis*: a biological monitor of

organochlorine pesticides. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 23, p. 351-354, 1992.

LOPES-FERREIRA, M.; FALCÃO, M. A. P.; DISNER, G. R.; LIMA, C. O modelo Zebrafish e sua contribuição ao meio ambiente. In: Silva, C. V. R. D.; Queiroz, L. G.; Gomes, L. E. T. **Recurso Água: Tecnologias e Pesquisas Para o uso e a Conservação de Ecossistemas Aquáticos**, 1st ed. Cubo Editora: São Carlos, Brazil, 2021. p. 188–219.

LÓPEZ 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**, v. 27, p. 968-979, 2018.

MARŠIĆ-LUČIĆ, J.; LUŠIĆ, J.; TUTMAN, P.; VAREZIĆ, D. B.; ŠILJIĆ, J.; PRIBUDIĆ, J. Levels of trace metals on microplastic particles in beach sediments of the island of Vis, Adriatic Sea, Croatia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 137, p. 231-236, 2018.

MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. **A bacia do Rio Tibagi**. Editora dos Editores, Londrina, PR, Brazil, 2002. p. 551-577.

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.

MEYERS, J. R. Zebrafish: development of a vertebrate model organism. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, v. 16, p. e19, 2018.

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.

NAJI, A.; NURI, M.; AMIRI, P.; NIYOGI, S. Small microplastic particles (S-MPPs) in sediments of mangrove ecosystem on the northern coast of the Persian Gulf. **Marine Pollution Bulletin**, v. 146, p. 305-311, 2019.

NIKINMAA, M. **An Introduction to Aquatic Toxicology**. Elsevier, 2014.

OECD Test No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. ***OECD Guidelines for the Testing of Chemicals,*** v. 2, p. 1-22, 2013.

OLIVEIRA, C. W. S.; CORRÊA, C. S.; SMITH, W. S. Food ecology and presence of microplastic in the stomach content of neotropical fish in an urban river of the upper Paraná River Basin. **Revista Ambiente & Água**, v. 15, 2020.

OLIVEIRA, L. F.; CABRAL, M. T.; RISSO, W. E.; MARTINEZ, C. B. R. Single and combined effects of Zn, Mn and Fe on the Neotropical freshwater bivalve *Anodontites trapesialis*: Bioaccumulation and biochemical biomarkers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, p. 735-745, 2018. (a)

OLIVEIRA, L. F.; CABRAL, M. T.; VIEIRA, C. E. D.; ANTONIAZZI, M. H.; RISSO, W. E.; MARTINEZ, C. B. R. Metals bioaccumulation and biomarkers responses in the Neotropical freshwater clam *Anodontites trapesialis*: Implications for monitoring coal mining areas. **Science of the Total Environment**, v. 571, p. 983-991, 2016.

OLIVEIRA, P.; BARBOZA, L. G. A.; BRANCO, V.; FIGUEIREDO, N.; CARVALHO, C.; GUILHERMINO, L. Effects of microplastics and mercury in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774): filtration rate, biochemical biomarkers and mercury bioconcentration. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 164,

p. 155-163, 2018. (b)

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 2022. **PlasticsEurope**, 2022.

RIBEIRO, F.; GARCIA, A. R.; PEREIRA, B. P.; FONSECA, M.; MESTRE, N. C.; FONSECA, T. G.; ILHARCO, L. M.; BEBIANNO, M. J. Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 122, p. 379-391, 2017.

RODA, J. F. B.; LAUER, M. M.; RISSO, W. E.; MARTINEZ, C. B. D. R. Microplastics and copper effects on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: Is there any interaction?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 242, p. 110659, 2020.

ROMEO, T.; PIETRO, B.; PEDÀ, C.; CONSOLI, P.; ANDALORO, F.; FOSSI, M. C. First evidence of presence of plastic debris in stomach of large pelagic fish in the Mediterranean Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 95, p. 358-361, 2015.

SANTOS, D.; LUZIO, A.; FÉLIX, L.; CABECINHA, E.; BELLAS, J.; MONTEIRO, S. M. Microplastics and copper induce apoptosis, alter neurocircuits, and cause behavioral changes in zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 242, p. 113926, 2022.

SANTOS, L. H. M. L. M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Microplastics as vectors of pharmaceuticals in aquatic organisms–an overview of their environmental implications. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 3, p. 100079, 2021.

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**. Editora dos Editores, Londrina, PR, Brazil, 2002. p. 403-42.

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. R. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 31-41, 2016.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, v. 83, p. 13-34, 2008.

SUBARAMANIYAM, U.; ALLIMUTHU, R. S.; VAPPU, S.; RAMALINGAM, D.; BALAN, R.; PAITAL, B.; PANDA, N.; RATH, P. K.; RAMALINGAM, N.; SAHOO, D. K. Effects of microplastics, pesticides and nano-materials on fish health, oxidative stress and antioxidant defense mechanism. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 1217666, 2023.

SUN, T.; ZHAN, J.; LI, F.; JI, C.; WU, H. Evidence-based meta-analysis of the genotoxicity induced by microplastics in aquatic organisms at environmentally relevant concentrations. **Science of the Total Environment**, v. 783, p. 147076, 2021.

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.

TALBOT, R.; CHANG, H. Microplastics in freshwater: a global review of factors affecting spatial and temporal variations. **Environmental Pollution**, v. 292, p. 118393, 2022.

TESSER, M. E.; DE PAULA, A. A.; RISSO, W. E.; MONTEIRO, R. A.; SANTO

PEREIRA, A. D. E.; FRACETO, L. F.; MARTINEZ, C. B. R. Sublethal effects of waterborne copper and copper nanoparticles on the freshwater Neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: A comparative approach. **Science of the Total Environment**, v. 704, p. 135332, 2020.

TESSER, M. E.; GUILGER, M.; BILESKY-JOSÉ, N.; RISSO, W. E.; DE LIMA, R.; MARTINEZ, C. B. R. Biogenic metallic nanoparticles (Ag, TiO2, Fe) as potential fungicides for agriculture: are they safe for the freshwater mussel *Anodontites trapesialis*?. **Chemosphere**, v. 309, p. 136664, 2022.

TOMAZELLI, A. C.; MARTINELLI, L. A.; AVELAR, W. E.; CAMARGO, P. B. D.; FOSTIER, A. H.; FERRAZ, E. S.; KRUG, F. J.; SANTOS JÚNIOR, D. Biomonitoring of Pb and Cd in two impacted watersheds in Southeast Brazil, using the freshwater mussel *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Mycetopodidae) as a biological monitor. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 673-684, 2003.

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

TRACHOOTHAM, D.; LU, W.; OGASAWARA, M. A.; VALLE, N. R. D.; HUANG, P. Redox regulation of cell survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, p. 1343-1374, 2008.

TURNER, A. Paint particles in the marine environment: An overlooked component of microplastics. **Water Research x**, v. 12, p. 100110, 2021.

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.

VETRIMURUGAN, E.; JONATHAN, M. P.; SARKAR, S. K.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, F.; ROY, P. D.; VELUMANI, S.; SAKTHI, J. S. Occurrence, distribution and provenance of microplastics: A large scale quantitative analysis of beach sediments from southeastern coast of South Africa. **Science of the Total Environment**, v. 746, p. 141103, 2020.

WANG, J.; PENG, J.; TAN, Z.; GAO, Y.; ZHAN, Z.; CHEN, Q.; CAI, L. Microplastics in the surface sediments from the Beijiang River littoral zone: composition, abundance, surface textures and interaction with heavy metals. **Chemosphere**, v. 171, p. 248-258, 2017.

WANG, W.; GE, J.; YU, X. Bioavailability and toxicity of microplastics to fish species: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 189, p. 109913, 2020.

WANG, Y.; ZHAO, Y.; LIANG, H.; MA, C.; CUI, N.; CAO, H.; WEI, W.; LIU, Y. Single and combined effects of polyethylene microplastics and acetochlor on accumulation and intestinal toxicity of zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Pollution**, v. 333, p. 122089, 2023.

WANG, Y.; ZHOU, B.; CHEN, H.; YUAN, R.; WANG, F. Distribution, biological effects and biofilms of microplastics in freshwater systems-a review. **Chemosphere**, v. 299, p. 134370, 2022.

WRIGHT, S. L.; THOMPSON, R. C.; GALLOWAY, T. S. The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. **Environmental Pollution**, v. 178, p. 483-492, 2013.

ZHANG, C.; WANG, S.; SUN, D.; PAN, Z.; ZHOU, A.; XIE, S.; WANG, J.; ZOU, J. Microplastic pollution in surface water from east coastal areas of Guangdong, South China and preliminary study on microplastics biomonitoring using two marine fish. **Chemosphere**, v. 256, p. 127202, 2020.

Capítulo I

Manuscrito I

MANUSCRITO I

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Environmental Toxicology and Pharmacology*.

EMBRIOTOXICIDADE ISOLADA E COMBINADA DE MICROPLÁSTICO E COBRE EM *Danio rerio* (*ZEBRAFISH*)

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.

RODA, Jéssica Fernanda Bernardes. **Toxicidade do microplástico isolado e associado ao cobre para o embrião de *Danio rerio***. 2023. 27 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da exposição aguda ao MP (20 μg L^{-1}) e ao cobre (10 μg L^{-1}), isolados e em mistura, no embrião de *Danio rerio* após exposições de 96 h pós fertilização (hpf). Os resultados mostraram alta afinidade do MP ao córion embrionário. Quando comparados ao grupo controle, embriões do grupo Cu (72 hpf) e MP+Cu (72 e 96 hpf) apresentaram atraso significativo na taxa de eclosão; e diminuição significativa na frequência cardíaca (96 hpf) em larvas expostas ao MP isolado e MP+Cu. O acúmulo de Cu foi observado em larvas com 96 hpf expostas ao Cu isolado e MP+Cu. O presente trabalho elucida que além da afinidade do MP com o córion embrionário, eles também podem afetar o desenvolvimento dos embriões de *D. rerio* tanto isolados quanto em mistura com o Cu.

Palavras-chave: Embriotoxicidade; Sinergismo; Cardiotoxicidade; ZET; Acúmulo de cobre.

1 INTRODUÇÃO

Devido às inúmeras vantagens socioeconômicas ocasionadas pelo uso de materiais plásticos, no decorrer do último século a alta demanda da sociedade por plástico tem motivado uma produção em escala industrial. Em 2021, a produção de plástico atingiu 390,7 milhões de toneladas, sendo que 90,2% da produção eram plásticos derivados do petróleo, 8,3% plásticos recicláveis e 1,5% bioplásticos. Com isso, é crescente a preocupação com os impactos ambientais negativos ocasionados pela poluição por plástico (PLASTICS EUROPE, 2022). A demanda e consumo indiscriminado dos materiais plásticos, o uso excessivo, o descarte incorreto e a baixa taxa de reciclagem têm contribuído para o aumento da poluição no meio ambiente (BROOKS et al., 2018; BHAGAT et al., 2020). Parte da poluição por plástico encontra-se na forma de microplásticos (MP), caracterizados por partículas menores que 5 mm (CRAWFORD; QUINN, 2017; YU et al., 2019), que de acordo com sua origem podem ser divididos em dois tipos, os MP primários e os MP secundários (BARNES et al., 2009; COLE et al., 2011). Os MP primários são aqueles fabricados em pequenos diâmetros para determinados fins, como uso em cosméticos, fármacos e fibras têxteis (COLE et al., 2011; ALOMAR et al., 2016). Já os MP secundários são advindos da degradação de plásticos maiores, ocasionados pela abrasão mecânica e exposição prolongada a radiação UV (BARNES et al., 2009; FENDALL; SEWELL, 2009; ANDRADY, 2011).

Geralmente os estudos concentram-se na classificação das micropartículas baseada na origem, tamanho, tipo e forma dos MP, e os efeitos biológicos são avaliados em diferentes organismos que interagem com MP direta ou indiretamente (de SÁ et al., 2018; GUAN et al., 2020; KHOSHMANESH et al., 2023). A contaminação por MP não se restringe ao ambiente marinho. As bacias hidrográficas são rotas para o transporte do lixo plástico até os oceanos, haja vista que a poluição por plástico se encontra amplamente distribuída tanto no ambiente aquático continental quanto no ambiente terrestre (JAMBECK et al., 2015; de SÁ et al., 2018; ALENCAR et al., 2022). Assim, os MPs são poluentes emergentes onipresentes e a poluição por micropartículas já foi constatada em diferentes ecossistemas aquáticos, como oceanos (AYTAN et al., 2023; CHEN et al., 2023; SIDDIQUE et al., 2023; ZHANG et al., 2023), estuários (WANG et al., 2023a; WANG, et al., 2023b), sistemas dulcícolas (COLLARD et al., 2019; EO et al., 2019; GUAN et

al., 2020; ZHANG et al., 2022) e até mesmo em habitats mais remotos como regiões polares e subterrâneas (OBBARD et al., 2014; LA DAANA et al., 2018; PANNO et al., 2019).

A constante liberação de partículas plásticas no ambiente aquático, tem dificultado estimar uma concentração ambientalmente segura e definir normativas que estabeleçam condições e padrões de lançamento de MP, assim como ocorre para efluentes como na Resolução CONAMA 357/2005. Uma vez presente no ambiente e disponível para organismos de diferentes níveis tróficos (CASTRO-CASTELLON et al., 2023; KALČÍKOVÁ, 2023), os MPs geram preocupação quanto à toxicidade e coexistências com outros poluentes. Devido à superfície relativa e hidrofobicidade (KHOSHMANESH et al., 2023; MARTIN-FOLGAR et al., 2023), assim como as propriedades físico-químicas, pequeno tamanho da partícula, grande área de superfície específica, os MPs são capazes de adsorver outros compostos tóxicos, atuando como carreadores antropogênicos para diferentes poluentes químicos, como os metais (FRED-AHMADU et al., 2020; GUAN et al., 2020; RODA et al., 2020; SATHYAMOORTHY et al., 2022). Uma vez adsorvidos pela superfície do MP, os compostos tóxicos podem ser transferidos para os organismos (ZHANG et al., 2020). Entre os metais com afinidade ao MP, inclui-se o cobre (Cu), que é um metal essencial para as funções biológicas, mas que em altas concentrações torna-se tóxico (SORENSEN et al., 1991). O Cu é amplamente encontrado em ecossistemas dulcícolas, onde a poluição por MP também é preocupante, e esta coexistência pode alterar tanto a biodisponibilidade quanto a toxicidade de ambos (STRUNGARU et al., 2019; WINDSOR et al., 2019; RODA et al., 2020; SATHYAMOORTHY et al., 2022; ZHANG et al., 2022).

Os efeitos causados pelos xenobióticos diferem de acordo com as características das espécies, como o tamanho, o sexo e o desenvolvimento ontogenético. A Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) e Agência de Proteção Ambiental (EPA) estabeleceram diretrizes padrão para estudos com embriões, denominadas “Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test” (OECD 236), a fim de determinar a toxicidade aguda de produtos quimicos (OECD, 2013). O FET tem sido amplamente utilizado com a espécie *Danio rerio* (HAMILTON, 1822), chamado popularmente de *zebrafish*, para determinar os efeitos embriotóxicos de poluentes que impõe estresses exógenos no desenvolvimento dos organismos. O uso de embriões e larvas de *zebrafish* em testes de toxicidade tem sido uma alternativa

ao uso de animais adultos, sendo considerado modelos *in vitro* as larvas com até 120 horas pós fertilização (hpf) (LAMMER et al., 2009).

Os embriões de *zebrafish* são considerados ótimos modelos biológicos para teste de toxicidade do desenvolvimento (AKSOY et al., 2019; PEREIRA et al., 2019; BRITO et al., 2022; CANEDO et al., 2022). Além do uso dos embriões de *zebrafish* pelas inúmeras vantagens da espécie (AKSOY et al., 2019; BHAGAT et al., 2020; MENEGOLA et al., 2023), trabalhar com essa espécie dulcícola permite entender como a reprodução em ambiente contaminado pode acarretar alterações nos parâmetros reprodutivos, na taxa de sobrevivência, no desenvolvimento de embriões e larvas, e até mesmo em como tal exposição pode afetar a população ao longo do tempo.

Embora o número de estudos sobre MP tenha aumentado recentemente, valores de concentrações confiáveis de MP para o ambiente aquático ainda precisam ser estabelecidos. Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos isolados e combinados da exposição aguda ao MP e ao Cu, no embrião do peixe *D. rerio* utilizando diferentes biomarcadores, como teste de toxicidade em embriões (ZET), acúmulo de metal e danos ao DNA, a fim de obter dados seguros sobre a exposição de peixes em estágios iniciais de desenvolvimento à mistura dos poluentes MP + Cu.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E EXPOSIÇÃO AOS POLUENTES

Os embriões de *D. rerio*, linhagem selvagem, utilizados nos testes de toxicidade foram obtidos de matrizes de reprodução do Laboratório de Ecofisiologia Animal da Universidade Estadual de Londrina (LEFA/UEL).

As matrizes de *D. rerio*, foram mantidas em sistema de recirculação, na proporção de 2 machos para 1 fêmea (2:1), em aquários de 18 L acoplados em sistema de recirculação e foram alimentadas 2 vezes ao dia, no período da manhã com ração comercial (Alcon Basic MEP 200 Complex) e no período da tarde com ração e *Artemia sp.* congelada. Para obtenção dos embriões, foram utilizados aparatos de acasalamento para indução da desova, fecundação e recolhimento dos embriões. A ovoposição ocorreu logo nas primeiras horas do dia, sob condições

controladas de temperatura 26,79°C ± 1, pH 6,39, oxigênio dissolvido 6,34 mg L^{-1}, condutividade 0,118 mS cm^{-1}, turbidez 12,4 NTU e total de sólidos dissolvidos 0,077 g L^{-1}, em um fotoperíodo de 14:10 h (claro: escuro), de acordo com Dammski et al. (2011). Para a coleta dos ovos, os aquários foram preparados previamente com recipientes contendo vegetação sintética e fundo telado para possibilitar a passagem dos ovos, onde permaneceram depositados até o momento da coleta.

Após 1-2 h do início da reprodução, os ovos foram recolhidos, despejados sobre uma peneira de malha fina (± 600 µm), lavados delicadamente com água reconstituída ($CaCl_2$ – 2 mM, $MgSO_4$ – 0,5 mM, $NaHCO_3$ – 0,7 mM e KCl – 0,07 mM), transferidos para uma placa de Petri e rapidamente selecionados para a exposição dos embriões nos diferentes grupos experimentais. Os ensaios com embriões foram baseados no protocolo para avaliação de toxicidade da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD): Fish Embryo Toxicity – FET – Test (OECD, 2013) com modificações.

Apenas ovos fertilizados e sem irregularidades foram selecionados e distribuídos em 4 grupos experimentais, grupo controle (CTR), com embriões expostos apenas a água reconstituída; grupo MP fluorescente a 20 µg L^{-1} (MP); grupo Cu a 10 µg L^{-1} (Cu); e a mistura de MP a 20 µg L^{-1} e Cu a 10 µg L^{-1} (MP + Cu). Para realização da análise de acúmulo de cobre, os embriões foram expostos em placas de Petri de vidro contendo 40 mL do meio de exposição, sendo 4 grupos experimentais, 8 placas de Petri por grupo experimental e 80 embriões por placa. Já para as demais análises os embriões foram expostos em placas de Petri de vidro contendo 10 mL do meio de exposição, sendo 4 grupos experimentais, 8 placas de Petri por grupo experimental e 22 embriões por placa. Embriões e larvas mortas foram removidos durante todo o período de exposição.

As placas foram condicionadas em incubadora de demanda de bioquímica de oxigênio (BOD) sob condições controladas de temperatura (26,5°C ± 1), pH 7,8 e fotoperíodo de 14: 10 h (claro: escuro), que se mantiveram estáveis durante duração dos testes de 96 h. As placas foram monitoradas a cada 24 h sob fotomicroscópio invertido, com renovação de 50% do meio experimental diariamente. Para validação do teste de toxicidade, foram consideradas a taxa de fertilização e sobrevivência dos embriões do grupo controle >90% (OECD, 2013; LAMMER et al., 2009).

Os experimentos realizados no presente estudo foram aprovados pela

Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (protocolo CEUA nº55/2020).

As exposições foram realizadas com microesferas de polietileno fluorescente, tamanho: 0,881 ± 0,412 µm, cor amarelo e densidade: 1,3 g cm^3, comprimento de onda ex: 485 nm e em: 525 nm (Cospheric LLC, California, EUA) na concentração de 20 µg L^{-1}, estabelecida de acordo com dados encontrados na literatura, referente a concentrações relevantes na biota aquática (OLIVEIRA et al., 2013; HORTON et al., 2017; RODA et al., 2020). 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. As águas de classe 1 e 2 são aquelas que podem ser destinadas ao consumo humano após tratamento, à proteção das comunidades aquáticas, entre outras aplicações. As soluções de MP, Cu e mistura foram preparadas 24 h antes da exposição para permitir melhor adsorção do Cu ao MP, como proposto por Chen et al. (2017).

2.2 Determinação do Cobre no meio de exposição

Amostras de água não filtrada e filtrada (filtro de 0,45 µm, Millipore Millex HV/PVDF) foram coletadas nos tempos de 0 e 48 h para análise de Cu total e dissolvido, respectivamente, acidificadas com HNO_3 (65%) e armazenadas a 4 °C até a determinação do metal. As concentrações de Cu nas amostras de água foram determinadas por espectrometria de absorção atômica (PerkinElmer A700) em forno de grafite com limite de detecção para Cu de 0,014 µg L^{-1}.

2.3 Acúmulo de Cobre nas larvas

O acúmulo de Cu foi realizado após o período de exposição, com lavas de 96 hpf. Para cada grupo experimental, *pools* de 70 larvas em octoplicatas (n = 8) foram obtidas aleatoriamente, submetidos a liofilização a 60 ºC por 24 h, digeridos em ácido nítrico ultrapuro 5N por 24 h a 60 ºC, de acordo com Alves e Wood (2006). Para avaliação do acúmulo de Cu, os materiais 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 CARACTERIZAÇÃO DO MICROPLÁSTICO

2.4.1 Microscopia de força atômica (AFM)

As análises morfológicas das micropartículas fluorescentes foram feitas por microscopia de força atômica (AFM) no Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba, Universidade Estadual de São Paulo. As micrografias foram obtidas por um microscópio de força atômica Nanosurf® Easy Scan 2 Basic AFM – Pattern BT02217, Suíça. A suspensão de micropartículas a 0,2 g L^{-1} foi diluída em água ultrapura (1:500, v/v), gotejada sobre grids de silício e seca em dessecador. As análises foram realizadas no modo não contato, com cantilever TapAl-G (BudgetSensors®, Bulgária) e uma taxa de varredura de 90 Hz. As imagens foram processadas usando o software Gwyddion.

2.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras das micropartículas fluorescentes (material em pó e em solução 0,2 g L^{-1}) foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para analisar o microplástico em pó, o mesmo foi alocado em um *stub* contendo fita dupla face de carbono (Electron Microscopy Science). Já a suspensão de micropartículas a 0,2 g L^{-1} foi gotejada em lamínula de 7 mm para secagem e análise posterior. Em seguida, o material nos stubs previamente preparados foram revestidos por pulverização catódica com ouro de 15 nm de espessura (Sputter Coater SDC 050, Bal-Tec Union Ltd., Liechtenstein) e analisados com microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200, Eindhoven, Holanda / Holanda) no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LEMM), Universidade Estadual de Londrina. As fotografias foram capturadas em aumento de 100x, 2.500x e 10.000x.

2.4.3 Detecção do microplástico por fluorescência no córion embrionário e em larvas

A detecção do microplástico fluorescente no córion embrionário e larvas de *zebrafish* foi verificada a cada tempo da exposição (0, 24, 48, 72 e 96 h), em 10 embriões ou larvas obtidos aleatoriamente de cada grupo experimental. Fotografias dos embriões e larvas com ampliação de 10x foram capturadas e analisadas utilizando

microscópio invertido de fluorescência (EVOS FL Auto Cell Imaging System, Thermo Fisher) e software EVOS FL Auto Software, no Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Estadual de Londrina.

2.4.4 Avaliação ultraestrutural do córion dos embriões e superfície das larvas

Embriões (48 hpf) e larvas (96 hpf) foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os embriões e larvas foram fixados por imersão em glutaraldeído 2,5% em tampão de fosfato 0,1 M (pH 7,2) por 24 h em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram lavadas três vezes por 10 minutos em tampão de fosfato 0,1 M (pH 7,2), fixadas por 1 h em tetróxido de ósmio 1%, submetidas a desidratação através de gradiente crescente de etanol (70, 80, 90 e 100%) e secas com dióxido de carbono líquido (CO_2) em secador de ponto crítico (Critical Point Dryer CPD 030, Bal-Tec Union Ltd., Liechtenstein). Os materiais secos foram revestidos por pulverização catódica com ouro de 15 nm de espessura (Sputter Coater SDC 050, Bal-Tec Union Ltd., Liechtenstein) e analisados com microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200, Eindhoven, Holanda / Holanda) no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LEMM), Universidade Estadual de Londrina. As fotografias foram capturadas em aumento de 100x, 2.500x e 10.000x.

2.5 BIOMARCADORES DE TOXICIDADE

2.5.1 Teste de Embriotoxicidade do *Zebrafish* - ZET

A taxa de mortalidade embrionária (%), taxa de eclosão (%), falta de formação de somito, não desprendimento da cauda e a frequência cardíaca (batimentos por minuto, bpm) foram analisadas a cada 24 h, do início da exposição até 96 horas pós-fertilização (hpf), utilizando estereomicroscópio (DMI Motic SMZ-140) e microscópio invertido (Olympus CKX41SF, Kyoto, Japão). *A taxa de eclosão foi calculada pela equação: taxa de eclosão (%) = (Número de embriões eclodidos/número total de embriões) × 100.

2.5.2 Danos no DNA - Ensaio Cometa Realizado em Condições Alcalinas

O ensaio alcalino do cometa foi realizado em embriões com 96 hpf,

baseado no método descrito por Singh et al. (1988) com modificações de Alvim e Martinez (2019). Para cada grupo experimental, *pools* contendo 10 larvas em octoplicata (n = 8 em cada condição), foram ressuspendidos em soro bovino fetal (SBF) e dissociados mecanicamente durante 3 minutos para obtenção das amostras para o ensaio. 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 avaliado visualmente em 100 nucleóides por amostra aleatoriamente selecionados e não sobrepostos. O comprimento da cauda formada pela migração de fragmentos de DNA foram classificados em quatro classes de cometas (de 0 a 3), segundo Vieira et al. (2016). Para o cálculo do escore 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.

2.6 Análise estatística

Os resultados dos biomarcadores e da concentração de Cu nos embriões obtidos nos diferentes tratamentos (CTR x MP x Cu x MP + Cu) foram comparados entre si através de teste paramétrico (one-way ANOVA) ou não paramétrico (Kruskal-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homoscedasticidade), seguidos por teste de comparações múltiplas (Student Newman Keuls ou Dunn) quando indicado, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Concentração de cobre na água

As concentrações de Cu total e dissolvido nas soluções testes apresentaram-se dentro do esperado (Tabela 1). As concentrações de Cu nos grupos CTR e MP, sem adição de Cu na água, variaram entre 0,35 µg L^{-1} a 0,40 µg L^{-1} para Cu total e 0,32 µg L^{-1} a 0,58 µg L^{-1} para Cu dissolvido. Já as concentrações de Cu nos grupos contendo Cu (Cu e MP + Cu) variaram entre 8,29 µg L^{-1} a 9,61 µg L^{-1} para Cu

total e 7,54 µg L^{-1} a 8,53 µg L^{-1} para Cu dissolvido.

Tabela 1 – Concentrações de Cu (µg L^{-1}) total e dissolvido na água, sendo controle (CTR), microplástico 20 µg L^{-1} (MP), cobre 10 µg L^{-1} (Cu) e microplástico 20 µg L^{-1} + cobre 10 µg L^{-1} (MP + Cu) nos tempos de 0 e 48 h. Os dados foram expressos como média ± EP (n = 2).

