

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE ÁGUA DOCE E**  
**PESCA INTERIOR – PPG-BADPI**

**INGESTÃO E EFEITOS MORFOFISIOLÓGICOS DOS MICROPLÁSTICOS**  
**EM ESPÉCIES DE PEIXES DA AMAZÔNIA CENTRAL**

**MARIA TEREZA VASCONCELOS DE SOUZA**

**MANAUS, AMAZONAS**

**2022**

**MARIA TEREZA VASCONCELOS DE SOUZA**

**INGESTÃO E EFEITOS MORFOFISIOLÓGICOS DOS MICROPLÁSTICOS  
EM ESPÉCIES DE PEIXES DA AMAZÔNIA CENTRAL**

ORIENTADOR: Adalberto Luis Val, Dr.

COORIENTADORA: Dra. Grazyelle Sebrenski da Silva

AGÊNCIA FINANCIADORA: CAPES/CNPq/FAPEAM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como  
parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em  
Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia de  
Água Doce e Pesca Interior.

**Manaus, AMAZONAS**

**2022**

**Banca examinadora**

**(parecer)**

## **Dedicatória**

Dedico essa dissertação a meus pais, Auxiliadora e Luiz Carlos, e ao meu irmão Luiz Fernando. Todo o mérito é de vocês também!

## **Agradecimentos**

Agradeço de todo coração meus pais, Auxiliadora e Luiz Carlos, pela paciência e compreensão em todos esses anos em que tenho me dedicado aos estudos. O esforço de vocês e o incentivo a educação me deram ânimo para continuar.

Agradeço a meu irmão, Luiz Fernando, pelos momentos de distração e risadas, que fizeram com que esse caminho fosse menos espinhoso. Que você entenda que o estudo, dedicação e muita paciência rendem bons frutos, e você tem muito na vida o que colher ainda.

Agradeço a minha coorientadora Dra. Grazyelle Sebreński da Silva, por ter me recrutado no final da graduação e me inserido ao grupo de pesquisas do LEEM. Além do suporte financeiro e emocional, e presença constante durante todo o processo do mestrado. Meus agradecimentos a professora Dra. Vera Fonseca de Almeida e Val pelo pontapé inicial do projeto de dissertação. Meu muito obrigado, vocês são exemplos de mulheres na pesquisa!

Ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular e toda equipe que compõe o motor desse laboratório: Maria de Nazaré de Paula, Dona Rai, Raquel Abecassis, aos técnicos Rogério dos Santos, Thiago Pires e Reginaldo. Meu muito obrigado.

Ao Laboratório de Síntese e Caracterização de Nanomateriais (LSCN), do Instituto Federal do Amazonas, ao Dr. Lizandro Manzato e ao Msc. Igor Araújo Pinto pela concessão do uso do equipamento de FTIR.

Ao grupo de pesquisas “Ecofisiologia e Ecotoxicologia de Organismos Aquáticos” liderado pela professora Dra. Helen Sadauskas, pela concessão de fragmentos de microplásticos de polietileno utilizados no experimento do segundo capítulo dessa dissertação.

Agradeço a Universidade Federal do Amazonas e ao Departamento de Morfologia pela permissão e acesso ao Laboratório de Histologia para a realização das análises histológicas.

Agradeço a turma de mestrado de 2019, Bruna Farias, Layla Rocha, Henrique Oliveira, Eletuza Farias, Alex, Tamiris, pelo apoio nos momentos de desespero durante a realização das disciplinas. Valeu muito conhecer vocês.

Ao pessoal da sala dos mestrandos: Larissa Matos, Suzane Moraes, Mayara Lima, Bruna Farias, Ian Fernandes, Jefferson Almeida, Beatriz Enóla, Vanessa Pereira, por todos os momentos de descontração e fuga nos momentos mais difíceis.

A Dra. Samara Souza pela paciência, tempo e disposição em me ensinar e ajudar nas análises e interpretações de dados, mesmo quando eu achava que não seria capaz. A Dra. Susana Braz, no auxílio com as análises das enzimas antioxidantes, nada como uma conversa com especialistas no assunto. Obrigado por tudo!

Aos doutorandos e amigos Melina Rizzato, Lorena Vieira, Renan Amanajás, por toda ajuda dada a essa mestranda desesperada do começo ao fim.

Aos amigos da copa Dona Val, Dona Ethelvina e Wanderlan, pelos momentos de conversas e risadas regadas a muito café.

A todas as pessoas que me ajudaram direta ou indiretamente nesse mestrado: Dr. Fernando Marques, Dra. Maria Inês Braga de Oliveira, Dr. Rommel.

Agradeço ao meu futuro engenheiro químico, Lucas Lima dos Santos, pelo companheirismo nesses momentos finais: *“Tout le succès du monde à toi. Voler, Lucas”*.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia – INPA e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

As agências financiadoras do presente projeto Capes, CNPq, FAPEAM e INCT Adapta II, pela concessão da bolsa.

Por fim e não menos importante, agradeço a Deus e a todas as formas divinas existentes, que me concederam saúde física e mental para poder prosseguir esse mestrado, em um momento atípico e pandêmico.

## **Frase**

*“...nenhum rio morre de repente, a bala que mata o rio é descaso, lixo e gente. Nenhum rio morre por acaso, a bala que mata o rio é gente lixo e descaso. Todo rio morre devagar se a gente deixar que lixo, cobiça e descaso matem o rio até secar.”*

*TT Catalão*

## Resumo

A Bacia Amazônica abriga a maior diversidade de peixes de água doce do mundo, com aproximadamente 3.000 espécies conhecidas. Entretanto, essa diversidade de espécies vem sendo ameaçada fortemente pela poluição, que tem alterado e impactado o ambiente aquático, particularmente em torno dos centros urbanos. Uma forma muito conhecida de impacto humano, e que constitui uma ameaça à biota aquática, é a poluição por objetos plásticos. Os plásticos fazem parte do cotidiano dos seres humanos, sendo utilizados tanto na fabricação de utensílios domésticos como na indústria pesada. Devido ao seu descarte incorreto acabam alcançando os corpos d'água com facilidade e em grande quantidade. No ambiente aquático, os plásticos sofrem influência das intempéries, fragmentando-se em pequenas partículas conhecidas como microplásticos. Em geral, os ambientes de água doce têm recebido menos atenção em relação à poluição por microplásticos do que o ambiente marinho. Os microplásticos estão disponíveis para ingestão por uma ampla gama de organismos no ambiente aquático, podendo causar graves danos morfológicos e fisiológicos como úlceras, obstrução do trato gastrointestinal, falsa sensação de saciedade, perda da capacidade de alimentação, comprometimento e incapacidade de evitar predadores até indução de estresse oxidativo. Considerando os feitos nocivos dos microplásticos, o objetivo desse estudo foi identificar a ingestão de microplásticos por espécies de peixes com diferentes hábitos alimentares, coletadas em duas localidades próximas a cidade de Manaus e, posteriormente, verificar os efeitos da ingestão de microplásticos sobre a histologia e fisiologia intestinal do tambaqui *Colossoma macropomum* em condições laboratoriais. Os resultados indicam uma evidente acessibilidade das espécies aqui estudadas de peixes amazônicas aos microplásticos, representando cerca de 61,3% dos indivíduos analisados ingerindo microplásticos. Nossos resultados apontam ainda que a ingestão de microplásticos é similar para todos os hábitos alimentares, independente dos parâmetros biométricos apresentados e a localidade em que esses indivíduos foram capturados. A morfologia e a fisiologia do intestino foram investigadas em indivíduos de *Colossoma macropomum* sob exposição aguda de microplásticos (24h), tendo sido evidenciados apenas danos reversíveis na morfologia intestinal. Quanto a fisiologia, constatamos que a exposição de até 24h, não foi capaz de induzir estresse oxidativo no tecido. Além disso, mais estudos devem acompanhar organismos de áreas tidas como preservadas e a exposição subcrônica e crônica aos microplásticos para avaliar os efeitos morfofisiológicos a longo prazo.

**Palavras- chave:** poluição plástica, peixes amazônicos, água doce, microplástico

## Abstract

The Amazon Basin is home to the world's largest freshwater fish diversity, with approximately 3.000 species known to occur. However, this diversity of species has been strongly threatened by pollution, which has altered and impacted the aquatic environment, particularly around urban centers. A well-known form of human impact, and a threat to aquatic biota, is pollution by plastics. Plastics are part of the daily lives of human beings, being used both in the manufacture of household items and in heavy industry. Due to their incorrect disposal, they end up reaching the water bodies easily and in large quantities. In the aquatic environment, plastics are influenced by the weather, fragmenting into small particles known as microplastics. In general, freshwater environments have received less attention in relation to microplastic pollution than the marine environment. Microplastics are available for ingestion by a wide range of organisms in the aquatic environment and can cause severe morphological and physiological damage such as ulcers, obstruction of the gastrointestinal tract, false feeling of satiety, loss of feeding capacity, impairment and inability to avoid predators until induction of oxidative stress. Considering the harmful effects of microplastics, the aim of this study was to identify the ingestion of microplastics by fish species with different feeding habits, collected in two locations near the city of Manaus and, subsequently, to verify the effects of microplastics intake on the histology and intestinal physiology of tambaqui *Colossoma macropomum* under laboratory conditions. The results indicate an evident accessibility of the species to microplastics, representing about 61.3% of the individuals analyzed ingesting microplastics. Our results also show that the ingestion of microplastics is similar for all feeding habits, regardless of the biometric parameters presented and the location in which these individuals were captured. The morphology and physiology of the intestine of *Colossoma macropomum* under acute exposure of microplastics (24h), and only reversible damage in intestinal morphology was evidenced. As for physiology, we found that exposure up to 24 hours did not cause oxidative stress in the tissue. In addition, more studies should monitor organisms from areas considered preserved and more studies with subchronic and chronic exposure to microplastics should evaluate the long-term morphophysiological effects.

Keywords: plastic pollution, Amazonian fish, freshwater, microplastic.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	12
<b>OBJETIVOS</b> .....	17
<b>Geral</b> .....	17
<b>Específicos</b> .....	17
<b>HIPÓTESES</b> .....	17
<b>CAPÍTULO I</b> .....	19
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
<b>RESULTADOS</b> .....	31
<b>DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>CONCLUSÃO</b> .....	40
<b>LEGENDA DE TABELA</b> .....	41
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42
<b>CAPÍTULO II</b> .....	48
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	51
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	54
<b>RESULTADOS</b> .....	61
<b>DISCUSSÃO</b> .....	65
<b>CONCLUSÃO</b> .....	69
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	69
<b>LEGENDA DE TABELAS</b> .....	71
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74

## INTRODUÇÃO GERAL

A ictiofauna da América do Sul compreende cerca de 4.000 espécies marinhas e mais de 5.000 espécies de água doce. Essa alta diversidade de peixes de água doce deve-se, principalmente, à presença de diversos sistemas hidrográficos, com consideráveis diferenças ictiofaunísticas (Reis et al. 2016). A bacia amazônica abriga a maior diversidade de peixes de água doce do mundo, com aproximadamente 3.000 espécies conhecidas, distribuídas por quase todos os grupos de peixes neotropicais (revisto por (Val 2019)). Isso não se deve apenas à grande área da bacia amazônica com aproximadamente sete milhões de km<sup>2</sup>, que abrange desde as nascentes do Rio Amazonas no Peru até a sua foz no Oceano Atlântico (MMA 2006), mas também a fatores como a heterogeneidade ambiental, complexidade de habitats, história geológica e, claro, biodiversidade (revisto por (Val 2019)). Contudo, o conhecimento sobre a diversidade desta fauna é restrito, e as dezenas de espécies de peixes descritas somente na última década no Brasil, evidenciam que a riqueza ictiofaunística é ainda maior (Reis et al. 2016). Preocupa, ainda, que essa alta diversidade de espécies vem sendo ameaçada em função de alterações ambientais, tais como desmatamento e queimadas, que têm alterado e impactado drasticamente o ambiente aquático (Society 2014). Uma forma bem conhecida de impacto humano e que constitui uma grande ameaça à biota aquática, é a poluição por itens plásticos (Derraik 2002).

A palavra plástico tem origem do grego *plastikos* que significa apto à moldagem, material este constituído por polímeros, classificados como orgânicos ou sintéticos, e que se apresentam como moléculas grandes formadas através da combinação de monômeros. Sólido em sua versão final que, na fase de polimerização, transforma-se em fluido, adequa-se à moldagem por meio das ações do calor ou da pressão (Piatti and Rodrigues 2005). Desenvolvido no século XX, o plástico, tem sido cada vez mais utilizado na fabricação dos mais variados objetos (Piatti and Rodrigues 2005). Os materiais plásticos são majoritariamente utilizados na fabricação de peças para automóveis, equipamentos eletrônicos, móveis, calçados, construção civil, embalagens de alimentos, entre outros. Isso se deve aos mais variados tipos de plásticos conhecidos como o poliestireno (PS), polipropileno (PP), polietileno de baixa densidade (PEBD), polietileno de alta densidade (PEAD), policloreto de vinila (PVC) e polietileno de tereftalato (PET) (Andrady 2011).

Um das características que fazem do plástico um material de uso cada vez mais frequente é a sua durabilidade, sendo necessários alguns séculos para serem totalmente

degradados no ambiente. No entanto, essa característica vantajosa promove, ao mesmo tempo, um sério problema ecológico, pois os itens plásticos são frequentemente descartados de forma incorreta após sua utilização e, conseqüentemente, acumulam-se ao longo do tempo na natureza (Piatti and Rodrigues 2005). Os materiais plásticos descartados de forma incorreta alcançam os corpos d'água, onde ficam expostos às intempéries e, quando expostos à radiação solar, às propriedades oxidativas, à ação da atmosfera ou à água, tornam-se quebradiços e fragmentam-se em partículas menores (Browne et al. 2013, Canesi et al. 2015) (Figura 1).

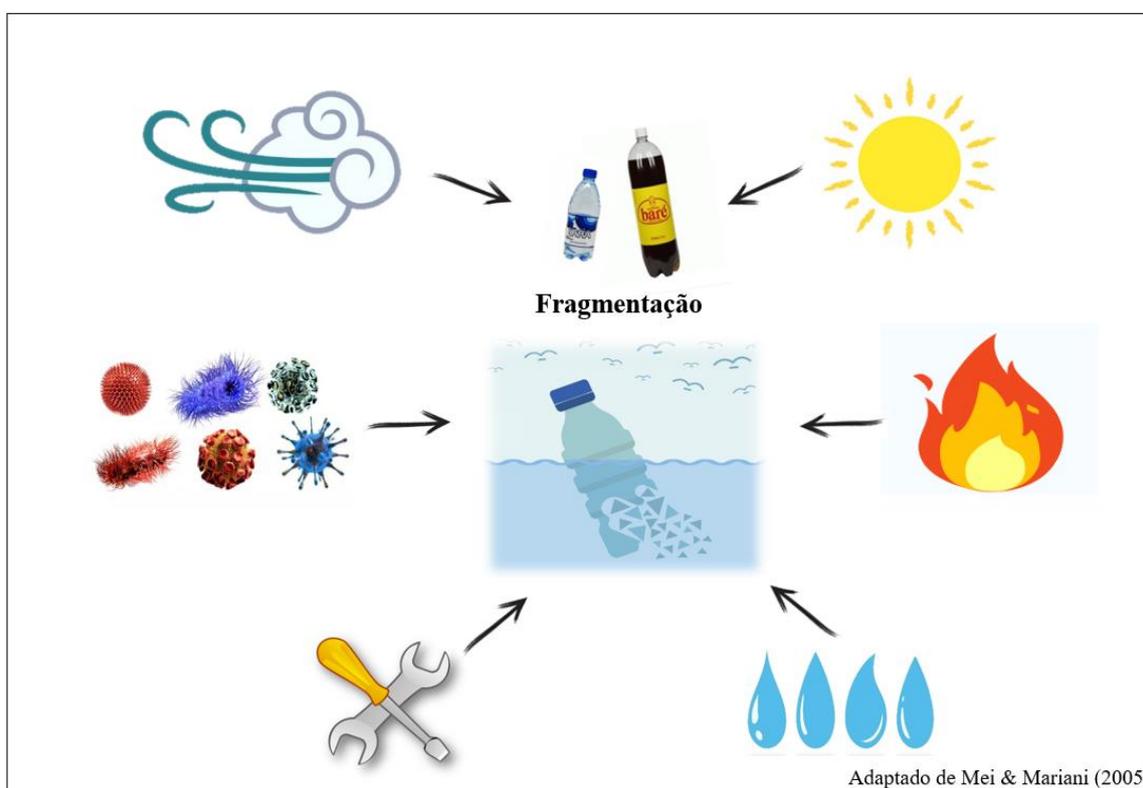


Figura 1. Esquema exemplificando o processo de fragmentação dos macroplásticos (ex. garrafas PET) em microplásticos, e os fatores que contribuem para o processo de fragmentação, como raios UV, temperatura, propriedades físicas e mecânicas da água, ação de microrganismos, massas de ar.