Tratamento	Tempo	Cu Total	Cu Dissolvido
CTR	0 h	0,39 ± 0,03	0,52 ± 0,07
	48 h	0,35 ± 0,00	0,32 ± 0,01
MP	0 h	0,40 ± 0,06	0,58 ± 0,07
	48 h	0,37 ± 0,05	0,33 ± 0,03
Cu	0 h	9,61 ± 0,34	7,80 ± 0,32
	48 h	8,29 ± 0,40	8,53 ± 0,02
MIX	0 h	9,11 ± 0,04	7,54 ± 0,02
	48 h	8,98 ± 0,88	8,24 ± 0,30

3.2 Caracterização e interação do microplástico

3.2.1 Micrografias por Microscopia de Força Atômica

A caracterização do microplástico obtida por microscopia de força atômica (AFM) e distribuição de tamanho das partículas estão apresentadas na Figura 1 (A e B). A micrografia (Fig. 1 A) indica que as partículas do microplástico apresentam formato majoritariamente esféricos e, em menor proporção, micropartículas em formato elípticos. A distribuição de tamanho é bastante heterogênea, com partículas distribuídas em uma faixa de 0,34 a 1,92 µm. A Figura 1 B representa a distribuição de tamanhos das partículas do microplástico, a qual foi subdividida em uma população de partículas com dimensões inferiores a 1 µm (0,595 ± 0,204 µm) e partículas com dimensões superiores ou igual a 1 µm (1,304 ± 0,236 µm). A distribuição média global, obtida pela contagem de 52 partículas identificadas na micrografia, apresentou um valor médio de 0,881 ± 0,412 µm.

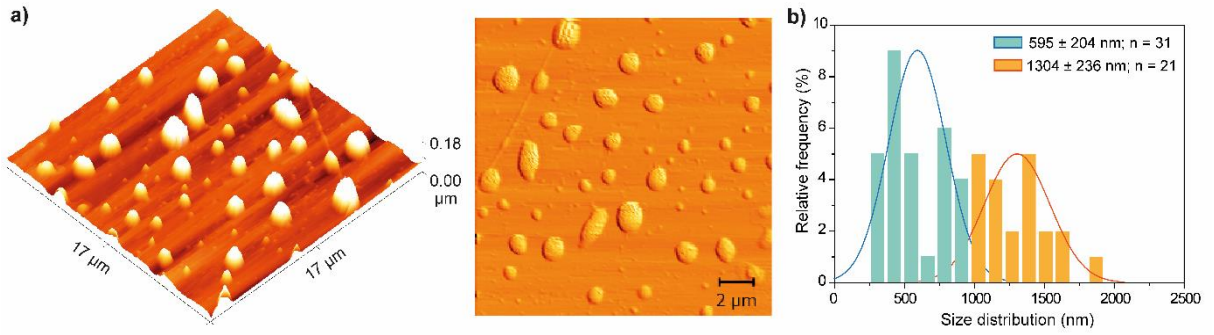

Figura 1 – Micrografias representativas do MP obtidas por microscópio de força atômica (AFM – Atomic Force Microscope): (A) modelo 3D com vista isométrica da região A, (B) imagem topográfica do microplástico, (C) distribuição de tamanho das partículas. A frequência relativa de distribuição esta subdividida em populações com tamanhos < que 1000 nm e ≥ 1000 nm. Para contagem e tratamento das imagens foi utilizado o software Gwyddion.

3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para avaliar a presença do MP no córion embrionário e larvas foram obtidas imagens com MEV dispostas na Figura 2. Primeiramente, imagens do MP na sua forma original (pó) (Fig. 2 A, B e C) foram capturadas de modo a auxiliar na sua caracterização, onde foi comprovado que as micropartículas são esféricas e de tamanhos variados, corroborando com os dados de caracterização obtidos pela AFM. Em seguida, imagens do MP em solução mãe 0,2 g L^{-1} (Fig. 2 D, E e F) utilizada na exposição dos embriões mostrou que as micropartículas continuaram dispostas de forma consistente. Por fim, na Figura 2 (G, H e I) e (J, K e M) foi observado a adsorção do MP na superfície coriônica (48 hpf) e superfície das larvas (96 h), respectivamente.

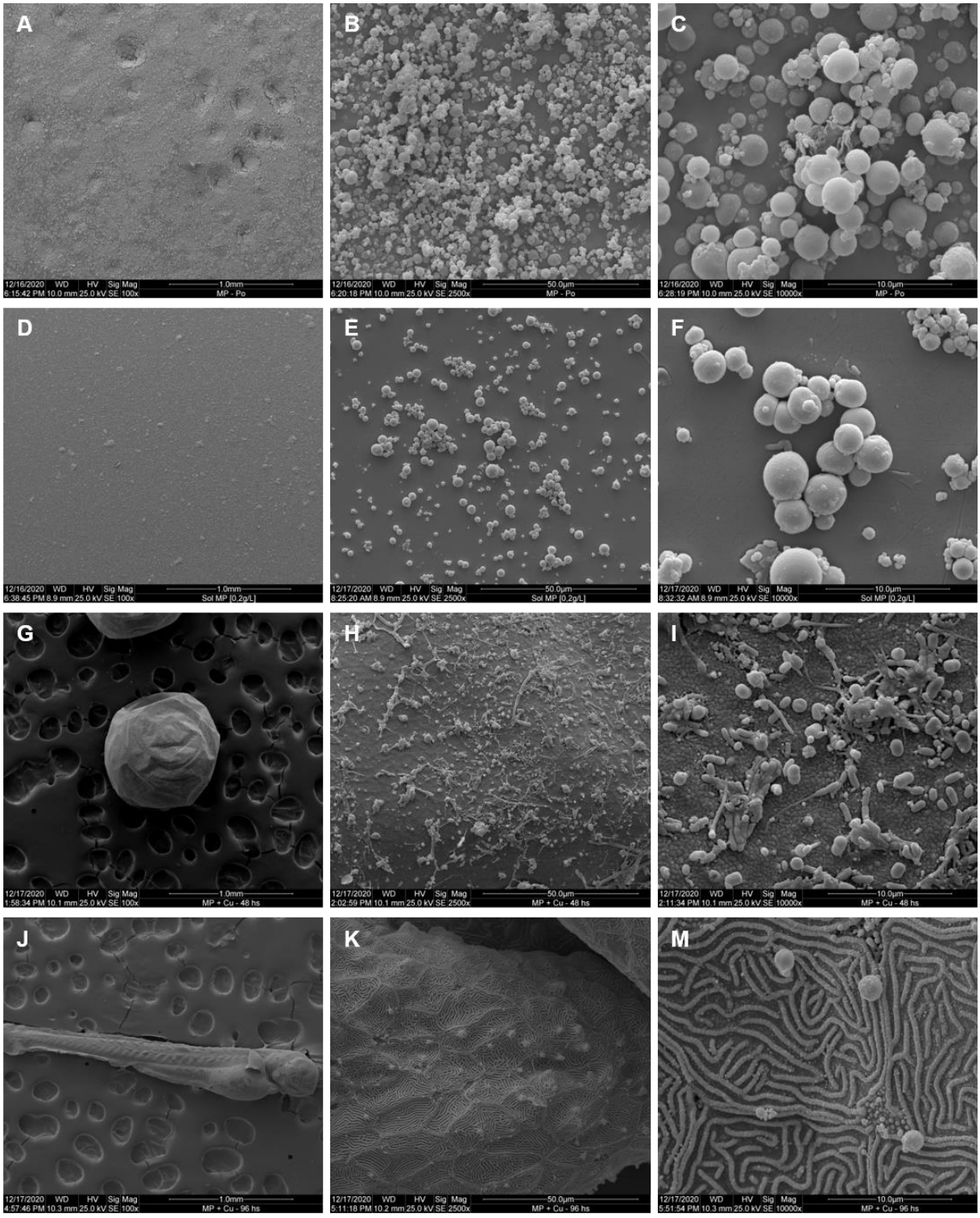

Figura 2 – Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A, B e C) imagens do MP em pó capturadas com magnitude de 100x, 2.500x e 10.000x, respectivamente. (D, E e F) imagens do MP na solução 0,2 g L^{-1} capturadas com magnitude de 100x, 2.500x e 10.000x, respectivamente. (G, H e I) imagens do MP adsorvidas à superfície coriônica (48 h) obtidas com magnitude de 100x, 2.500x e 10.000x, respectivamente. (J, K e M) imagens do MP adsorvidas à superfície da larva (96 hpf) com magnitude de 100x, 2.500x e 10.000x, respectivamente. Escala em 1.0 mm (A, D, G e J). Escala em 50 µm (B, E, H e K). Escala em 10 µm (C, F, I e M).

3.2.3 Interação do Microplástico na Superfície do Córion Embrionário e Larvas

Com base nos dados coletados, foi verificado afinidade do MP ao córion embrionário (Fig. 3), sendo que os embriões de *D. rerio* quando expostos ao MP isolado e combinado com o Cu (MP + Cu) apresentaram acúmulo das micropartículas na superfície externa do córion desde as primeiras 24 h de exposição (Fig. 3 A, B e C). No entanto, de acordo com o método realizado não foi detectado fluorescência no fluido periovular. Após a eclosão do embrião, a presença de MP também foi observada na superfície das larvas tanto em 72 hpf quanto em 96 hpf, porém, em menor quantidade (Fig. 3 D e E).

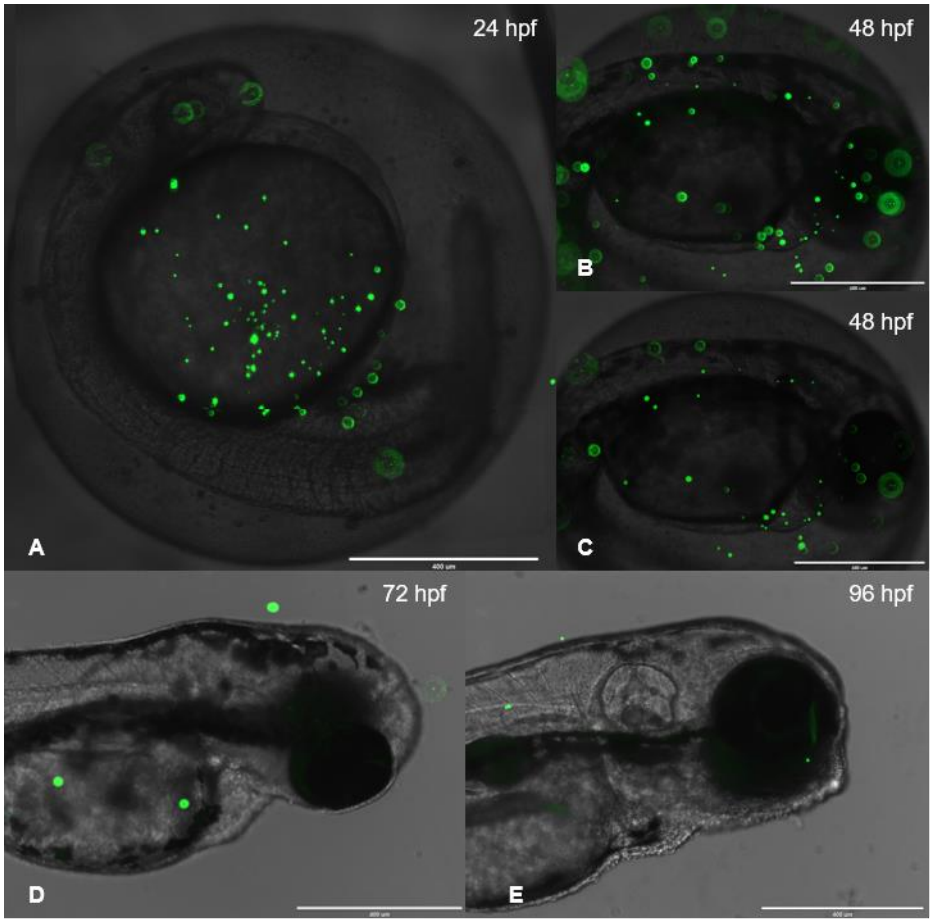

Figura 3 – Fotomicrografias ótica sob fluorescência da distribuição de microplástico na superfície do córion embrionário (A, B e C) e da acumulação de microplástico na superfície larval em 72 e 96 hpf (D e E). Fotografias capturas em microscópio de fluorescência, escala em 400 µm.

3.3 TESTE DE EMBRIOTOXICIDADE DO *ZEBRAFISH* - ZET

3.3.1 Taxa de Mortalidade e Eclosão

Para os diferentes tratamentos experimentais, não houve diferença significativa (p = 0,266; F = 1,393) na mortalidade dos embriões, sendo em 96 hpf as taxas de mortalidade foram CTR = Cu 8,52% < MP + Cu 9,09% < MP 13,64%. Quanto à eclosão, embriões do grupo Cu e MP + Cu apresentaram atraso significativo (p < 0,001; F = 23,524) na taxa de eclosão a partir de 72 hpf (Fig. 4). No grupo CTR a taxa de eclosão observada foi de 83,52%, enquanto no Cu foi 55,68% e na MP + Cu 31,25%. Já os embriões do grupo MP a taxa de eclosão foi de 77,84%, semelhante às do CTR. Após o período de 96 hpf, a diminuição significativa na taxa de eclosão foi mantida nos embriões expostos ao grupo mistura (82,39%) quando comparados ao grupo controle (91,48%). Para os embriões expostos aos poluentes isolados (MP e Cu) a taxa de eclosão apresentada foi de 86,36%.

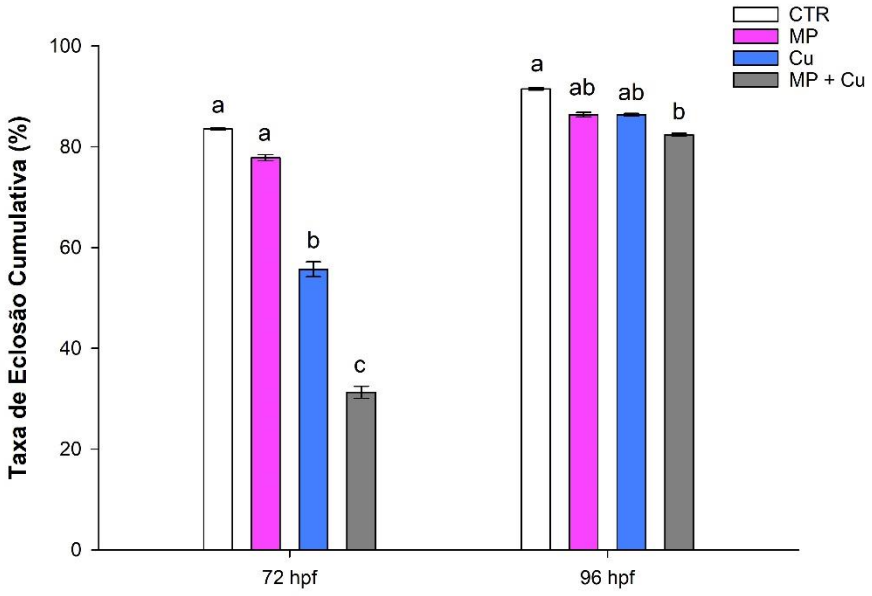

Figura 4 – Taxa de eclosão cumulativa de embriões e larvas de *D. rerio* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 20 µg MP L^{-1} (MP), 10 µg Cu L^{-1} (Cu) e 20 µg MP L^{-1} mais 10 µg Cu L^{-1} (MP + Cu) em 72 e 96 hpf. Os resultados foram expressos como média e erro padrão (média ± EP; n = 8). Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (p < 0,05).

3.3.2 Formação de Somito, Alterações Morfológicas e Desprendimento da Cauda

De acordo com os biomarcadores avaliados, a exposição de embriões de *D. rerio* nos tratamentos experimentais não acarretou embriotoxicidade uma vez

que não foram encontradas diferenças significativas ao longo de 96 hpf para os parâmetros de formação dos somitos, malformação embrionária e desprendimento da cauda.

3.3.3 Cardiotoxicidade

A frequência cardíaca foi aferida no período de 48, 72 e 96 hpf. A exposição das larvas ao MP isolado e em mistura com Cu apresentaram diminuição significativa (p = 0,002 e p = 0,005, respectivamente) na frequência cardíaca em 96 hpf, quando comparadas ao grupo CTR (Fig. 5). Em 48 e 72 hpf não foi observado diferença significativa.

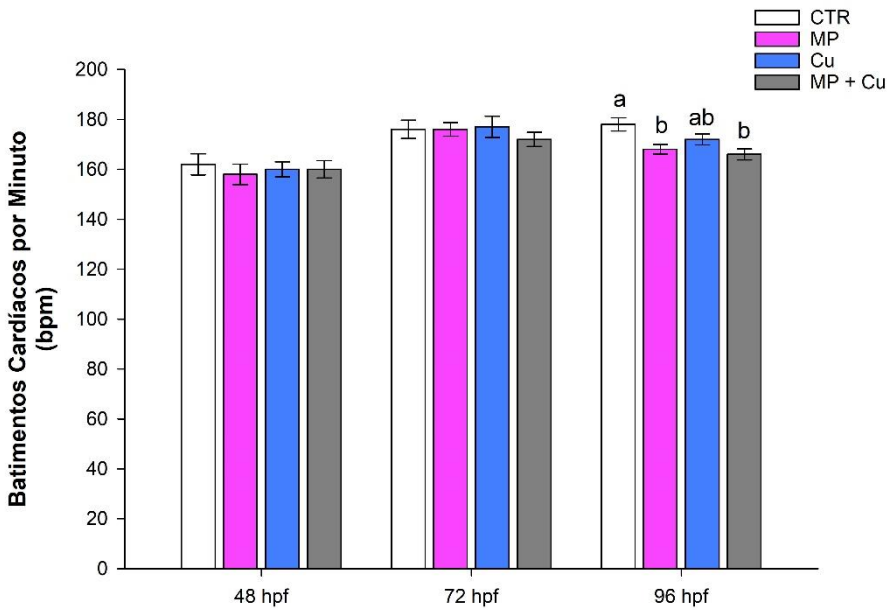

Figura 5 – Frequência cardíaca (batimento min $^{-1}$) de embriões e larvas de *D. rerio* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 20 µg MP L^{-1} (MP), 10 µg Cu L^{-1} (Cu) e 20 µg MP L^{-1} mais 10 µg Cu L^{-1} (MP + Cu) em 48, 72 e 96 hpf. Os resultados foram expressos como média e erro padrão (média ± EP; n = 8). Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (p < 0,05).

3.4 ACUMULAÇÃO DE COBRE NAS LARVAS

Nos embriões e larvas submetidos às exposições com Cu, foi evidenciado aumento significativo (p = 0,001; H = 15,733) na concentração do metal no tratamento Cu isolado e em mistura com o MP (MP + Cu) quando comparados aos grupos CTR e MP (Fig. 6). Ainda, não houve diferença significativa nos níveis de biacumulação do metal no grupo Cu isolado quando comparado ao grupo mistura (MP + Cu) (p = 0,753).

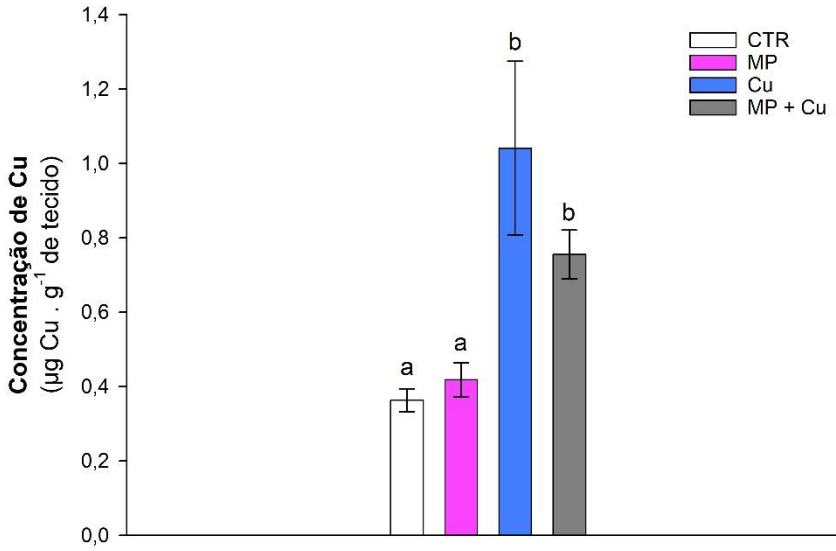

Figura 6 - Concentração de Cu (média ± EP) em larvas de *D. rerio* (n = 8 *pools* de 70 indivíduos por *pool*) expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 20 µg MP L^{-1} (MP), 10 µg Cu L^{-1} (Cu) e 20 µg MP L^{-1} mais 10 µg Cu L^{-1} (MP + Cu) por 24 h (A) e 96 h (B). Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos para cada tecido em cada tempo experimental ($p < 0,05$).

3.5 GENOTOXICIDADE

O ensaio cometa alcalino realizado com embriões de 96 hpf, não apontou diferença significativa no escore de danos no DNA ($p = 0,230$; $F = 1,551$) quanto à exposição aos diferentes tratamentos (Fig. 7).

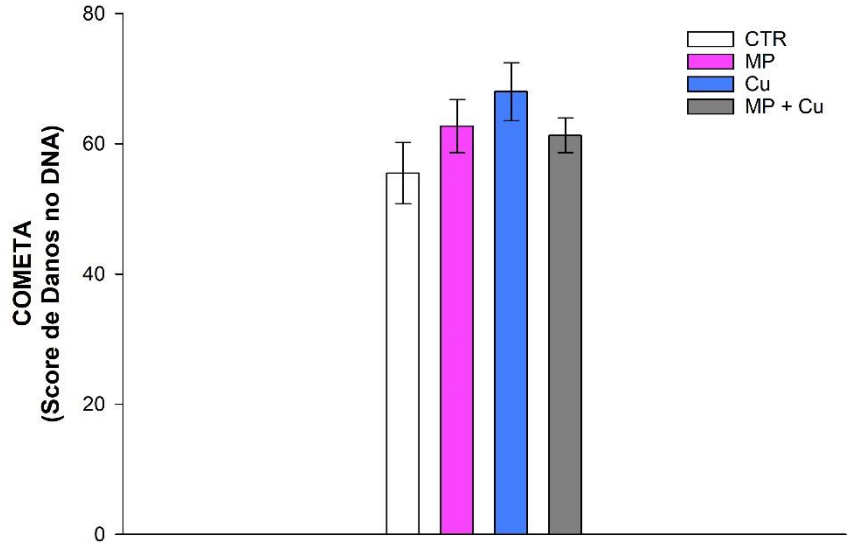

Figura 7 – Escore de danos no DNA (média ± EP) em larvas de *D. rerio* (n = 8 *pools* com 10 indivíduos por *pool*) expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 20 µg MP L^{-1} (MP), 10 µg Cu L^{-1} (Cu) e

20 µg MP L^{-1} mais 10 µg Cu L^{-1} (MP + Cu) por 96 hpf. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

4 DISCUSSÃO

Devido à contaminação e complexidade dos ecossistemas aquáticos, os organismos ali presentes estão expostos de forma simultânea a inúmeros xenobióticos. Diferentes estudos têm abordado a toxicidade dos microplásticos de forma isolada, no entanto sabe-se que os MP são capazes não só de adsorver como também de modificar a biodisponibilidade e toxicidade de outros xenobióticos, como o metal cobre. Estudos considerando a interação dos poluentes MP e Cu são limitados e parte dos trabalhos tem sido realizados com concentrações de exposição maiores, tanto para MP quanto para Cu. Existe uma defasagem ainda maior quando se trata dos estágios iniciais de desenvolvimento dos peixes e nossos resultados com exposições a concentrações menores dos poluentes no estágio embrio-larval, mostrou ser determinante na manutenção da espécie.

Como observado, o MP utilizado no presente estudo apresentou afinidade pelo córion embrionário. Até aproximadamente 72 hpf os embriões são envoltos pelo córion, que possui permeabilidade reduzida e age de forma seletiva impedindo que partículas e substâncias com massa molecular superior a 3 KDa presentes no meio tenham contato direto com o embrião (OECD, 2013). O córion apresenta poros de 300 nm a 1 µm distribuídos por toda superfície e por meio deles que ocorre a absorção de nutrientes, oxigênio e a excreção de resíduos (LIN et al., 2013; BHAGAT et al., 2020; ZHANG et al., 2020). Apesar das micropartículas utilizadas nos experimentos terem se enquadrado na faixa de tamanho dos poros, o MP não foi observado no líquido periovular, tendo permanecido alocado na superfície externa do córion, corroborando com o proposto por Lin et al. (2013). Alguns autores têm discutido características que podem influenciar na capacidade de penetração ou não das micropartículas pelos poros coriônicos, entre elas a concentração e tipo de MP utilizado, tempo de exposição, entre outros. O tempo de manejo entre a desova e exposição dos ovos aos tratamentos foi questionado por Pelka et al. (2017), pois durante o processo de desenvolvimento a estrutura e permeabilidade do córion sofre alterações consideravelmente rápidas, assim como todo o desenvolvimento do animal, podendo esse tempo interferir na absorção das micropartículas. Gellert e Heinrischsdorff (2001) relataram que os ovos expostos 1 hpf foram mais suscetíveis a

absorção de efluentes do que ovos expostos a partir de 4 hpf. Outro fator relevante questionado foi o tamanho das micropartículas. Em estudos avaliando diferentes tamanhos de microplástico, os MP maiores foram relatados com maior proporção na superfície externa do córion, enquanto as micropartículas menores foram encontradas dentro do saco vitelínico, associando os menores diâmetros de MP com a absorção e passagem pelos poros (LEE et al., 2019; SANTOS et al., 2020).

Em relação aos efeitos letais e subletais avaliados em embriões de *Danio rerio*, parâmetros como taxa de mortalidade, formação de somitos, malformações embrionárias, desprendimento da cauda e danos no DNA não apresentaram alterações significativas entre os tratamentos. Ao compararmos nossos dados com resultados obtidos por outros autores, foi possível observarmos divergências entre os efeitos. Condições como concentração dos poluentes, tamanho das micropartículas, tempo de exposição e permeabilidade do córion podem estar diretamente ligadas a tais divergências. Segundo Johson et al. (2007), a exposição de embriões de *zebrafish* ao Cu > 50 μg L^{-1} acarretou no aumento da taxa de mortalidade a partir de 5 hpf, porém nossos resultados foram obtidos através de exposições em concentração de Cu menor, baseando na concentração permitida pela legislação brasileira. Aumento na taxa de mortalidade de embriões também foi observada por Santos et al. (2020) em exposição a mistura de MP 2 mg L^{-1} + Cu 60 e 125 μg L^{-1} em 24, 48, 72 e 96 hpf, no entanto embriões expostos a mistura com Cu 15 μg L^{-1} não foram afetados. Quando expostos a baixas concentrações dos poluentes, MP 20 μg L^{-1} e Cu 10 μg L^{-1} isolados ou em mistura, os embriões de *D. rerio* não tiveram sua sobrevivência afetada, confirmando que as condições de exposição influenciam no resultado. Com relação aos danos em DNA, apesar de já terem sido observados em espécimes de *D. rerio* expostos ao MP (DIMITRIADI et al., 2021; ARAUJO et al., 2022), o fato de o MP ter afinidade pelo córion pode ter diminuído a disponibilidade dos poluentes aos embriões e larvas.

Embora MP isolado e em mistura com o Cu não tenha sido observado no líquido periovular, mas apenas na superfície externa do córion, os animais expostos a esses tratamentos apresentaram bradicardia. Este resultado demostra que a diminuição da frequência cardíaca foi uma resposta à exposição ao MP, uma vez que o mesmo não se apresentou em larvas expostas apenas ao Cu isolado. Diferentes fatores podem estar relacionados a bradicardia. Uma vez aderido à superfície do córion, o MP interfere na tomada de oxigênio desencadeando estresse oxidativo e

prejudicando o funcionamento ideal do coração (PITT et al., 2018). Esses efeitos podem resultar em prejuízos a longo prazo, uma vez que desenvolvida uma alteração cardíaca, esta pode afetar o desenvolvimento e sobrevivência dos indivíduos quando adultos (PITT et al., 2018). *D. rerio* tem se mostrado um bom modelo para estudos cardiotóxicos (DIMITRIADI et al., 2021), porém os efeitos cardiotóxicos do MP são controversos e mais estudos precisam ser realizados a fim de se investigar tais interações. A bradicardia também foi observada em *D. rerio*, tanto em animais adultos expostos a MP 26 e 260 mg L^{-1} tendo um resultado dose dependente (DIMITRIADI et al., 2021), quanto em embriões expostos ao MP 0,1, 1 e 10 ppm (PITT et al., 2018). Já Santos et al. (2020; 2021a) observaram aumento na frequência cardíaca de embriões de *zebrafish* expostos à mistura MP 2 mg L^{-1} + Cu 125 µg L^{-1} em 48 hpf.

As concentrações de Cu nos tratamentos contendo o metal mantiveram-se constantes e semelhantes ao proposto pela Resolução CONAMA 357/2005 para águas de classe 1 e 2, que estabelece a concentração de Cu dissolvido de 9 µg L^{-1}. A concentração estabelecida pela legislação brasileira ainda demonstra efeitos toxicológicos acarretados pela exposição ao xenobiótico. O Cu é um metal essencial, utilizado pelo organismo como cofator catalítico e estrutural por diferentes enzimas desde o metabolismo energético e defesas antioxidante até mesmo na respiração mitocondrial, mas em concentrações elevadas pode acarretar ações prejudiciais e deletérias (TISATO et al., 2010).

Um dos fatores alterados no presente estudo pela toxicidade do Cu foi a taxa de eclosão nos embriões. A exposição ao Cu isolado e em mistura, teve efeito retardante na eclosão embrionária, resultando na diminuição da taxa de eclosão em 72 hpf. Apesar de utilizarem exposições em concentrações maiores, a diminuição na taxa de eclosão dose-dependente foi relatada por outros pesquisadores (SANTOS et at., 2020; 2021a; 2021b). Ainda, foi possível observar uma interação entre os poluentes, uma vez que, em mistura, o MP foi capaz de potencializar o efeito do Cu, resultando em uma taxa de eclosão em 72 hpf ainda menor do que a taxa observada em embriões expostos apenas ao Cu, sugerindo sinergismo entre os poluentes e o potencial de adsorção do metal pelo MP. A influência dos poluentes no retardo da eclosão ainda não está bem definida, contudo, pode estar relacionada à captação de oxigênio durante os estágios iniciais de vida e com a interferência de mecanismos fisiológicos e enzimas envolvidas na ruptura do córion (ZHANG et al., 2018; SANTOS et al., 2020).

A potencialização do efeito do Cu na diminuição da taxa de eclosão indica possível ocorrência de sinergismo entre os poluentes e a importância de estudar efeitos combinados. A interação entre os poluentes MP e Cu já havia sido relatada anteriormente. Qiao et al. (2019) observaram o efeito sinérgico dos poluentes quando avaliaram os níveis de metalotioneína (MT), malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD) e acúmulo de Cu nos tecidos de animais adultos de *Danio rerio* expostos ao MP 40 mg L^{-1} e Cu 50 µg L^{-1}. Também foi observado que a adsorção de Cu pelo MP foi influenciada pelo tamanho da micropartícula, onde as menores partículas de MP tiveram maior adsorção de Cu (Qiao et al., 2019). Roda et al. (2020), em estudo com o peixe *Prochilodus lineatus*, mostraram que a coexposição ao MP e Cu resultou em danos significativos no DNA em eritrócitos e hepatócitos, neurotoxicidade, alteração na concentração de íons plasmáticos, diminuição da atividade da cálcio ATPase (Ca^{+}ATPase) e potencial sinergismo entre os poluentes. Santos et al. (2021a; 2022) também relataram o sinergismo entre MP 2 mg L^{-1} + Cu 60 e 125 µg L^{-1} e MP 2 mg L^{-1} + Cu 25 µg L^{-1}, respectivamente, em diversos biomarcadores analisados em *zebrafish*.

A acumulação de Cu em animais expostos ao metal isolado e em mistura com o MP foi significativa apesar de observarmos uma tendência ainda maior de acúmulo em animais expostos apenas ao grupo Cu 10 µg L^{-1} isolado, a diferença entre os grupos contendo o metal não foi significativa. Essa tendência à diminuição ao acúmulo de Cu observada em embriões expostos ao grupo MP 20 µg L^{-1} + Cu 10 µg L^{-1}, pode estar relacionada ao fato da maioria das micropartículas carregadas de Cu terem permanecido retidas ao córion, enquanto no grupo exposto ao Cu 10 µg L^{-1}, o Cu estava em sua forma livre e com maior biodisponibilidade para ser absorvido pelas larvas. Além disso, por meio da análise realizada não foram observados sinais de fluorescência do MP no interior das larvas, indicando que os MP carregados com Cu dispersos no meio de exposição provavelmente não foram ingeridos pelos embriões. Ainda, fatores como aumento da densidade do MP também precisam ser considerado e mais estudos envolvendo a interação entre poluentes proporcionará melhor entendimento sobre os efeitos toxicológicos das misturas nos organismos aquáticos (WANG et al., 2017; ARAUJO et al., 2022).

Os embriões de *D. rerio* até 120 hpf são considerados em estágio não protegido, fato que possibilitou padronizar e validar os testes de toxicidade que anteriormente eram realizados apenas com animais adultos (PELKA et al., 2017;

BHAGAT et al., 2020). Além disso, os efeitos causados pela exposição aos poluentes durante o período de desenvolvimento, podem ser facilmente observados em embriões de *zebrafish* e nos trazer uma previsão quanto à sobrevivência e desempenho dos animais quando adultos (PEREIRA et al., 2016; LEMOINE et al., 2018; QIANG; CHENG, 2019; WAN et al., 2019). Como o presente estudo utilizou concentrações de MPs dentro do estimado para ambiente aquático, marinho e dulcícola, que varia entre 0,2 e 320 μg L^{-1} (PENG et al., 2017; JIANG, 2018; TRIEBSKORN et al., 2019), os resultados fornecem informações relevantes sobre a toxicidade para os estágios iniciais de desenvolvimento de *D. rerio* quando expostos a MP e a mistura com o Cu.

5 CONCLUSÃO

Embora os MPs não tenham internalizado o ovo, atravessando o córion, a afinidade deles a este também configurou-se como algo prejudicial. No geral, nossas descobertas apontam que a resposta biológica e as interferências dos poluentes está relacionada ao tamanho das micropartículas, tempo de exposição dos organismos e concentração dos poluentes. Foram observados efeitos isolados pela exposição a cada poluente, como a diminuição da taxa de eclosão no grupo Cu 10 μg L^{-1}, diminuição nos batimentos cardíacos no grupo MP 20 μg L^{-1}, ligação do MP ao córion e no acúmulo de Cu nas larvas. Além disso, ocorreu uma interação entre os poluentes que resultou no atraso da eclosão em embriões, em que os efeitos causados pelo Cu isolado foram potencializados na mistura. O presente estudo confirma o potencial efeito tóxico de MP e Cu em embriões de *D. rerio* e contribui para a compreensão dos efeitos do MP, isolado e em mistura com o Cu, para peixes dulcícolas em fase embrionária, bem como fornece dados relevantes para que níveis seguros de MP em ambientes aquáticos de água doce tropicais sejam estabelecidos.

REFERENCIAS

AKSOY, Y. A.; NGUYEN, D. T.; CHOW, S.; CHUNG, R. S.; GUILLEMIN, G. J.; COLE, N. J.; HESSELSON, D. Chemical reprogramming enhances homology-directed genome editing in zebrafish embryos. **Communications Biology**, v. 2, p. 198, 2019.

ALENCAR, M. V.; GIMENEZ, B. G.; SASAHARA, C.; ELLIFF, C. I.; RODRIGUES, L. S.; CONTI, L, A.; DIAS, S. L. F. G.; CETRULO, T. B.; SCRICH, V. M.; TURRA, A. How far are we from robust estimates of plastic litter leakage to the environment?. **Journal of Environmental Management**, v. 323, p. 116195, 2022.

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**, v. 842, p. 85-93, 2019.

ANDRADY, A. L. Microplastics in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 1596-1605, 2011.

ARAÚJO, A. P. C.; DA LUZ, T. M.; ROCHA, T. L.; AHMED, M. A. I.; E SILVA, D. D. M.; RAHMAN, M. M.; MALAFAIA, G. Toxicity evaluation of the combination of emerging pollutants with polyethylene microplastics in zebrafish: Perspective study of genotoxicity, mutagenicity, and redox unbalance. **Journal of Hazardous Materials**, v. 432, p. 128691, 2022.

AYTAN, Ü.; ESENSOY, F. B.; ŞENTÜRK, Y.; GÜVEN, O.; KARAOĞLU, K.; ERBAY, M. Plastic occurrence in fish caught in the highly industrialized Gulf of İzmit (Eastern Sea of Marmara, Türkiye). **Chemosphere**, v. 324, p. 138317, 2023.

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.

BHAGAT, J.; ZANG, L.; NISHIMURA, N.; SHIMADA, Y. Zebrafish: An emerging model to study microplastic and nanoplastic toxicity. **Science of The Total Environment**, v. 728, p. 138707, 2020.

BRITO, R.S.; CANEDO, A.; FARIAS, D.; ROCHA, T. L. Transgenic zebrafish (*Danio rerio*) as an emerging model system in ecotoxicology and toxicology: Historical review, recent advances, and trends. **Science of The Total Environment**, v. *848*, p.157665, 2022.

BROOKS, A. L.; WANG, S.; JAMBECK, J. R. The Chinese import ban and its impact on global plastic waste trade. **Science Advances**, v. 4, p. eaat0131, 2018.

CANEDO, A.; SAIKI, P.; SANTOS, A. L; CARNEIRO, K. D. S.; SOUZA, A. M. D.; QUALHATO, G.; BRITO, R. D. S.; MELLO-ANDRADE, F.; ROCHA, T. L. Zebrafish (*Danio rerio*) meets bioethics: the 10Rs ethical principles in research. **Ciência Animal Brasileira**, v. 23, 2022.

CASTRO-CASTELLON, A. T.; HORTON, A. A.; HUGHES, J. M.; RAMPLEY, C.;

JEFFERS, E. S.; BUSSI, G.; WHITEHEAD, P. Ecotoxicity of microplastics to freshwater biota: Considering exposure and hazard across trophic levels. **Science of the Total Environment**, v. 816, p. 151638, 2022.

CHEN, B.; ZHANG, Z.; WANG, T.; HU, H.; QIN, G.; LU, T.; HONG, W.; HU, J.; PENUELAS, J.; QIAN, H. Global distribution of marine microplastics and potential for biodegradation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 451, p. 131198, 2023.

CHEN, Q.; GUNDLACH, M.; YANG, S.; JIANG, J.; VELKI, M.; YIN, D.; HOLLERT, H. Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity. **Science of the Total Environment**, v. 584, p. 1022-1031, 2017.

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.

COLLARD, F.; GASPERI, J.; GABRIELSEN, G. W.; TASSIN, B. Plastic particle ingestion by wild freshwater fish: a critical review. **Environmental Science & Technology**, v. 53, p. 12974-12988, 2019.

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

CRAWFORD, C. B.; QUINN, B. **Microplastic Pollutants**. Elsevier Limited, 2017.

DAMMSKI, A. P.; MÜLLER, B. R.; GAYA, C. **Manual de Criação em Biotério**. 2011.

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.

DIMITRIADI, A.; PAPAEFTHIMIOU, C.; GENIZEGKINI, E.; SAMPSONIDIS, I.; KALOGIANNIS, S.; FEIDANTSIS, K.; BOBORI, D. C.; KASTRINAKI, G.; KOUMOUNDOUROS, G.; LAMBROPOULOU, D. A.; KYZAS, G. Z.; BIKIARIS, D. N. Adverse effects polystyrene microplastics exert on zebrafish heart–Molecular to individual level. **Journal of Hazardous Materials**, v. 416, p. 125969, 2021.

EO, S.; HONG, S. H.; SONG, Y. K.; HAN, G. M.; SHIM, W. J. Spatiotemporal distribution and annual load of microplastics in the Nakdong River, South Korea. **Water Research**, v. 160, p. 228-237, 2019.

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.

FRED-AHMADU, O. H.; BRAGWAT, G.; OLUYOYE, I.; BENSON, N. U.; AYEJUYO, O. O.; PALANISAMI, T. Interaction of chemical contaminants with microplastics: principles and perspectives. **Science of the Total Environment**, v. 706, p. 135978, 2020.

GELLERT, G.; HEINRICHSDORFF, J. A. N. Effect of age on the susceptibility of zebrafish eggs to industrial wastewater. **Water Research**, v. 35, p. 3754-3757, 2001.

GUAN, J.; QI, K.; WANG, J.; WANG, W.; WANG, Z.; LU, N; QU, J. Microplastics as an emerging anthropogenic vector of trace metals in freshwater: Significance of biofilms and comparison with natural substrates. **Water Research**, v. 184, p.116205, 2020.

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.

JAMBECK, J. R.; GEYER, R.; WILCOX, C.; SIEGLER, T. R.; PERRYMAN, M.; ANDRADY, A.; NARAYAN, R.; LAW, K. L. Plastic waste inputs from land into the ocean. **Science**, v. 347, p. 768-771, 2015.

JIANG, J. Q. Occurrence of microplastics and its pollution in the environment: A review. **Sustainable Production and Consumption**, v. 13, p. 16-23, 2018.

JOHNSON, A.; CAREW, E.; SLOMAN, K. A. The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 431-438, 2007.

KALČÍKOVÁ, G. Beyond ingestion: Adhesion of microplastics to aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 258, p. 106480, 2023.

KHOSHMANESH, M.; SANATI, A. M.; RAMAVANDI, B. Co-occurrence of microplastics and organic/inorganic contaminants in organisms living in aquatic ecosystems: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 187, p. 114563, 2023.

LA DAANA, K. K.; GÅRDFELDT, K.; LYASHEVSKA, O.; HASSELLÖV, M.; THOMPSON, R. C.; O'CONNOR, I. Microplastics in sub-surface waters of the Arctic Central Basin. **Marine Pollution Bulletin**, v. 130, p. 8-18, 2018.

LAMMER, E.; CARR, G. J.; WENDLER, K.; RAWLINGS, J. M.; BELANGER, S. E.; BRAUNBECK, T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, p. 196-209, 2009.

LEE, W. S.; CHO, H. J.; KIM, E.; HUH, Y. H.; KIM, H. J.; KIM, B.; KANG, T.; LEE, J. S.; JEONG, J. Bioaccumulation of polystyrene nanoplastics and their effect on the toxicity of Au ions in zebrafish embryos. **Nanoscale**, v. 11, p. 3173-3185, 2019.

LEMOINE, C. M.; KELLEHER, B. M.; LAGARDE, R.; NORTHAM, C.; ELEBUTE, O. O.; CASSONE, B. J. Transcriptional effects of polyethylene microplastics ingestion in developing zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Pollution**, v. 243, p. 591-600, 2018.

LIN, S.; ZHAO, Y.; NEL, A. E.; LIN, S. Zebrafish: an in vivo model for nano EHS studies. **Small**, v. 9, p. 1608-1618, 2013.

MARTIN-FOLGAR, R.; TORRES-RUIZ, M.; DE ALBA, M.; CAÑAS-PORTILLA, A. I.; GONZÁLEZ, M. C.; MORALES, M. Molecular effects of polystyrene nanoplastics toxicity in zebrafish embryos (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 312, p. 137077, 2023.

MENEGOLA, E.; BATTISTONI, M.; METRUCCIO, F.; DI RENZO, F. Advantages and disadvantages of the use of *Xenopus laevis* embryos and Zebra fish as alternative methods to assess teratogens. **Current Opinion in Toxicology**, v. 34, p. 100387, 2023.

OBBARD, R. W.; SADRI, S.; WONG, Y. Q.; KHITUN, A. A.; BAKER, I.; THOMPSON, R. C. Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice. **Earth's Future**, v. 2, p. 315-320, 2014.

OECD Test No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. ***OECD Guidelines for the Testing of Chemicals***, v. 2, p. 1-22, 2013.

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.

PANNO, S. V.; KELLY, W. R.; SCOTT, J.; ZHENG, W.; MCNEISH, R. E.; HOLM, N.;

HOELLEIN, T.; BARANSKI, E. Microplastic contamination in karst groundwater systems. **Groundwater**, v. 57, p. 189-196, 2019.

PELKA, K. E.; HENN, K.; KECK, A.; SAPEL, B.; BRAUNBECK, T. Size does matter–Determination of the critical molecular size for the uptake of chemicals across the chorion of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 185, p. 1-10, 2017.

PENG, J.; WANG, J.; CAI, L. Current understanding of microplastics in the environment: Occurrence, fate, risks, and what we should do. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 13, p. 476-482, 2017.

PEREIRA, A. C.; GOMES, T.; MACHADO, M. R. F.; ROCHA, T. L. The zebrafish embryotoxicity test (ZET) for nanotoxicity assessment: from morphological to molecular approach. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 1841-1853, 2019.

PEREIRA, T. C. B.; CAMPOS, M. M.; BOGO, M. R. Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, p. 876-885, 2016.

PITT, J. A.; KOZAL, J. S.; JAYASUNDARA, N.; MASSARSKY, A.; TREVISAN, R.; GEITNER, N.; WIESNER, M.; LEVIN, E. D.; DI GIULIO, R. T. Uptake, tissue distribution, and toxicity of polystyrene nanoparticles in developing zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 194, p. 185-194, 2018.

PLASTICSEUROPE. Plastics – the Facts 2022. **PlasticsEurope**, 2022.

QIANG, L.; CHENG, J. Exposure to microplastics decreases swimming competence in larval zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 176, p. 226-233, 2019.

QIAO, R.; LU, K.; DENG, Y.; REN, H.; ZHANG, Y. Combined effects of polystyrene microplastics and natural organic matter on the accumulation and toxicity of copper in zebrafish. **Science of the Total Environment**, v. 682, p. 128-137, 2019.

RODA, J. F. B.; LAUER, M. M.; RISSO, W. E.; MARTINEZ, C. B. R. Microplastics and copper effects on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: Is there any interaction?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 242, p. 110659, 2020.

SANTOS, D.; FÉLIX, L.; LUZIO, A.; PARRA, S.; BELLAS, J.; MONTEIRO, S. M. Single and combined acute and subchronic toxic effects of microplastics and copper in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. **Chemosphere**, v. 277, p. 130262, 2021. (a)

SANTOS, D.; FÉLIX, L.; LUZIO, A.; PARRA, S.; CABECINHA, E.; BELLAS, J.; MONTEIRO, S. M. Toxicological effects induced on early life stages of zebrafish (*Danio rerio*) after an acute exposure to microplastics alone or co-exposed with copper. **Chemosphere**, v. 261, p. 127748, 2020.

SANTOS, D.; LUZIO, A.; FÉLIX, L.; CABECINHA, E.; BELLAS, J.; MONTEIRO, S. M. Microplastics and copper induce apoptosis, alter neurocircuits, and cause behavioral changes in zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 242, p. 113926, 2022.

SANTOS, D.; LUZIO, A.; MATOS, C.; BELLAS, J.; MONTEIRO, S. M.; FÉLIX, L. Microplastics alone or co-exposed with copper induce neurotoxicity and behavioral alterations on zebrafish larvae after a subchronic exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 235, p. 105814, 2021. (b)

SATHYAMOORTHY, M.; SENTHILKUMAR, R.; SARAVANAKUMAR, K.; REDDY PRASAD, D. M.; NAVEEN PRASAD, B. S. The potential of polyethylene microplastics to transport copper in aquatic systems: Adsorption and desorption

studies. **Water Environment Research**, v. 94, p. e10809, 2022.

SIDDIQUE, M. A. M.; UDDIN, A.; BHUIYA, A.; RAHMAN, S. M. A.; KIBRIA, G. Occurrence, spatial distribution, and characterization of microplastic particles in the salt pans from the Southeastern part of the Bay of Bengal. **Regional Studies in Marine Science**, v. 61, p. 102846, 2023.

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.

SORENSEN, E. M. B. **Metal Poisoning in Fish**. CRC Press, 1991.

STRUNGARU, S. A.; JIJIE, R.; NICOARA, M.; PLAVAN, G.; FAGGIO, C. Micro-(nano) plastics in freshwater ecosystems: Abundance, toxicological impact and quantification methodology. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 110, p. 116-128, 2019.

TISATO F.; MARZANO C.; PORCHIA M.; PELLEI M.; SANTINI C. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. **Medicinal Research Reviews**, v. 30, p. 708-749, 2010.

TRIEBSKORN, R.; BRAUNBECK, T.; GRUMMT, T.; HANSLIK, L.; HUPPERTSBERG, S.; JEKEL, M.; KNEPPER, T. P.; KRAIS, S.; MÜLLER, Y. K.; PITTROFF, M.; RUHL, A. S.; SCHMIEG, H.; SCHÜR, C.; STROBEL, C.; WAGNER, M.; ZUMBÜLTE, N.; KÖHLER, H. R. Relevance of nano-and microplastics for freshwater ecosystems: a critical review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 110, p. 375-392, 2019.

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.

WAN, Z.; WANG, C.; ZHOU, J.; SHEN, M.; WANG, X.; FU, Z.; JIN, Y. Effects of polystyrene microplastics on the composition of the microbiome and metabolism in larval zebrafish. **Chemosphere**, v. 217, p. 646-658, 2019.

WANG, C.; SUN, D.; JUNAID, M.; XIE, S.; XU, G.; LI, X.; TANG, H.; ZOU, J.; ZHOU, A. Effects of tidal action on the stability of microbiota, antibiotic resistance genes, and microplastics in the Pearl River Estuary, Guangzhou, China. **Chemosphere**, v. 327, p. 138485, 2023. (a)

WANG, W.; NDUNGU, A. W.; LI, Z.; WANG, J. Microplastics pollution in inland freshwaters of China: A case study in urban surface waters of Wuhan, China. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 1369-1374, 2017.

WANG, X.; ZHANG, X.; YAO, C.; SHAN, E.; LV, X.; TENG, J.; ZHAO, J.; WANG, Q. Impact of aged and virgin microplastics on sedimentary nitrogen cycling and microbial ecosystems in estuaries. **Science of The Total Environment**, v. 878, p. 162977, 2023. (b)

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, F.; YANG, C.; ZHU, Z.; BAI, X.; MA, J. Adsorption behavior of organic pollutants and metals on micro/nanoplastics in the aquatic environment. **Science of the Total Environment**, v. 694, p.133643, 2019.

ZHANG, C.; YE, L.; WANG, C.; XIONG, X.; LI, Y.; LI, P.; ZHANG, X.; YU, H. Toxic Effect of Combined Exposure of Microplastics and Copper on Goldfish (*Carassius auratus*): Insight from Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis and Autophagy

in Hepatopancreas and Intestine. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 109, p. 1029-1036, 2022.

ZHANG, R.; WANG, M.; CHEN, X.; YANG, C.; WU, L. Combined toxicity of microplastics and cadmium on the zebrafish embryos (*Danio rerio*). **Science of the Total Environment**, v. 743, p. 140638, 2020.

ZHANG, Y.; WU, P.; XU, R.; WANG, X.; LEI, L.; SCHARTUP, A. T.; PENG, Y.; PANG, Q.; WANG, X.; MAI, L.; WANG, R.; LIU, H.; WANG, X.; LUIJENDIJK, A.; CHASSIGNET, E.; XU, X.; SHEN, H.; ZHENG, S.; ZENG, E. Y. Plastic waste discharge to the global ocean constrained by seawater observations. **Nature Communications**, v. 14, p. 1372, 2023.

ZHANG, Y.; ZHANG, R.; SUN, H.; CHEN, Q.; YU, X.; ZHANG, T.; YI, M.; LIU, J. X. Copper inhibits hatching of fish embryos via inducing reactive oxygen species and down-regulating Wnt signaling. **Aquatic Toxicology**, v. 205, p. 156-164, 2018.

Capítulo II

Manuscrito II

MANUSCRITO II

Manuscrito será submetido a um periódico a ser definido.

EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO MICROPLÁSTICO E DO COBRE EM UMA ESPÉCIE DE TELEÓSTEO DE ÁGUA DOCE

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.

RODA, Jéssica Fernanda Bernardes. **Efeitos toxicológicos do microplástico e do cobre em uma espécie de teleósteo de água doce**. 2023. 29 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

O ecossistema aquático dulcícola tem sido cada mais afetado pela contaminação por microplásticos (MPs), isolado ou combinado com outros poluentes, como o metal cobre, e sua toxicidade para os organismos aquáticos ainda não são bem compreendidos. O objetivo do nosso trabalho foi avaliar os efeitos da exposição aguda (96 h) ao MP (20 ug L^{-1}) e ao Cu (10 ug L^{-1}), isolados e em mistura, em juvenis do peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. A interação entre os poluentes foi observada na mistura, confirmando nossa hipótese quanto à seguinte ordem de toxicidade: MP + Cu > Cu > MP > CTR. A exposição a mistura causou alteração na glicemia, anemia, aumento nos danos do DNA em eritrócitos e hepatócitos e aumento nos níveis de proteínas carboniladas (PCO) nas brânquias e no fígado. Já a exposição ao Cu isolado foi responsável por diminuir a atividade da glutationa S-transferase (GST) e causar danos no DNA em hepatócitos, enquanto a exposição ao MP isolado acarretou no aumento de dano no DNA hepático. A exposição simultânea mostrou possível interação entre os poluentes MP e Cu, resultando em efeito sinérgico, onde uma pequena partícula tem se transformado num grande problema.

Palavras-chave: Sinergismo, Genotoxicidade, Estresse oxidativo, Peixe Neotropical, Poluentes Emergentes.

1 INTRODUÇÃO

Os plásticos são polímeros orgânicos sintéticos derivados do petróleo, produzidos em larga escala devido às suas inúmeras vantagens e aplicações que proporcionam, como a longa vida útil, resistência e durabilidade, que tem resultado no seu uso e descarte insustentável (THOMPSON et al., 2009; PRATA et al., 2019).

Nos últimos anos, os microplásticos (MPs), partículas menores que 5 mm, tornaram-se uma crescente preocupação devido ao seu acúmulo no ambiente e potencial efeito tóxico para a saúde humana e ambiental (CONTI et al., 2021; JUNG et al., 2022). Os MPs são liberados no ambiente de forma abundante e categorizados de acordo com sua origem, dividindo-se em MP primário e secundário (LIN et al., 2023). Os MPs primários são aqueles liberados no ambiente (tamanho < 5 mm) provenientes de processos industriais, produtos de cuidados pessoais, como esfoliantes e creme dental e microfibras liberadas nas lavagens de produtos têxtil. Os MPs de fontes primárias representam de 15 a 31% de todos os plásticos depositados no meio ambiente (BOUCHER; FRIOT, 2017). Os MPs secundários são aqueles advindos da degradação de plásticos maiores, seja pela fragmentação ou fotodegradação (BARNES et al., 2009; COLE et al., 2011; BOUCHER; FRIOT, 2017).

Os MPs são considerados poluentes emergentes onipresentes e atualmente são encontrados por toda extensão dos ecossistemas aquáticos em diferentes profundidades, incluindo sedimento, coluna d'agua e águas superficiais (WANG et al., 2020b). Inúmeros estudos têm quantificado a presença de MP no ambiente aquático, marinho (KANHAI et al., 2020; VETRIMURUGAN et al., 2020; ZHANG et al., 2020b; ZHANG et al., 2022c) e dulcícola (MINTENIG et al., 2019; TONG et al., 2020; WANG et al., 2020a; ZHANG et al., 2020a; MAO et al., 2021; ZHANG et al., 2022c). A presença de MPs em corpos hídricos, como rios, riachos, lagos e águas subterrâneas está cada vez mais prevalente. A constante entrada de MP nos ecossistemas aquáticos, a falta de gestão de resíduos e normativas que padronizem os métodos de quantificação ainda são uma barreira para a identificação de níveis seguros de MP no ambiente (CONTI et al., 2021; JUNG et al., 2022). Além disso, a contaminação em ambiente dulcícola pode ser influenciada pelo conjunto de elementos ali presentes, como o tipo de corpo d'água, a presença de atividades antrópicas e densidade populacional (WANG et al., 2020b; ZHANG et al., 2022c).