A poluição por microplásticos vem sendo, recentemente, reconhecida, atingindo diferentes ambientes como solos (He et al. 2018), sendo absorvida por frutas e legumes (Oliveri Conti et al. 2020), a água de torneiras, a cerveja e o sal marinho (Kosuth et al. 2018). Mesmo o ponto mais alto do mundo, o monte Everest, não escapou da presença dos microplásticos (Napper et al. 2020). As geleiras dos Andes (Cabrera et al. 2022) são reconhecidas como grandes depósitos de microplástico, assim como o ar atmosférico que

atua como transportador dessas minúsculas partículas (Zhang et al. 2020b). Mesmo antes de nascermos estamos em contato com essas partículas, que foram encontradas na placenta humana (Ragusa et al. 2021). São encontradas, ainda, nas mamadeiras com leite, aquecidas para a alimentação de bebês (Li et al. 2020), em ambientes aquáticos sob intensa pressão antropogênica (Free et al. 2014), além da biota (Andrade et al., 2019; Pegado et al., 2018) que deles depende, e está, assim, ameaçada pelos microplásticos. Hoje pode se dizer que nenhum lugar ou ser vivo existente está livre dos microplásticos.

Em 2004, o termo microplástico foi empregado pela primeira vez para definir as partículas de plásticos de tamanho reduzido (Law and Thompson 2014). De acordo com a Administração Nacional Oceânica e Atmosférica dos Estados Unidos da América, microplásticos são definidos como partículas com menos de 5 mm de diâmetro, (NOAA, 2015), compreendendo um conjunto heterogêneo de partículas que variam em tamanho, forma, cor, composição química, densidade e outras características (Galgani et al. 2015). Os microplásticos presentes no ambiente são classificados em dois tipos, de acordo com a sua origem: microplástico primário e microplástico secundário. A fonte primária de microplásticos inclui polietileno (PE), polipropileno (PP) e poliestireno (PS) e resultam do descarte doméstico de resíduos de produtos de limpeza, cosméticos e medicamentos (Fendall and Sewell 2009) e pode, ainda, resultar de rejeitos industriais (Lusher 2015). A proporção de microplásticos primários no meio ambiente provavelmente é pequena em comparação aos microplásticos secundários (Eriksen et al. 2013). A fonte secundária envolve a fragmentação de plásticos no ambiente aquático, que reduz o peso molecular desses polímeros (Andrady 2011). Esse material atinge o ambiente aquático por meio do descarte inadequado em processos industriais, de seu descarte pela população ou, também, por meio da perda acidental durante o seu transporte (Ogata et al. 2009).

A presença de pequenas partículas plásticas foi relatada pela primeira vez em 1970, no ambiente marinho (Carpenter and Smith 1972). Sua presença em amostras de águas superficiais, praias, sedimento e interagindo com a biota (Barnes et al. 2009b) tem sido relatada em várias localidades ao redor do mundo. Até mesmo ambientes isolados estão sob uma ameaça igualmente preocupante de poluição por microplásticos (Van Cauwenberghe et al. 2015). Os microplásticos vem se acumulando no ambiente marinho há décadas, sendo relatados no fundo do mar e em toda a coluna d'água (Van Cauwenberghe et al. 2013). Há evidências de que a poluição por microplásticos é uma ameaça à biodiversidade marinha, associada com outros fatores como a pesca excessiva,

e as mudanças climáticas (Derraik 2002). Entretanto, os ambientes de água doce têm recebido menos atenção em relação à poluição por microplásticos do que o ambiente marinho (Barletta et al. 2019). Mais recentemente, pesquisas têm relatado a presença de partículas plásticas contaminantes em ecossistemas de água doce e no ar atmosférico (Eerkes-Medrano et al. 2015, Horton et al. 2018).

Nos últimos anos, foram identificados microplásticos em diversos sistemas de água doce na América do Norte (Moore et al. 2011), na Europa (Faure et al. 2012) e na Ásia (Free et al. 2014). Ainda não se sabe como os microplásticos podem ser transferidos dos ecossistemas de água doce para os terrestres e pouco se sabe, como eles podem afetar a saúde humana. Isso é preocupante devido à alta dependência de água, pelas populações humanas, demandando seu uso diário para a realização de tarefas básicas como beber água e higienização das mãos e do corpo, assim como na produção de alimentos, sendo o peixe um exemplo.

Na Amazônia, onde a população apresenta um consumo per capita de aproximadamente 369 g/dia de pescado, sendo maior média de consumos em relação a outras regiões do Brasil, esse aspecto assume contornos relevantes (Eerkes-Medrano et al. 2015). Os primeiros registros da presença de microplásticos em águas da Amazônia evidenciaram a ingestão de plástico por peixes carnívoros do Rio Amazonas (Pegado et al. 2018b). O exame do conteúdo estomacal de 172 espécimes de 16 espécies de serrasalmídeos da bacia do baixo Rio Xingu revelou o consumo de partículas plásticas por peixes herbívoros, onívoros e carnívoros (Andrade et al. 2019).

Devido à sua natureza leve, os microplásticos podem ser transportados pelo ar para longe de sua fonte original (Singh and Sharma 2008). Assim, os microplásticos estão disponíveis para ingestão por uma ampla gama de organismos. Há indícios de que podem ser propagados para todos os níveis tróficos da cadeia alimentar (Farrell and Nelson 2013, Setälä et al. 2014), ocorrendo desde os grupos mais basais como crustáceos e bivalves (Costa and Barletta 2015), até predadores (Eriksson and Burton 2003). A ingestão de microplásticos com tamanhos entre 1 e 5 mm pela biota aquática pode comprometer a nutrição e os mecanismos de digestão (Codina-García et al. 2013). A ingestão de plásticos com tamanhos maiores pode causar graves lesões como: úlceras, obstrução do trato digestivo, falsa sensação de saciedade, perda de capacidade de alimentação, comprometimento e incapacidade de evitar predadores, até a morte (Gall and Thompson 2015).

Watts et al. (2016) detectaram a retenção de microplásticos nas lamelas branquiais do crustáceo *Carcinus maenas*, quando expostos a diferentes concentrações do contaminante. A presença de microplásticos foi observada em diferentes tecidos, como vesícula biliar, fígado, sangue e trato gastrointestinal, de *Sebastes schgelli*, espécie marinha de peixe (Abbasi et al. 2018). Qiao et al. (2019) observaram alterações morfológicas como inflamação, afinamento da parede intestinal e danos nas microvilosidades do trato gastrointestinal de zebrafish, expostos a microplásticos. (Lei et al. 2018) verificaram, em condições de laboratório, os efeitos de diferentes tipos de microplásticos em *Danio rerio*. As análises histológicas do intestino dessa espécie demonstraram que a exposição aos microplásticos de PP e PVC com aproximadamente 70 µm causaram ruptura de vilosidades e de enterócitos intestinais. Sendo assim, há necessidade de mais descrições da histologia do trato gastrointestinal, dadas as interferências dos microplásticos na fisiologia dos organismos (Santos et al. 2008). Alguns estudos têm indicado, também, um aumento na indução do estresse oxidativo provocado pela exposição aos microplásticos em células dos órgãos que compõem o TGI (Jeong et al. 2016, 2017, Barboza et al. 2018, Qiao et al. 2019a).

Tendo em vista que a região Amazônica se destaca na pesca e no alto consumo de peixes pela população, o desenvolvimento do presente projeto possibilitará um primeiro diagnóstico de como os microplásticos estão interagindo com as espécies de peixes da Amazônia. Com isso, aumenta-se o nível de compreensão nessa área, essencial para o desenvolvimento de ações e tomada de providências por autoridades governamentais, bem como a conscientização dos cidadãos em geral, contribuindo com a mudança de comportamento, reduzindo a quantidade de plástico consumida, o que refletirá na conservação da biodiversidade e no desenvolvimento de atividades socioeconômicas na região. A problemática da gestão de itens plásticos merece atenção multidisciplinar de conservacionistas, cientistas e formuladores de políticas públicas. Sendo assim, estudar a ingestão e os efeitos causados pelos microplásticos na biota aquática da região amazônica, tem importância ecológica e socioeconômica. Também, por meio de estudos como este, será possível saber se os microplásticos estão sendo ingeridos também pelos seres humanos por meio do consumo da carne de peixe contaminada.

## **OBJETIVOS**

### **Geral**

Identificar a ingestão e os efeitos morfológicos e fisiológicos causados pelos microplásticos no trato gastrointestinal de peixes com diferentes hábitos alimentares da Amazônia Central.

### **Específicos**

#### **Capítulo I**

- a) Qualificar e quantificar os itens microplásticos encontrados no trato gastrointestinal de peixes com diferentes hábitos alimentares;
- b) Identificar se há relação entre a ingestão de microplásticos e os hábitos alimentares apresentados pelas espécies analisadas;
- c) Identificar se os parâmetros biométricos dos indivíduos estudados têm relação com os microplásticos ingeridos.

#### **Capítulo II**

- d) Observar a presença de possíveis danos e/ou efeitos na morfologia do tecido intestinal de peixes expostos à ingestão de microplásticos;
- e) Observar se a presença de microplásticos no trato gastrointestinal provoca aumento da atividade das enzimas antioxidantes.

## **HIPÓTESES**

### **Capítulo I**

**H<sub>1</sub>:** A ingestão de microplásticos difere de acordo com o hábito alimentar dos peixes analisados;

**H<sub>2</sub>:** Haverá relação entre os parâmetros biométricos dos peixes com a ingestão de microplásticos.

### **Capítulo II**

**H<sub>3</sub>:** Haverá alterações morfológicas no trato gastrointestinal dos indivíduos analisados em decorrência da ingestão de microplásticos;

**H<sub>4</sub>:** Haverá aumento na atividade de enzimas antioxidantes (SOD e CAT), além de LPO.

## CAPÍTULO I

Ingestão de microplásticos por espécies de peixes amazônicas com diferentes hábitos alimentares. Formatação de acordo com a revista *Acta Amazonica*

Maria Tereza VASCONCELOS-SOUZA<sup>1</sup>, Igor Araújo PINTO<sup>2</sup>, Lizandro MANZATO<sup>2</sup>; Grazyelle Sebreński da SILVA<sup>3</sup>, Adalberto Luis VAL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Síntese e Caracterização de Nanomateriais (LSCN/IFAM)

<sup>3</sup>Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil

## Resumo

Os ecossistemas de água doce assim como os marinhos, veem sendo cada vez mais ameaçados pelos microplásticos. Definidos como quaisquer itens plásticos com até 5 mm, os microplásticos apresentam uma variedade de cores, formas e tamanhos. Sabendo que a diversidade de peixes de água doce da bacia Amazônica vem sendo ameaçada pelo descarte incorreto de plástico e, conseqüentemente, dos microplásticos, o objetivo desse estudo foi identificar a presença dos microplásticos no interior do trato gastrointestinal de espécies de peixes amazônicas com diferentes hábitos alimentares. Os indivíduos coletados foram transportados ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM), no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), e analisados em estereomicroscópio. Em seguida, os microplásticos foram extraídos e a matéria orgânica foi digerida em NaOH 10M, seguidos por filtração e identificação através da técnica *Fourier Transformed by Infrared* - FTIR. Observamos a presença de microplásticos no interior do trato gastrointestinal de diferentes espécies de peixe coletadas em duas localidades, Lago Janauacá e Arquipélago de Anavilhanas. Um total de 183 partículas de microplásticos foram encontradas no interior do trato gastrointestinal de 13 espécies analisadas. No geral, os microplásticos apresentaram formato de fibras e fios, nas cores preto, azul, vermelho e verde. Os hábitos alimentares, assim como as localidades, não apresentaram efeitos na ingestão de microplásticos. Nossos resultados apontam que peixes que habitam ambientes preservados, independente dos hábitos alimentares que apresentam, estão expostos e ingerindo microplásticos, tornando-se uma ameaça ainda pouco conhecida. Sem dúvida, a presença de microplásticos nesses ambientes pode trazer riscos à biodiversidade da região, à segurança alimentar humana, à economia e ao turismo.

**Palavras-chave:** Poluição aquática, Amazônia, microplásticos, polímeros plásticos, peixes de água doce.

## Abstract

Freshwater ecosystems, as well as marine ecosystems, are increasingly threatened by microplastics. Defined as any plastic items up to 5 mm, microplastics come in a variety of colors, shapes and sizes. Knowing that the diversity of freshwater fish in the Amazon basin has been threatened by the incorrect disposal of plastic and, consequently, microplastics. The objective of this study was to identify the presence of microplastics within the gastrointestinal tract of Amazonian fish species with different eating habits. The collected individuals were transported to the Laboratory of Ecophysiology and Molecular Evolution (LEEM), at the National Institute of Amazonian Research (INPA), and analyzed in stereomicroscope. Then, the microplastics were extracted and the organic matter was digested in NaOH 10M, followed by filtration and identification using the Fourier Transformed by Infrared - FTIR technique. We observed the presence of microplastics inside the gastrointestinal tract of different species of fish collected in two locations, Lake Janauacá and Anavilhanas Archipelago. A total of 183 microplastic particles were found inside the gastrointestinal tract of 13 species analyzed. In general, the microplastics presented fibers and yarns in black, blue, red and green. Feeding habits, as well as localities, showed no effects on microplastics intake. Our results indicate that fish that inhabit preserved environments, regardless of their eating habits, are exposed and ingesting microplastics, becoming a threat unknown. Undoubtedly, the presence of microplastics in these environments can pose risks to the region's biodiversity, human food security, economy and tourism.

**Keywords:** Aquatic pollution, Amazon, microplastics, plastic polymers, freshwater fish.

## INTRODUÇÃO

A presença de itens plásticos nos ambientes aquáticos tem se tornado uma questão preocupante, afetando mares e rios e, conseqüentemente, prejudicando os ambientes naturais e toda a sociedade (PlasticsEurope 2018). Os itens plásticos descartados de forma incorreta alcançam os corpos d'água, ficando expostos às intempéries como a radiação solar, às propriedades oxidativas e à ação dos ventos, entre outros. Dessa forma tornam-se quebradiços e fragmentam-se em pedaços menores, até atingir micrômetros, quando passam a ser denominados como “microplásticos” ou nanômetros, sendo denominados "nanoplásticos" (Browne et al. 2013, Canesi et al. 2015).

Os microplásticos são definidos como partículas com até 5 mm, de acordo com a Administração Nacional Oceânica e Atmosférica dos Estados Unidos da América (NOAA, 2015) e compreendem um conjunto muito heterogêneo de partículas que variam em tamanho, forma, cor, composição química, densidade e outras características (Galgani et al. 2015). Os microplásticos presentes no meio ambiente são classificados em dois tipos, de acordo com a sua origem: microplástico primário e microplástico secundário. A fonte primária de microplásticos resulta do descarte doméstico de resíduos de produtos de limpeza, cosméticos e medicamentos (Fendall and Sewell 2009). Rejeitos industriais também são considerados microplásticos primários (Lusher 2015). A fonte secundária envolve a fragmentação de plásticos no ambiente aquático, que têm seu peso molecular reduzido (Andrady 2011). Por meio do descarte inadequado em processos industriais, ou pelo descarte doméstico ou, ainda, decorrente da perda acidental durante o seu transporte, os microplásticos chegam até o ambiente aquático (Ogata et al. 2009).

A presença de microplásticos em amostras de águas superficiais, praias, sedimentos e interagindo com a biota (Barnes et al. 2009a) tem sido relatada em várias localidades ao redor do mundo. Devido à sua natureza leve, os microplásticos podem ser transportados por massas de ar para longe de sua fonte original (Singh and Sharma 2008). Até mesmo ambientes isolados estão sob uma ameaça igualmente preocupante de poluição por microplásticos (Vandermeersch et al. 2015). Os microplásticos vêm se acumulando no ambiente marinho há décadas e foram relatados no fundo do mar e em toda a coluna d'água (Van Cauwenberghe et al. 2013). Entretanto, os ambientes de água doce têm recebido menos atenção em relação à poluição por microplásticos do que o ambiente marinho (Costa and Barletta 2015).

Microplásticos na Amazônia vêm se tornando paulatinamente estudados, sendo encontrados em rios, sedimentos e estuário (Pegado et al. 2018a, Gerolin et al. 2020). Com isso, acabam disponíveis para interação com a biota aquática, interação essa que tem se demonstrado evidente (Pegado et al. 2018a, Andrade et al. 2019). Os microplásticos vem sendo considerados poluentes emergentes de grande preocupação para o ambiente aquático dada a sua interação com a biota (Cole et al. 2011). Alguns trabalhos vêm demonstrando os impactos que esses microplásticos causam em organismos de água doce, como no caso da espécie *Symphysodon aequifasciatus* (acará-disco), que exposta a microplásticos, apresentaram déficits em seu desempenhos predatório e capacidade digestiva (Wen et al. 2018a), incluindo indução de estresse oxidativo (Wen et al. 2018b). Além dos microplásticos *per se*, a biota aquática amazônica ainda precisa lidar diariamente com inúmeros compostos despejados no ambiente como cafeína, cocaína e metabólitos da nicotina, que aderem aos microplásticos (Fabregat-Safont et al. 2021).

Uma das vias de interação característica dos microplásticos com a biota aquática é a ingestão. Uma vez disponíveis para ingestão, os microplásticos podem ser propagados para todos os níveis tróficos da cadeia alimentar (Farrell and Nelson 2013, Setälä et al. 2014), ocorrendo desde os grupos mais basais como crustáceos e bivalves (Costa and Barletta 2015) até predadores (Eriksson and Burton 2003). A ingestão de microplásticos com tamanhos entre 1 e 5 mm pela biota aquática pode comprometer a nutrição e a digestão desses indivíduos (Codina-García et al. 2013). Conhecer os impactos dos microplásticos causados no trato gastrointestinal de espécies de peixe da região amazônica, com diferentes hábitos alimentares, torna-se de grande importância a fim de criarmos alternativas para reduzir seus efeitos, contribuindo com a conservação das espécies, bem como, com a segurança alimentar e a economia regional.

Nos últimos anos, a existência de microplásticos e seus potenciais impactos sobre a vida selvagem e sobre a saúde humana receberam maior atenção pública e científica (Cole and Galloway 2015). Apesar de várias políticas internacionais estarem em vigor há algum tempo para gerenciar a entrada de lixo plástico no ambiente aquático, suas deficiências as tornam incertas. O presente estudo tem como objetivo identificar a presença e ingestão de microplásticos por peixes de duas áreas preservadas da região amazônica, região do país que apresenta a população com o maior consumo de proteína proveniente de peixe em comparação com outros estados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área de Estudo

Os peixes foram coletados e amostrados durante os meses de outubro e novembro de 2019, em duas localidades: Lago Janauacá (Rio Solimões) e Arquipélago de Anavilhanas (Rio Negro) (Figura 2).

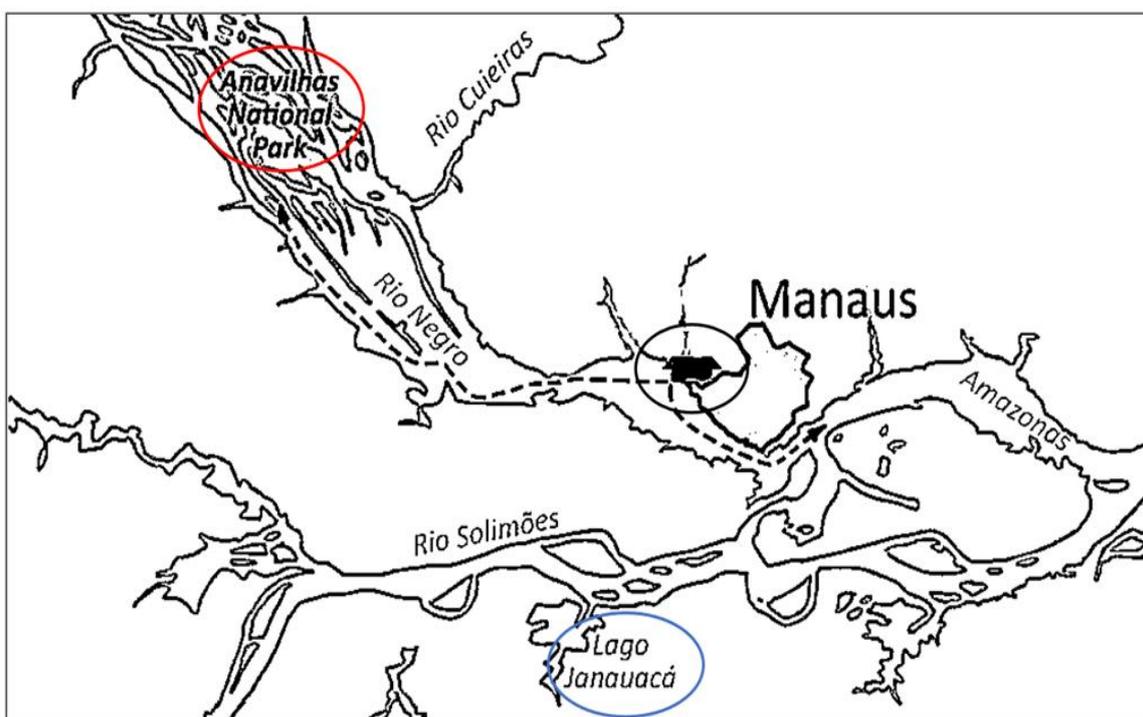


Figura 2. Mapa das áreas que foram coletados os indivíduos estudados. Estão destacados em vermelho o Parque Nacional de Anavilhanas, em azul o Lago Janauacá e em preto o Laboratório de Ecotoxicologia e Evolução molecular – LEEM, localizado em Manaus, para onde os indivíduos foram transportados para análise

O Lago Janauacá ( $3^{\circ}23'43''$  S  $60^{\circ}18'33''$  W), é um lago de várzea de águas brancas, afluente do rio Solimões, localizado à 40 km de Manaus (AM), entre os municípios de Careiro Castanho e Manaquiri (Batistella et al. 2005). O lago é influenciado pela população ribeirinha que o utiliza como residência e subsistência, descartando incorretamente os resíduos domésticos diretamente na água. O Arquipélago de Anavilhanas ( $2^{\circ}40'15''$  S  $60^{\circ}47'27''$  W), está localizado dentro de uma unidade de conservação (Parque Nacional de Anavilhanas), na cidade de Novo Airão, banhado pelo rio Negro, de águas pretas. O parque tem como principal atrativo o turismo e, por essa razão, tem em suas proximidades grandes hotéis e Lodges de selva, que fornecem aos

turistas passeios de imersão na floresta. A atividade turística, de certa forma, acaba contribuindo com a poluição plástica daquela região por meio dos resíduos sólidos erroneamente ou indiretamente descartados.

#### Amostragem das espécies

A captura das espécies foi realizada com o auxílio de redes de espera (20:20, 30:30, 25:30 mm entre nós), distribuídas de forma aleatória em ambas as localidades: Lago Janauacá e Arquipélago de Anavilhanas. O tempo de permanência das malhadeiras foi de aproximadamente 10 horas por dia com vistorias realizadas a cada 2 horas. No momento das coletas os peixes foram anestesiados e, posteriormente, eutanasiados por secção medular (Pegado et al. 2018a). Em seguida, com o auxílio de um paquímetro (precisão de 0,01 cm), o comprimento padrão (em milímetros) foi obtido, juntamente com o peso total (em gramas), com o auxílio de uma balança digital (Marte BL 3200h; precisão 0,01g). As amostras foram congeladas e armazenadas em álcool 70% por até duas semanas a -20 °C no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular – LEEM, antes do processamento de separação e identificação. As espécies de peixes foram selecionadas quanto à sua ocorrência e abundância nos locais de coleta e importância comercial. Preferencialmente, foram selecionados indivíduos com tamanhos semelhantes e hábitos alimentares distintos para verificação de possível relação da ingestão de microplásticos com o hábito alimentar.

#### Processamento das amostras

Para a remoção do trato gastrointestinal (TGI) dos peixes, foi realizada uma incisão longitudinal na cavidade celomática (Figura 3.A), sendo o estômago e o intestino removidos e em seguida observados (Figura 3. B, D) quanto à morfologia *in situ* com o auxílio de um estereomicroscópio (ZEISS) (Figura 3.C, D). O TGI foi removido da cavidade celomática (Figura 3.B) (Lusher et al. 2013) e fixado em álcool 70% em recipientes de vidro. O estômago e o intestino foram cortados longitudinalmente e lavados em uma placa de Petri com álcool 70%. As partículas plásticas foram visualmente detectadas e, em seguida, separadas e identificadas de acordo com o indivíduo e origem. As possíveis partículas plásticas encontradas foram separadas e mensuradas com o software ImageJ (mm) e fotografadas segundo (Pegado et al. 2018b).

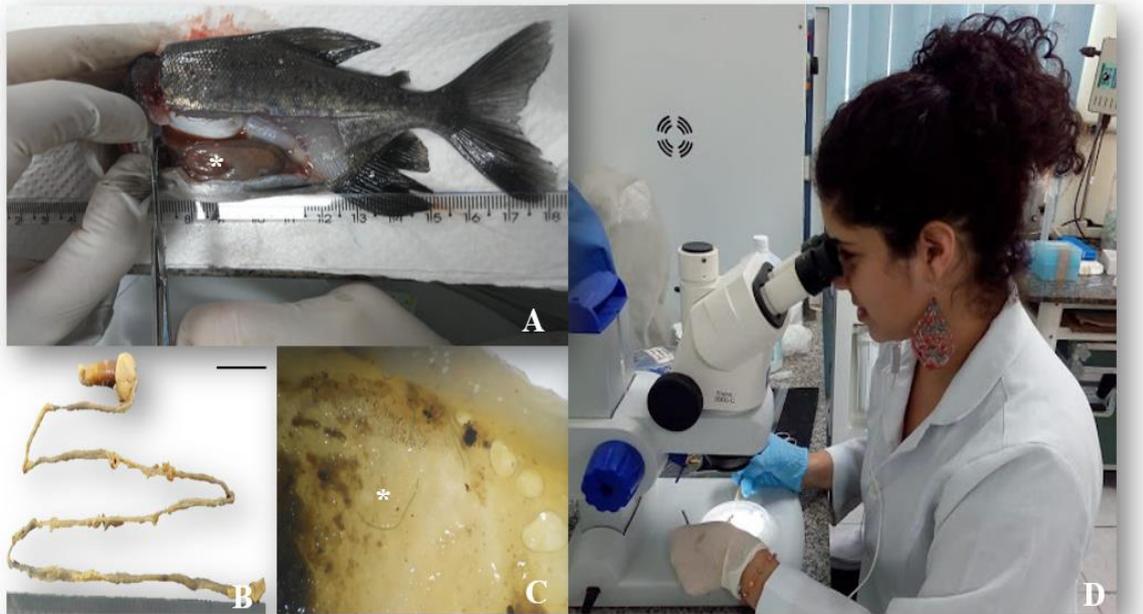


Figura 3. Processamento das amostras: **A)** incisão longitudinal na cavidade celomática do indivíduo para retirada do trato gastrointestinal (TGI); **B)** trato gastrointestinal retirado da cavidade celomática da espécie *Semaprochilodus taeniurus* para iniciar a observação em estereomicroscópio; **C)** amostra de microplástico na cor azul observado no interior do trato gastrointestinal; **D)** observação em estereomicroscópio do interior do trato gastrointestinal em busca de possíveis partículas de microplásticos.

### Extração dos Microplásticos

Para a extração dos microplásticos adaptamos o protocolo de Cole et al. (2014), que verificaram maior eficácia na digestão otimizada (91,3%), adicionando 10M de NaOH, com agitação por 40s, para facilitar a remoção de todo o material biológico. O conteúdo do trato gastrointestinal foi digerido sob a ação de 40 ml de NaOH para cada 0,2g de tecido seco, mantidos durante 24 h a 60 °C em estufa em frascos de vidro com tampas de vidro (Figura 4. A, B).

Para evitar a contaminação de resíduos plásticos possivelmente persistentes nas vidrarias, cada recipiente de vidro foi descontaminado antes de sua utilização, sendo lavados três vezes com água ultrapura (Milliq). O percentual de frequência de ocorrência de microplásticos no interior do TGI foi calculado pela fórmula:  $FO\% = (Ni/N) \times 100$ , na qual, **FO%** = frequência de ocorrência de partículas plásticas; **Ni** = número de tratos

gastrointestinais que contém partículas plásticas; N = número total de tratos gastrointestinais examinados.

#### Filtração em malha de aço

Após 24 h de digestão (Figura 4.A), os compostos orgânicos foram dissolvidos por completo, restando apenas as partículas plásticas. As amostras após-digestão foram pesadas e filtradas por uma malha de aço inoxidável com porosidade de 0,30 mm. A malha de aço (1x1 metro) precisou ser cortada em pequenos círculos/filtros para facilitar o manuseio no processo de filtração. Esses pequenos círculos/filtros foram previamente pesados e em seguida, pesados novamente agora contendo as amostras retidas. Para facilitar e agilizar o processo de filtração adaptamos uma bomba à vácuo manual, contendo um Kitassato de 2L (Figura 4. C), juntamente com o filtro de aço na sua abertura superior, conectado a uma mangueira de sucção. Depois de filtradas, as amostras retidas permaneceram por 1 h secando em estufa (60 °C) (Figura 4. B) e em seguida, vedadas e reservadas em papel alumínio para posteriores observações em estereomicroscópio (ZEISS) (Figura 4. D, E) e qualificação em FTIR.

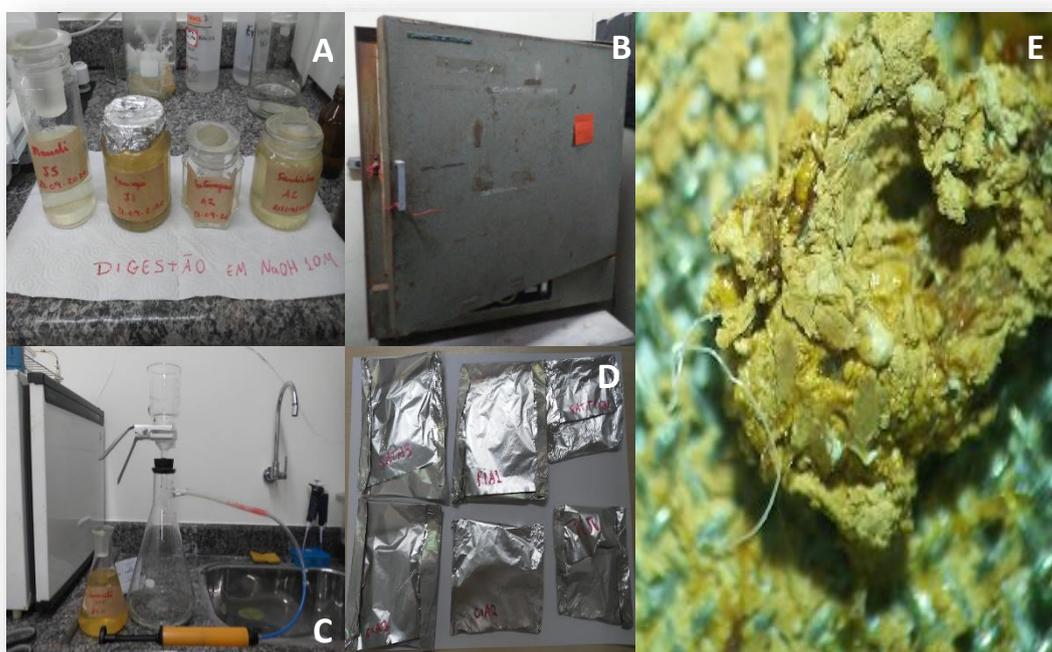


Figura 4. Extração das partículas de microplásticos. **A)** amostras armazenadas em vidros no processo de digestão na solução NaOH 10M; **B)** amostras em solução de NaOH 10M em 60 °C em estufa, durante 24h; **C)** após 24h em estufa, as amostras foram submetidas a uma filtração em malha de aço inoxidável; **D)** após a filtração e secagem, as amostras foram separadas e armazenadas em papel alumínio para posterior observação em estereomicroscópio. **E)** microplástico após a digestão do trato gastrointestinal.