A biodisponibilidade do MP pode variar quanto às suas

características, como a densidade, o tamanho, a forma, a cor e o tipo do plástico (WRIGHT et al., 2013; CINCINELLI et al., 2019). Com relação ao tamanho dos MPs foi sugerido a subdivisão das micropartículas em dois grupos, as grandes partículas microplásticas (L-MPP, 1 – 5 mm) e as pequenas partículas microplásticas (S-MPP, < 1 mm) (NAJI et al., 2019; LIM et al., 2022). Os S-MPP tendem a ser mais suscetíveis a serem acidentalmente absorvidos pelos peixes durante a alimentação e respiração e posteriormente transportados pelos diferentes órgãos e tecidos (LIN et al., 2023). Quanto ao formato dos MPs, são encontrados os mais variados tipos desde fibras, fragmentos, filmes e *pellets* com cores diversas, e sua presença nos peixes pode ser influenciada principalmente pela semelhança às suas presas, ou simplesmente ingeridas de forma passiva (VETRIMURUGAN et al., 2020; LIM et al., 2022). Com relação aos principais tipos de polímeros observados nos estudos, destacam-se os MPs de Polietileno (PE) > Poliamida (PA) > Polipropileno (PP) = Polietileno Tereftalato (PET) > Poliestireno (PS) (LIN et al., 2023).

O ecossistema aquático é um ambiente complexo que abriga de forma simultânea diferentes poluentes. Sabe-se que devido às suas características, como a sua hidrofobicidade e área de superfície, os MPs são capazes de adsorver outros compostos inorgânicos e orgânicos, como por exemplo, metais, fármacos, bifenilas policloradas (PCBs) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), alterando a concentração e o efeito destes na matriz ambiental (SYBERG et al., 2015; ZHANG et al., 2022b). Frequentemente, a toxicidade combinada dos MPs com outros poluentes pode resultar em efeitos antagônicos ou sinérgicos (ZHANG et al., 2022c). Sabe-se que os MPs são capazes de adsorver metais como o cobre (Cu), que é um metal essencial para as funções biológicas, mas que em altas concentrações torna-se tóxico, e ambos os poluentes são frequentemente encontrados no ambiente aquático tornando inevitável tal combinação (DAVARPANAH; GUILHERMINO, 2015; ALI et al., 2019). Os mecanismos de interação entre os MPs e os metais são controversos, mas as sugestões são que a adsorção esteja relacionada a processos físicos e químicos entre os poluentes (LANG et al., 2020; LIN et al., 2021).

É sabido que o Cu pode se acumular em diferentes órgãos e tecidos dos animais e causar danos em proteínas, lipídeos e DNA devido a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (MONTEIRO et al., 2009). Quando em mistura, o Cu adsorvido pelo MP pode se apresentar em concentrações elevadas, resultando em efeitos significativos para os organismos expostos. Roda et al. (2020) observaram

que a exposição à mistura dos poluentes MP + Cu potencializou a diminuição do cálcio plasmáticos no teleósteo dulcícola *Prochilodus lineatus*, quando em comparação as exposições aos poluentes isolados. Além disso, ambas as exposições tanto aos poluentes isolados, como em mistura, resultaram em diferentes efeitos como danos ao DNA, redução da atividade cerebral da acetilcolinesterase (AChE) e também alteração na ionorregulação (RODA et al., 2020). Em *Danio rerio*, nos primeiros estágios de vida (2 a 96 horas pós-fertilização), a co-exposição do MP + Cu induziu estresse oxidativo e inibiu a atividade da AChE, além de apresentar antagonismo quando observado os níveis de glutationa e expressão gênica (SANTOS et al., 2020). A exposição simultânea de MP e Cu aumentou o acúmulo de Cu no hepatopâncreas e no intestino do peixe *Carassius auratus*, além de induzir o estresse oxidativo afetando os níveis de inflamação, apoptose e autofagia nos peixes dourados (ZHANG et al., 2022a). Em um estudo realizado com *Oreochromis niloticus*, ZHANG et al. (2022b) observaram que o MP contribuiu para a bioacumulação de Cu no fígado e, à medida que o acúmulo de Cu aumentou, o sistema antioxidante e imunológico das tilápias do Nilo foi prejudicado.

Lacunas sobre a toxicidade dos MPs e sua possível interação com outros poluentes presentes no ambiente aquático, ainda são uma realidade. E estudos em laboratório com animais de água doce ainda são escassos, principalmente quando se trata de estudos sobre os efeitos dos poluentes em espécies nativas da América Latina (LÓPEZ ACA et al., 2018). Tais efeitos podem ser avaliados por meio de biomarcadores, que são importantes ferramentas pois fornecem informações relativamente precoces sobre os efeitos causados por poluentes, indicando mudanças desde níveis moleculares até a ecossistemas (VAN DER OOST et al., 2003). As respostas dos biomarcadores devem ser integradas de forma a permitir um melhor entendimento sobre a relação existente entre os biomarcadores e os níveis de contaminação ambiental (DEVIN et al., 2014). Analisando os resultados obtidos utilizando os biomarcadores, acreditamos que os efeitos às exposições irão se classificar na seguinte ordem: MP + Cu > Cu > MP > CTR.

O peixe *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) apresenta potencial como modelo biológico para a avaliação dos efeitos decorrentes do MP e do Cu por ser espécie nativa, de fácil manutenção em laboratório e sensível a poluentes (RODA et al., 2020). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição aguda ao MP e ao Cu, isolados e em mistura, em biomarcadores genotóxicos (dano no DNA),

bioquímicos (antioxidantes e danos oxidativos), fisiológicos (glicose, glicogênio, lactato, concentração iônica e parâmetros hematológicos), além da concentração de Cu nos tecidos de *P. lineatus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Prochilodus lineatus

Juvenis de *P. lineatus* (n = 32; 220,84 ± 5,13 g; 27,57 ± 0,24 cm; média ± EP) foram obtidos da piscicultura Cambará Fish - Scandolo (Paraná, Brasil). Os animais foram aclimatados no laboratório durante 6 dias, em tanque de 500 L contendo água desclorada, com aeração constante e parâmetros físicos e químicos monitorados (média ± EP): temperatura de 25,04 ºC ± 0,06; pH 6,53 ± 0,16; condutividade 0,16 ± 0,02 mS cm^{-1}; turbidez 9,22 ± 1,91 NTU; oxigênio dissolvido 4,02 ± 0,33 mg O_2 L^{-1} e total de sólidos dissolvidos 0,10 ± 0,01 g L^{-1}. O fotoperíodo foi mantido com 12 h claro: 12 h escuro. Os animais foram alimentados a cada 48 h com ração comercial de peixe 36% de proteína (Guabi-Brasil), sendo a alimentação suspensa 24 h antes do início das exposições e os peixes não foram alimentados durante o experimento.

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após a aclimatação, os exemplares de *P. lineatus* foram distribuídos em quatro grupos (n = 8 em cada condição): o primeiro grupo exposto apenas à água desclorada (CTR), e os demais grupos expostos aos poluentes de forma isolada e em mistura, sendo: MP 20 µg L^{-1} (MP), Cu 10 µg L^{-1} (Cu) (nominal) e a mistura de MP 20 µg L^{-1} e Cu 10 µg L^{-1} (MP+Cu), durante 96 h. Os microplásticos utilizados no estudo foram microesferas fluorescentes (ex: 485 nm e em: 525 nm), tamanho: 0,881 ± 0,412 µm, cor amarelo e densidade: 1,3 g cm^3 (Cospheric LLC, California, EUA). Segundo imagens obtidas por microscopia de força atômica (AFM) realizadas no “manuscrito I”, o MP utilizado apresentou formato esférico em maior proporção e o formato elíptico em algumas micropartículas. A distribuição de tamanho das micropartículas variou entre 0,340 a 1,920 µm, o qual foi dividido em população de partículas com dimensões inferiores a 1 µm (0,595 ± 0,204 µm) e populações com dimensões superiores ou igual

a 1 µm (1,304 ± 0,236 µm). A concentração de MP utilizada foi baseada em concentrações encontradas no ambiente aquático, de acordo com dados disponíveis em literatura (OLIVEIRA et al., 2013; HORTON et al., 2017). Já a concentração testada de cobre (Copper(II) dihydrate, ACROS Organics^{TM}) de 10 µg L^{-1} (nominal), foi escolhida por ser uma concentração que se enquadra nos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005 para água doce, e está abaixo da CL_{50} 96 h estimada para *P. lineatus*, que é de 29 µg L^{-1} de Cu (Mazon e Fernandes, 1999). As suspensões estoque de MP, Cu e mistura foram preparadas 24 h antes da exposição. Primeiramente iniciamos com o preparo das soluções estoque dos tratamentos com os poluentes na sua forma isolada, MP e Cu. Posteriormente, uma parte das soluções isoladas (MP e Cu) foram combinadas para obter a suspenção estoque do tratamento mistura, possibilitando melhor adsorção do Cu ao MP, como proposto por Chen et al. (2017).

Para as exposições, os peixes foram mantidos individualmente em aquários de 10 L, isolados de modo que um animal não fosse capaz de ver o outro, com aeração contante, fotoperíodo de 12 h claro: 12 h escuro, com renovação parcial (80%) do meio de exposição em 48 h. Os parâmetros físicos e químicos da água (média ± EP) foram monitorados nos 4 grupos experimentais: temperatura 25,61 ± 0,11 °C; pH 6,94 ± 0,07; condutividade 0,11 ± 0,002 mS cm^{-1}; turbidez 1,65 ± 0,29 NTU; oxigênio dissolvido 5,10 ± 0,08 mg O_2 L^{-1}; total de sólidos dissolvidos 0,08 ± 0,001 g L^{-1} e dureza 27,27 ± 0,76 mg $CaCO_3$ L^{-1}.

2.3 AMOSTRAGEM

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, utilizado posteriormente para análise de parâmetros hematológicos, análises plasmáticas, análise genotóxica e mensuração da concentração de Cu. Em seguida, os animais foram eutanasiados por secção medular para remoção de brânquias, fígado, trato digestório, rim posterior, cérebro e músculo, os quais foram armazenados a -80 °C para análises bioquímicas, fisiológicas, genotóxicas e neurotóxicas. Os experimentos realizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (protocolo CEUA nº 005.2020).

2.4 QUANTIFICAÇÃO DE COBRE

2.4.1 Amostras de água

Amostras de água não filtradas e filtradas (filtro de 0,45 µm, Millipore Millex HV/PVDF) foram coletadas para a análise de Cu total e dissolvido, respectivamente, nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 h, sendo que em 48 h as amostras foram coletadas antes e após a renovação dos tratamentos. Imediatamente após a coleta da água, as amostras foram acidificadas com HNO_3 (65%) e armazenadas a 4 °C até a determinação do metal. As concentrações de Cu nas amostras de água foram analisadas por atomizador de grafite, por espectrometria de absorção atômica (AAnalyst 700, PerkinElmer, EUA), comparando com solução padrão de referência (Specsol, Brasil), com limite de detecção para Cu de 0,014 µg L^{-1}. Além da concentração de Cu, a concentração de sódio (Na^+) e potássio (K^+) foram medidas em fotômetro de chama (DM-62, Digimed) e expressas em mM.

2.4.2 Amostras de tecido de *P. lineatus*

A concentração de Cu foi determinada em brânquias, trato gastrointestinal, fígado, rim, cérebro e músculo. Os tecidos foram completamente secos a 60 ºC e digeridos em ácido nítrico ultrapuro 5N (48 h a 60 ºC), de acordo com Alves e Wood (2006). Após a digestão, a concentração de Cu nos tecidos foi avaliada seguindo o mesmo protocolo para análise de Cu na água. Os resultados foram expressos em mg de Cu g de tecido $seco^{-1}$.

2.5 CARACTERIZAÇÃO DO MICROPLÁSTICO - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A morfologia das micropartículas fluorescentes (material em pó e em solução 0,2 g L^{-1}) foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). As micropartículas em pó foram alocadas em um *stub* contendo fita dupla face de carbono (Electron Microscopy Science). Já a suspensão estoque de MP foi depositada em lamínula de 7 mm para secagem e análise posterior. Em seguida, as amostras foram revestidas por pulverização catódica com ouro de 15 nm de espessura (Sputter Coater SDC 050, Bal-Tec Union Ltd., Liechtenstein) e analisados com microscópio eletrônico

de varredura (FEI Quanta 200, Eindhoven, Holanda / Holanda) no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LEMM), Universidade Estadual de Londrina. As fotografias foram capturadas em aumento de 100x, 2.500x e 10.000x.

2.6 BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS

2.6.1 Análises hematológicas

O número de eritrócitos por mm^3 de sangue (Red Blood Cell - RBC) foi determinado utilizando câmara de Neubauer em microscópio de luz. A dosagem de hemoglobina (Hb) foi realizada pelo método colorimétrico utilizando cianetometahemoglobina em espectrofotômetro com leitura a 540 nm (Libra S32, Biochrom, UK), utilizando kit comercial (Labtest Diagnostica, Brasil, REF 47). O hematócrito (Hct) foi determinado por centrifugação das amostras de sangue (1200 g e 7 min) em centrífuga de microhematócrito (Luguimac – S.R.C, modelo LC-5, Argentina), posteriormente foram realizadas as leituras utilizando cartão de leitura padronizado (FANEM LTDA, Brasil).

2.6.2 Análises plasmáticas

O sangue total foi centrifugado (3000 g, 10 min) e as amostras de plasmas foram armazenadas a -20 ºC. A glicose plasmática foi determinada utilizando espectrofotômetro (505 nm – Victor^3, Perkin Elmer) pelo método da glicose oxidase com teste enzimático colorimétrico (Labtest Diagnostica, Brasil, REF 84-2/500) e a quantidade de glicose foi expressa em mg dL^{-1}. O lactato plasmático foi determinado utilizando kit enzimático comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil, REF 138-1/50) em espectrofotômetro a 550 nm (Victor^3, Perkin Elmer). As concentrações de sódio (Na^+) e potássio (K^+) (1:100 v/v) foram determinadas em fotômetro de chama (DM-62, Digimed) e expressos em mM.

2.6.3 Glicogênio

O glicogênio foi determinado no músculo e no fígado, seguindo as etapas de digestão, hidrólise e precipitação, de acordo com o protocolo descrito por Bidinotto et al. (1997) . Em seguida, o pellet foi ressuspenso em água para

avaliação do teor de açúcares redutores de acordo com Dubois et al. (1956).

2.7 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

As amostras de brânquias e fígado foram homogeneizadas (1:10 w/v) em solução tampão fosfato de K^+ (0,1 M; pH 7,0), centrifugadas (13.000 g ou 9.000 g para PCO, 20 min, 4 ºC) e os sobrenadantes foram armazenados a -80 °C até o momento das análises. O conteúdo de proteína das amostras foi determinado de acordo com Bradford (1976).

2.7.1 Glutationa S-transferase

A atividade da glutationa S-transferase (GST) foi determinada em brânquias e fígado, de acordo com protocolo estabelecido por Keen et al. (1976), monitorando a complexação do GSH com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB; 1 mM) em espectrofotômetro a 340 nm (Victor^3, Perkin Elmer). A atividade da enzima foi expressa em nmol CDNB min^{-1} mg de $proteína^{-1}$.

2.7.2 Catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada nas brânquias e fígado pelo decaimento da absorbância a 240 nm (SpectraMax, Plus 384) consequente da quebra do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Beutler, 1975). A atividade enzimática foi expressa em µmol de H_2O_2 min^{-1} mg de $proteína^{-1}$.

2.7.3 Glutationa

A concentração do tripeptídeo GSH foi medida no fígado utilizando 5,5’-ditiobis-ácido-nitrobenzóico (DTNB), a 412 nm contra uma curva padrão de GSH, de acordo com Beutler et al. (1963). A concentração de GSH foi expressa em µg de GSH mg de $proteína^{-1}$.

2.7.4 Lipoperoxidação

A LPO foi determinada no fígado pelo ensaio de TBARS (substâncias

reativas ao ácido tiobarbitúrico), seguindo o protocolo descrito por Camejo et al. (1998). Foi realizada uma curva padrão de malondialdeído (MDA), com leitura de fluorescência (ex/em: 535/590 nm). A LPO foi expressa em nmol de MDA mg de proteína^{-1}.

2.7.5 Proteína Carbonilada

O teor de proteína carbonilada (PCC) foi quantificado (360 nm) nas brânquias e fígado pela formação de dinitrofenilhidrazonas na presença de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) de acordo com Levine et al. (1994). Os resultados foram expressos em nmol carbonil mg proteína^{-1}.

2.8 Biomarcador Genotóxico – Ensaio cometa alcalino

O ensaio alcalino do cometa foi realizado de acordo com Singh et al. (1988), com modificações descritas por Alvim e Martinez (2019), em eritrócitos, células branquiais e hepáticas. As amostras de brânquias e fígado foram dissociadas manualmente de forma mecânica de acordo com Cavalcante et al. (2008), posteriormente foram filtradas (malha de 30 µm) e armazenadas a 4 ºC por até 48 h. Uma alíquota de cada amostra foi misturada com agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), gotejada em lâminas recobertas com agarose 1%, cobertas com lamínulas e mantidas refrigeradas a 4 ºC por 50 min. Em seguida, as amostras foram submetidas às seguinte etapas: a) lise celular: 2 h a 4 °C, ao abrigo 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}; d) neutralização: três lavagens com tampão (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 min cada; e e) fixação: 10 min em etanol absoluto. As lâminas foram armazenadas refrigeradas (4 ºC) até o momento da análise quando foram coradas com gelRed e submetidas à teste cego em microscópio adaptado para fluorescência (Microscope DM-2500, Alemanha) com ampliação de 400x. O dano ao DNA foi quantificado visualmente em 100 nucleoídes selecionados de forma aleatória e não sobrepostos, de acordo com o comprimento da cauda formada pela migração de fragmentos do DNA. Os danos genotóxicos foram classificados em quatro classes de

cometa de acordo com Vieira et al. (2016): a) classe 0: sem danos aparente; b) classe 1: comprimento da cauda menor que o diâmetro do nucleóide; c) classe 2: comprimento da cauda até duas vezes o tamanho do nucleóide; e d) classe 3: comprimento da cauda maior que duas vezes o tamanho do nucleóide. O escore de dano foi calculado multiplicando o número de células em cada classe pelo valor da classe de dano, variando de 0 (todas não danificadas) a 300 (todas com dano máximo). Os resultados foram expressos pelo valor médio do escore de dano obtido para cada grupo experimental.

2.9 Análise Estatística

Os resultados dos biomarcadores obtidos nos diferentes tratamentos (CTR x MP x Cu x MP + Cu) foram comparados entre si, 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

Não houve mortalidade dos indivíduos durante a aclimatação e tampouco durante a exposição aos tratamentos.

3.1 Caracterização do Microplástico - Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens de caracterização por microscópio eletrônico de varredura (MEV) estão dispostas na Figura 1. Imagens da micropartícula em pó (forma original) (Figs. 1 A e 1 B) e em solução mãe 0,2 g L^{-1} (Figs. 1 C e 1 D) confirmam o formato esférico do MP, além dos diferentes tamanhos apresentados, corroborando os resultados obtidos pela AFM.

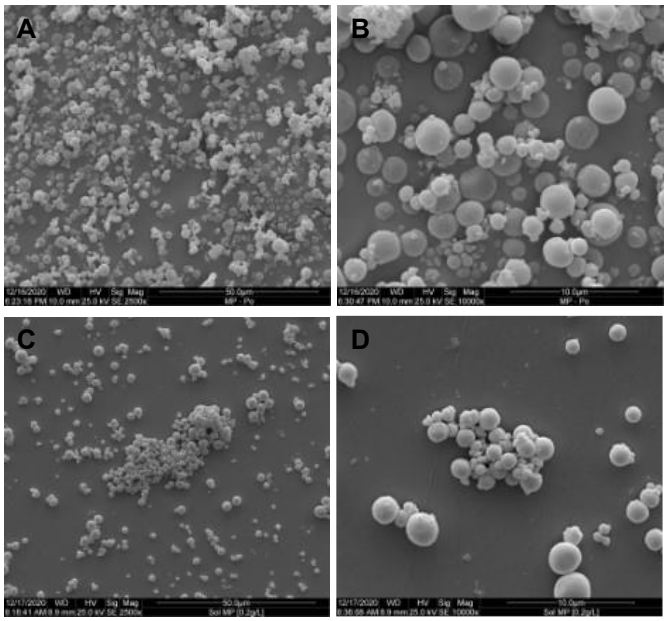

Figura 1 – Eletromicrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A e B) imagens do MP em pó capturadas com magnitude de 2.500x e 10.000x, respectivamente. (C e D) imagens do MP na solução 0,2 g L^{-1} capturadas com magnitude de 2.500x e 10.000x, respectivamente. Escala em 50 µm (A e C). Escala em 10 µm (B e D).

3.2 Concentração de cobre na água

As concentrações de Cu total e dissolvido (média ± EP) quantificada nos tratamentos CTR e MP, apresentaram-se dentro do esperado. Já as concentrações de Cu nos tratamentos que continham o metal, Cu e MP + Cu, foram superiores às concentrações nominais (Tabela 1). As concentrações apresentadas correspondem as médias obtidas nos diferentes tratamentos de amostras coletadas em 0, 24, 48, 72 e 96 h, sendo que em 48 h foram coletadas antes e após a renovação da água.

Tabela 1 – Concentrações de Cu (µg L^{-1}) total e dissolvido na água, sendo controle (CTR), microplástico 20 µg L^{-1} (MP), cobre 10 µg L^{-1} (Cu) e microplástico 20 µg L^{-1} + cobre 10 µg L^{-1} (MP + Cu). Os dados foram expressos como média ± EP (n = 2).

Tratamento	Cu Total	Cu Dissolvido
CTR	2,70 ± 0,30	2,29 ± 0,27
MP	2,60 ± 0,24	2,39 ± 0,29
Cu	22,86 ± 0,79	20,30 ± 0,58
MIX	23,07 ± 0,69	21,48 ± 0,50

A concentração de íons sódio (Na^+) e potássio (K^+) analisados nas

amostras de água no tempo inicial (0 h) e no tempo final (96 h) do experimento mantiveram-se estáveis (Na^+ p = 0,068; H = 13,170; K^+ p = 0,059; H = 13,567).

3.3 ACÚMULO DE COBRE NOS TECIDOS

Quando comparado ao grupo controle e MP, houve aumento significativo na concentração de Cu nas brânquias (p < 0,001; F = 49,907) e no músculo (p < 0,001; F = 14,485) dos animais expostos ao grupo Cu e MP + Cu. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na concentração do metal no trato gastrointestinal, fígado, rim e cérebro (Fig. 2).

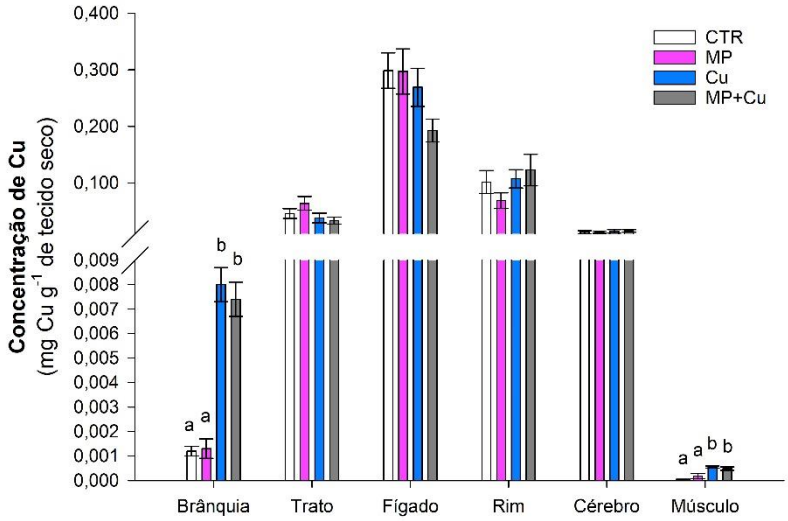

Figura 2 – Concentrações de cobre em brânquias, trato gastrointestinal, fígado, rim, cérebro e músculo de *Prochilodus lineatus* expostos por 96 h em água desclorada (CTR) ou expostos ao microplástico 20 µg L^{-1} (MP), cobre 10 µg L^{-1} (Cu) e microplástico 20 µg L^{-1} + cobre 10 µg L^{-1} (MP + Cu). Os dados foram expressos como média e erro padrão (média ± EP; n = 8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre grupos experimentais para um mesmo órgão (p <0,05).

3.4 BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS

Dos parâmetros hematológicos analisados (Fig. 3), foi observado uma diminuição significativa (p = 0,043; F = 3,106) na contagem de eritrócitos em animais expostos ao MP + Cu (Fig. 3 A) em relação ao grupo CTR.

Em relação às concentrações plasmáticas de glicose (Fig. 4 A), foi observado hiperglicemia (p = 0,002; H = 14,755) nos peixes expostos ao MP + Cu quando comparados aos animais do grupo CTR e MP. E tanto os resultados de glicogênio hepático quanto o lactato plasmático não apresentaram variação entre os

grupos experimentais (Figs. 4 B e 4 C).

Após a exposição, os animais do grupo Cu e MP + Cu apresentaram desequilíbrio de K^+ (Fig. 4 D), exibindo aumento significativo ($p < 0,001$; $F = 11,288$) na concentração plasmática de K^+ quando comparado com os demais grupos (CTR e MP). Não houve alteração na concentração plasmática de Na^+ para nenhum grupo experimental (Fig. 4 D).

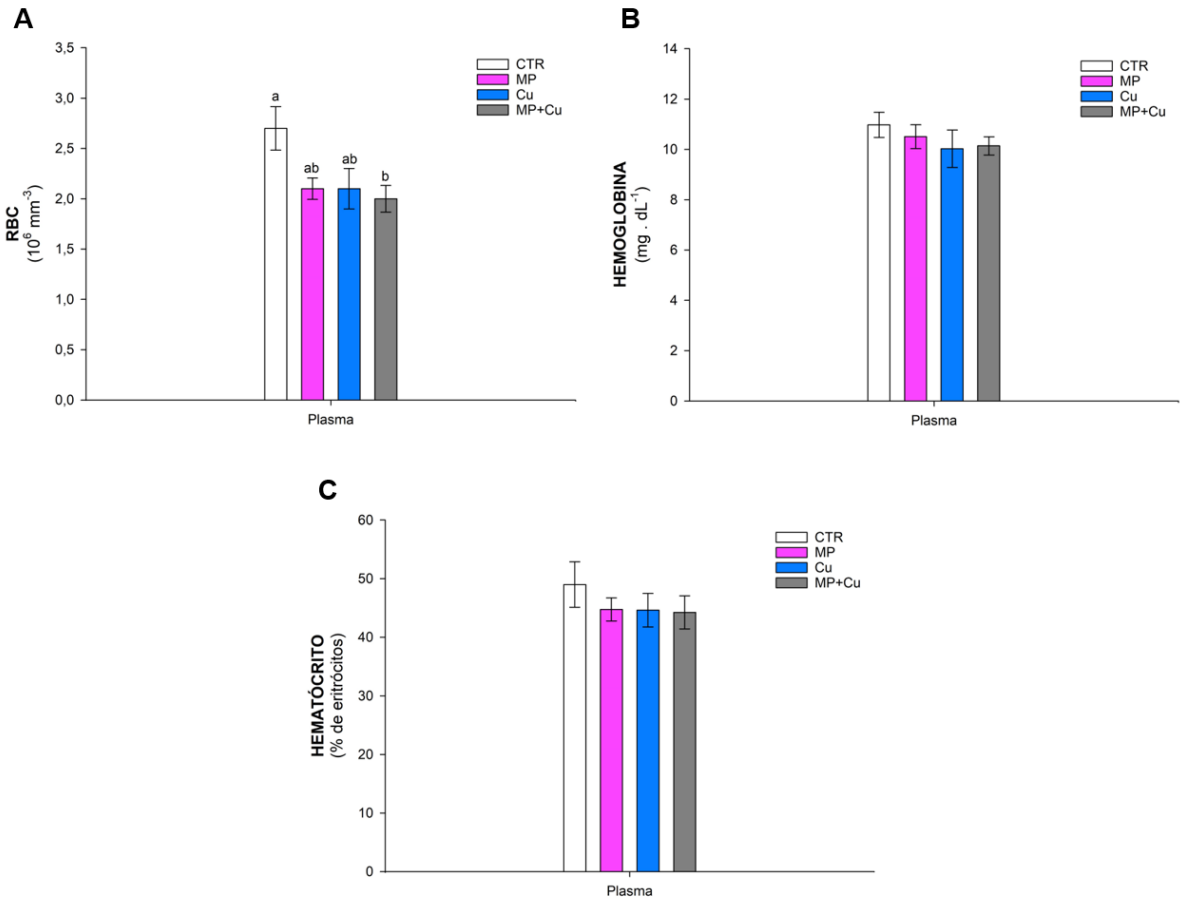

Figura 3 – (A) Contagem de eritrócitos (RBC), (B) hemoglobina (Hb) e (C) hematrócrito (Hct) de *P. lineatus* expostos apenas a água desclorada (CTR), ao microplástico 20 µg L^{-1} (MP), ao cobre 10 µg L^{-1} (Cu) e ao microplástico 20 µg L^{-1} + cobre 10 µg L^{-1} (MP + Cu) por 96 h. Os resultados foram expressos como média e erro padrão (média ± EP; n = 8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

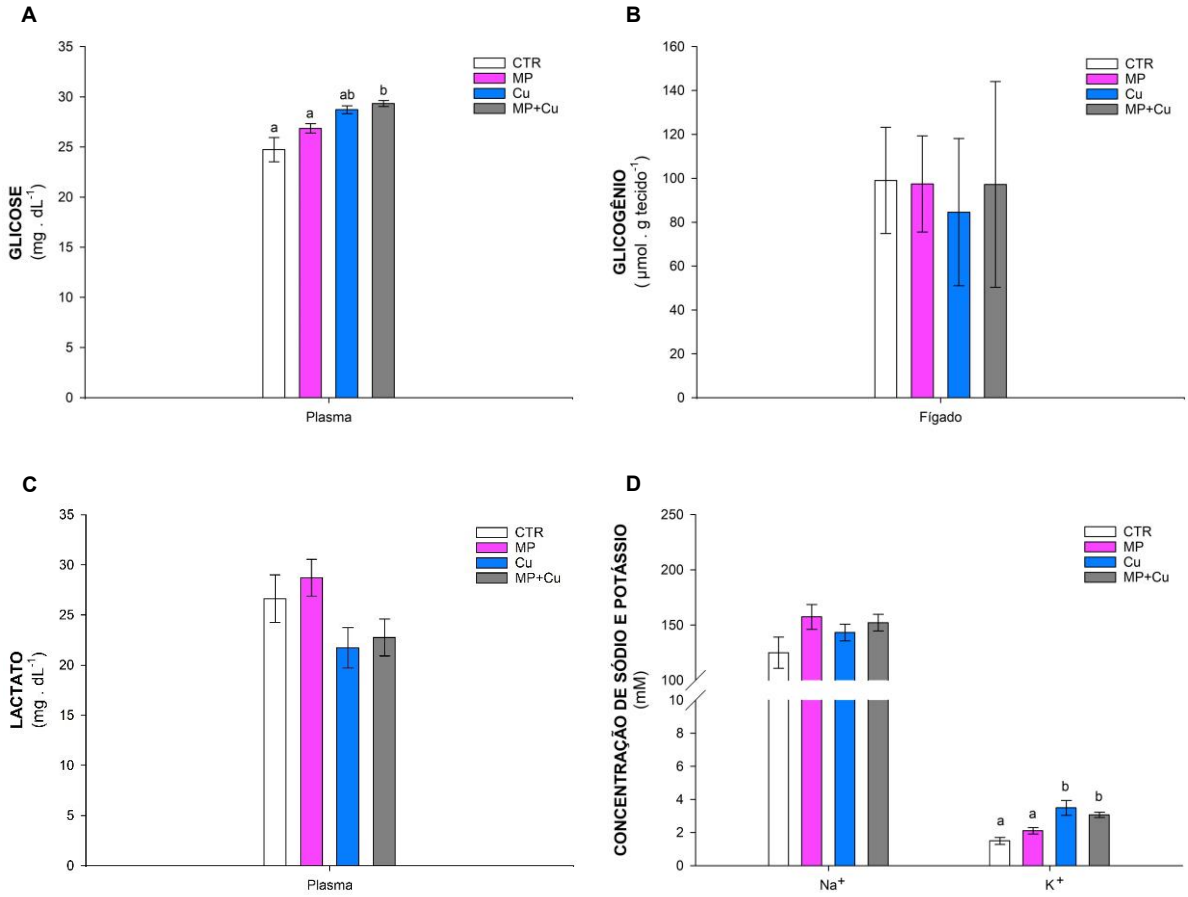

Figura 4 – (A) Concentração plasmática de glicose, (B) glicogênio hepático, (C) lactato plasmático e (D) concentração plasmática de Na^+ e K^+ em *P. lineatus* expostos apenas a água desclorada (CTR), ao microplástico 20 µg L^{-1} (MP), ao cobre 10 µg L^{-1} (Cu) e ao microplástico 20 µg L^{-1} + cobre 10 µg L^{-1} (MP + Cu) por 96 h. Os resultados foram expressos como média e erro padrão (média ± EP; n = 8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

3.5 Biomarcadores Bioquímicos

A atividade da GST foi significativamente menor ($p = 0,030$; $F = 3,495$) (Fig. 5 A) no fígado dos peixes expostos ao Cu, quando comparados aos animais do grupo CTR. E tanto nas brânquias, como no fígado, verificou-se aumento significativo ($p = 0,018$; $F = 4,011$, e $p = 0,011$; $H = 11,148$, respectivamente) de danos oxidativos nas proteínas (PCO) nos peixes expostos à mistura (MP + Cu) (Fig. 5 E). Os demais parâmetros, como a GST nas brânquias (Fig. 5 A), CAT nas brânquias e fígado (Fig. 5 B), GSH no fígado (Fig. 5 C) e LPO no fígado (Fig. 5 D) não apresentaram variações significativas.

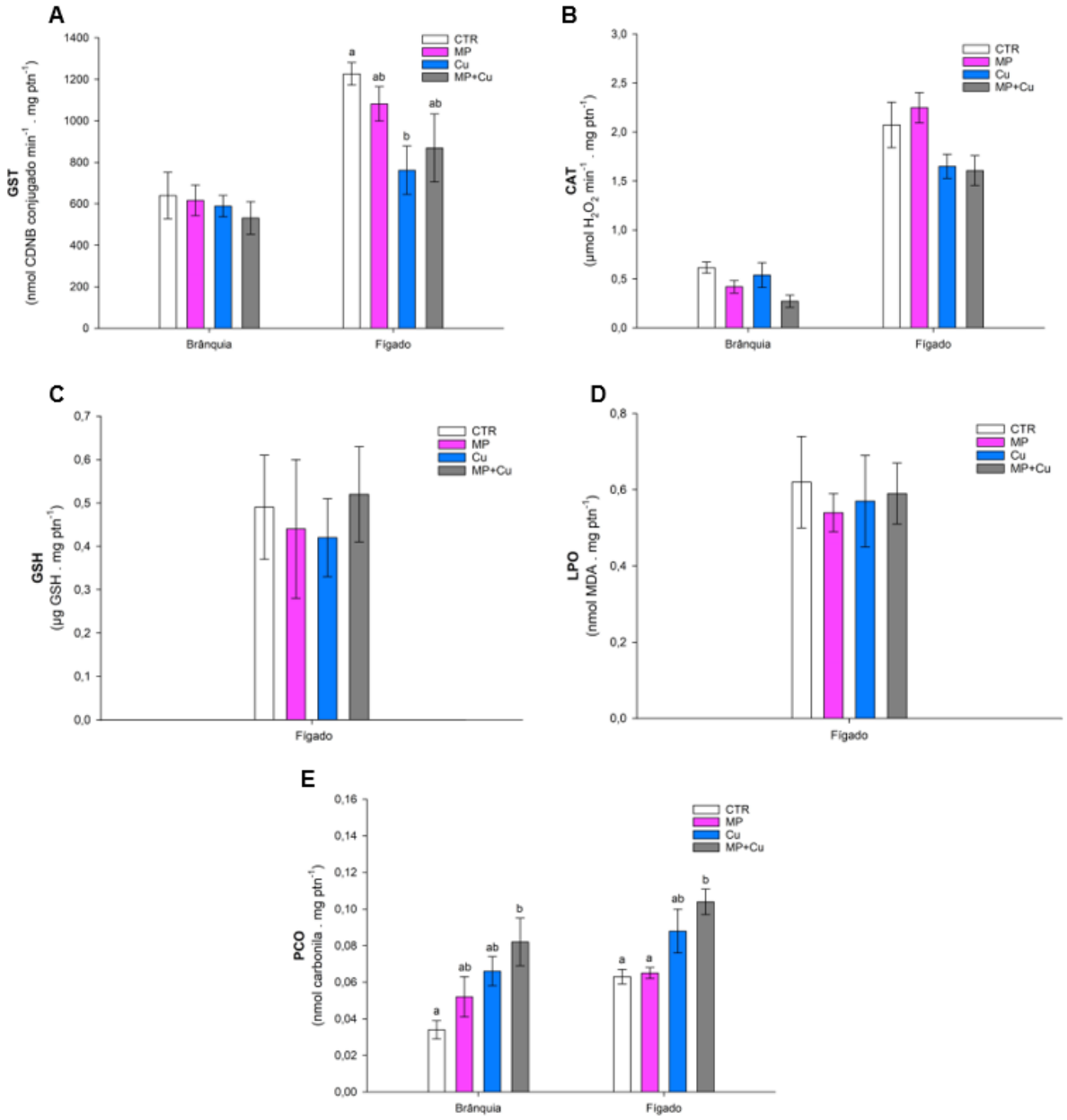

Figura 5 – (A) Atividade de glutationa S-transferase (GST), (B) catalase (CAT), (C) concentração de glutationa (GSH), (D) lipoperoxidação (LPO) e (E) proteínas carboniladas (PCO) em brânquias e fígado de *P. lineatus* expostos apenas a água desclorada (CTR), ao microplástico 20 µg L^{-1} (MP), ao cobre 10 µg L^{-1} (Cu) e ao microplástico 20 µg L^{-1} + cobre 10 µg L^{-1} (MP + Cu) por 96 h. Os resultados foram expressos como média e erro padrão (média ± EP; n = 8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais para um mesmo órgão ($p < 0,05$).

3.6 Biomarcador Genotóxico

Com relação aos danos no DNA (Fig. 6), nos eritrócitos dos peixes expostos ao MP + Cu o escore foi maior ($p = 0,010$; $H = 11,278$) em relação aos animais do grupo CTR. Já no tecido hepático, o escore de danos no DNA foi significativamente maior nos peixes expostos tanto aos poluentes isolados, como em

mistura, quando comparados ao grupo CTR ($p < 0,001$; $H = 24,103$). Nas brânquias não foram constatadas alterações significativas no escore de danos.

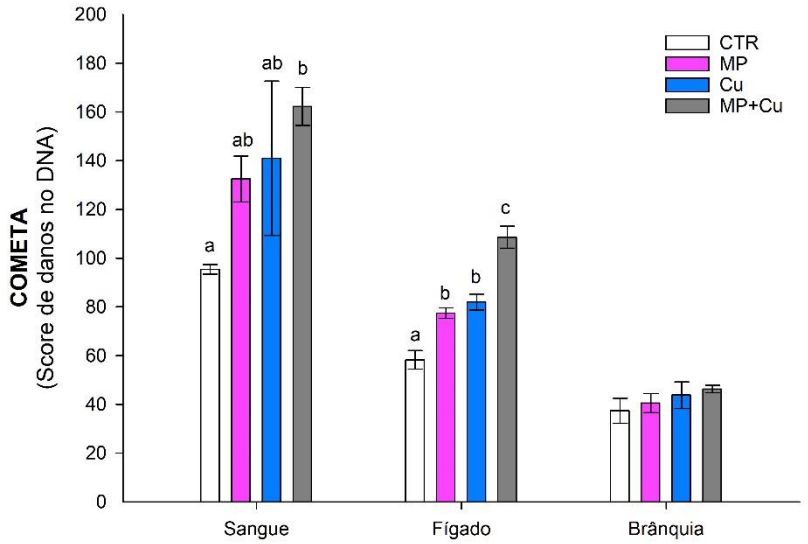

Figura 6 – Escore de dano ao DNA em sangue, fígado e brânquia de *P. lineatus* expostos apenas a água desclorada (CTR), ao microplástico 20 µg L^{-1} (MP), ao cobre 10 µg L^{-1} (Cu) e ao microplástico 20 µg L^{-1} + cobre 10 µg L^{-1} (MP + Cu) por 96 h. Os resultados foram expressos como média e erro padrão (média ± EP; n = 8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais para um mesmo tecido ($p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, observamos que o cobre dissolvido (20,3 a 21,48 µg L^{-1}) se apresentou em concentrações maiores que a concentração nominal de 10 µg L^{-1} esperada. Contudo, a concentração estudada se enquadra na faixa de relevância para o ambiente dulcícola e corresponde a concentração subletal para a espécie *P. lineatus*, visto que a CL_{50} 96h para esses animais é de 29 µg L^{-1}. Apesar da concentração de Cu trabalhada ser maior que a esperada, não foi observado mortalidade nos animais expostos aos tratamentos contendo o metal. Ainda, os efeitos toxicológicos para a espécie *P. lineatus* apresentou-se de forma mais significativa quando exposto ao tratamento contendo a mistura, confirmando nossa hipótese inicial onde classificamos os efeitos às exposições na seguinte ordem, MP + Cu > Cu > MP > CTR. Os efeitos toxicológicos apresentados nos animais expostos a mistura foram alterações nos níveis de glicose e K^+ plasmático, diminuição do número de hemácias, aumento na concentração de proteína carbonilada nas brânquias e fígado, e aumento nos danos do DNA em eritrócitos e células do fígado. Já a exposição ao Cu isolado foi responsável por alterar os níveis de K^+ plasmático, diminuir a atividade da GST e

causar danos no DNA de células do fígado, enquanto a exposição apenas ao MP acarretou no aumento de dano no DNA hepático.

As principais vias conhecidas de absorção de Cu pelos peixes dulcícolas são as brânquias, seguida pela absorção pela pele e trato gastrointestinal (DOS SANTOS CARVALHO; FERNANDES, 2008). Quando a captação de Cu não pode ser contida e excede a capacidade de regulação dos mecanismos excretores, metabólicos, de armazenamento e de desintoxicação, pode acarretar o acúmulo do metal em diferentes tecidos e consequentemente resultar em efeitos tóxicos (LANGSTON, 1990). O Cu é um oligoelemento essencial para o funcionamento de diferentes enzimas e proteínas, mas quando em excesso pode ser tóxico para o organismo. Como esperado, a exposição dos *P. lineatus* ao Cu e a mistura do MP + Cu acarretou o acúmulo do metal nas brânquias e nos músculos desses animais. Por estar em constante exposição ao meio externo e devido a sua grande área superficial, as brânquias são os tecidos mais vulneráveis aos poluentes transportados pela água (MAZON; FERNANDES, 1999) incluindo os metais, como o Cu (GROSELL; WOOD, 2002; NADELLA et al., 2007). Entre as suas principais funções, as brânquias destacam-se pelo seu envolvimento no processo respiratório, na regulação iônica, regulação ácido-base e na excreção de compostos (GILMOUR; PERRY, 2009). O aumento na concentração de Cu nas brânquias está de acordo com o pressuposto de que as brânquias são a principal via de absorção de Cu em peixes dulcícolas, (DOS SANTOS CARVALHO; FERNANDES, 2008), sendo o órgão que mais acumula metal em exposições agudas (DE PAULA et al., 2021).

Uma vez absorvido pela brânquia, o Cu é transportado para outros tecidos por meio da corrente sanguínea (WOOD, 2011). O aumento de Cu observado no músculo dos animais dos grupos Cu e MP + Cu, apesar de ser em quantidades bem menores do que nos outros tecidos, causa preocupação, pois o Cu pode ser transferido pela cadeia trófica podendo atingir outros organismos aquáticos e até mesmo os seres humanos (LOGHMANI et al., 2022). É reconhecido que a espécie *P. lineatus* é um peixe iliófago bentônico de grande importância ecológica e econômica. Devido ao seu hábito alimentar, são significativamente importantes no fluxo de energia dos ecossistemas aquáticos que habitam (REIS et al., 2003; CASTRO; VARI, 2004). A transferência do Cu através da cadeia alimentar desperta a preocupação quanto a ameaças à saúde humana. Isso se deve ao fato de que a parte mais comercializada e consumida do animal é a musculatura, e já se conhece os efeitos diretos do poluente

e sua correlação com várias doenças, incluindo o câncer (JÄRUP, 2003).

O Cu é considerado um metal tóxico ionorregulador, uma vez que a exposição a este metal pode influenciar nos níveis de íons plasmático (GROSELL; WOOD, 2002). O K^+ tem um importante papel no transporte de Na^+ pela bomba de Na^+/ K^+-ATPase, através da membrana basolateral (COIMBRA et al., 1988). Em peixes teleósteos, o fluxo de K^+ através da membrana apical nas brânquias ocorre por meio de um gradiente de concentração, por transporte ativo (EDDY, 1985). O aumento na concentração de K^+ plasmático em animais expostos ao Cu, tanto na sua forma isolada quanto em combinação com o MP, pode estar relacionado com a hemólise apresentada nos indivíduos, como demonstrado pela redução de números de eritrócitos em animais expostos a mistura. Com o rompimento dos glóbulos vermelhos (RBC), o conteúdo de K^+ intracelular é liberado resultando na hipercalemia. Isso foi observado anteriormente em *P. lineatus,* por Martinez e Souza (2002), após exposição aguda ao nitrito onde os indivíduos apresentaram diminuição significativa na concentração plasmática de glóbulos vermelhos e aumento extracelular de K^+.

Foi observado hiperglicemia nos animais expostos à mistura dos poluentes. O aumento dos níveis de glicose em peixes pode se apresentar como uma resposta neuroendócrina na exposição a agentes estressores como compostos tóxicos, dietas ricas em carboidratos e danos em tecidos envolvidos no metabolismo da glicose, como o fígado (ZHAO et al., 2020), a fim de fornecer ao animal substratos energéticos requeridos pela demanda (BARTON, 2002). A homeostase da glicose em peixes é mantida pelo equilíbrio entre a produção dos níveis de glicose e o armazenamento de glicose em forma de glicogênio (POLAKOF et al., 2012). Os resultados observados neste estudo não foram conclusivos, uma vez que os níveis de glicogênio hepático e lactato plasmático não apresentaram variação significativa. Uma hipótese levantada para a ocorrência da hiperglicemia nos animais expostos à mistura foi a soma dos fatores de estresse, como hipóxia tecidual causada pela diminuição das células sanguíneas, com o aumento de danos no DNA do fígado, um dos órgãos responsáveis pelo metabolismo da glicose. Em resumo, os resultados obtidos com os parâmetros sanguíneos demonstram que eles estão interligados. Pressupomos que o sangue tenha realizado a distribuição dos poluentes para outros tecidos, no entanto o que permaneceu na corrente sanguínea prejudicou o metabolismo dos indivíduos, levando a morte celular das hemácias, liberação de K^+, alterações nos níveis glicêmicos e aumento nos danos do DNA nos eritrócitos.

Apesar do Cu ter acumulado nas brânquias, tanto na exposição isolada quanto na exposição em mistura, foi observado maior concentração de proteínas carboniladas (PCO) apenas nos animais expostos à mistura dos poluentes. A alteração no conteúdo de PCO é um indício de estresse oxidativo, comumente utilizado como biomarcador. As espécies reativas de oxigênio (ERO), formadas em decorrência à exposição aos poluentes, podem interagir com as proteínas causando oxidação proteica e consequentemente alteração na sua estrutura e funcionalidade (WONG et al., 2010). Apesar dos maiores níveis de PCO nas brânquias, não foi observado alteração na LPO e nas defesas antioxidantes analisadas. Por estarem em constante exposição ao meio externo, os resultados obtidos nas brânquias podem estar associados à variação dos mecanismos defesas que é diferente para cada tipo de tecido (ALVIM; MARTINEZ, 2019; RODA et al., 2020).

Quanto ao aumento de dano no DNA em eritrócitos de animais expostos à mistura dos poluentes e nos hepatócitos de animais expostos aos diferentes tratamentos (MP, Cu e MP + Cu), sabe-se que o Cu é um metal essencial de natureza redox que pode acarretar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), podendo resultar em danos oxidativos em diferentes moléculas, incluindo o DNA (YU, 1994; ALAK et al., 2019). Além das ERO, o Cu é capaz de se ligar diretamente à molécula de DNA causando danos estruturais e funcionais que são evidenciados com o ensaio alcalino do cometa (GOVINDARAJU et al., 2013; ALAK et al., 2019). De Paula et al. (2022), em um estudo trófico com *Hoplias malabaricus* alimentadas por 10 dias com *Astyanax altiparanae* exposto ao Cu 20 μg L^{-1}, observaram aumento de dano no DNA em eritrócitos causados pelo efeito do metal. Quanto a genotoxicidade do MP, acredita-se que esteja relacionada principalmente com a formação de ERO que são responsáveis por causar danos oxidativos a molécula, acarretando a inibição da síntese de DNA, bem como interferência nos processos de replicação e transcrição (AVIO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017; HAMED et al., 2020; HAMED et al., 2021; SUN et al., 2021). Ainda, de acordo com Tagort e Kaya (2022) a genotoxicidade pode ser causada pelo estresse oxidativo, processos inflamatórios e interrupção do reparo do DNA induzidos pela presença do MP. Contudo, os efeitos genotóxicos do MP ainda não são bem definidos. Recentemente, vários trabalhos têm demostrado os efeitos genotóxicos de MP em diferentes organismos aquáticos, com concentrações e tamanhos distintos que divergem os resultados (HAMED, et al., 2019; ARAÚJO et al., 2022; BOBORI et al.,

2022). Além disso, é relevante destacar que, ao avaliar os danos no DNA no fígado de animais expostos à mistura, foi evidenciado um aumento significativo dos danos no DNA em comparação com os animais expostos aos poluentes isolados, indicando uma interação sinérgica entre os poluentes.

As enzimas glutationas S-transferases (GST) atuam na biotransformação, realizando a conversão de xenobióticos orgânicos lipossolúveis em compostos hidrossolúveis que possam ser mais facilmente excretados (VAN DER OOST et al., 2003). A GST tem sido amplamente utilizada como biomarcador de estresse oxidativo devido sua função na detoxificação (CUNHA et al., 2007; HAN et al., 2013). O fígado é o principal órgão envolvido na desintoxicação do organismo. Devido seu papel como metabolizador de xenobióticos, o fígado está sujeito a alterações pela sobrecarga dos poluentes ali presentes que podem induzir a formação de ERO e consequentemente levar ao aumento dos danos oxidativos do tecido hepático (MADUENHO; MARTINEZ, 2008), bem como aumento nos danos no DNA (YU, 1994). Com a diminuição da atividade da GST no fígado dos animais expostos ao Cu isolado, era esperado uma redução nos níveis de desintoxicação do tecido, e consequentemente um aumento de danos oxidativos, assim como observado por Vieira et al. (2018). No entanto, a diminuição na atividade da GST em animais expostos ao Cu isolado foi considerada um resultado pontual, pois além do aumento de danos no DNA, não observamos alterações significativas nas demais análises antioxidantes (CAT e GSH) e de danos oxidativos (LPO e PCO).

Assim como para as brânquias, o aumento no conteúdo de PCO hepático foi observado apenas nos animais expostos à mistura. Tal resultado relaciona-se com os danos no DNA em hepatócitos, onde uma possível interação sinérgica entre os poluentes pôde ser observada. Quando em mistura o aumento de dano genotóxico foi maior do que os apresentados com a exposição aos poluentes isolados. Como citado anteriormente, o Cu e o MP podem causar danos no DNA e em proteínas predominantemente através de danos oxidativos decorrentes da formação de ERO (WONG et al., 2010; HAMED et al., 2020; HAMED et al., 2021; SUN et al., 2021). Diferentes estudos têm demonstrado que os efeitos toxicológicos do MP podem ser influenciados quanto ao tamanho, o tipo e forma das micropartículas. Por exemplo, Roda et al. (2020) ao analisar o efeito dos poluentes MP (10 a 90 µm) 20 µg L^{-1} e Cu 10 µg L^{-1}, isolados e em mistura, em *P. lineatus* observaram aumento de dano no DNA hepático de animais expostos aos poluentes na sua forma isolada, no entanto não

observaram diferença significativa com a exposição dos poluentes em mistura. Duas características relevantes que justificam essa convergência entre os resultados, é que no atual estudo foram utilizadas micropartículas de menor tamanho (340 a 1920 nm), além da concentração de Cu ter sido duas vezes maior.

5 CONCLUSÃO

No presente estudo verificamos que os animais expostos ao MP isolado apresentaram alterações significativas apenas quanto ao dano no DNA hepático. No entanto, nossos resultados sugerem um efeito relevante quanto a capacidade dos MPs em adsorver e transportar o Cu, cuja toxicidade para peixes de água doce tem sido cada vez mais fundamentada, resultando em um possível efeito sinérgico entre os poluentes, influenciando no aumento nos níveis de glicose, diminuição na quantidade de eritrócitos, aumento nos danos no DNA em células sanguíneas e hepáticas, e aumento nos níveis de proteínas carboniladas. Apesar das concentrações utilizadas em outros trabalhos basearem-se em mg L^{-1}, nosso estudo mostrou que mesmo concentrações reduzidas de MP, como 20 µg L^{-1}, são relevantes e causam efeitos toxicológicos nos peixes dulcícolas.

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.

ALI, H.; KHAN, E.; ILAHI, I. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. **Journal of Chemistry**, v. 2019, 2019.

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**, v. 842, p. 85-93, 2019.

ARAÚJO, A. P. C.; DA LUZ, T. M.; ROCHA, T. L.; AHMED, M. A. I.; SILVA, D. D. M.; RAHMAN, M. M.; MALAFAIA, G. Toxicity evaluation of the combination of emerging pollutants with polyethylene microplastics in Zebrafish: Perspective study of genotoxicity, mutagenicity, and redox unbalance. **Journal of Hazardous Materials**, v. 432, p. 128691, 2022.

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.

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.

BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p. 517-525, 2002.

BEUTLER, E. A manual of biochemical methods. **Grune &amp**, 1975.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-888, 1963.

BIDINOTTO, P. M.; MORAES, G.; SOUZA, R. H. S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 10, p. 53-60, 1997.

BOBORI, D. C.; DIMITRIADI, A.; FEIDANTSIS, K.; SAMIOTAKI, A.; FAFOUTI, D.; SAMPSONIDIS, I.; KALOGIANNIS, S.; KASTRINAKI, G.; LAMBROPOULOU, D. A.; KYZAS, G. Z.; KOUMOUNDOUROS, G.; BIKIARIS, D. N.; KALOYIANNI, M. Differentiation in the expression of toxic effects of polyethylene-microplastics on two freshwater fish species: Size matters. **Science of the Total Environment**, v. 830, p. 154603, 2022.

BOUCHER, J.; FRIOT, D. **Primary microplastics in the oceans: a global evaluation of sources**. Gland, Switzerland: Iucn, 2017.

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.

CAMEJO, G.; WALLIN, B.; ENOJÄRVI, M. Analyses of oxidation and antioxidants using microtiter plates. **Free Radical and Antioxidants Protocols**, p. 377-387, 1998.

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.

CHEN, Q.; GUNDLACH, M.; YANG, S.; JIANG, J.; VELKI, M.; YIN, D.; HOLLERT, H. Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity. **Science of the Total Environment**, v. 584, p. 1022-1031, 2017.

CINCINELLI, A.; MARTELLINI, T.; GUERRANTI, C.; SCOPETANI, C.; CHELAZZI, D.; GIARRIZZO, T. A potpourri of microplastics in the sea surface and water column of the Mediterranean Sea. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 110, p. 321-326, 2019.

COIMBRA, J.; MACHADO, J.; FERNANDES, P. L.; FERREIRA, H. G.; FERREIRA, K. G. Electrophysiology of the mantle of *Anodonta cygnea*. **Journal of Experimental Biology**, v. 140, p. 65-88, 1988.

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.

CONTI, I.; SIMIONI, C.; VARANO, G.; BRENNA, C.; COSTANZI, E.; NERI, L. M. Legislation to limit the environmental plastic and microplastic pollution and their influence on human exposure. **Environmental Pollution**, v. 288, p. 117708, 2021.