## Identificação dos microplásticos por *Infrared Transformed by Fourier* (FTIR)

A técnica de FTIR é uma expressão digital para caracterizar os polímeros que compõem cada tipo de microplástico, podendo assim fornecer evidências da presença de grupos funcionais presentes na estrutura de uma substância, utilizada na identificação de um composto ou composição química. O princípio da Espectroscopia no Infravermelho baseia-se no fato de que quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal de ATR) para um meio menos denso (amostra), ocorre a reflexão a qual será medida. Essa técnica é, na maioria das vezes, aplicada para a análise de superfície em polímeros do tipo filmes ou em pó (Amendola 2007). Ao interpretar a saída de FTIR, somente as leituras com níveis de confiança >75% foram aceitas. Apenas esses dados foram incluídos para a análise das medidas de FTIR para confirmar a identidade de cada microplástico encontrado durante a observação do conteúdo do TGI. Os espectros foram coletados na região em que a onda foi absorvida de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$  (centímetros recíprocos). O diamante cristal do ATR foi limpo com solução 70% álcool isopropílico, e uma leitura de fundo foi feita sempre antes de cada amostra. Cada amostra foi comprimida pelo diamante para garantir uma boa superfície de contato entre o ATR cristal e a amostra (Figura 5.B).

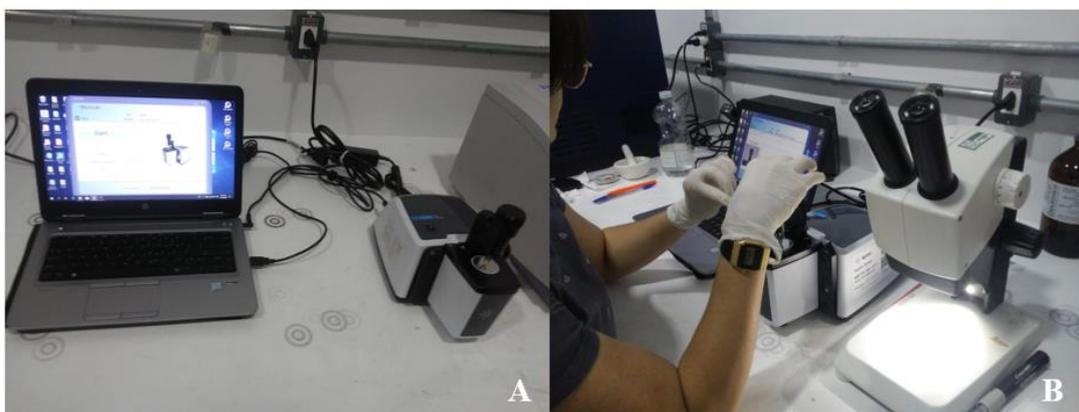


Figura 5. Análise utilizando a técnica de espectroscopia por *Fourier Transformed by Infrared* (FTIR) acoplado ao dispositivo de refletância total atenuada – ATR, utilizado para a identificação dos polímeros encontrados. **A)** Computador acoplado ao dispositivo ATR utilizando o método de FTIR para processamento, leitura e identificação dos polímeros encontrados. **B)** Leitura de uma amostra de microplástico sobre o cristal de ATR, observado com o auxílio de um estereomicroscópio *Leica*.

## Preparação do equipamento de FTIR para leitura

As amostras de microplásticos encontradas visualmente com o auxílio de estereomicroscópio (Figura 5. B), juntamente com as amostras filtradas após digestão, foram submetidas à identificação do polímero por um espectrômetro de infravermelho FT-IR com dispositivo de ATR (Reflectância total atenuada) (Figura 5. A) (fabricante Agilent), com espectros coletados na faixa de varredura de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ , disponibilizado pelo Laboratório de Síntese e Caracterização de Nanomateriais (LSCN), localizado no Instituto Federal do Amazonas (IFAM), Campus Distrito Industrial. As bandas de absorção que foram identificadas utilizando a altura dos picos nas amostras com similaridade de no mínimo 75% foram comparadas com as bandas de cada polímero reportados na literatura. Um cálculo é utilizado para determinação da porcentagem de similaridades de picos da amostra com a biblioteca, com valores indo de 0 a 1, quando maior a similaridade, mais próximo de 1 é o valor, baseando-se na equação de Cauchy-Schwarz (Mecozzi et al. 2016).

$$\text{similaridade} = \frac{\langle \text{amostra} . \text{referência} \rangle}{\|\text{amostra}\| . \|\text{referência}\|}$$

## Preparação das amostras

O preparo da amostra para a leitura no espectrômetro de infravermelho é uma etapa fundamental, evitando interpretações errôneas do número de ondas referente às amostras ou a outras substâncias orgânicas que absorvem no mesmo comprimento que pode incluir materiais orgânicos, biofilme ou resíduo da etapa de limpeza. Tal etapa foi apresentada por (Jung et al. 2018), que compararam os diferentes solventes utilizados para a limpeza do polímero, auxiliando na identificação de pequenos picos que passam a ser fundamentais na identificação de polímeros com picos muito próximos. Jung e colaboradores utilizaram-se de tais picos com menor banda de absorbância no infravermelho para distinção de polietileno de baixa e alta densidade, por exemplo. Quando a amostra é retirada do filtro após o tratamento com hidróxido de sódio (NaOH 10M), é feita uma lavagem rápida utilizando água ultra pura (Miliq), pois a amostra poderá ainda conter resquícios de material orgânico, formando um biofilme, o que descaracteriza as bandas reais de absorbância da amostra, havendo uma sobreposição de espectros de material orgânico com os do polímero.

## Utilização de padrão de Polietileno

Um lote de microplásticos de polietileno (PE) fornecido pelo grupo de pesquisas “Ecofisiologia e Ecotoxicologia de Organismos Aquáticos” da Universidade de Santa Cecília de São Paulo, foi utilizado como amostra padrão para identificação dos picos característicos para polietileno. As características do polietileno utilizado como padrão, são identificadas na figura de FTIR abaixo (Figura 6.). Por meio das absorvâncias nos números de ondas:  $2915\text{ cm}^{-1}$ ,  $2845\text{ cm}^{-1}$ ,  $1467\text{ cm}^{-1}$ ,  $1462\text{ cm}^{-1}$ ,  $730\text{ cm}^{-1}$ , e  $717\text{ cm}^{-1}$ , associados a alongamentos C-H, C-H, dobra  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2$ , balanço  $\text{CH}_2$ , e  $\text{CH}_2$ , respectivamente. Ambas as absorvâncias são encontradas para polietileno de alta densidade (Figura 6. A) e polietileno de baixa densidade (Figura 6. B).

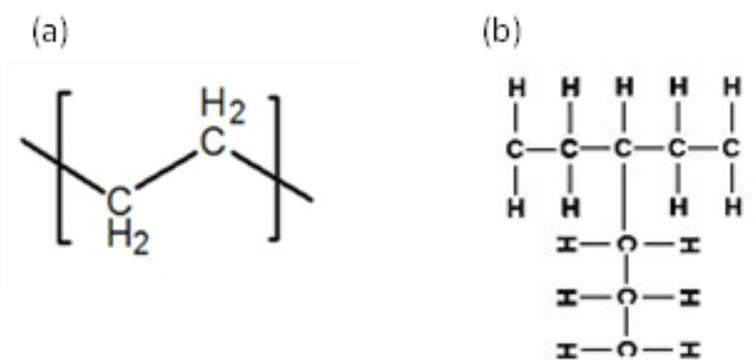


Figura 6. Estruturas Moleculares de polietileno: (a) Polietileno de alta densidade; (b) Polietileno de baixa densidade com cadeia ramificada ou com a presença de uma metila substituindo a ramificação.

## Risco de contaminação

Para reduzir o risco de contaminação das amostras por microplásticos no ambiente laboratorial, luvas nitrílicas foram utilizadas desde o manuseio dos equipamentos até o processamento das amostras, assim como as superfícies de trabalho foram cuidadosamente limpas com álcool 70%, além de todos os equipamentos de vidro e ferramentas, antes e depois de cada procedimento. Para evitar a contaminação pelo ar, se deu uma atenção redobrada durante a dissecação, extração, classificação e identificação visual dos microplásticos, sendo esses procedimentos realizados em *Clean Lab*, que possui sistemas de ar-condicionado com circulação e filtragem em operação contínua. Foi realizado um teste de potencial presença de microplásticos no ar (Pegado et al. 2018b),

no qual, uma placa de Petri com álcool 70% foi posicionada acima da superfície de trabalho antes do início de cada procedimento. No final do dia, essa placa foi examinada com estereomicroscópio para verificar se ocorreu contaminação.

#### Análises estatísticas

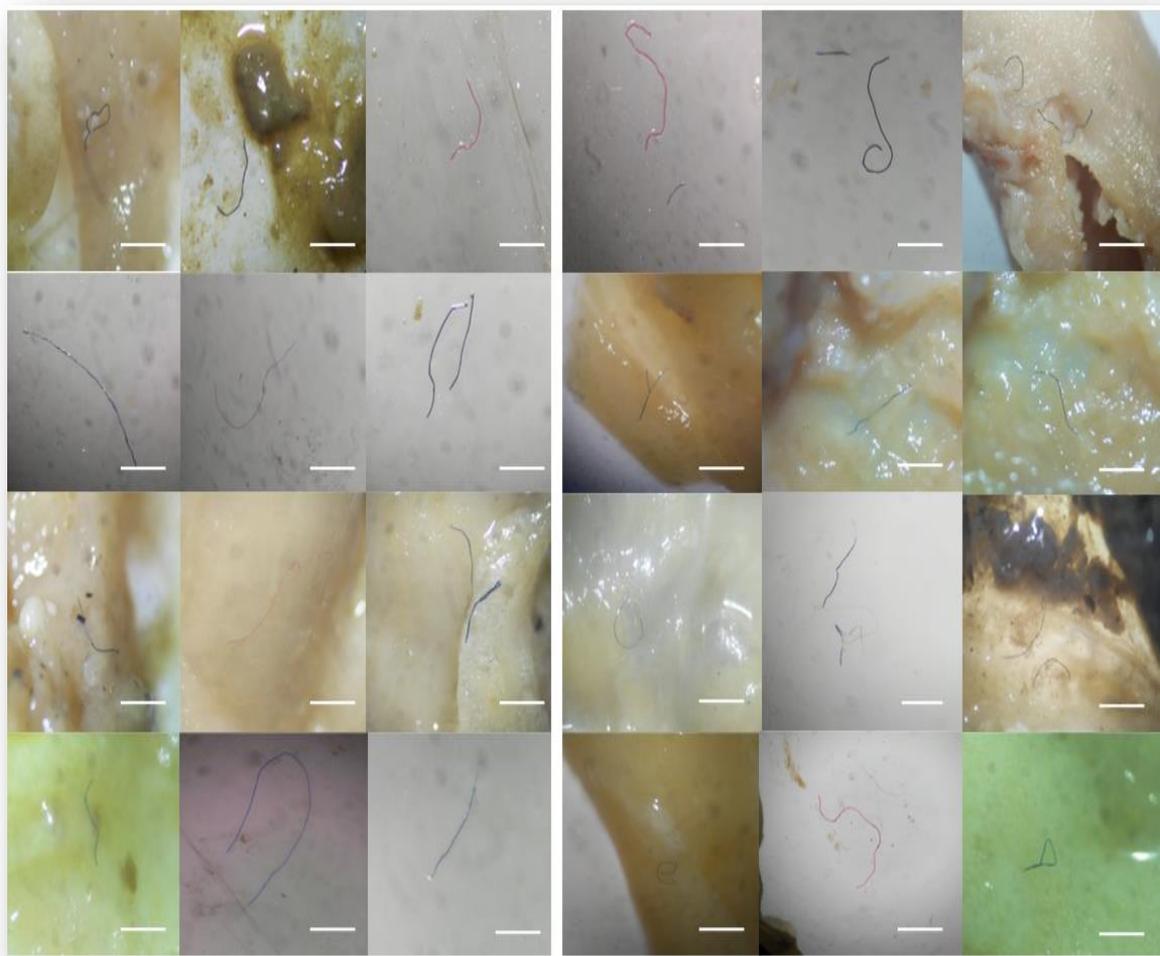
Foram realizados testes de Shapiro Wilk para avaliar a normalidade dos dados. Os testes de Kruskal-Wallis foram utilizados para verificar se a quantidade de microplásticos encontrada ( $q_{\text{micro}}$ ) apresentava diferença significativa em relação aos hábitos alimentares (carnívoro, detritívoro, omnívoro o herbívoro) dos indivíduos analisados, e para avaliar se houve diferença significativa de microplásticos ingeridos pelos indivíduos coletados entre as duas localidades. Para verificar se houve relação entre a quantidade de microplásticos encontrada ( $q_{\text{micro}}$ ) e os parâmetros biométricos dos indivíduos (tamanho do corpo, tamanho do trato gastrointestinal, peso do corpo e peso do trato gastrointestinal), foi utilizado uma regressão linear simples. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R version 4.0.4 (2021), e foram conduzidas considerando um nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

### Quantificação e qualificação dos microplásticos encontrados

Um total de 183 partículas de microplásticos foram encontrados no interior do trato gastrointestinal de 54 dos 88 peixes analisados, pertencentes a 13 espécies (Tabela 1) representando cerca de 61,4% dos indivíduos analisados que ingeriram microplásticos. Das 13 espécies analisadas, *Hoplias malabaricus* foi a espécie com o maior número de partículas de microplásticos encontrados (37 partículas de microplásticos), seguidos de *Serrasalmus elongatus* (20 partículas de microplásticos) e *Semaprochilodus taeniurus* (19 partículas de microplásticos). Do total de partículas de microplásticos encontrado 91,5% estavam na porção intestinal e 8,5% na porção estomacal. As partículas encontradas tinham em média  $1,89 \pm 0,87$  mm de comprimento, a menor partícula encontrada mediou  $0,79 \pm 0,18$  mm e a maior partícula  $3,7 \pm 2,68$  mm de comprimento.

Todas as micropartículas encontradas tinham apresentaram o formato de fibras e fios (Figura 7).



Lago Janauacá

Arquipélago de Anavilhanas

Figura 7. Amostras de microplásticos em forma de fios e com diferentes cores encontrados no interior do trato gastrointestinal de diferentes espécies de peixes amazônicas.

#### Identificação dos microplásticos

A identificação e confirmação das partículas encontradas foi realizada através do método de *Fourier Transformed by Infrared (FTIR)*, confirmando que essas partículas eram microplásticos. Foram contabilizadas apenas as partículas que apresentaram grau de similaridade  $\geq 75\%$ , de acordo com o banco de dados de polímeros do fabricante do equipamento. Foram encontrados 4 microplásticos de fibras de poliéster, 11 microplásticos de polietileno de alta e baixa densidade (PE), 2 de filtro de papel celulose, 1 de EVA, 2 de polipropileno (PP), 5 de polietileno de tereftalato (PET) e 3 microplásticos de neopreno (Figura 8).



Figura 8. Tabela de identificação de microplásticos por meio da técnica de FTIR. Polietileno de alta e baixa densidade (PE) – 39%, PET – 18%, fibras de poliéster – 14%, neopreno – 11%, polipropileno (PP) e papel de celulose – 7% e EVA – 4%. Gráfico em formato de pizza representando as porcentagens para cada tipo de microplástico encontrado.