CUNHA, I.; MANGAS-RAMIREZ, E.; GUILHERMINO, L. Effects of copper and cadmium on cholinesterase and glutathione S-transferase activities of two marine gastropods (*Monodonta lineata* and *Nucella lapillus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, p. 648-657, 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 PAULA, A. A.; RISSO, W. E.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of copper on an omnivorous (*Astyanax altiparanae*) and a carnivorous fish (*Hoplias malabaricus*): A comparative approach. **Aquatic Toxicology**, v. 237, p. 105874, 2021.

DE PAULA, A. A.; RISSO, W. E.; MARTINEZ, C. B. R. What happens to *Hoplias malabaricus* fed on live prey (*Astyanax altiparanae*) previously exposed to copper? A multiple biomarker approach. **Aquatic Toxicology**, v. 252, p. 106315, 2022.

DEVIN, S.; BURGEOT, T.; GIAMBÉRINI, L.; MINGUEZ, L.; PAIN-DEVIN, S. The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 2448-2454, 2014.

DOS SANTOS CARVALHO, C.; 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.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. T.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EDDY, F. B. Uptake and loss of potassium by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in fresh water and dilute sea water. **Journal of Experimental Biology**, v. 118, p. 277-286, 1985.

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.

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.

HAMED, M.; OSMAN, A. G.; BADREY, A. E.; SOLIMAN, H. A.; SAYED, A. E. D. H. Microplastics-induced eryptosis and poikilocytosis in early-juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 742922, 2021.

HAMED, M.; SOLIMAN, H. A.; SAYED, A. E. H. Ameliorative effect of Spirulina platensis against lead nitrate–induced cytotoxicity and genotoxicity in catfish *Clarias gariepinus*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 20610-20618, 2019.

HAN, J.; WON, E. J.; HWANG, D. S.; RHEE, J. S.; KIM, I. C.; LEE, J. S. Effect of copper exposure on GST activity and on the expression of four GSTs under oxidative stress condition in the monogonont rotifer, *Brachionus koreanus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 158, p. 91-100, 2013.

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.

JÄRUP, L. Hazards of heavy metal contamination. **British Medical Bulletin**, v. 68, p. 167-182, 2003.

JUNG, Y. S.; SAMPATH, V.; PRUNICKI, M.; AGUILERA, J.; ALLEN, H.; LABEAUD, D.; VEIDIS, E.; BARRY, M.; ERNY, B.; PATEL, L.; AKDIS, C.; AKDIS, M.; NADEAU, K. Characterization and regulation of microplastic pollution for protecting planetary and human health. **Environmental Pollution**, p. 120442, 2022.

KANHAI, L. D. K.; GARDFELDT, K.; KRUMPEN, T.; THOMPSON, R. C.; O'CONNOR, I. Microplastics in sea ice and seawater beneath ice floes from the Arctic Ocean. **Scientific Reports**, v. 10, p. 5004, 2020.

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

LANG, M.; YU, X.; LIU, J.; XIA, T.; WANG, T.; JIA, H.; GUO, X. Fenton aging significantly affects the heavy metal adsorption capacity of polystyrene microplastics. **Science of the Total Environment**, v. 722, p. 137762, 2020.

LANGSTON, W. J. Toxic effects of metals and the incidence of metal pollution in marine ecosystems. **Heavy Metals in the Marine Environment**, p. 101-122,

1990.
LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 246-257, 1994.
LIM, K. P.; LIM, P. E.; YUSOFF, S.; SUN, C.; DING, J.; LOH, K. H. A meta-analysis of the characterisations of plastic ingested by fish globally. **Toxics**, v. 10, p. 186, 2022.
LIN, X.; GOWEN, A. A.; PU, H.; XU, J. L. Microplastic contamination in fish: Critical review and assessment of data quality. **Food Control**, p. 109939, 2023.
LIN, Z.; HU, Y.; YUAN, Y.; HU, B.; WANG, B. Comparative analysis of kinetics and mechanisms for Pb (II) sorption onto three kinds of microplastics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111451, 2021.
LOGHMANI, M.; TOOTOONI, M. M.; SHARIFIAN, S. Risk assessment of trace element accumulation in two species of edible commercial fish *Scomberoides commersonnianus* and *Cynoglossus arel* from the northern waters of the Oman Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 174, p. 113201, 2022.
LÓPEZ 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**, v. 27, p. 968-979, 2018.
MADUENHO, L. P.; MARTINEZ, C. B. R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 148, p. 265-272, 2008.
MAO, R.; SONG, J.; YAN, P.; OUYANG, Z.; WU, R.; LIU, S.; GUO, X. Horizontal and vertical distribution of microplastics in the Wuliangsuhai Lake sediment, northern China. **Science of The Total Environment**, v. 754, p. 142426, 2021.
MARTINEZ, C. B. R.; SOUZA, M. M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 133, p. 151-160, 2002.
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, p. 797-804, 1999.
MINTENIG, S. M.; LÖDER, M. G.; PRIMPKE, S.; GERDTS, G. Low numbers of microplastics detected in drinking water from ground water sources. **Science of the Total Environment**, v. 648, p. 631-635, 2019.
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.
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.
NAJI, A.; NURI, M.; AMIRI, P.; NIYOGI, S. Small microplastic particles (S-MPPs) in sediments of mangrove ecosystem on the northern coast of the Persian Gulf. **Marine Pollution Bulletin**, v. 146, p. 305-311, 2019.
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.

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.

PRATA, J. C.; SILVA, A. L. P.; DA COSTA, J. P.; MOUNEYRAC, C.; WALKER, T. R.; DUARTE, A. C.; ROCHA-SANTOS, T. Solutions and integrated strategies for the control and mitigation of plastic and microplastic pollution. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, p. 2411, 2019.

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.

RIBEIRO, F.; GARCIA, A. R.; PEREIRA, B. P.; FONSECA, M.; MESTRE, N. C.; FONSECA, T. G.; ILHARCO, L. M.; BEBIANNO, M. J. Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 122, p. 379-391, 2017.

RODA, J. F. B.; LAUER, M. M.; RISSO, W. E.; MARTINEZ, C. B. R. Microplastics and copper effects on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: Is there any interaction?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 242, p. 110659, 2020.

SANTOS, D.; FÉLIX, L.; LUZIO, A.; PARRA, S.; CABECINHA, E.; BELLAS, J.; MONTEIRO, S. M. Toxicological effects induced on early life stages of zebrafish (*Danio rerio*) after an acute exposure to microplastics alone or co-exposed with copper. **Chemosphere**, v. 261, p. 127748, 2020.

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.

SUN, T.; ZHAN, J.; LI, F.; JI, C.; WU, H. Evidence-based meta-analysis of the genotoxicity induced by microplastics in aquatic organisms at environmentally relevant concentrations. **Science of the Total Environment**, v. 783, p. 147076, 2021.

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.

TAGORTI, G.; KAYA, B. Genotoxic effect of microplastics and COVID-19: The hidden threat. **Chemosphere**, v. 286, p. 131898, 2022.

THOMPSON, R. C.; MOORE, C. J.; VOM SAAL, F. S.; SWAN, S. H. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, p. 2153-2166, 2009.

TONG, H.; JIANG, Q.; HU, X; ZHONG, X. Occurrence and identification of microplastics in tap water from China. **Chemosphere**, v. 252, p. 126493, 2020.

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.

VETRIMURUGAN, E.; JONATHAN, M. P.; SARKAR, S. K.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, F.; ROY, P. D.; VELUMANI, S.; SAKTHI, J. S. Occurrence, distribution and provenance of microplastics: A large scale quantitative analysis of beach sediments from southeastern coast of South Africa. **Science of the Total Environment**, v. 746, p. 141103, 2020.

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, 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.

WANG, G.; LU, J.; TONG, Y.; LIU, Z.; ZHOU, H.; XIAYIHAZI, N. Occurrence and pollution characteristics of microplastics in surface water of the Manas River Basin, China. **Science of The Total Environment**, v. 710, p. 136099, 2020. (a)

WANG, W.; GE, J.; YU, X. Bioavailability and toxicity of microplastics to fish species: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 189, p. 109913, 2020. (b)

WONG, C. M.; MARCOCCI, L.; LIU, L.; SUZUKI, Y. J. Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, p. 393-404, 2010.

WOOD, C. M. An introduction to metals in fish physiology and toxicology: basic principles. **Fish Physiology**. 2011.

WRIGHT, S. L.; THOMPSON, R. C.; GALLOWAY, T. S. The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. **Environmental Pollution**, v. 178, p. 483-492, 2013.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, p. 139-162, 1994.

ZHANG, C.; YE, L.; WANG, C.; XIONG, X.; LI, Y.; LI, P.; ZHANG, X.; YU, H. Toxic effect of combined exposure of microplastics and copper on goldfish (*Carassius auratus*): insight from oxidative stress, inflammation, apoptosis and autophagy in hepatopancreas and intestine. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 109, p. 1029-1036, 2022. (a)

ZHANG, F.; LI, D.; YANG, Y.; ZHANG, H.; ZHU, J.; LIU, J.; BU, X.; LI, E.; QINC, J.; YU, N.; CHEN, L.; WANG, X. Combined effects of polystyrene microplastics and copper on antioxidant capacity, immune response and intestinal microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Science of The Total Environment**, v. 808, p. 152099, 2022. (b)

ZHANG, M.; LI, J.; DING, H.; DING, J.; JIANG, F.; DING, N. X.; SUN, C. Distribution characteristics and influencing factors of microplastics in urban tap water and water sources in Qingdao, China. **Analytical Letters**, v. 53, p. 1312-1327, 2020. (a)

ZHANG, T.; JIANG, B.; XING, Y.; YA, H.; LV, M.; WANG, X. Current status of microplastics pollution in the aquatic environment, interaction with other pollutants, and effects on aquatic organisms. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-30, 2022. (c)

ZHANG, W.; ZHANG, S.; ZHAO, Q.; QU, L.; MA, D.; WANG, J. Spatio-temporal ditribution of plastic and microplastic debris in the surface water of the Bohai Sea, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 158, p. 111343, 2020. (b)

ZHAO, L.; CUI, C.; LIU, Q.; SUN, J.; HE, K.; ADAM, A. A; LUO, J.; LI, Z.; WANG, Y.; YANG, S. Combined exposure to hypoxia and ammonia aggravated biological effects on glucose metabolism, oxidative stress, inflammation and apoptosis in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquatic Toxicology**, v. 224, p. 105514, 2020.

Capítulo III

Manuscrito III

MANUSCRITO III

Manuscrito a ser submetido para um periódico a ser definido.

MÚLTIPLOS ENDPOINTS DA TOXICIDADE DOS MICROPLÁSTICOS, ISOLADOS OU COMBINADOS COM O COBRE, EM *Anodontites trapesialis* (BIVALVE DULCÍCOLA)

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.

RODA, Jéssica Fernanda Bernardes. **Respostas de biomarcadores no bivalve dulcícola *Anodontites trapesialis* após exposições isoladas e combinadas ao microplástico e cobre**. 2023. 28 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

A contaminação aquática por plástico, principalmente por microplásticos (partículas < 5 mm), tem despertado crescente preocupação quanto aos impactos ambientais negativos associados a essas micropartículas, que são responsáveis por desencadear efeitos toxicológicos em organismos de diferentes níveis tróficos. Os animais filtradores, como o mexilhão de água de doce *Anodontites trapesialis*, representam uma das espécies mais suscetíveis à contaminação por microplásticos, devido ao grande volume de água que filtram diariamente e à semelhança das micropartículas com suas presas naturais. O objetivo deste estudo foi analisar os possíveis efeitos ecotoxicológicos resultantes da exposição aguda (96 h) ao MP isolado e em mistura com o cobre no bivalve *A. trapesialis* por meio da avaliação de múltiplos biomarcadores. A exposição dos bivalves *A. trapesialis* ao MP (20 ug L^{-1}) isolado resultou no aumento de dano oxidativo e aumento de dano no DNA. A exposição dos animais ao Cu (10 ug L^{-1}) isolado acarretou no aumento da concentração de glicose, diminuição nos níveis de carbonilação proteica e diminuição na atividade da acetilcolinesterase (AChE). Já a exposição dos bivalves à mistura dos poluentes (MP 20 ug L^{-1} + Cu 10 ug L^{-1}) foi responsável por alterar os parâmetros fisiológicos, aumentando os níveis de K^+ e glicose na hemolinfa, diminuiu conteúdo de glutationa (GSH), aumentou os danos oxidativos em lipídeos e proteínas, aumentou os danos no DNA e promoveu alterações na AChE, indicando neurotoxicidade. Ainda, quando em mistura, o resultado de diferentes análises revelou possíveis efeitos de interação entre os poluentes. Por fim, os resultados apresentados no presente estudo apontam para a toxicidade dos MPs em animais filtradores, além de evidenciar potencial interação com o cobre, alterando os efeitos tóxicos deste metal.

Palavras-chave: Espécie nativa; Efeitos toxicológicos; Micropartículas; Sinergismo; Dano oxidativo.

1 INTRODUÇÃO

A contaminação por microplástico (MP; partículas < 5 mm) tornou-se um grave problema ambiental pois já está presente em todos os ecossistemas (OBBARD et al., 2014; LA DAANA et al., 2018; PANNO et al., 2019). Atualmente, muitos pesquisadores têm investigado a presença dos MPs no ambiente marinho e suas consequências para os organismos (COLE et al., 2011; DAVARPANAH; GUILHERMINO, 2015; TOSETTO et al., 2017; KANHAI et al., 2020; VETRIMURUGAN et al., 2020). No entanto, os ambientes de água doce têm sido os principais responsáveis pelo transporte das micropartículas do ambiente terrestre até os oceanos (DRIS et al., 2015; JAMBECK et al., 2015).

A presença de MPs no ambiente dulcícola pode ocasionar efeitos toxicológicos em todos os níveis tróficos, desde zooplâncton, bivalves, peixes até cetáceos (ZHOU et al., 2015; ZHU et al., 2019; DING et al., 2020; HE et al., 2022; LIN et al., 2023) e tais efeitos podem ser: a) físicos: como o comprometimento de tecidos, bloqueio do trato gastrointestinal (NASSER; LYNCH, 2016; BESSELING et al., 2017); b) químicos: como danos oxidativos (ABIDLI et al., 2021; KIM et al., 2021) e alteração ou inibição de enzimas, como a acetilcolinesterase (RODA et al., 2020); e c) biológicos: advindos da adsorção de patógenos na superfície do MP (LU et al., 2022; HE et al., 2023).

Outro fator de preocupação quanto efeitos toxicológicos dos MPs envolve sua capacidade de adsorver outros poluentes, como os metais (DAVARPANAH; GUILHERMINO, 2015; LIN et al., 2021). Na biota aquática a presença de inúmeros xenobióticos ocorrem de forma simultânea e não apenas de forma isolada, como realizado na maioria das avaliações de risco, o que torna fundamental considerar a interação que pode ocorrer entre os poluentes (NIKINMAA, 2014). Em decorrência da combinação de suas substâncias tóxicas, tal interação pode influenciar na biodisponibilidade e toxicidade um do outro, resultando em diferentes tipos de interações, como interação aditiva, sinérgica ou antagônica (RODEA-PALOMARES et al., 2015). A interação aditiva, é quando em mistura os poluentes não interferem sobre o efeito um do outro; a interação sinérgica, é quando em combinação os efeitos dos poluentes são maiores do que os apresentados na sua forma isolada. Já a interação antagônica, é quando em mistura os poluentes podem diminuir ou até mesmo anular o efeito um do outro (KLAASEN; WATKINS, 2015). Quando captado

pelos organismos, os poluentes adsorvidos ao MP podem ser liberados, num processo chamado de dessorção também conhecido como efeito “Cavalo de Tróia” (GONZÁLEZ-SOTO et a., 2019).

Entre os metais adsorvidos pelo MP destaca-se o cobre (Cu), um metal essencial que em concentrações ideais é fundamental para os organismos e participa de vários processos bioquímicos e fisiológicos, mas quando em excesso pode ser tóxico, interferindo principalmente na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) desencadeando danos oxidativos em proteínas, lipídeos e DNA (YU, 1994; MONTEIRO et al., 2009; ALAK et al., 2019). As consequências da exposição do molusco bivalve *Anodontites trapesialis* ao Cu causou inibição da resistência a multixenobióticos (MXR), responsável pela defesa celular (EL HAJ et al., 2019). Loayza-Muro e Elías-Letts (2007) constataram que o Cu, assim como outros metais (cádmio e zinco), influenciou na taxa de filtração do mexilhão *A. trapesialis*. Ainda, a exposição ao Cu foi responsável pela lipoperoxidação (LPO), inibição da acetilcolinesterase (AChE), aumento das atividades da catalase (CAT), da glutationa peroxidase (GPX) e da metalotioneína (MT), e acúmulo do metal nas brânquias no mexilhão *Mytilus galloprovincialis* (GOMES et al., 2011).

Os efeitos decorrentes da exposição de animais filtradores ao MP ou à combinação dos poluentes, embora ainda sejam limitados e controversos, está aumentando a cada ano. Os animais filtradores podem ser mais suscetíveis a contaminação pelas micropartículas, seja pela semelhança dos MPs com suas presas, ou pela alta taxa de filtração que executam (WARD et al., 2019). Em um estudo realizado com MP (0,3 g de MP de polietileno, 55 e 110 µm) isolado, Moreschi et al. (2020) observou que quanto mais tempo os bivalves *A. trapesialis* permaneciam em contato com os MP presentes na água, mais MP eram ingeridos por esses animais, e a probabilidade de encontrar micropartículas nas brânquias e no intestino desses animais foi de 78% e 72%, respectivamente. *A. trapesialis*, *Perna perna* e *Mytella Guyanensis* ao serem expostos a microplásticos em pérolas e microfibras apresentaram micropartículas em todos os tecidos analisados (gônadas, manto, brânquias, pé e bisso) (STAICHAK et al., 2021). À medida que sabemos da capacidade do MP em adsorver o Cu, da ocorrência simultânea de ambos os poluentes no ambiente aquático dulcícola e a falta de dados sobre seus efeitos em mistura, torna-se fundamental analisarmos os efeitos toxicológicos de ambos para a biota aquática dulcícola.

A espécie de mexilhão de água doce *A. trapesialis* foi considerada um potencial organismo sentinela para contaminação por MP (MORESCHI et al., 2020; STAICHAK et al., 2021). Suas características como ampla distribuição, comportamento séssil, filtrar grandes volumes de água e realizar absorção direta dos poluentes, foram fatores determinantes para a escolha desta espécie em nosso estudo. Ainda, várias espécies de bivalves são consumidas pelo homem, e portanto, estes animais podem ser veículos de poluentes, incluindo o MP (DING et al., 2021). Além disso, os bivalves *A. trapesialis* são amplamente distribuídos na América do Sul e frequentemente observados em bacias hidrográficas e tanques de pisciculturas próximos a região urbana (FELIPI; SILVA-SOUZA, 2008; AGUDO-PADRÓN, 2015). Assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar os possíveis efeitos ecotoxicológicos acarretados pela exposição aguda ao MP isolado e em mistura com o Cu no bivalve *A. trapesialis*. Para tanto, foram realizadas análises bioquímicas (glutationa-S-transferase, catalase, glutationa, lipoperoxidação e carbonilação de proteína), fisiológicas (glicose, glicogênio e concentração iônica), genotóxicas (danos no DNA), de neurotoxicidade (acetilcolinesterase) e acumulação do metal em diferentes tecidos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 *Anodontites trapesialis* – COLETA E ACLIMATAÇÃO

Os mexilhões de água doce *A. trapesialis* (n = 32; peso: 137,00 ± 3,74 g; largura: 53,22 ± 3,73 mm; comprimento: 119,36 ± 1,19 mm) foram capturados manualmente do sedimento de uma represa, no pesqueiro Toca do Jacaré pertencente ao município de Londrina (Paraná, Brasil), e alocados em sacos plásticos contendo água do local de coleta. Posteriormente, os animais foram transportados para o laboratório de bioensaios do Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) onde permaneceram por 9 dias aclimatando em tanques de 400 L contendo água desclorada, aeração constante e renovação da água a cada 24 h. A alimentação dos animais foi realizada a cada 48 h com algas da espécie *Raphidocelis subcapitata* (10.000 céls mL^{-1}). Os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados e mantiveram-se constante (temperatura 23,66°C; pH 8,02; oxigênio dissolvido 5,84 mg L^{-1}; condutividade 0,114 mS cm^{-1};

turbidez 2,01 NTU; e total de sólidos dissolvidos 0,074 g L^{-1}), em um fotoperíodo de 12 h claro:12 h escuro.

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os espécimes de *A. trapesialis* foram expostos individualmente em aquários de 1,5 L com aeração constante, mantendo a água oxigenada e circulação dos poluentes (MP e Cu) nos tratamentos experimentais, fotoperíodo de 12 h claro/ 12 h escuro, com renovação total (100%) do meio de exposição em 48 h. Os animais foram distribuídos em quatro grupos (n = 8 em cada tratamento), e expostos por 96 h: grupo controle (CTR) – animais expostos apenas a água desclorada; grupo microplástico (MP) – MP 20 µg L^{-1}; grupo cobre (Cu) – Cu 10 µg L^{-1} (nominal) e o grupo mistura (MP + Cu) – MP 20 µg L^{-1} e Cu 10 µg L^{-1}. Os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados e não apresentaram variações significativas entre os grupos (média ± EP: temperatura 24,22 ± 0,08 °C; pH 7,95 ± 0,02; condutividade 0,14 ± 0,00 mS cm^{-1}; turbidez 1,23 ± 0,32 NTU; oxigênio dissolvido 6,77 ± 0,11 mg O_2 L^{-1}; e total de sólidos dissolvidos 0,1 g L^{-1}) e dureza 37,12 ± 1,78 mg $CaCO_3$ L^{-1}.

O microplástico escolhido para o presente estudo foi microesferas de polietileno fluorescente, tamanho: 0,881 ± 0,412 µm, cor amarelo e densidade: 1,3 g cm^3, comprimento de onda ex: 485 nm e em: 525 nm (Cospheric LLC, California, EUA). Segundo as imagens obtidas por microscopia de força atômica (AFM) no "manuscrito I", os MPs possuem formato esféricos (maior proporção), e formato elípticos em algumas micropartículas. A distribuição de tamanho das micropartículas variou entre 0,34 a 1,92 µm. As imagens de caracterização por microscópio eletrônico de varredura (MEV) obtidas das micropartículas em pó (forma original) e em solução mãe 0,2 g L^{-1} confirmam o formato esférico do MP, além dos diferentes tamanhos apresentados. A concentração de MP testada está de acordo com concentrações relevantes encontradas no ambiente natural (OLIVEIRA et al., 2013; HORTON et al., 2017; RODA et al., 2020). A concentração de Cu (Copper (II) dihydrate, ACROS Organics™) de 10 µg L^{-1} (nominal), baseou-se na concentração condizente com os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005 para água doce. A suspensão estoque de MP, Cu e mistura foram preparadas com antecedência de 24 h, para possibilitar a adsorção do Cu pelo MP (Chen et al., 2017).

Após a exposição, amostras de hemolinfa dos bivalves foram obtidas do músculo adutor e armazenada a -20 ºC. Em seguida, os animais foram anestesiados sob refrigeração e eutanasiados por secção do músculo adutor para amostragem dos tecidos de brânquias, glândula digestiva, manto e músculo (pé), armazenados a -80 ºC para as análises descritas posteriormente.

2.3 QUANTIFICAÇÃO DE COBRE

2.3.1 Amostras de água

A concentração de Cu na água foi avaliada por atomizador de grafite, por espectrometria de absorção atômica (AAnalyst 700, PerkinElmer, EUA), com limite de detecção para Cu de 0,014 µg L^{-1} em amostras de água filtradas (filtro de 0,45 µm, Millipore Millex HV/PVDF) e não filtradas. Foi analisado o Cu total e dissolvido, respectivamente, nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 h, sendo em 48 h realizado duas coletas de amostras, uma antes e outas depois da renovação dos tratamentos. As amostras foram acidificadas com HNO_3 (65%) e armazenadas a 4 °C até a determinação do metal. A concentração de sódio (Na^+) e potássio (K^+) também foram medidas nas amostras de água, em fotômetro de chama (DM-62, Digimed) e expressos em mM.

2.3.2 Amostras de tecido de *A. trapesialis*

Para determinação do acúmulo de Cu nos tecidos, as amostras brânquias, manto, glândula digestiva e músculo (pé) foram processadas seguindo protocolo descrito por Alves e Wood (2006). Os tecidos foram completamente secos a 60 °C e depois submetidos à digestão ácida com ácido nítrico ultrapuro (5 N) a 60 ºC por 48 h. Em seguida, a concentração de Cu nos tecidos foi avaliada seguindo o protocolo acima, sendo os resultados expressos em mg de Cu g de tecido $seco^{-1}$.

2.4 BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS

2.4.1 Análises na hemolinfa

Na hemolinfa foram analisados os parâmetros de glicose e

concentração iônica. A glicose foi avaliada em espectrofotômetro de microplacas (505 nm – Victor^3, Perkin Elmer) pelo método da glicose oxidase com teste enzimático colorimétrico (Labtest Diagnostica, Brasil, REF 84-2/500) e expressa em mg dL^{-1}. A quantidade de glicose foi expressa em mg dL^{-1}. As concentrações de sódio (Na^+) e potássio (K^+) (1:10 v/v) na hemolinfa foram determinadas em fotômetro de chama (DM-62, Digimed) e expressos em mM.

2.4.2 Glicogênio

O glicogênio foi determinado na glândula digestiva e músculo (pé), seguindo as etapas de digestão, hidrólise e precipitação, de acordo com o protocolo descrito por Bidinotto et al. (1997). Em seguida, o pellet formado foi ressuspendido em fenol (4,1%) e H_2SO_4 afim de extrair a glicose, de acordo com Dubois et al. (1956).

2.5 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

As amostras de tecido de brânquias, manto e glândula digestiva foram homogeneizadas (1:4 w/v) em solução tampão fosfato K^+ (0,1 M; pH 7,0), centrifugadas (14.000 g ou 9.000 g para PCO, 20 min, 4 ºC) e os sobrenadantes foram armazenados a -80 °C até o momento das análises. O conteúdo de proteína das amostras foi determinado de acordo com Bradford (1976).

2.5.1 Glutationa S-transferase

A atividade da enzima glutationa S-transferase (GST) foi avaliada de acordo com protocolo estabelecido por Keen et al. (1976), monitorando a complexação do GSH com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB; 1 mM) em espectrofotômetro a 340 nm (Victor^3, Perkin Elmer) durante 10 min. A atividade da enzima foi expressa em nmol CDNB min^{-1} mg de $proteína^{-1}$.

2.5.2 Catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pelo decaimento da absorbância a 240 nm (SpectraMax, Plus 384, EUA) consequente da decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Beutler, 1975). A atividade enzimática foi expressa

em µmol H_2O min^{-1} mg de proteína^{-1}.

2.5.3 Concentração de Glutationa

A concentração do tripeptídeo GSH foi medida de acordo com Iummato et al. (2018) com as seguintes modificações: as amostras foram tratadas com ácido sulfossalicílico (5%), centrifugadas (10.000 g; 5 min; 4 ºC), e, posteriormente foi adicionado tampão fosfato de K^+ (0,1 M; pH 7,4; EDTA 6,3 nM) e 5,5'-ditiobis-ácido-nitrobenzóico (DTNB) (10 mM). As amostras foram quantificadas a 412 nm em espectrofotômetro de microplacas (Victor^3, Perkin Elmer). A concentração de GSH foi expressa em µg GSH mg de proteína^{-1}.

2.5.4 Lipoperoxidação

A LPO foi determinada pelo ensaio de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), seguindo o protocolo descrito por Camejo et al. (1998) com modificações para as amostras de glândula digestiva que foram tratadas com TCA 50% e centrifugadas a 2.400 g por 5 min a 4 ºC. Foi realizado uma curva padrão de malondialdeído (MDA), com leitura de fluorescência (ex/em: 535/590 nm) 10 minutos após retirar as placas da estufa. A LPO foi expressa em nmol MDA mg de proteína^{-1}.

2.5.5 Proteína Carbonilada

O teor de proteína carbonilada (PCO) foi quantificado (360 nm) pela formação de dinitrofenilhidrazonas na presença de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) de acordo com Levine et al. (1994). Os resultados foram expressos em nmol carbonil mg de proteína^{-1}.

2.6 Biomarcador genotóxico – Ensaio cometa alcalino

O ensaio alcalino do cometa foi realizado com amostras de hemolinfa de acordo com Singh et al. (1988), com modificações descritas por Alvim e Martinez (2019). Uma alíquota de cada amostra de hemolinfa foi homogeneizada com agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), gotejada em lâminas recobertas com agarose 1%, cobertas com lamínulas e mantidas refrigeradas a 4 ºC por 50 min. Em seguida, as

amostras foram submetidas às seguinte etapas: a) lise celular: 2 h a 4 °C, ao abrigo 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}; d) neutralização: três lavagens com tampão (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 min cada; e e) fixação: 10 min em etanol absoluto. As lâminas foram armazenadas refrigeradas (4 ºC) até o momento da análise quando foram coradas com gelRed e submetidas à teste cego em microscópio adaptado para fluorescência (Microscope DM-2500, Alemanha) com ampliação de 400x. O dano ao DNA foi quantificado visualmente em 100 nucleoídes selecionados de forma aleatória e não sobrepostos, de acordo com o comprimento da cauda formada pela migração de fragmentos do DNA. Os danos genotóxicos foram classificados em quatro classes de cometa de acordo com Vieira et al. (2016): a) classe 0: sem danos aparente; b) classe 1: comprimento da cauda menor que o diâmetro do nucleóide; c) classe 2: comprimento da cauda até duas vezes o tamanho do nucleóide; e d) classe 3: comprimento da cauda maior que duas vezes o tamanho do nucleóide. O escore de dano foi realizado multiplicando o número de células em cada classe pelo valor da classe de dano, variando de 0 (todas não danificadas) a 300 (todas com dano máximo). Os resultados foram expressos pelo valor médio do escore de dano obtido para cada grupo experimental.

2.7 Biomarcador de neurotoxicidade – Acetilcolinesterase

As amostras de tecido de manto e músculo (pé) foram homogeneizadas (1:4 w/v) em solução tampão fosfato de K^+ (0,1 M; pH 8,0), centrifugadas (20.280 g; 20 min; 4 ºC) e os sobrenadantes armazenados a -80 °C até o momento das análises. A determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi realizada de acordo com o método de Ellman et al. (1961) com modificações de Oliveira et al. (2016). A quantificação da atividade da AChE foi determinada em 415 nm por 30 min e expressa em nmol min^{-1} mg de $proteína^{-1}$. O conteúdo de proteína das amostras foi determinado de acordo com Bradford (1976).

2.8 Análise estatística

Os resultados dos biomarcadores obtidos nos diferentes tratamentos (CTR x MP x Cu x MP + Cu) foram comparados entre si, 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 o período de exposição houve a morte isolada de um único animal exposto ao Cu, provavelmente um acontecimento ao acaso.

3.1 Concentração de cobre no meio de exposição

Como demonstrado na Tabela 1, a concentração de Cu apresentada na água foi superior ao esperado (concentração nominal: 10 µg Cu L^{-1}). Os valores de Cu total e dissolvido no tempo inicial de 0 h e no tempo de renovação do poluente em 48 h foram semelhantes, com as concentrações variando aproximadamente em 79% do Cu dissolvido para o Cu total. Já os valores de Cu total e dissolvido no tempo de 24, 72 e 96 h apresentaram uma diminuição relevante quando comparados com a concentração encontrada em 0 e 48 h. As porcentagens do metal, foram de 14% de Cu total e de 7% de Cu dissolvido no grupo Cu. Já no grupo mistura a porcentagem foi de 4% de Cu total e 9% de Cu dissolvido. Em ambos os tratamentos observamos a ação de filtração dos *A. trapesialis* diminuindo a concentração do metal na água.

Tabela 1 – Concentrações de Cu (µg L^{-1}) total e dissolvido na água de amostras do grupo controle (CTR), microplástico 20 µg L^{-1} (MP), cobre 10 µg L^{-1} (Cu) e microplástico 20 µg L^{-1} + cobre 10 µg L^{-1} (MP + Cu), representando a média dos tempos 0 e 48 h. Os dados foram expressos como média ± EP (n = 4).

Tratamento	Cu Total	Cu Dissolvido
CTR	1,68 ± 0,74	0,51 ± 0,04
MP	1,12 ± 0,70	0,56 ± 0,10
Cu	15,99 ± 0,53	12,32 ± 0,98
MP + Cu	17,03 ± 0,68	13,96 ± 1,11

A concentração de íons sódio (Na^+) e potássio (K^+) mantiveram-se estáveis comparando o tempo inicial (0 h) e o tempo final (96 h) do experimento (Na^+ p = 0,878; H = 0,0443; K^+ p = 0,574; H = 0,342).

3.2 BIOACUMULAÇÃO DE COBRE NO TECIDO

A concentração de Cu presente nos tecidos de hemolinfa, brânquias, glândula digestiva, pé e manto não apresentaram aumento significativo (Fig. 1).

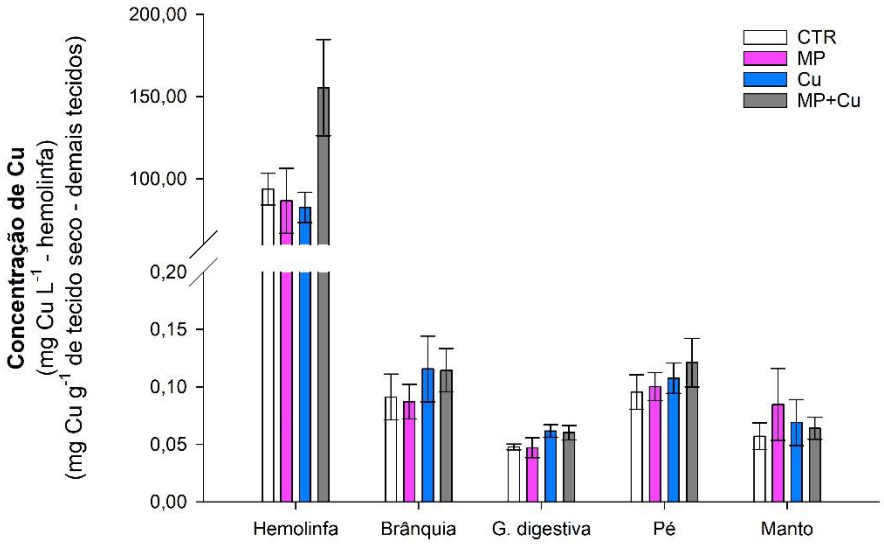

Figura 1 – Concentrações de cobre em hemolinfa, brânquias, glândula digestiva, pé e manto de *Anodontites trapesialis* expostos por 96 h em água desclorada (CTR) ou expostos ao microplástico 20 µg L^{-1} (MP), cobre 10 µg L^{-1} (Cu) e microplástico 20 µg L^{-1} + cobre 10 µg L^{-1} (MP + Cu). Os dados foram expressos como média e erro padrão (média ± EP; n = 8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre grupos experimentais (p <0,05).

3.3 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

A concentração de K^+ aumentou (p = 0,002; F = 6,703) na hemolinfa dos bivalves expostos a mistura dos poluentes (MP + Cu) quando comparados ao CTR, MP e Cu. Já a concentração de Na^+ não foi interferida por nenhuma exposição (Fig. 2).

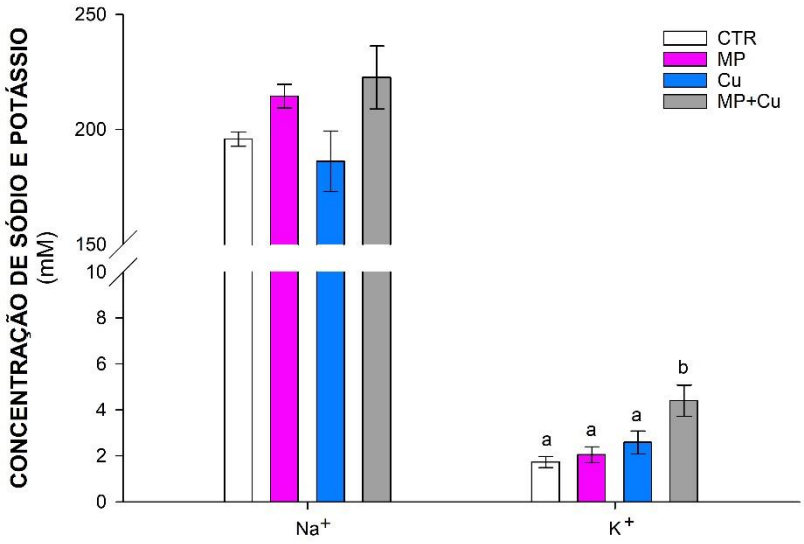

Figura 2 – Concentração de íons na hemolinfa de *Anodontites trapesialis* expostos por 96 h em água desclorada (CTR) ou expostos ao microplástico 20 µg L^{-1} (MP), cobre 10 µg L^{-1} (Cu) e microplástico 20 µg L^{-1} + cobre 10 µg L^{-1} (MP + Cu). Os dados foram expressos como média e erro padrão (média ± EP; n = 8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre grupos experimentais (p <0,05).

Foi observado hiperglicemia (p <0,001; H = 26,146) nos *A. trapesialis* expostos ao Cu em relação aos animais do grupo CTR (Fig. 3A). Também foi observado um aumento glicêmico ainda maior (p <0,001; H = 26,146) nos animais expostos a mistura dos poluentes (MP + Cu) quando comparados ao grupo CTR e MP (Fig. 3A). A concentração de glicogênio no pé e na glândula digestiva não foram afetadas em nenhuma exposição (Fig. 3B).

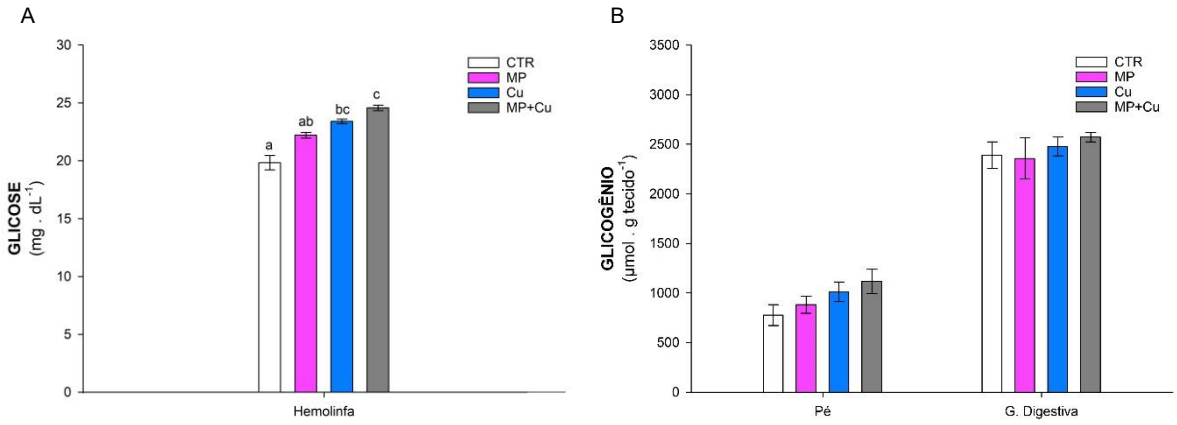

Figura 3 – (A) Glicose hemolinfática e (B) glicogênio no músculo (pé) e glândula digestiva de *A. trapesialis* expostos apenas a água desclorada (CTR), ao microplástico 20 µg L^{-1} (MP), ao cobre 10 µg L^{-1} (Cu) e ao microplástico 20 µg L^{-1} + cobre 10 µg L^{-1} (MP + Cu) por 96 h. Os resultados foram expressos como média e erro padrão (média ± EP; n = 8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais (p < 0,05).

3.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES

A concentração de glutationa (GSH) diminuiu de forma significativa (p = 0,030; F = 3,469) nas brânquias dos bivalves expostos a mistura dos poluentes quando analisadas em relação as brânquias dos animais do grupo CTR e MP. A concentração de glutationa no manto não foi afetada (Fig. 4).

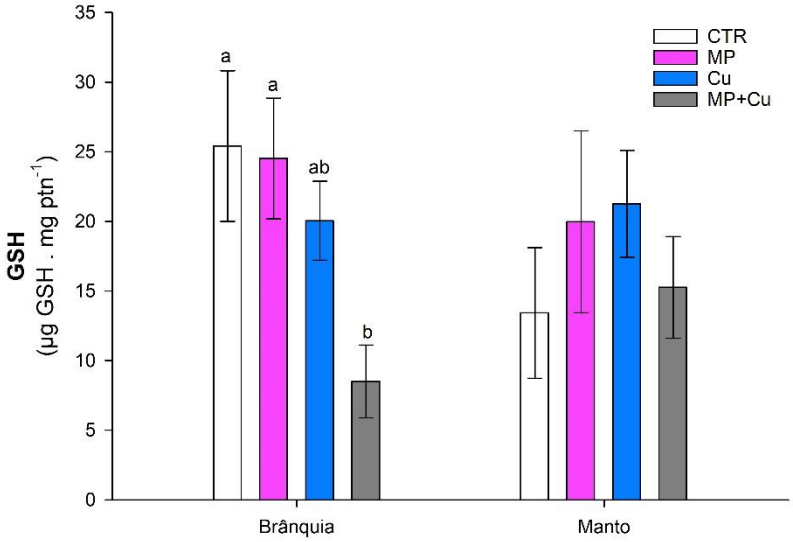

Figura 4 – Concentração de glutationa (GSH) na brânquia e manto de *A. trapesialis* expostos apenas a água desclorada (CTR), ao microplástico 20 µg L^{-1} (MP), ao cobre 10 µg L^{-1} (Cu) e ao microplástico 20 µg L^{-1} + cobre 10 µg L^{-1} (MP + Cu) por 96 h. Os resultados foram expressos como média e erro padrão (média ± EP; n = 8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais (p < 0,05).

As atividades das enzimas GST e CAT não foram alteradas nos tecidos analisados (brânquias, manto e glândula digestiva) como demonstrado na figura 5 A e B.

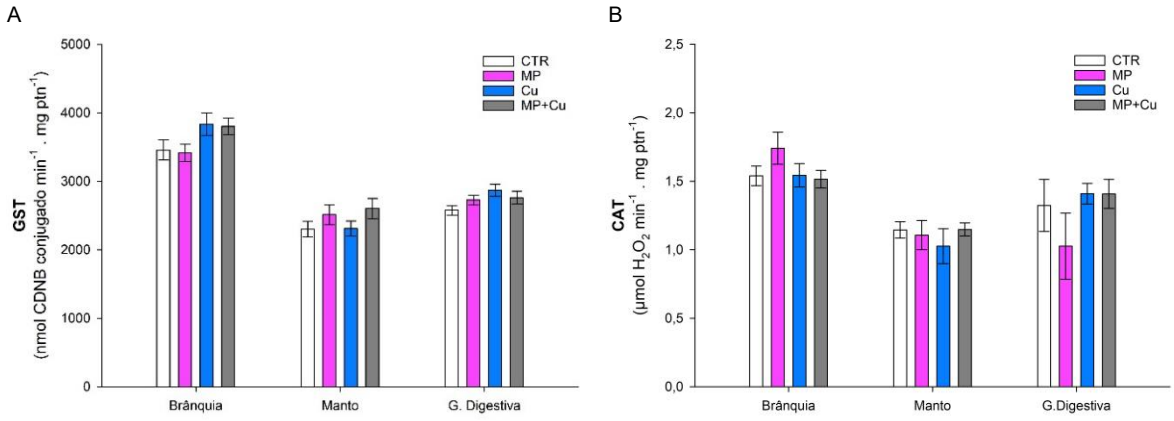

Figura 5 – (A) Atividade de glutationa S-transferase (GST) e (B) catalase (CAT) na brânquia, manto e glândula digestiva de *A. trapesialis* expostos apenas a água desclorada (CTR), ao microplástico 20 µg L^{-1} (MP), ao cobre 10 µg L^{-1} (Cu) e ao microplástico 20 µg L^{-1} + cobre 10 µg L^{-1} (MP + Cu) por 96 h. Os resultados foram expressos como média e erro padrão (média ± EP; n = 8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

3.5 DANO OXIDATIVO

Os danos oxidativos em lipídeos foram maiores ($p < 0,001$; $F = 11,681$) no manto dos *A. trapesialis* expostos ao MP em relação ao CTR e Cu. Ainda sobre o manto, os animais expostos a mistura dos poluentes tiveram um aumento significativo ($p < 0,001$; $F = 11,681$) ainda maior (MP + Cu) em relação ao MP, CTR e Cu (Fig. 6A). Nas glândulas digestivas a peroxidação lipídica teve aumento significativo ($p = 0,040$; $H = 8,313$) na mistura (MP + Cu) quando comparado ao grupo CTR (Fig. 6A). As brânquias não foram afetadas (Fig. 6A). O conteúdo de proteína carbonilada nas brânquias diminuiu de forma significativa ($p = 0,021$; $F = 3,801$) no tratamento Cu em relação ao CTR, MP e MP + Cu (Fig. 6B). Já no manto, houve aumento ($p < 0,001$; $F = 18,823$) de PCO na mistura (MP + Cu) quando comparado aos demais tratamentos (CTR, MP e Cu) (Fig. 6B).

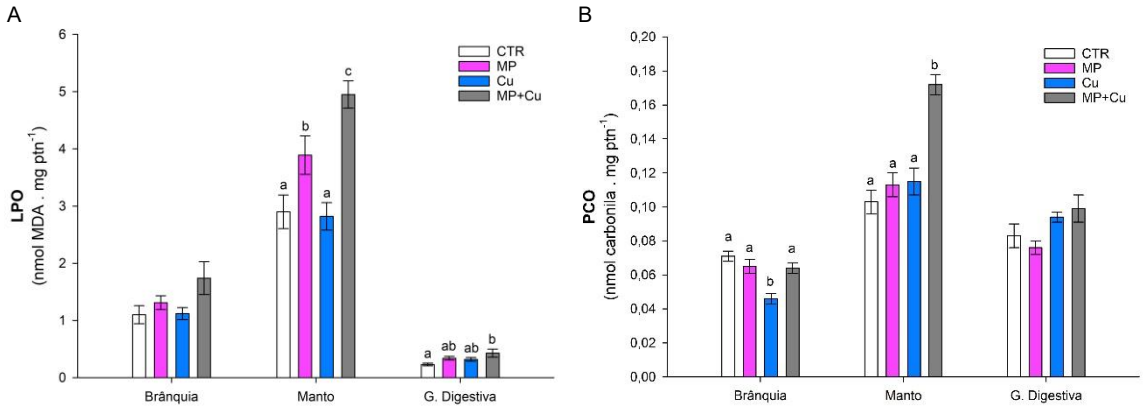

Figura 6 – (A) Lipoperoxidação (LPO) e (B) proteína carbonilada (PCO) na brânquia, manto e glândula digestiva de *A. trapesialis* expostos apenas a água desclorada (CTR), ao microplástico 20 µg L^{-1} (MP), ao cobre 10 µg L^{-1} (Cu) e ao microplástico 20 µg L^{-1} + cobre 10 µg L^{-1} (MP + Cu) por 96 h. Os resultados foram expressos como média e erro padrão (média ± EP; n = 8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

3.6 DANOS GENOTÓXICOS

Os danos no DNA analisados na hemolinfa dos bivalves tiveram aumento significativo ($p = <0,001$; $F = 13,269$) nos animais expostos aos grupos MP e MP + Cu quando comparados aos grupos CTR e Cu (Fig. 7).

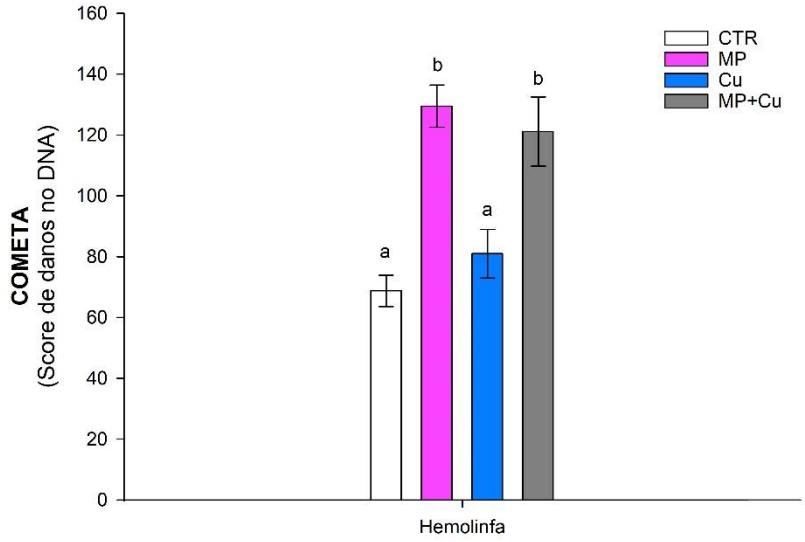

Figura 7 – Escore de dano ao DNA em hemolinfa de *A. trapesialis* expostos apenas a água desclorada (CTR), ao microplástico 20 µg L^{-1} (MP), ao cobre 10 µg L^{-1} (Cu) e ao microplástico 20 µg L^{-1} + cobre 10 µg L^{-1} (MP + Cu) por 96 h. Os resultados foram expressos como média e erro padrão (média ± EP; n = 8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

3.7 ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (ACHE)

A mistura dos poluentes afetou a atividade da AChE no pé, tendo aumentado significativamente ($p < 0,001$; $F = 27,491$) as atividades em relação aos demais grupos (CTR, MP e MP + Cu) (Fig. 8). No manto a atividade da AChE também foi significativamente ($p < 0,001$; $F = 25,587$) maior na mistura (MP + Cu) comparada aos demais grupos. No entanto, os animais expostos ao Cu isolado tiveram uma diminuição significativa na atividade da AChE em relação ao CTR, MP e MP + Cu (Fig. 8).

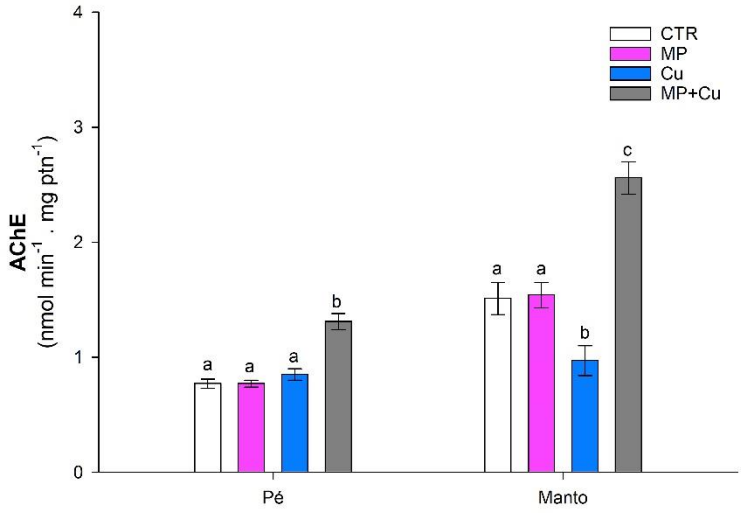

Figura 8 – Atividade da acetilcolinesterase (AChE) no músculo (pé) e manto de *A. trapesialis* expostos apenas a água desclorada (CTR), ao microplástico 20 µg L^{-1} (MP), ao cobre 10 µg L^{-1} (Cu) e ao microplástico 20 µg L^{-1} + cobre 10 µg L^{-1} (MP + Cu) por 96 h. Os resultados foram expressos como média e erro padrão (média ± EP; n = 8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Após a exposição aguda ao MP e ao Cu em laboratório, os moluscos bivalves *A. trapesialis* demonstraram ser modelos biológicos eficazes para testes ecotoxicológicos no ambiente dulcícola. Até o momento, o presente estudo é o pioneiro em análises dos efeitos toxicológicos de MP e Cu, isolados e em mistura, nesta espécie de bivalve dulcícola.

A concentração de Cu no tempo inicial (0 h) e no tempo de renovação (48 h), nos tratamentos com o metal, isolado e em combinação com o MP, ultrapassou a concentração nominal esperada (10 µg L^{-1}). Entretanto, a concentração de Cu

dissolvida observada (Cu: 12,32 ± 0,98 e MP + Cu: 13,96 ± 1,11) enquadra-se na concentração considerada relevante para ambientes de água doce, aproximando-se da concentração esperada para águas de classe III, conforme estipulado pela Resolução CONAMA 357/2005. Com relação aos valores de Cu total e dissolvido exibidos nos períodos sem renovação (24, 72 e 96 h), observou-se uma diminuição do metal, o que está relacionado a ação de filtragem dos *A. trapesialis.* Loayza-Muro e Elías-Letts (2007) ao estudar os bivalves *A. trapesialis* expostos aos metais cádmio, cobre e zinco, observou que a taxa de filtração nos animais aumentou com a temperatura da água, atingindo o valor mais alto entre 20 ºC e 30 ºC, com a constância de 700 mL/mexilhão/h. Embora não tenhamos determinado a taxa de filtração nos bivalves, é provável que os animais mantiveram uma filtração ao longo do período de exposição, na temperatura mantida durante o experimento (em torno de 24 ºC), diminuindo a concentração de Cu na água nos intervalos sem renovação. Além disso, apresentaram alterações significativas nos diferentes biomarcadores testados, os quais serão explicados a seguir.

Apesar do resultado mencionado anteriormente evidenciar a filtração de Cu presente na água, a concentração utilizada no experimento não foi suficiente para provocar acúmulo do metal nos tecidos avaliados, incluindo hemolinfa, brânquias, glândula digestiva, músculo (pé) e manto. Ainda, uma tendência no aumento da concentração de Cu na hemolinfa de animais expostos à mistura foi observada, no entanto não foi significativa. É importante destacar que pesquisas sobre a toxicidade de xenobióticos em moluscos bivalves de água doce ainda é limitada, sendo a maioria das abordagens voltada para moluscos marinhos. O acúmulo de Cu em tecidos moles de mexilhões e caracóis marinhos foi observada após cinco dias de exposição ao metal, nas concentrações 0,12, 0,36 e 0,60 mg L^{-1}, sendo a capacidade de acúmulo e efeitos tóxicos de metais, como o Cu, influenciados por condições físicas e químicas da água (SIRIN et al., 2021). Além disso, vários estudos indicam que o acúmulo de metais pode ser afetado pelo tamanho do animal, observando-se que a concentração de metal nos indivíduos diminui com o aumento do tamanho do espécime (MUBIANA et al., 2006; BALTAS et al., 2016).

Embora não tenha sido avaliado neste estudo o acúmulo de MP nos tecidos dos bivalves, é possível que as micropartículas tenham sido absorvidas, devido aos múltiplos efeitos tóxicos observados nos biomarcadores analisados após a exposição ao MP, principalmente quando em mistura como o Cu. Diferentes autores

têm relatado a absorção de microplásticos por moluscos. Como Abidli et al. (2019) que detectaram MP de polietileno (PE), em sua grande maioria, em três espécies de bivalves *M. galloprovincialis*, *Ruditapes decussatus* e *Crassostrea gigas* da lagoa Bizerte, no norte da Tunísia. Microplásticos de PE e PP (< 400 µm) também foram observadas em *Mytilus* spp. expostos a 100 µg L^{-1} (REVEL et al., 2019). No entanto, os mesmos autores ainda relataram que partículas entre 50 e 200 µm em qualquer concentração foram filtradas e excretadas pelos animais. O acúmulo de MP por bivalves ainda é bastante controverso, sendo apresentado por diferentes autores a não acumulação dos MP após diferentes exposições (SUSSARELLU et al., 2016; REVEL et al., 2020; ABIDLI et al., 2021).