### Microplásticos e hábitos alimentares

Apesar dos peixes analisados apresentarem diferentes hábitos alimentares (carnívoros, detritívoros, onívoros e herbívoros), não foram identificadas diferenças significativas entre a quantidade de partículas de microplásticos encontrada por indivíduo e os hábitos alimentares ( $p > 0,05$ ) (Figura 9).

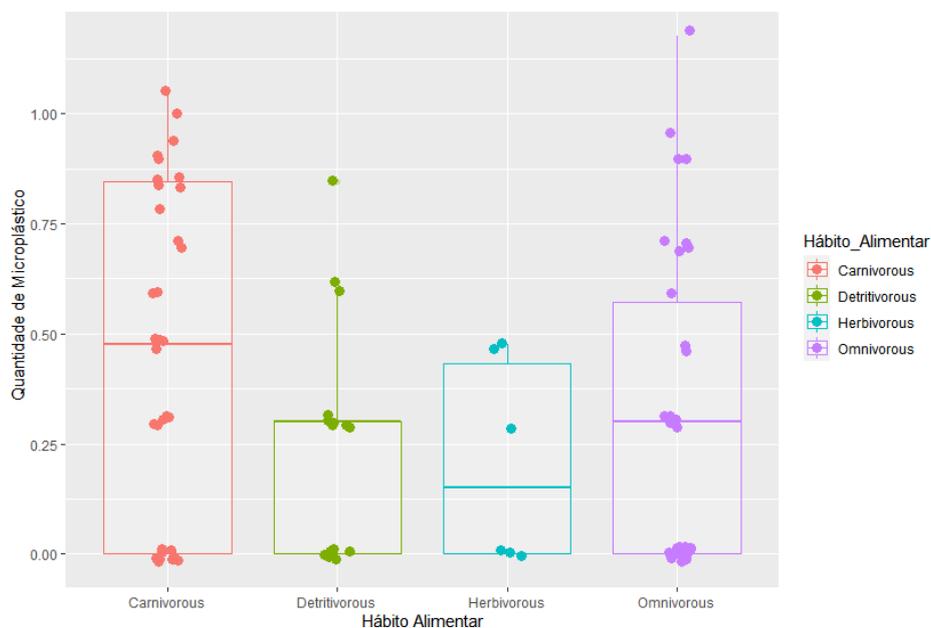


Figura 9. Gráfico representando a quantidade de partículas de microplásticos encontradas em 54 indivíduos, em função dos hábitos alimentares (carnívoro, detritívoro, herbívoro e onívoro) dos indivíduos analisados. Não foram encontradas diferenças significativas entre as duas variáveis ( $p > 0,05$ ).

## Microplásticos e parâmetros biométricos dos indivíduos analisados

Os parâmetros biométricos como peso e comprimento padrão do indivíduo e peso e tamanho dos tratos gastrointestinais, não tiveram relação com a quantidade de microplásticos observada ( $p>0,05$ ) (Figura 10).

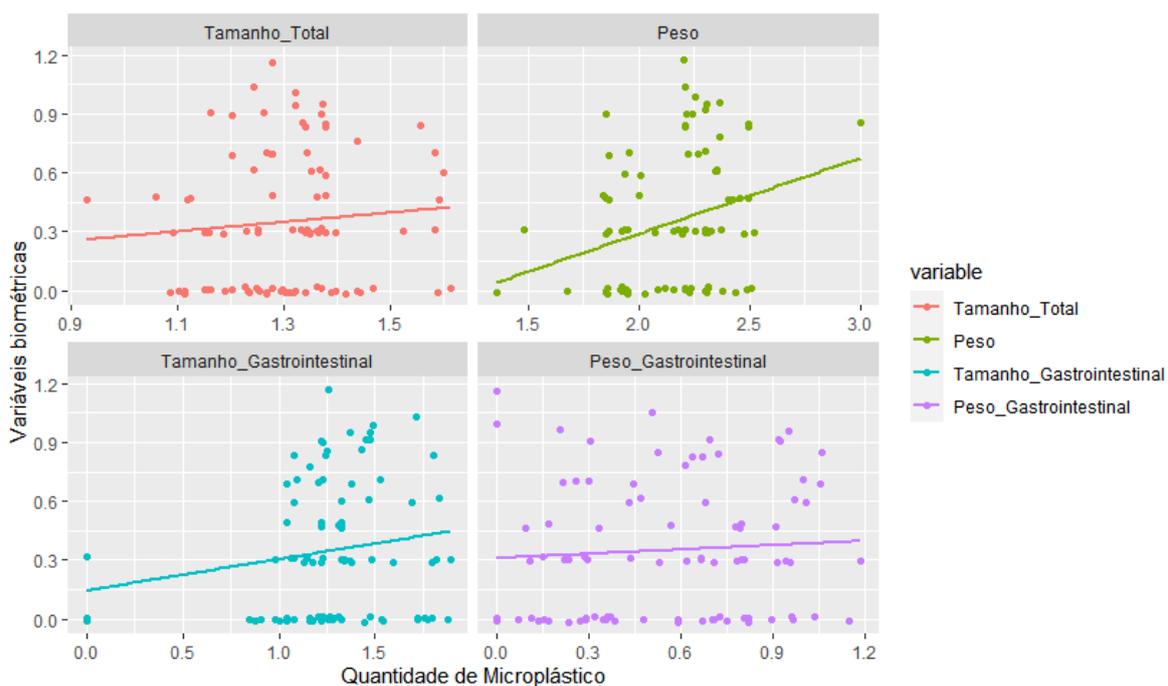


Figura 10. Gráfico representando a quantidade de partículas de microplásticos encontrada em função dos parâmetros biométricos dos indivíduos ( $n=54$ ) analisados ( $p>0,05$ ).

## Microplástico e localidades

Não houve relação entre a quantidade de partículas de microplásticos encontrada no trato gastrointestinal dos peixes e a localidade em que os indivíduos foram coletados. (Figura 11).

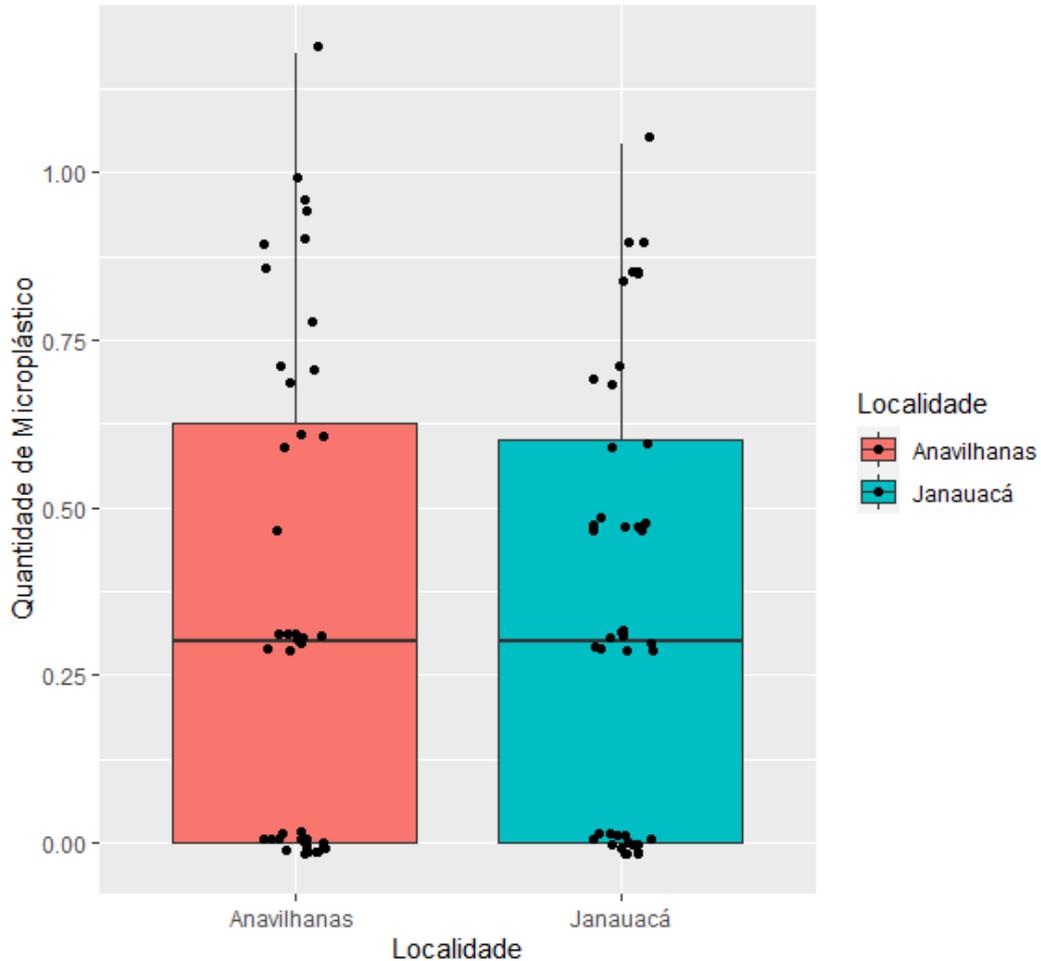


Figura 11. Gráfico representando a quantidade de partículas de microplásticos encontrada em função das localidades (Lago Janauacá e Arquipélago de Anavilhanas) nas quais os peixes foram coletados. ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Recentemente muita atenção tem sido dada à região amazônica, no que se refere à poluição emergente por resíduos plásticos. O presente estudo analisa o cenário atual dos microplásticos quanto a sua abundância, caracterização, e interação com algumas espécies de peixes amazônicas de importância comercial. A presença de microplásticos em lugares considerados preservados como o lago Janauacá e o Arquipélago de Anavilhanas é evidenciada.

Embora estudos a respeito dessas partículas na região Amazônica ainda seja de pequena escala, estudos anteriores (Pegado et al. 2018b, Andrade et al. 2019) indicam

que a poluição por microplásticos em água doce pode ser tão prejudicial quanto nos oceanos, ambiente que a tempos vem sendo investigado (Eerkes-Medrano et al. 2015).

Sabe-se que a quantidade ou a abundância dessas micropartículas de plástico pode variar de acordo com sua localização, como sedimento, superfície, águas rasas, proximidade dos centros urbanos, etc (Li et al. 2018). Em ambientes de água doce, suas possíveis fontes são, na maioria das vezes, estações de tratamento de águas residuais, doméstica ou industrial, utensílios de pesca, materiais plásticos maiores (macroplásticos) e utensílios domésticos descartados (Eerkes-Medrano et al. 2015). O presente estudo corrobora esta descrição, pois, principalmente, no lago Janauacá, onde ocorre o extrativismo por meio da pesca de subsistência, muitos materiais provenientes dessas atividades acabam sendo descartados direta ou indiretamente no ambiente aquático ou nas margens dos rios, ficando expostos às intempéries proporcionadas por esse ambiente, e que com o passar do tempo, fragmentam-se e transformam-se em microplásticos (Barnes et al. 2009b).

Um outro fator que pode proporcionar e influenciar a abundância de microplásticos na região estudada, é a falta de saneamento básico nas casas flutuantes ou próximas à urbanização, o que torna o ambiente aquático o principal destino para efluentes domésticos não tratados. A grande maioria das casas dos ribeirinhos na região Amazônica, e até mesmo na capital amazonense, Manaus, não possuem tratamento de esgoto ou coleta seletiva, contribuindo para emissões significativas de contaminantes, a qual incluem-se os microplásticos (Fabregat-Safont et al. 2021).

Devido à atividade turística na região, que detém uma variedade de hotéis de selva e que é constantemente utilizada como caminho para muitos passeios turísticos amazônicos, essa atividade também acaba exercendo forte influência e contribuição na poluição por plásticos nessa região. Segundo a Empresa Estadual de Turismo do Amazonas (Amazonas Tur), no ano de 2020 o estado recebeu cerca de 343.530 turistas, sendo que dos destinos mais cobiçados estão os hotéis de selva (5,7% para turistas domésticos e 15,3% para turistas estrangeiros) (AmazonasTur 2020).

Na região norte o plástico associado ao turismo, apresenta-se como principal componente do lixo das praias da região (85,8%), o que acaba impactando regiões ribeirinhas, populações tradicionais, pescadores, muitas vezes situadas em regiões

remotas. A solução para tal problema depende da integração de ações governamentais, boas práticas e gestão participativa (Heinrich 2020).

Estudos recentes têm evidenciado a presença e ingestão de microplásticos por diferentes espécies de peixes amazônicas. Justino et al. (2021) investigando também espécies de peixes tropicais encontraram cerca de 176 microplásticos em 82 indivíduos analisados. No presente estudo, 183 partículas de microplásticos foram encontrados no interior do trato gastrointestinal de espécies de peixes com diferentes hábitos alimentares, representando 61,3% dos indivíduos observados consumindo partículas de microplásticos. Este achado corrobora com estudos anteriores utilizando organismos aquáticos da região amazônica, como os de Andrade et al. (2019), que encontraram um total de 96 partículas de microplásticos (81,3%) em espécies de piranhas com diferentes hábitos alimentares do rio Xingu, e de Pegado et al. (2018a) que encontraram um total de 228 partículas de microplásticos (13,7%) em diferentes espécies de peixes do estuário do rio Amazonas. A quantidade de microplásticos encontrada revelou um padrão na abundância de microplásticos.

A elevada produção global de plásticos do tipo polietileno (Jambeck et al. 2015), que compõe na maioria das vezes, materiais plásticos de uso único, principalmente sacolas plásticas e utensílios responsáveis no armazenamento de comida (GESAMP 2015), pode explicar a alta taxa desse tipo de microplástico encontrado no presente estudo. O polietileno de alta e baixa densidade representou, no presente estudo, 39% (PEHD e PELD), seguido de PET (18%), fibras de poliéster (14%), neopreno (11%), polipropileno (7%), papel celulose (7%) e EVA (4%).

Um dos fatores que podem contribuir com a disponibilidade de microplásticos nos ambientes estudados, e que acelera o processo de fragmentação dos microplásticos de polietileno, é a sua alta fotossensibilidade, que na região amazônica é ampliada devido à alta incidência de raios UV, resultando em uma redução das propriedades mecânicas desse material e, conseqüentemente, reduzindo seu tempo de vida (Hidalgo-Ruz et al. 2012).

No presente estudo, o tamanho dos microplásticos encontrados variou de 0,79 a 3,70 mm, capturados em malha de aço com porosidade de 0,30 mm. Isso sugere a necessidade de um manejo ambiental mais adequado, pois sabe-se que quanto menor o

tamanho das partículas de microplásticos, maiores são os seus efeitos em diferentes organismos (Zhang et al. 2022).

A relação entre o tamanho das partículas de microplásticos e a concentração em uma espécie de peixe híbrido “snakehead” (*Channa maculata* × *Channa argus*) foi analisada, demonstrando que os peixes foram mais intolerantes a altas concentrações de partículas de microplásticos de 0,0005 mm se comparado com partículas de 0,005 mm (Zhang et al. 2022). Microalgas tiveram suas paredes celulares destruídas por adsorção da superfície, ao serem expostas a microplásticos de (0,00005 mm) (Liu et al. 2020). Indivíduos de goldfish (*Carassius auratus*) expostos a dois tamanhos de poliestireno (0,00025 mm e 0,008 mm), apresentaram danos mais graves na ingestão de microplásticos no tamanho de 0,00025 mm do que no tamanho de 0,008 mm (Abarghouei et al. 2021).

Quanto às formas dos microplásticos encontrados no presente estudo, os fios representaram 100% dos microplásticos encontrados. Quanto às cores desses fios, azul (79%), vermelho (11%) preto (9%) e verde (1%), foram encontradas. Sendo a forma de microplástico mais encontrada também por Andrade et al. (2019) que ao investigarem espécies de piranhas da região amazônica, encontram cerca de 53,1% dos microplásticos na forma de fios, nas cores preto (28,1%), azul (19,8%), vermelho (18,8%), branco (14,6%) e transparente (8,3%). Contrastando com nossos achados, Pegado et al. (2018b) encontraram apenas 0,9% das partículas em formato de fios, a maioria em forma de pellets (97,4%), nas cores amarelo e vermelho no interior do trato gastrointestinal de espécies de peixes amazônicas. Recentemente quatro espécies de peixes anfítrons foram expostos a partículas de microplásticos de diferentes cores na água, e demonstraram preferência pelas cores vermelho e amarelo (Okamoto et al. 2022). Estes estudos revelam as principais características das propriedades dos microplásticos, que se encontram disponíveis nos ambientes aquáticos de água doce da Amazônia e que, conseqüentemente, são ingeridas com maior frequência pelas espécies de peixes amazônicas.

A técnica de FTIR- ATR se mostrou eficiente pela simplicidade no preparo das amostras para as análises, demandando somente a limpeza das partículas de microplástico com água destilada, ou etanol, ou álcool isopropílico (Jung et al. 2018), para que pudesse ser retirada qualquer camada de molécula orgânica interferente na leitura das bandas do polímero. Os microplásticos são reconhecidos na literatura por possuírem bandas de IR típicas para cada grupo funcional do polímero. Por ser uma técnica de refletância atenuada

por meio de um diamante, a penetração do laser IR (aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ ) faz com que valores de absorvância sejam menores se comparado com o modo de medida clássico por transmitância. Uma das complicações do modo refletância é a medida de fragmentos de formato irregulares de microplásticos podendo resultar em espectros não interpretáveis por erros de refração (Löder and Gerdt 2015).

Mais recentemente, o trabalho de revisão de Veerasingam et al. (2020) avaliou mais de 400 trabalhos de identificação de microplásticos pelos mais diversos modos do FTIR. O modo ATR com refletância foi utilizado em mais de 60% dos trabalhos para identificar variados tipos de polímeros em diversos tipos de matrizes, ressaltando também as vantagens e desvantagens dos diferentes modos de refletância total atenuada (ATR), transmitância, refletância difusa (Veerasingam et al. 2020). Ainda que muito utilizado, o método de identificação por refletância total atenuada ainda precisa seguir alguma padronização, pois os diferentes modos de preparação da amostra e o tamanho e o diâmetro dos microplásticos são fatores limitantes quando se utiliza tal técnica.

Em relação aos hábitos alimentares e a ingestão de microplásticos, Pegado et al. (2018b) não encontraram diferenças significativas entre os hábitos alimentares e a quantidade de partículas de microplásticos encontradas. (Andrade et al. 2019) também não encontraram diferenças significativas entre os hábitos alimentares e a frequência de ocorrência de microplásticos em espécies de piranha da região amazônica, reforçando os resultados encontrados no presente estudo, onde a relação entre hábito alimentar e quantidade de partículas de microplástico ingerida também não teve diferença entre as espécies analisadas para as duas localidades na Amazônia. Esses dados contrastam com os de Mizraji et al. (2017) que observaram para peixes onívoros maior quantidade de microplásticos ingeridos por peixes em relação aos hábitos herbívoro e carnívoro. Contrastam, também, com os achados de Justino et al. (2021), que identificaram uma variação entre a ingestão de partículas de microplásticos e os diferentes hábitos alimentares de espécies de peixes tropicais.

Em relação aos parâmetros biométricos, Pegado et al. (2018b) encontraram diferenças significativas entre o comprimento total e a ingestão de microplásticos, o que não foi observado no presente estudo, pois não foram encontradas diferenças significativas entre o peso e comprimento padrão dos indivíduos e nem entre o peso e comprimento do trato gastrointestinal em relação a ingestão de partículas de

microplásticos, indicando não haver relação positiva entre o indivíduo e partículas de microplásticos ingeridas.

O presente trabalho observou indivíduos de duas localidades diferentes próximas a cidade de Manaus, Amazonas. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre a ingestão de partículas de microplásticos por indivíduos de ambas as localidades, demonstrando não haver diferença na presença e ingestão de partículas de microplásticos entre uma área mais antropizada (Lago Janauacá) e menos urbanizada (Arquipélago de Anavilhanas). A proporção de ingestão de partículas de microplásticos também não foi afetada em espécies de peixes de duas localidades do mar Mediterrâneo (Rios-Fuster et al. 2019). Isso indica que embora ambientes mais próximos a áreas urbanas sejam mais impactados pelo recebimento direto de rejeitos, os microplásticos podem ser facilmente carreados e transportados por ações adversas como massas de ar, precipitação e ações humanas, atingindo, assim, regiões mais remotas e influenciar respostas ambientais tão acentuadas quanto nos ambientes antropizados.

## **CONCLUSÃO**

Ambas as áreas de estudo têm partículas plásticas evidenciando que mesmo os organismos de áreas protegidas estão sujeitos às ações dos microplásticos, independente sua proximidade de área urbana.

A disponibilidade de microplásticos nas localidades que os peixes foram coletados é similar para todos os hábitos alimentares observados (onívoro, carnívoro, detritívoro e herbívoro), ou seja, os peixes estão sendo contaminados por partículas plásticas independente do hábito alimentar que apresentam.

A abundância (183 partículas de microplásticos) e o predomínio dos microplásticos em forma de fios e nas cores encontradas sugerem falta de saneamento básico na região e grande uso de aparatos de pesca.

Concluimos que há um padrão até aqui predominante de partículas plásticas nesta primeira evidência de ingestão de microplásticos por espécies de peixes do estado do Amazonas, isto é, na forma dominante de fios, nas cores azul, vermelho, preto e verde.

## LEGENDA DE TABELA

Tabela 1. Tabela de determinação dos microplásticos encontrados: **(Qfish)** representa a quantidade de indivíduos por espécie; **(Fmicro)** representa a quantidade de indivíduos por espécies contendo partículas de microplásticos; **(Qmicro)** é a quantidade de partículas de microplásticos encontrados por indivíduo; **(Amicro)** representando a média e o desvio padrão da quantidade de partículas de microplásticos encontrados por espécie; **(FO%)** representa a frequência de ocorrência de partículas de microplásticos por espécie; **(Asmicro)** representa a média e o desvio padrão do tamanho das partículas de microplásticos encontrados e **(Feeding Habits)** os hábitos alimentares de cada espécie analisada.

Species	Location	Qfish	Fmicro	Amicro	FO%	Asmicro	Feeding Habits
<i>Pygocentrus nattereri</i>	Janauaca/ Anavilhanas	10	6	27	60%	2,68±2,62	Carnivorous
<i>Heros acaroides</i>	Anavilhanas	11	6	19	54,5%	1,31±0,23	Omnivorous
<i>Semaprochilodus taeniurus</i>	Janauaca	12	9	37	75%	1,51±0,59	Detritivorous
<i>Hoplias malabaricus</i>	Janauaca	2	2	7	100%	2,48±2,94	Carnivorous
<i>Prochilodus lineatus</i>	Janauaca	3	3	9	100%	3,70±2,68	Detritivorous
<i>Calophysus macropterus</i>	Janauaca	5	4	14	80%	1,37±0,50	Carnivorous
<i>Auchenipterus nuchalis</i>	Janauaca	7	2	2	28,6%	1,36±0,54	Omnivorous
<i>Triportheus elongatus</i>	Janauaca	6	4	10	66,6%	3,29±2,93	Detritivorous
<i>Cichla vazzoleri</i>	Janauaca	15	7	33	46,6%	0,79±0,18	Carnivorous
<i>Satanoperca jurupari</i>	Janauaca	6	4	10	46,6%	1,10±0,43	Omnivorous
<i>Anostomoides laticeps</i>	Janauaca	6	3	5	50%	1,70±1,62	Herbivorous
<i>Chaetobranchopsis orbicularis</i>	Janauaca	4	3	3	75%	1,69±0,31	Detritivorous
<i>Psectrogaster amazonica</i>	Anavilhanas	1	1	7	100%	1,6±0,49	Detritivorous
		<b>88</b>	<b>54</b>	<b>183</b>			

## REFERÊNCIAS

- Abarghouei, S.; Hedayati, A.; Raeisi, M.; Hadavand, B.S.; Rezaei, H.; Abed-Elmdoust, A. 2021. Size-dependent effects of microplastic on uptake, immune system, related gene expression and histopathology of goldfish (*Carassius auratus*). *Chemosphere* 276: 129977.
- Abbasi, S.; Soltani, N.; Keshavarzi, B.; Moore, F.; Turner, A.; Hassanaghahi, M. 2018. Microplastics in different tissues of fish and prawn from the Musa Estuary, Persian Gulf. *Chemosphere* 205: 80–87.
- AmazonasTur. 2020. MOVIMENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE TURISTAS NO ESTADO DO AMAZONAS 2020 AMAZONASTUR. *AMAZONASTUR* 2020: 1–6.
- Amendola, M.C. 2007. Algoritmo Genético E Espectroscopia No Infravermelho – Algumas Aplicações Na Indústria Cosmética. .
- Andrade, M.C.; Winemiller, K.O.; Barbosa, P.S.; Fortunati, A.; Chelazzi, D.; Cincinelli, A.; et al. 2019. First account of plastic pollution impacting freshwater fishes in the Amazon: Ingestion of plastic debris by piranhas and other serrasalmids with diverse feeding habits. *Environmental Pollution*: 766–773.
- Andrady, A.L. 2011. Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*.
- Barboza, A.; Russo, L.; Branco, V.; Figueiredo, N.; Carvalho, F.; Carvalho, C.; et al. 2018. Microplastics cause neurotoxicity , oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass, *Dicentrarchus labrax* ( Linnaeus , 1758 ). *Aquatic Toxicology* 195: 49–57.
- Barletta, M.; Lima, A.R.A.; Costa, M.F. 2019. Distribution, sources and consequences of nutrients, persistent organic pollutants, metals and microplastics in South American estuaries. *Science of the Total Environment* 651: 1199–1218.
- Barnes, D.K.A.; Galgani, F.; Thompson, R.C.; Barlaz, M. 2009a. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364: 1985–1998.
- Barnes, D.K.A.; Galgani, F.; Thompson, R.C.; Barlaz, M.; Barnes, D.K.A.; Galgani, F.; et al. 2009b. Accumulation and Fragmentation of Plastic Debris in Global Environments Linked references are available on JSTOR for this article : Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364: 1985–1998.
- Batistella, A.M.; Castro, C.P. de; Vale, J.D. do. 2005. Conhecimento dos moradores da comunidade de Boas Novas, no Lago Janauacá - Amazonas, sobre os hábitos alimentares dos peixes da região. *Acta Amazonica* 35: 51–54.
- Browne, M.A.; Niven, S.J.; Galloway, T.S.; Rowland, S.J.; Thompson, R.C. 2013. Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Current Biology* 23: 2388–2392.
- Cabrera, M.; Moulatlet, G.M.; Valencia, B.G.; Maisincho, L.; Rodríguez-Barroso, R.;

- Albendín, G.; et al. 2022. Microplastics in a tropical Andean Glacier: A transportation process across the Amazon basin? *Science of the Total Environment* 805: 150334.
- Canesi, L.; Ciacci, C.; Bergami, E.; Monopoli, M.P.; Dawson, K.A.; Papa, S.; et al. 2015. Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*. *Marine Environmental Research* 111: 34–40.
- Carpenter, E.J.; Smith, K.L. 1972. Plastics on the Sargasso sea surface. *Science* 175: 1240–1241.
- Van Cauwenberghe, L.; Vanreusel, A.; Mees, J.; Janssen, C.R. 2013. Microplastic pollution in deep-sea sediments. *Environmental Pollution* 182: 495–499.
- Van Cauwenberghe, L.; Devriese, L.; Galgani, F.; Robbins, J.; Janssen, C.R. 2015. Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. *Marine Environmental Research* 111: 5–17.
- Cole, M.; Galloway, T.S. 2015. Ingestion of nanoplastics and microplastics by Pacific oyster larvae. .
- Cole, M.; Lindeque, P.; Halsband, C.; Galloway, T.S. 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin* 62: 2588–2597.
- Cole, M.; Webb, H.; Lindeque, P.K.; Fileman, E.S.; Halsband, C.; Galloway, T.S. 2014. Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Scientific Reports* 4: 1–8.
- Costa, M.F.; Barletta, M. 2015. Microplastics in coastal and marine environments of the western tropical and sub-tropical Atlantic Ocean. *Environmental Sciences: Processes and Impacts* 17: 1868–1879.
- Derraik, J.G.B. 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: A review. *Marine Pollution Bulletin* 44: 842–852.
- Eerkes-Medrano, D.; Thompson, R.C.; Aldridge, D.C. 2015. Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water Research* 75: 63–82.
- Eriksen, M.; Mason, S.; Wilson, S.; Box, C.; Zellers, A.; Edwards, W.; et al. 2013. Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Marine Pollution Bulletin* 77: 177–182.
- Eriksson, C.; Burton, H. 2003. Origins and biological accumulation of small plastic particles in fur seals from Macquarie Island. *Ambio* 32: 380–384.
- Fabregat-Safont, D.; Ibáñez, M.; Bijlsma, L.; Hernández, F.; Waichman, A. V.; de Oliveira, R.; et al. 2021. Wide-scope screening of pharmaceuticals, illicit drugs and their metabolites in the Amazon River. *Water Research* 200: 117251.
- Farrell, P.; Nelson, K. 2013. Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environmental Pollution* 177: 1–3.
- Faure, F.; Corbaz, M.; Baecher, H.; De Alencastro, L.F. 2012. Pollution due to plastics and microplastics in lake Geneva and in the Mediterranean sea. *Archives des*

*Sciences* 65: 157–164.

- Fendall, L.S.; Sewell, M.A. 2009. Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Marine Pollution Bulletin* 58: 1225–1228.
- Free, C.M.; Jensen, O.P.; Mason, S.A.; Eriksen, M.; Williamson, N.J.; Boldgiv, B. 2014. High-levels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake. *Marine Pollution Bulletin* 85: 156–163.
- Galgani, F.; Hanke, G.; Maes, T. 2015. *Marine Anthropogenic Litter*. 29–56p.
- Gall, S.C.; Thompson, R.C. 2015. The impact of debris on marine life. *Marine Pollution Bulletin* 92: 170–179.
- Gerolin, C.R.; Pupim, F.N.; Sawakuchi, A.O.; Grohmann, C.H.; Labuto, G.; Semensatto, D. 2020. Microplastics in sediments from Amazon rivers, Brazil. *Science of the Total Environment* 749: 141604.
- GESAMP. 2015. Science for Sustainable Oceans. .
- He, D.; Luo, Y.; Lu, S.; Liu, M.; Song, Y.; Lei, L. 2018. Microplastics in soils: Analytical methods, pollution characteristics and ecological risks. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 109: 163–172.
- Heinrich, B.S. 2020. *Atlas do plástico - Fatos e números sobre o mundo dos polímeros sintéticos*. Vol. 01.64p.
- Hidalgo-Ruz, V.; Gutow, L.; Thompson, R.C.; Thiel, M. 2012. Microplastics in the marine environment: A review of the methods used for identification and quantification. *Environmental Science and Technology* 46: 3060–3075.
- Horton, A.A.; Jürgens, M.D.; Lahive, E.; van Bodegom, P.M.; Vijver, M.G. 2018. The influence of exposure and physiology on microplastic ingestion by the freshwater fish *Rutilus rutilus* (roach) in the River Thames, UK. *Environmental Pollution* 236: 188–194.
- Jambeck, J.R.; Geyer, R.; Wilcox, C.; Siegler, T.R.; Perryman, M.; Andrady, A.; et al. 2015. Entradas de residuos plásticos desde la tierra al océano. *Ciencia* 347: 768–771.
- Jeong, C.; Won, E.; Kang, H.; Lee, M.; Hwang, D.; Hwang, U. 2016. Microplastic Size-Dependent Toxicity, Oxidative Stress Induction, and p - JNK and p - p38 Activation in the Monogonont Rotifer ( *Brachionus koreanus* ).
- Jeong, C.B.; Kang, H.M.; Lee, M.C.; Kim, D.H.; Han, J.; Hwang, D.S.; et al. 2017. Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclopina nana*. *Scientific Reports* 7: 1–11.
- Jung, M.R.; Horgen, F.D.; Orski, S. V.; Rodriguez C., V.; Beers, K.L.; Balazs, G.H.; et al. 2018. Validation of ATR FT-IR to identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms. *Marine Pollution Bulletin* 127: 704–716.
- Justino, A.K.S.; Lenoble, V.; Pelage, L.; Ferreira, G.V.B.; Passarone, R.; Frédou, T.; et al. 2021. Microplastic contamination in tropical fishes: An assessment of different feeding habits. *Regional Studies in Marine Science* 45: 101857.