O equilíbrio redox nos organismos é mantido por meio das ações das defesas antioxidantes, as quais atuam para neutralizar os efeitos do desequilíbrio na produção de ERO, assegurando a manutenção da homeostase e prevenindo danos prejudicais excessivos (ABIDLI et al., 2021). Para tanto, os organismos possuem um sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático, dos quais alguns foram avaliados no presente estudo, como a GSH, CAT e GST. O desequilíbrio na homeostase entre as defesas antioxidantes e o excesso na produção de ERO pode resultar em danos oxidativos como, inativação de enzimas, degradação de proteínas, lipoperoxidação, danos no DNA e até mesmo morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Referente às enzimas antioxidantes, a CAT é uma enzima que atua diretamente na neutralização de ERO, promovendo a degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio ($2\ H_2O_2 \Rightarrow 2\ H_2O + O_2$) mitigando assim potenciais danos ao organismo (CARVALHO et al., 2015; PROKIC et al., 2018). Já a GST, desempenha um papel no processo de biotransformação de fase II, no qual catalisa a conjugação da glutationa em sua forma reduzida (GSH) com compostos, promovendo a conversão de xenobióticos orgânicos lipossolúveis em derivados hidrossolúveis, facilitando a excreção (VAN DER OOST et al., 2003). Não foi observado aumento na atividade das enzimas CAT e GST em brânquias, manto e glândula digestiva. Em contrapartida, observou-se aumento na lipoperoxidação no manto de animais expostos ao MP e ao MP + Cu, além de um aumento na LPO na glândula digestiva e um aumento nos níveis de PCO no manto de animais expostos à mistura. Nossos resultados apontam que o aumento de dano oxidativo em lipídeos e proteínas, pode estar relacionado à ausência de ativação das enzimas antioxidantes analisadas, como a CAT e a GST, que pode ser atribuída ao período curto de

exposição, o qual pode não ter sido o suficiente para desencadear a ativação dos mecanismos de defesa mediados por essas enzimas. Resultados divergentes foram apresentados por Abdli et al. (2021), em fêmeas da espécie *Mytilus galloprovincialis*, expostas por 14 dias ao MP de PE em concentrações maiores (100 e 1000 µg L^{-1}), apresentando diminuição na atividade da CAT e GST, além da redução significativa da LPO nas glândulas digestivas quando exposta a maior concentração (1000 µg L^{-1}). Ainda, no mesmo estudo foi observado apenas redução na atividade da GST nos machos expostos a concentração de 1000 µg L^{-1}.

Nenhuma evidência de dano oxidativo foi observado nas brânquias dos bivalves; pelo contrário, houve uma redução significativa nos níveis de PCO nas brânquias de animais expostos ao Cu isolado. Tais resultados podem ser atribuídos à eficácia da ação da GSH e demais defesas antioxidantes, na mitigação do estresse oxidativo nas brânquias, que possivelmente atuou na neutralização das ERO, além de se ligar diretamente aos poluentes e/ou metabolitos. A GSH é um antioxidante não-enzimático, que atua na primeira linha de defesa contra a desintoxicação de xenobióticos, sendo cofator para várias enzimas (VAN DER OOST et al., 2003). A diminuição dos níveis de GSH em animais expostos à mistura dos xenobióticos pode ser atribuída à interação entre os poluentes, uma vez que tal efeito não foi observado nas exposições isoladas ao MP e Cu. Mesmo apresentando diminuição apenas nos animais expostos à mistura, notou-se uma tendência à redução na atividade do tiol não proteico nos demais tratamentos.

A exposição a um agente estressor, como o MP e o Cu, conforme apresentado no presente estudo, pode induzir modificações nos níveis séricos de glicose na hemolinfa dos moluscos bivalves, como o *A. trapesialis*. Apesar dos níveis de reserva energética não terem sido afetados, como observado nos resultados do glicogênio, foi evidenciado hiperglicemia em animais expostos ao Cu e ao MP + Cu, que pode ser atribuída a um aumento na demanda metabólica necessária para a execução das funções essenciais do organismo.

O potássio (K^+) é um importante íon utilizado pela Na^+/ K^+ - ATPase no transporte de sódio (Na^+) através da membrana basolateral do citosol para os fluidos extracelulares, como a hemolinfa (GRIFFITH, 2016). A concentração elevada de K^+ no citosol favorece a difusão do K^+ de volta para fluido extracelular através dos canais de potássio, os quais são impermeáveis ao Na^+ mas parcialmente permeáveis a alguns íons metálicos alcalinos (DOYLE et al., 1998). Assim como apresentado no

“manuscrito II” em *P. lineatus*, um aumento significativo na concentração de K^+ (4,40 mM) também foi observado na hemolinfa de bivalves *A. trapesialis* expostos à mistura dos poluentes, indicando potencial sinergismo entre eles, já que o mesmo resultado não se apresentou em animais expostos aos poluentes isolados. A hipercalemia pode ter ocorrido como consequência de um aumento na lise dos hemócitos, que em decorrência à ruptura celular resultou no extravasamento de íons K^+ (MARTINEZ; SOUZA, 2002). Nossos resultados enfatizam a importância de realizar mais estudos para a compreensão dos efeitos combinados de MP e Cu no ambiente aquático dulcícola, dado que resultados semelhantes estão sendo observados em organismos com hábitos distintos.

A exposição ao MP isolado e em mistura com o Cu apresentou risco potencial à integridade do genoma dos moluscos bivalves *A. trapesialis*, avaliada pelo ensaio cometa alcalino. Danos no DNA em hemócitos de moluscos marinhos já haviam sido relatados anteriormente em decorrência à exposição ao MP, atribuído à ação de ERO (AVIO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017; HAN et al., 2021) que podem causar danos oxidativos no DNA, levando à quebra na cadeia de DNA, formação de danos por ligação covalente, inibição da síntese de DNA e/ou interferência nos processos de duplicação e transcrição genética (AVIO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017). Após exposição à mistura de MP de PE e PP, 10 μg L^{-1} e 100 μg L^{-1}, *Mytilus* spp. apresentaram aumento de dano no DNA em hemolinfa, com uma tendência dependente da concentração (REVEL et al., 2019). Os hemócitos são as principais células envolvidas na defesa dos bivalves (TAKAHASHI; MUROGA, 2008) desempenhando um papel crucial no transporte de gases (GOSLING, 2015), assim como no transporte e digestão de nutrientes (DONAGHY et al., 2009) e na eliminação de resíduos indesejados (ALLAM; RAFTOS, 2015), como as micropartículas, evidenciando o potencial genotóxico do MP para este tecido. A maioria dos trabalhos que apresentam o potencial genotóxico dos MPs ainda são referentes a animais marinhos, como no estudo sobre os efeitos do MP de poliestireno (PS), 10^6 microesferas L^{-1} (0,9 μm), Chelomin et al. (2022) que apresentaram as propriedades genotóxicas do MP, em células da glândula digestiva no bivalve *Mytilus trossulus*.

A fim de compreender a neurotoxicidade dos poluentes, foi avaliada a atividade da AChE, uma enzima localizada na fenda sináptica, responsável pela hidrolise do neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético (AGUIRRE-MARTÍNEZ et al., 2016). A ação da AChE impede a contração muscular continua

tornando-se fundamental na regulação da neurotransmissão colinérgica (SANTANA et al., 2021). A exposição dos animais ao Cu isolado diminuiu as atividades da enzima AChE no manto. No entanto, um aumento na atividade da AChE foi observado no músculo (pé) e manto dos animais expostos à mistura. Tanto a diminuição quanto o aumento da atividade da AChE são prejudiciais para o organismo. A neurotoxicidade do Cu diminuindo a atividade da AChE pode resultar no acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, consequentemente os sinais colinérgicos irão persistir por mais tempo, comprometendo as respostas neuromusculares com estímulos prolongados contínuos (AGUIRRE-MARTÍNEZ et al., 2016). É importante ressaltar que, quando em mistura, a micropartícula alterou o efeito do metal, passando a apresentar um efeito contrário com o aumento das atividades enzimáticas. A atividade da AChE foi reduzida nas brânquias dos mexilhões marinhos *M. galloprovincialis* após exposição ao MP virgem (20 g L^{-1}) e contaminando com pireno (MP 20 g L^{-1} + pireno 0,5 µg L^{-1}, 5 µg L^{-1} e 50 µg L^{-1}) demonstrando a capacidade do MP deprimir a AChE, considerando seu possível efeito anticolinérgico (AVIO et al., 2015). Os efeitos neurotóxicos para bivalves ainda não são bem esclarecidos, e mais estudos precisam ser realizados a fim de contribuir com o entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos na neurotoxicidade destes poluentes.

5 CONCLUSÃO

As concentrações dos poluentes utilizadas no presente estão de acordo com as concentrações relevantes para meio ambiente, no entanto está abaixo da maioria da concentração utilizada nos demais trabalhos. Mesmo em um período curto de exposição e em baixas concentrações dos xenobióticos, tanto o MP quanto o Cu apresentaram toxicidade, na sua forma isolada mas principalmente quando em mistura, influenciando a homeostase dos moluscos bivalves *A. trapesialis*. O Cu isolado foi responsável por interferir nos níveis de glicose, diminuir os danos em proteínas e diminuir as atividades da AChE. Já o MP isolado desencadeou aumento da lipoperoxidação e aumento de danos no DNA. A maior preocupação foi quanto a presença simultânea dos poluentes, pois uma vez em mistura os MP + Cu resultaram no aumento da concentração de K^+, aumentaram os níveis de glicose, os danos oxidativos em lipídeos e proteínas, os danos no DNA, a atividade da AChE e diminuíram a concentração da GSH. É importante notar que a combinação dos

poluentes (MP + Cu) teve um impacto maior nos parâmetros avaliados em comparação aos efeitos dos poluentes isolados (MP e Cu) evidenciando sinergismos entre eles. Estudos em regiões tropicais com espécies nativas dulcícolas ainda são pouco exploradas e nosso trabalho demonstrou-se uma ferramenta importante no auxílio da monitorização da contaminação ambiental e impactos biológicos para essas regiões.

REFERÊNCIAS

ABIDLI, S.; LAHBIB, Y.; EL MENIF, N. T. Microplastics in commercial molluscs from the lagoon of Bizerte (Northern Tunisia). **Marine Pollution Bulletin**, v. 142, p. 243-252, 2019.

ABIDLI, S.; PINHEIRO, M.; LAHBIB, Y.; NEUPARTH, T.; SANTOS, M. M.; TRIGUI EL MENIF, N. Effects of environmentally relevant levels of polyethylene microplastic on *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia): filtration rate and oxidative stress. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 26643-26652, 2021.

AGUDO-PADRÓN, A. I. Mollusc aquaculture and malacological research in Santa Catarina State (central southern Brazil Region): a brief synthetic critical review. **Brazilian Journal of Biological Sciences**, v. 2, p. 377-380, 2015.

AGUIRRE-MARTÍNEZ, G. V.; DELVALLS, T. A.; MARTÍN-DÍAZ, M. L. General stress, detoxification pathways, neurotoxicity and genotoxicity evaluated in *Ruditapes philippinarum* exposed to human pharmaceuticals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 18-31, 2016.

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.

ALLAM, B.; RAFTOS, D. Immune responses to infectious diseases in bivalves. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 131, p. 121-136, 2015.

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**, v. 842, p. 85-93, 2019.

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.

BALTAS, H. A. S. A. N.; DALGIC, G. Ö. K. T. U. Ğ.; BAYRAK, E. Y.; SIRIN, M. U. R. A. T.; CEVIK, U. Ğ. U. R.; APAYDIN, G. Ö. K. H. A. N. Experimental study on copper uptake capacity in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p.10983-10989, 2016.

BESSELING, E.; QUIK, J. T.; SUN, M.; KOELMANS, A. A. Fate of nano-and microplastic in freshwater systems: A modeling study. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 540-548, 2017.

BEUTLER, E. A manual of biochemical methods. **Grune &amp**, 1975.

BIDINOTTO, P. M.; MORAES, G.; SOUZA, R. H. S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 10, p. 53-60, 1997.

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.

CAMEJO, G.; WALLIN, B.; ENOJÄRVI, M. Analyses of oxidation and antioxidants using microtiter plates. **Free Radical and Antioxidants Protocols**, p. 377-387, 1998.

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.

CHELOMIN, V. P.; MAZUR, A. A.; SLOBODSKOVA, V. V.; KUKLA, S. P.; DOVZHENKO, N. V. Genotoxic properties of polystyrene (PS) microspheres in the filter-feeder mollusk *Mytilus trossulus* (Gould, 1850). **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 10, p. 273, 2022.

CHEN, Q.; GUNDLACH, M.; YANG, S.; JIANG, J.; VELKI, M.; YIN, D.; HOLLERT, H. Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity. **Science of the Total Environment**, v. 584, p. 1022-1031, 2017.

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.

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.

DING, J.; LI, J.; SUN, C.; JIANG, F.; HE, C.; ZHANG, M.; JU, P.; DING, N. X. An examination of the occurrence and potential risks of microplastics across various shellfish. **Science of the Total Environment**, v. 739, p. 139887, 2020.

DING, J.; SUN, C.; HE, C.; LI, J.; JU, P.; LI, F. Microplastics in four bivalve species and basis for using bivalves as bioindicators of microplastic pollution. **Science of the Total Environment**, v. 782, p. 146830, 2021.

DONAGHY, L.; LAMBERT, C.; CHOI, K. S.; SOUDANT, P. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): current knowledge and future prospects. **Aquaculture**, v. 297, p. 10-24, 2009.

DOYLE, D. A.; CABRAL, J. M.; PFUETZNER, R. A.; KUO, A.; GULBIS, J. M.; COHEN, S. L.; CHAIT, B. T.; MACKINNON, R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. **Science**, v. 280, p. 69-77, 1998.

DRIS, R.; IMHOF, H.; SANCHEZ, W.; GASPERI, J.; GALGANI, F.; TASSIN, B.; LAFORSCH, C. Beyond the ocean: contamination of freshwater ecosystems with (micro-) plastic particles. **Environmental Chemistry**, v. 12, p. 539-550, 2015.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. T.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EL HAJ, Y.; BOHN, S.; SOUZA, M. M. Tolerance of native and invasive bivalves under herbicide and metal contamination: an ex vivo approach. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 31198-31206, 2019.

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.

FELIPI, P. G.; SILVA-SOUZA, Â. T. *Anodontites trapesialis* (LAMARCK, 1819): a bivalve parasite of freshwater fishes. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, p. 895-904, 2008.

GRIFFITH, M. B. Toxicological perspective on the osmoregulation and ionoregulation physiology of major ions by freshwater animals: teleost fish, Crustacea, aquatic insects, and Mollusca. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, p. 576-600, 2017.

GOMES, T.; PINHEIRO, J. P.; CANCIO, I.; PEREIRA, C. G.; CARDOSO, C.; BEBIANNO, M. J. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 9356-9362, 2011.

GONZÁLEZ-SOTO, N.; HATFIELD, J.; KATSUMITI, A.; DUROUDIER, N.; LACAVE, J. M.; BILBAO, E.; ORBEA, A.; NAVARRO, E.; CAJARAVILLE, M. P. Impacts of dietary exposure to different sized polystyrene microplastics alone and with sorbed benzo [a] pyrene on biomarkers and whole organism responses in mussels *Mytilus galloprovincialis*. **Science of the Total Environment**, v. 684, p. 548-566, 2019.

GOSLING, E. **Marine Bivalve Molluscs**. 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.

HAN, Y.; ZHOU, W.; TANG, Y.; SHI, W.; SHAO, Y.; REN, P.; ZHANG, J.; XIAO, G.; SUN, H.; LIU, G. Microplastics aggravate the bioaccumulation of three veterinary antibiotics in the thick shell mussel *Mytilus coruscus* and induce synergistic immunotoxic effects. **Science of The Total Environment**, v. 770, p. 145273, 2021.

HE, M.; YAN, M.; CHEN, X.; WANG, X.; GONG, H.; WANG, W.; WANG, J. Bioavailability and toxicity of microplastics to zooplankton. **Gondwana Research**, v. 108, p. 120-126, 2022.

HE, S.; TONG, J.; XIONG, W.; XIANG, Y.; PENG, H.; WANG, W.; YANG, Y.; YE, Y.; HU, M.; YANG, Z.; ZENG, G. Microplastics influence the fate of antibiotics in freshwater environments: Biofilm formation and its effect on adsorption behavior. **Journal of Hazardous Materials**, v. 442, p. 130078, 2023.

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.

IUMMATO, M. M.; SABATINI, S. E.; CACCIATORE, L. C.; COCHÓN, A. C.; CATALDO, D.; DE MOLINA, M. D. C. R.; JUÁREZ, Á. B. Biochemical responses of the golden mussel *Limnoperna fortunei* under dietary glyphosate exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 163, p. 69-75, 2018.

JAMBECK, J. R.; GEYER, R.; WILCOX, C.; SIEGLER, T. R.; PERRYMAN, M.; ANDRADY, A.; NARAYAN, R.; LAW, K. L. Plastic waste inputs from land into the ocean. **Science**, v. 347, p. 768-771, 2015.

KANHAI, L. D. K.; GARDFELDT, K.; KRUMPEN, T.; THOMPSON, R. C.; O'CONNOR, I. Microplastics in sea ice and seawater beneath ice floes from the Arctic Ocean. **Scientific Reports**, v. 10, p. 5004, 2020.

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

KIM, J. H.; YU, Y. B.; CHOI, J. H. Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and neurotoxicity in fish exposed to microplastics: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 413, p. 125423, 2021.

KLAASEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casaret e Doull**. Porto Alegre: AMGH, 2012.

LA DAANA, K. K.; GÅRDFELDT, K.; LYASHEVSKA, O.; HASSELLÖV, M.; THOMPSON, R. C.; O'CONNOR, I. Microplastics in sub-surface waters of the Arctic Central Basin. **Marine Pollution Bulletin**, v. 130, p. 8-18, 2018.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 246-257, 1994.

LIN, X.; GOWEN, A. A.; PU, H.; XU, J. L. Microplastic contamination in fish: Critical review and assessment of data quality. **Food Control**, v. 153, p. 109939, 2023.

LIN, Z.; HU, Y.; YUAN, Y.; HU, B.; WANG, B. Comparative analysis of kinetics and mechanisms for Pb (II) sorption onto three kinds of microplastics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111451, 2021.

LOAYZA-MURO, R.; ELÍAS-LETTS, R. Responses of the mussel *Anodontites trapesialis* (Unionidae) to environmental stressors: effect of pH, temperature and metals on filtration rate. **Environmental Pollution**, v. 149, p. 209-215, 2007.

LU, J.; YU, Z.; NGIAM, L.; GUO, J. Microplastics as potential carriers of viruses could prolong virus survival and infectivity. **Water Research**, v. 225, p. 119115, 2022.

MARTINEZ, C. B. R.; SOUZA, M. M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 133, p. 151-160, 2002.

MORESCHI, A. C.; CALLIL, C. T.; CHRISTO, S. W.; JUNIOR, A. L. F.; NARDES, C.; DE FARIA, É.; GIRARD, P. Filtration, assimilation and elimination of microplastics by freshwater bivalves. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 2, p. 100053, 2020.

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.

MUBIANA, V. K.; VERCAUTEREN, K.; BLUST, R. The influence of body size, condition index and tidal exposure on the variability in metal bioaccumulation in *Mytilus edulis*. **Environmental Pollution**, v. 144, p.272-279, 2006.

NASSER, F.; LYNCH, I. Secreted protein eco-corona mediates uptake and impacts of polystyrene nanoparticles on *Daphnia magna*. **Journal of Proteomics**, v. 137, p. 45-51, 2016.

NIKINMAA, M. **An Introduction to Aquatic Toxicology**. Elsevier, 2014.

OBBARD, R. W.; SADRI, S.; WONG, Y. Q.; KHITUN, A. A.; BAKER, I.; THOMPSON, R. C. Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice. **Earth's Future**, v. 2, p. 315-320, 2014.

OLIVEIRA, L. F.; CABRAL, M. T.; VIEIRA, C. E. D.; ANTONIAZZI, M. H.; RISSO, W. E.; MARTINEZ, C. B. R. Metals bioaccumulation and biomarkers responses in the Neotropical freshwater clam *Anodontites trapesialis*: Implications for monitoring coal mining areas. **Science of the Total Environment**, v. 571, p. 983-991, 2016.

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.

PANNO, S. V.; KELLY, W. R.; SCOTT, J.; ZHENG, W.; MCNEISH, R. E.; HOLM, N.; HOELLEIN, T.; BARANSKI, E. Microplastic contamination in karst groundwater

systems. **Groundwater**, v. 57, p. 189-196, 2019.

PROKIĆ, M. D.; PETROVIĆ, T. G.; GAVRIĆ, J. P.; DESPOTOVIĆ, S. G.; GAVRILOVIĆ, B. R.; RADOVANOVIĆ, T. B.; FAGGIO, C.; SAIČIĆ, Z. S. Comparative assessment of the antioxidative defense system in subadult and adult anurans: A lesson from the *Bufotes viridis* toad. **Zoology**, v. 130, p. 30-37, 2018.

REVEL, M.; CHÂTEL, A.; PERREIN-ETTAJANI, H.; BRUNEAU, M.; AKCHA, F.; SUSSARELLU, R.; ROUXEL, J.; COSTIL, K.; DECOTTIGNIES, P.; COGNIE, B.; LAGARDE, F.; MOUNEYRAC, C. Realistic environmental exposure to microplastics does not induce biological effects in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 150, p. 110627, 2020.

REVEL, M.; LAGARDE, F.; PERREIN-ETTAJANI, H.; BRUNEAU, M.; AKCHA, F.; SUSSARELLU, R.; ROUXEL, J.; COSTIL, K.; DECOTTIGNIES, P.; COGNIE, B.; CHÂTEL, A.; MOUNEYRAC, C. Tissue-specific biomarker responses in the blue mussel *Mytilus* spp. exposed to a mixture of microplastics at environmentally relevant concentrations. **Frontiers in Environmental Science**, v. 7, p. 33, 2019.

RIBEIRO, F.; GARCIA, A. R.; PEREIRA, B. P.; FONSECA, M.; MESTRE, N. C.; FONSECA, T. G.; ILHARCO, L. M.; BEBIANNO, M. J. Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 122, p. 379-391, 2017.

RODA, J. F. B.; LAUER, M. M.; RISSO, W. E.; MARTINEZ, C. B. R. Microplastics and copper effects on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: Is there any interaction?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 242, p. 110659, 2020.

RODEA-PALOMARES, I.; GONZÁLEZ-PLEITER, M.; MARTÍN-BETANCOR, K.; ROSAL, R.; FERNÁNDEZ-PIÑAS, F. Additivity and interactions in ecotoxicity of pollutant mixtures: some patterns, conclusions, and open questions. **Toxics**, v. 3, p. 342-369, 2015.

SANTANA, M. S.; SANDRINI-NETO, L.; DI DOMENICO, M.; PRODOCIMO, M. M. Pesticide effects on fish cholinesterase variability and mean activity: A meta-analytic review. **Science of the Total Environment**, v. 757, p. 143829, 2021.

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.

SIRIN, M.; CILOGLU, E; BALTAS, H. Acute copper accumulation in Mediterranean mussel and sea snail. **Spectroscopy Letters**, v. 54, p. 539-548, 2021.

STAICHAK, G.; FERREIRA-JR, A. L.; SILVA, A. C. M.; GIRARD, P.; CALLIL, C. T.; CHRISTO, S. W. Bivalves with potential for monitoring microplastics in South America. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 4, p. 100119, 2021.

SUSSARELLU, R.; SUQUET, M.; THOMAS, Y.; LAMBERT, C.; FABIOUX, C.; PERNET, M. E. J.; GOIC, N. L.; QUILLIEN, V.; MINGANT, C.; EPELBOIN, Y.; CORPOREAU, C.; GUYOMARCH, J.; ROBBENS, J.; PAUL-PONT, I.; SOUDANT, P.; HUVET, A. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, p. 2430-2435, 2016.

TAKAHASHI, K. G.; MUROGA, K. Cellular defense mechanisms in bivalve molluscs. **Fish Pathology**, v. 43, p. 1-18, 2008.

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.

VETRIMURUGAN, E.; JONATHAN, M. P.; SARKAR, S. K.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, F.; ROY, P. D.; VELUMANI, S.; SAKTHI, J. S. Occurrence, distribution and provenance of microplastics: A large scale quantitative analysis of beach sediments from southeastern coast of South Africa. **Science of the Total Environment**, v. 746, p. 141103, 2020.

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.

WARD, J. E.; ZHAO, S.; HOLOHAN, B. A.; MLADINICH, K. M.; GRIFFIN, T. W.; WOZNIAK, J.; SHUMWAY, S. E. Selective ingestion and egestion of plastic particles by the blue mussel (*Mytilus edulis*) and eastern oyster (*Crassostrea virginica*): implications for using bivalves as bioindicators of microplastic pollution. **Environmental Science & Technology**, v. 53, p. 8776-8784, 2019.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, p. 139-162, 1994.

ZHOU, Q.; ZHANG, H. B.; LI, Y.; LUO, Y. M. Progress on microplastics pollution and its ecological effects in the coastal environment. **Chinese Science Bulletin**, v. 60, p. 3210-3220, 2015.

ZHU, J.; YU, X.; ZHANG, Q.; LI, Y.; TAN, S.; LI, D.; YANG, Z.; WANG, J. Cetaceans and microplastics: First report of microplastic ingestion by a coastal delphinid, *Sousa chinensis*. **Science of The Total Environment**, v. 659, p. 649-654, 2019.

Considerações finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A poluição ambiental por plástico, principalmente pelas micropartículas, tornou-se uma ameaça crescente. Além do crescimento exacerbado do uso de produtos plásticos a cada ano, grande parte do lixo plástico é descartado de forma inadequada, acumulando nos ecossistemas naturais e atingindo os recursos hídricos. Uma vez lançados no ambiente, tornam-se biodisponíveis para organismos de diferentes níveis tróficos, aumentando os impactos associados a esta forma de poluição.

O ambiente aquático é um sistema complexo, onde frequentemente os xenobióticos ocorrem de maneira simultânea. É necessário abordar e compreender a toxicidade dos poluentes não apenas de forma isolada, mas também em mistura. Considerando que os efeitos causados pelos poluentes podem variar de acordo com características especificas de cada espécie, bem como tamanho, sexo, hábito alimentar e desenvolvimento ontogenético, torna-se importante estudar os efeitos toxicológicos em diferentes modelos biológicos com hábitos distintos.

Ao avaliarmos os efeitos da exposição dos embriões de *Danio rerio* ao microplástico (MP) e ao cobre (Cu), observou-se que desde as fases iniciais de vida, os poluentes são capazes de interferir na saúde e desenvolvimento dos organismos. Embora não tenha culminado a morte dos embriões, constatou-se afinidade das micropartículas com o córion embrionário (MP e MP + Cu), diminuição da taxa de eclosão (Cu e MP + Cu), bradicardia (MP e MP + Cu) e acúmulo do metal (Cu e MP + Cu) nos respectivos grupos, podendo desencadear consequências à longo prazo. Ainda, outro fator que chamou atenção foi a possível interação entre os poluentes, responsável por potencializar o efeito do cobre nos resultados da taxa de eclosão.

O peixe *Prochilodus lineatus* e o molusco bivalve *Anodontites trapesialis*, ambas espécies nativas, foram selecionadas para este estudo devido aos seus hábitos distintos, apesar de pertencerem ao mesmo habitat, ampliando nosso conhecimento sobre a ação e toxicidade dos poluentes no ambiente aquático dulcícola. Apesar das diferenças funcionais entre as espécies, observou-se que alguns efeitos foram compartilhados entre elas. Um aumento nos níveis de glicose e concentração dos íons K^+ foram observados, provavelmente em consequência de

rompimento dos hemócitos (bivalve) e das hemácias (peixes), resultando no extravasamento e aumento de K^+. Tal desequilíbrio, por sua vez, resultou na hiperglicemia em resposta ao estresse.

Danos oxidativos em proteínas e aumento de danos no DNA foram compartilhados nas exposições do peixe *P. lineatus* e do bivalve *A. trapesialis*. Os danos oxidativos em proteínas podem ser atribuídos a ausência de ativação das enzimas antioxidantes, reforçando a ideia de que tenha ocorrido possivelmente ação oxidativa no DNA. Para as três espécies avaliadas foi observado possíveis interações entre os poluentes, indicando provável sinergismo entre eles, corroborando a evidência de interação e a toxicidade da mistura para os organismos.

Diante das considerações apresentadas, nosso estudo confirma a toxicidade dos poluentes MP e Cu, tanto isolados quanto em mistura, para os três modelos biológicos avaliados. Ressaltamos ainda, a importância de pesquisas que investiguem a toxicidade desses poluentes em exposição aguda e crônica para diferentes organismos dulcícolas, a fim de complementar as informações atuais disponíveis no banco de dados, contribuindo com informações seguras sobre as concentrações de MP em ambientes aquáticos dulcícolas.