- Kosuth, M.; Mason, S.A.; Wattenberg, E. V. 2018. Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt. *PLoS ONE* 13: 1–18.
- Law, K.; Thompson, R.C. 2014. Microplastics in the seas - Concern is rising about widespread contamination of the marine environment by microplastics. *Science* 345: 144–145.
- Lei, L.; Wu, S.; Lu, S.; Liu, M.; Song, Y.; Fu, Z.; et al. 2018. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science of the Total Environment* 619–620: 1–8.
- Li, D.; Shi, Y.; Yang, L.; Xiao, L.; Kehoe, D.K.; Gun'ko, Y.K.; et al. 2020. Microplastic release from the degradation of polypropylene feeding bottles during infant formula preparation. *Nature Food* 1: 746–754.
- Li, J.; Liu, H.; Paul Chen, J. 2018. Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. *Water Research* 137: 362–374.
- Liu, G.; Jiang, R.; You, J.; Muir, D.C.G.; Zeng, E.Y. 2020. Microplastic Impacts on Microalgae Growth: Effects of Size and Humic Acid. *Environmental Science and Technology* 54: 1782–1789.
- Löder, M.G.J.; Gerdt, G. 2015. Methodology Used for the Detection and Identification of Microplastics---A Critical Appraisal. In: Bergmann, M.; Gutow, L.; Klages, M. (Eds.), *Marine Anthropogenic Litter*, Springer International Publishing, Cham, p.201–227.
- Lusher, A. 2015. Microplastics in the marine environment: Distribution, interactions and effects. In: *Marine Anthropogenic Litter*, .
- Lusher, A.L.; McHugh, M.; Thompson, R.C. 2013. Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine Pollution Bulletin* 67: 94–99.
- Mecozzi, M.; Pietroletti, M.; Monakhova, Y.B. 2016. FTIR spectroscopy supported by statistical techniques for the structural characterization of plastic debris in the marine environment: Application to monitoring studies. *Marine Pollution Bulletin* 106: 155–161.
- Mizraji, R.; Ahrendt, C.; Perez-Venegas, D.; Vargas, J.; Pulgar, J.; Aldana, M.; et al. 2017. Is the feeding type related with the content of microplastics in intertidal fish gut? *Marine Pollution Bulletin* 116: 498–500.
- MMA. 2006. *Caderno da Região Hidrográfica Amazônica*. 124p.
- Moore, C.J.; Lattin, G.L.; Zellers, A.F. 2011. Quantity and type of plastic debris flowing from two urban rivers to coastal waters. *Journal of Integrated Coastal Zone Management* 11: 65–73.
- Napper, I.E.; Davies, B.F.R.; Clifford, H.; Elvin, S.; Koldewey, H.J.; Mayewski, P.A.; et al. 2020. Reaching New Heights in Plastic Pollution—Preliminary Findings of Microplastics on Mount Everest. *One Earth* 3: 621–630.
- Ogata, Y.; Takada, H.; Mizukawa, K.; Hirai, H.; Iwasa, S.; Endo, S.; et al. 2009.

- International Pellet Watch: Global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs. *Marine Pollution Bulletin* 58: 1437–1446.
- Okamoto, K.; Nomura, M.; Horie, Y.; Okamura, H. 2022. Color preferences and gastrointestinal-tract retention times of microplastics by freshwater and marine fishes. *Environmental Pollution* 304: 119253.
- Oliveri Conti, G.; Ferrante, M.; Banni, M.; Favara, C.; Nicolosi, I.; Cristaldi, A.; et al. 2020. Micro- and nano-plastics in edible fruit and vegetables. The first diet risks assessment for the general population. *Environmental Research* 187: 109677.
- Pegado, T.; Sarti, F.; Nunes, J.; Cincinelli, A.; Monteiro, R.; Filho, M. 1966. Presence of microplastics in stingrays ( *Hypanus guttatus* ) from Brazilian Amazon Coast. : 334400.
- Pegado, T. de S. e. S.; Schmid, K.; Winemiller, K.O.; Chelazzi, D.; Cincinelli, A.; Dei, L.; et al. 2018a. First evidence of microplastic ingestion by fishes from the Amazon River estuary. *Marine Pollution Bulletin* 133: 814–821.
- Pegado, T. de S. e. S.; Schmid, K.; Winemiller, K.O.; Chelazzi, D.; Cincinelli, A.; Dei, L.; et al. 2018b. First evidence of microplastic ingestion by fishes from the Amazon River estuary. *Marine Pollution Bulletin* 133: 814–821.
- Piatti, T.M.; Rodrigues, R.A.F. 2005. Plásticos: características, usos, produção e impactos ambientais. *Série: Conversando sobre ciências em alagoas*: 51.
- PlasticsEurope. 2018. Annual Review 2017-2018. *PlasticsEurope Annual Review 2017-2018* 15: 44.
- Prata, J.C.; da Costa, J.P.; Lopes, I.; Duarte, A.C.; Rocha-Santos, T. 2020. Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Science of the Total Environment* 702: 134455.
- Ragusa, A.; Svelato, A.; Santacroce, C.; Catalano, P.; Notarstefano, V.; Carnevali, O.; et al. 2021. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment International* 146: 106274.
- Reis, R.E.; Albert, J.S.; Di Dario, F.; Mincarone, M.M.; Petry, P.; Rocha, L.A. 2016. Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of fish biology* 89: 12–47.
- Rios-Fuster, B.; Alomar, C.; Compa, M.; Guijarro, B.; Deudero, S. 2019. Anthropogenic particles ingestion in fish species from two areas of the western Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin* 144: 325–333.
- Santos, C.M.; Duarte, S.; Souza, T.G.L.; Ribeiro, T.P.; Sales, A.; Araújo, F.G. 2008. Histologia e caracterização histoquímica do tubo gastrintestinal de *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) no reservatório de Funil, Rio de Janeiro, Brasil. *Iheringia. Série Zoologia* 97: 411–417.
- Setälä, O.; Fleming-Lehtinen, V.; Lehtiniemi, M. 2014. Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environmental Pollution* 185: 77–83.
- Singh, B.; Sharma, N. 2008. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability* 93: 561–584.

- Society, B.E. 2014. The Ecology of Tropical Lakes and Rivers . by A . I . Payne Review by : Geoffrey Fryer Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2260443> . 75: 582–583.
- Val, A.L. 2019. Fishes of the Amazon: diversity and beyond. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 91 3: e20190260.
- Val, A.L.; Fearnside, P.M.; Almeida-Val, V.M.F. 2016. Environmental disturbances and fishes in the Amazon. *Journal of Fish Biology* 89: 192–193.
- Vandermeersch, G.; Van Cauwenberghe, L.; Janssen, C.R.; Marques, A.; Granby, K.; Fait, G.; et al. 2015. A critical view on microplastic quantification in aquatic organisms. *Environmental Research* 143: 46–55.
- Veerasingam, S.; Ranjani, M.; Venkatachalapathy, R.; Bagaev, A.; Mukhanov, V.; Litvinyuk, D.; et al. 2020. Contributions of Fourier transform infrared spectroscopy in microplastic pollution research: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 0: 1–63.
- Watts, A.J.R.; Urbina, M.A.; Goodhead, R.; Moger, J.; Lewis, C.; Galloway, T.S. 2016. Effect of Microplastic on the Gills of the Shore Crab *Carcinus maenas*. *Environmental Science and Technology* 50: 5364–5369.
- Wen, B.; Zhang, N.; Jin, S.R.; Chen, Z.Z.; Gao, J.Z.; Liu, Y.; et al. 2018a. Microplastics have a more profound impact than elevated temperatures on the predatory performance, digestion and energy metabolism of an Amazonian cichlid. *Aquatic Toxicology* 195: 67–76.
- Wen, B.; Jin, S.R.; Chen, Z.Z.; Gao, J.Z.; Liu, Y.N.; Liu, J.H.; et al. 2018b. Single and combined effects of microplastics and cadmium on the cadmium accumulation, antioxidant defence and innate immunity of the discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*). *Environmental Pollution* 243: 462–471.
- Zhang, C.; Pan, Z.; Wang, S.; Xu, G.; Zou, J. 2022. Size and concentration effects of microplastics on digestion and immunity of hybrid snakehead in developmental stages. *Aquaculture Reports* 22: 100974.
- Zhang, Y.; Wolosker, M.B.; Zhao, Y.; Ren, H.; Lemos, B. 2020a. Exposure to microplastics cause gut damage, locomotor dysfunction, epigenetic silencing, and aggravate cadmium (Cd) toxicity in *Drosophila*. *Science of the Total Environment* 744: 140979.
- Zhang, Y.; Kang, S.; Allen, S.; Allen, D.; Gao, T.; Sillanpää, M. 2020b. Atmospheric microplastics: A review on current status and perspectives. *Earth-Science Reviews* 203: 103118.

## **CAPÍTULO II**

Efeitos morfofisiológicos causados pela ingestão de microplásticos em *Colossoma macropomum*. Formatação de acordo com a revista *Acta Amazônica*

Maria Tereza VASCONCELOS-SOUZA<sup>1</sup>, Lorena Vieira de MATOS<sup>2</sup>, Samara Silva SOUZA<sup>1</sup>; Grazyelle Sebreński da SILVA<sup>3</sup>, Adalberto Luis VAL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Parasitologia de Peixes

<sup>3</sup>Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil

## Resumo

Sabemos que os organismos aquáticos de água doce da Amazônia vêm constantemente interagindo com diversos poluentes que ameaçam esse ambiente. Materiais de origem plástica são exemplos de poluentes, que quando descartados de forma incorreta fragmentam-se em pequenas partículas conhecidas como microplásticos (<5mm). No entanto, pouco se sabe acerca dos impactos que os microplásticos podem causar aos organismos aquáticos da Amazônia. Sendo assim, o presente estudo teve por objetivo verificar os efeitos agudos causados pela ingestão de microplásticos, sobre a morfologia e fisiologia intestinal de *Colossoma macropomum*. Para isso um experimento agudo (24h) foi realizado, submetendo indivíduos de *C. macropomum* a 100 mg de microplásticos do tipo polietileno (PE) para cada quilograma de ração manipulada, em 4 tempos de coleta: t=0; t=3h; t=6h; t=24h. Os resultados demonstram que os microplásticos afetam a morfologia do epitélio intestinal de *C. macropomum*, que apresentaram alterações teciduais classificadas como de grau I, reversíveis, como aumento da abrasão do epitélio da mucosa e hipertrofia das células caliciformes. Apenas no tempo de exposição de 3h observou-se um aumento na obstrução vascular, e hiperplasia das células caliciformes, classificadas como alterações de grau II. Quanto a análise das atividades enzimáticas, SOD apresentou uma diminuição na atividade quando comparada ao controle, indicando diferença significativa entre os tempos 0 e 3h. A atividade de CAT teve diferença significativa entre os tratamentos no tempo 3h e os demais tempos (0, 6h e 24h), sugerindo início de ativação dessas enzimas antioxidantes. Não houve lipoperoxidação, demonstrado pela análise da LPO. Concluímos que danos na morfologia e fisiologia do intestino de indivíduos de *C. macropomum* expostos a microplásticos de polietileno (PE) até 24h, não foram considerados graves ou de grau irreversível, sugerindo que indivíduos da espécie estudada foram tolerantes à exposição aguda e/ou dependentes do tempo e concentração de microplásticos de PE utilizados. Contudo, saber que efeitos os microplásticos vêm causando para *C. macropomum* a longo prazo e em altas concentrações, pode indicar caminhos para mitigar e frear esses efeitos para manter a conservação da espécie, que sendo uma das mais apreciadas pela população, pode afetar a segurança alimentar dessa região.

**Palavras-chave:** poluição microplástica, luz polarizada, histologia intestinal, enzimas antioxidantes.

## Abstract

It is known that the freshwater aquatic organisms of the Amazon are constantly interacting with various pollutants that threaten this environment. Materials of plastic origin are examples of pollutants, which when discarded incorrectly fragment into small particles known as microplastics (<5mm). However, little is known about the impacts that microplastics can cause to aquatic organisms in the Amazon. Thus, the present study aimed to verify the acute effects caused by ingestion of microplastics on the morphology and intestinal physiology of *Colossoma macropomum*. For this an acute experiment (24h) was performed, subjecting individuals of *C. macropomum* to 100 mg of microplastics of the polyethylene (PE) type for each kilogram of feed manipulated, in 4 collection times: t=0; t=3h; t=6h; t=24h. The results show that the microplastics affect the morphology of the intestinal epithelium of *C. macropomum*, which showed tissue changes classified as grade I, reversible, such as increased abrasion of the mucosal epithelium and hypertrophy of the goblet cells. Only at 3h exposure time was observed an increase in vascular obstruction and hyperplasia of goblet cells, classified as grade II changes. As for the analysis of enzymatic activities, SOD showed a decrease in activity when compared to control, indicating a significant difference between times 0 and 3h. The activity of CAT had significant difference between the treatments in time 3h and the other times (0, 6h and 24h), suggesting the beginning of activation of these antioxidant enzymes. There was no lipoperoxidation, demonstrated by the LPO analysis. We concluded that damage to the morphology and physiology of the intestine of individuals of *C. macropomum* exposed to microplastics of polyethylene (PE) up to 24 hours, were mild and of reversible degree, species were tolerant to acute exposure and/or dependent on time and concentration of PE microplastics used. However, knowing what effects microplastics have been causing for *C. macropomum* in the long term and at high concentrations, may indicate ways to mitigate and curb these effects to maintain the conservation of the species, which is one of the most appreciated by the population, may affect the food security of this region.

**Keywords:** microplastic pollution, effects, intestinal morphology, oxidative stress.

## INTRODUÇÃO

Os materiais plásticos constituem cerca de 10% dos resíduos sólidos descartados, sendo uma parte considerável depositada principalmente em ambientes aquáticos de água doce (Barnes et al. 2009a). Lebreton and Andrady (2019) estimam que entre 60 e 99 milhões de toneladas de resíduos plásticos tenham sido produzidos no mundo somente no ano de 2015, e que se não houver intervenção, essa produção tende a aumentar desproporcionalmente em países asiáticos e africanos. Até o ano de 2017, Geyer et al. (2017) estimaram que mais de 8 milhões de toneladas de plástico tenham sido produzidas. A crescente poluição do ambiente aquático proporcionada pelo aumento do consumo e descarte de materiais de origem plástica, fez com que surgissem questões sobre como a biota aquática, em especial os peixes, está sendo afetada morfológica e fisiologicamente em decorrência da exposição aos microplásticos (Ding et al. 2018, Espinosa et al. 2018, Zhang et al. 2022).

Os peixes são excelentes indicadores da qualidade ambiental, refletindo os impactos em diferentes níveis da organização biológica e respondendo de diversas formas à contaminação (Araújo 1998). A utilização de peixes como objeto desse estudo assume extrema importância na Amazônia, uma vez que essa região abriga a maior diversidade de peixes de água doce do mundo, e que vem sendo cada vez mais ameaçada (Fausch et al. 1990). A extrema susceptibilidade dos peixes a diversas alterações no ambiente aquático, leva à crescente necessidade do monitoramento de espécies que habitam áreas impactadas, sendo possível avaliar os mecanismos de contaminação destes ambientes, bem como a biota que ali reside. Organismos como os peixes possuem diferentes mecanismos por meio dos quais tentam manter o equilíbrio frente às alterações ambientais, sendo essas provocadas pela poluição, um dos principais fatores que contribuem para a ocorrência de algumas enfermidades em peixes (Araújo 1998, Guilhermino et al. 2018).

Na região norte a piscicultura é concentrada no tambaqui, sendo a espécie mais consumida, e uma das principais espécies mais comercializadas no mercado regional. Sabendo disso, avaliar os efeitos da ingestão dos microplásticos pelo tambaqui é necessário para a observação de danos morfológicos e fisiológicos causados pela ingestão de microplásticos, podendo trazer um indicativo dos riscos para a saúde da população amazônica que consome esse pescado. Como consequência para o futuro, temos o consumo de peixes que podem estar contaminados, especialmente na região amazônica,

onde o consumo de peixe é alto quando comparado com outras regiões do Brasil (Sartori; Amancio 2012).

Recentemente, a relação microplástico-homem tem sido relatada com mais frequência. Ragusa et al. (2021) evidenciaram, por exemplo, a presença de microplásticos na placenta humana. Li et al. (2020) observaram a fragmentação de mamadeiras de plástico aquecidas com leite para crianças, resultando na formação de microplásticos. A presença de microplásticos no sangue humano também foram descrita (Leslie et al. 2022), assim como em diferentes órgãos humanos (Amato-Lourenço et al. 2020) evidenciando o estreito contato entre a relação microplástico-homem. Suas prováveis consequências também têm sido analisadas (Prata et al. 2020)

Sabe-se que os microplásticos vêm interagindo com diferentes organismos aquáticos, desde o zooplâncton (Cole et al. 2013), peixes de topo de cadeia (Ivar do Sul 2014), répteis (de Sá et al. 2018), chegando aos mamíferos aquáticos (Silva and Marmontel 2009); porém, pouco sabemos sobre as consequências e respostas morfológicas e fisiológicas da presença dos microplásticos para o trato gastrointestinal causadas pelo consumo e interação de microplásticos por organismos aquáticos da região amazônica.

Análises histopatológicas do intestino de minhocas *Eisenia andrei* Bouché forneceram evidências de danos e respostas do sistema imunológico em exposição aos microplásticos (Rodriguez-Seijo et al. 2017). Outro trabalho observou a presença de microplásticos em diferentes tecidos, como vesícula biliar, fígado, sangue e trato gastrointestinal, de indivíduos de *Sebastes schgelli*, espécie de peixe marinha (Abbasi et al. 2018). Lei et al. (2018) verificaram, em condições de laboratório, pelo menos 10 efeitos de diferentes tipos de microplásticos em *Danio rerio*. As análises histológicas do intestino dessa espécie demonstraram que a exposição aos microplásticos de PP e PVC com aproximadamente 70 µm causaram danos intestinais, incluindo ruptura de vilosidades e de enterócitos. Sendo assim, há necessidade de mais estudos que verifiquem os efeitos dos microplásticos no trato gastrointestinal de organismos aquáticos amazônicos, dadas as interferências dos microplásticos na morfologia dos organismos (Santos et al. 2008).

Jeong et al. (2017) e Von Moos et al. (2012) também demonstraram em seus trabalhos que os microplásticos são capazes de induzir aumento no nível intracelular de

espécies Reativas de Oxigênio (do inglês Reactive Oxygen Species, ROS) resultando em inflamação e danos oxidativos. Efeitos como inflamação e estresse oxidativo, alterações no microbioma intestinal e nos perfis metabólicos teciduais vêm sendo evidenciados com a exposição a microplásticos causando danos intestinais, bem como alterações no metaboloma e microbioma intestinal (Qiao et al. 2019a). Apesar de microplásticos não afetarem severamente o metabolismo bacteriano do intestino do robalo adulto (*Dicentrarchus labrax*), ocasionaram a diminuição das atividades enzimáticas e na microbiota intestinal (Caruso et al. 2018).

Nos últimos anos, a existência de microplásticos e seus potenciais impactos sobre a vida selvagem e sobre a saúde humana receberam maior atenção pública e científica (Cole and Galloway 2015). Apesar de várias políticas internacionais estarem em vigor há algum tempo para gerenciar a entrada de lixo plástico no ambiente aquático, falhas nas fiscalizações as tornam incertas e ineficazes.

Na Amazônia, mais especificamente na cidade de Manaus, há poucos estudos sobre os efeitos dos microplásticos em peixes. Considerando que o conhecimento sobre os efeitos dos microplásticos sobre a biota aquática do ambiente de água doce é escasso e que a região amazônica é praticamente desconhecida quanto a esse aspecto, o presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos agudos por meio da ingestão de microplásticos, sobre o trato gastrointestinal de *C. macropomum* alimentados com ração comercial acrescida de partículas de microplástico, a fim de criarmos alternativas para reduzir esses efeitos contribuindo com a conservação da espécie, bem como, como com a segurança alimentar e com a economia regional (Val et al. 2016).

A gestão adequada de resíduos sólidos é uma questão ecológica importante, que vem afetando fortemente as funcionalidades da biota aquática, assim como, as questões socioeconômicas e a saúde da população que depende dela. Portanto, estudar e, consequentemente, delinear estratégias para mitigar os possíveis danos e impactos dos microplásticos sob uma das espécies de peixe mais consumidas na região (*C. macropomum*), deve ser dado como desafio, especialmente diante das rápidas mudanças regionais que envolvem o maior consumo de itens plásticos pela população.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Modelo animal

O tambaqui, *C. macropomum*, pertence à família Serrasalmidae, segunda família de peixes mais estudada em relação aos microplásticos (Cera and Scalici 2021). É um peixe considerado de grande importância econômica devido ao seu crescimento, qualidade de carne e rusticidade (Bezerra 2013). Segundo o Anuário Peixe BR da Piscicultura (2019), o tambaqui é o peixe nativo mais presente nas produções brasileiras, ficando atrás apenas da produção da tilápia IBGE (2019). Nos últimos anos, os estoques naturais de tambaqui sofreram uma queda e a produção dessa espécie gera uma alternativa para a sobre-exploração, segundo a Fundação para o Ecodesenvolvimento da Amazônia - Ecoamazônia.

### Obtenção dos indivíduos de *Colossoma macropomum*

Foram adquiridos 200 indivíduos juvenis de *C. macropomum* obtidos com piscicultor local, e posteriormente transportados para o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular – LEEM, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Em seguida, os animais foram aclimatados por 60 dias em condições controladas e alimentados diariamente com ração comercial com 36% de proteína. Os indivíduos submetidos à experimentação foram manipulados seguindo as regras do guia brasileiro de ética para o uso de animais – CONCEA, com autorização do comitê de ética do INPA, número 021/2021, SEI 01280.00872/2021-74.

### Características do microplástico utilizado no experimento

Partículas de microplásticos de polietileno (PE) inerte de até 5 mm, sem forma definida, com reentrâncias e aspecto rugoso, utilizados na fabricação de produtos cosméticos (esfoliantes), foram fornecidos pelo grupo de pesquisas “Ecofisiologia e Ecotoxicologia de Organismos Aquáticos” da Universidade de Santa Cecília de São Paulo UNISANTA, cedidos pela empresa Braskem. Considerando o que foi observado no capítulo I, o tipo de microplástico mais encontrado em espécies de peixes coletadas no ambiente natural foi do tipo polietileno (PE), este polímero foi escolhido para ser utilizado no preparo da ração experimental. Além disso, foi considerada a sua alta produção e utilização nos mais diversos itens plásticos encontrados no dia a dia (Horton et al. 2017).

### Preparo da Ração

No processamento da ração experimental, foi utilizada a ração comercial para peixes onívoros (*Nutripiscis* TR 36%). A partir disso, foram elaborados dois tipos de ração: a ração controle composta somente por ração comercial umidificada que foi processada em máquina de moer carne (Moedor/Picador de carne 8, bivolt, inox 1/3CV. CAF) e peletizada para alimentação do grupo controle, e em seguida, submetida a 7 dias de secagem a 50° C em estufa; e a ração experimental (contendo microplásticos). Para a preparação da ração experimental contendo microplásticos, na etapa de moagem foram acrescentados 100 mg de microplásticos para cada quilo de ração comercial (100 mg de PE/1kg de ração) do tipo polietileno (PE), peletizadas e também submetidas a secagem por 7 dias a 50° C em estufa. Todas as rações preparadas foram separadas e armazenadas em recipientes de vidro até o início do experimento.

#### Delineamento experimental

Para a realização do experimento 150 indivíduos de *C. macropomum* passaram pelo período de aclimatação por 60 dias. Após este período os indivíduos foram transferidos para 6 tanques experimentais com capacidade de 50L de água. Três tanques (C1, C2, C3) contendo 5 peixes cada (n=5) foram separados como grupo controle e três tanques (MP1, MP2, MP3) como grupo experimental contendo 5 peixes cada (n=5). O experimento consistiu em um sistema fechado, no qual metade da água dos tanques era trocada a cada 24h (após o 1° e o 2° dia de aclimatação e após o primeiro dia de coleta).

Ao serem transferidos para os tanques experimentais, os indivíduos passaram por mais dois dias de aclimatação no novo ambiente. Após este período, foi realizada a primeira coleta (T=0), quando foi coletado um indivíduo de cada grupo controle (C1=1 indivíduo, C2=1 indivíduo e C3= 1 indivíduo) contendo 3 indivíduos representando o grupo controle no tempo 0 e, um indivíduo de cada grupo de tratamento com microplástico (MP1= 1 indivíduo, MP2= 1 indivíduo e MP3= 1 indivíduo) sendo 3 indivíduos representando o grupo contaminado com microplásticos (Figura 1). A coleta de tempo 0 representa o controle negativo, com o objetivo de conhecer o estado de saúde desses indivíduos antes de dar início ao experimento.

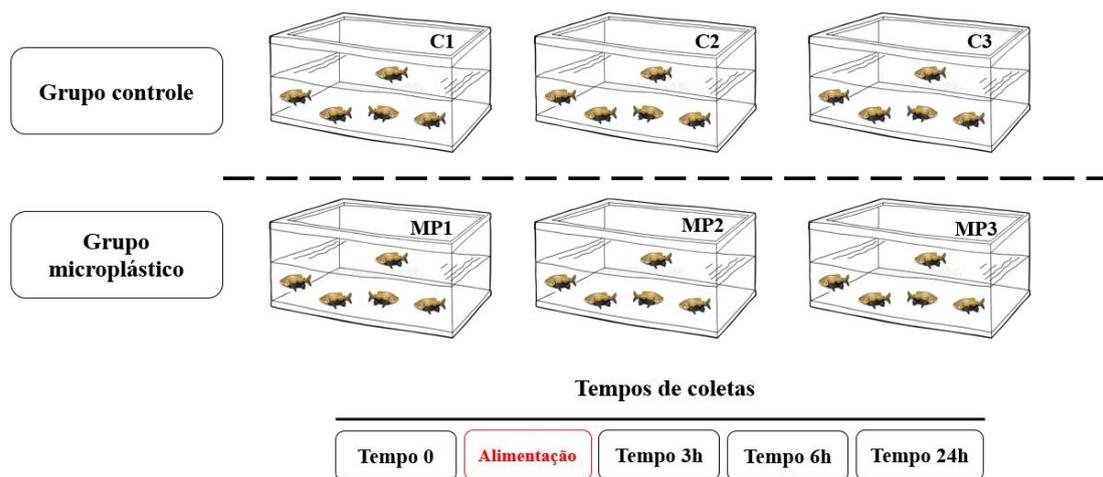


Figura 1. Esquema do desenho experimental. A parte superior do esquema representa os grupos controle, apresentando 3 tanques contendo 5 indivíduos de *Colossoma macropomum* cada. A parte inferior representa os grupos experimentais, com 3 tanques contendo 5 indivíduos cada, expostos a 100 mg de partículas de microplásticos por Kg de ração. Abaixo os tempos de coleta: 0, 3, 6 e 24h).

Após a coleta de tempo 0, os indivíduos foram alimentados de acordo com o delineamento experimental, sendo a ração distribuída conforme a biomassa que cada tanque apresentava, de acordo com a equação a seguir:

$$\text{Quantidade de ração por dia} = \text{BM} \times \frac{4\%}{100}$$

Onde:

BM = Biomassa dos peixes no tanque;

4% da ração diária ofertada.

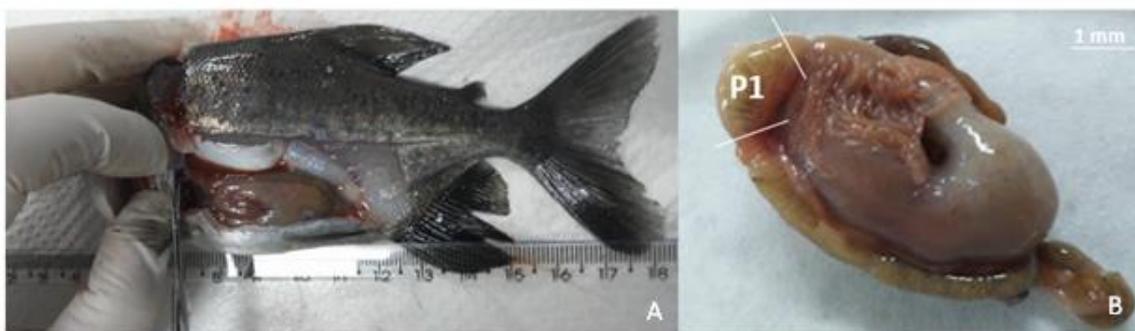
Três horas após a alimentação, foi feita a 2ª coleta (T=3h), e em seguida a 3ª coleta (T=6h) e 4ª coleta (T=24h), nas quais eram coletadas para cada tempo 1 indivíduo de cada tanque (Figura 1). O experimento foi repetido 5 vezes, para garantir um número de indivíduos analisados, estatisticamente aceito (n=120).

## Coleta de tecido para análise

Após cada coleta nos tempos: 0, 3h, 6h e 24h, foram tomadas as seguintes medidas: comprimento padrão e peso de cada indivíduo e comprimento e peso de seus respectivos intestinos.

Uma incisão abdominal em cada indivíduo foi realizada (Figura 2.A) e, em seguida, separadas amostras com fragmentos da primeira porção do intestino de cada indivíduo. A escolha da primeira porção (P1) do intestino é devida às características básicas presentes em peixes teleósteos, como sendo curto, retilíneo, composto por cecos pilóricos e longas vilosidades intestinais (de Matos et al. 2017, Aguiar et al. 2018). Mesmo sem uma separação clara entre intestino delgado e grosso, é possível identificar dois segmentos intestinais, primeira e segunda porção. A primeira porção do intestino é responsável pela absorção de micronutrientes como monossacarídeos, além da presença de células mucosas que também estão envolvidas no processo de absorção (Rotta 2003). Com isso, parte da primeira porção (Figura 2.B - P1) do intestino de cada indivíduo foi coletada e separada para análise dos danos morfológicos. O material coletado foi mantido em formol 10% tamponado, e outra parte para análise dos danos fisiológicos, mantidos em geladeira -80 °C.

Figura 2. Coleta de amostras de intestino para análises histológicas e enzimáticas. **A)** Incisão abdominal na



cavidade celomática para a retirada do trato gastrointestinal; **B) P1** – primeira porção do intestino separada para as análises.

## Parâmetros químicos da água

Amostras de água foram coletadas para verificar os aspectos físico-químicos (pH, temperatura e oxigênio dissolvido) durante o experimento. Para a medida do pH da água, utilizou-se um pHmetro de bancada *Ohaus* ST3100-F, enquanto a temperatura e oxigênio

dissolvido foram mensurados por meio de um oxímetro YSI-55, sendo o oxigênio dissolvido expresso em mg.l<sup>-1</sup> e a temperatura em °C (tabela 2).

#### Análise de danos na morfologia do intestino

A túnica mucosa e a submucosa das primeiras camadas intestinais foram selecionadas para o diagnóstico das alterações histológicas. Estas camadas estão voltadas para o lúmen intestinal, estando em contato direto com os alimentos e qualquer corpo estranho ingerido.

A túnica mucosa é composta pelas vilosidades intestinais e revestida por epitélio simples cilíndrico com microvilosidades células caliciformes e células de defesa. Subjacente a ela está a camada submucosa composta por tecido conjuntivo frouxo, extensivamente vascularizada e com fibroblastos que têm a função de reparo (Ross and Pawlina 2016).

Assim, fragmentos da primeira porção do intestino de cada indivíduo coletado foram separados e fixados em formol 10% tamponado por duas semanas. Em seguida, os fragmentos intestinais foram submetidos a uma desidratação em álcool 70%, 80%, 95% e 100%, clarificação/diafanização em xilol, impregnação e inclusão em blocos de parafina aquecida a 60 °C. Os cortes histológicos foram realizados na espessura de 5 µm, e após o preparo das lâminas foi realizada a coloração em H&E (hematoxilina e eosina) para em seguida serem observadas em estereomicroscópio óptico (Leica EZ4), com respectiva captura de imagens (Figura 3).

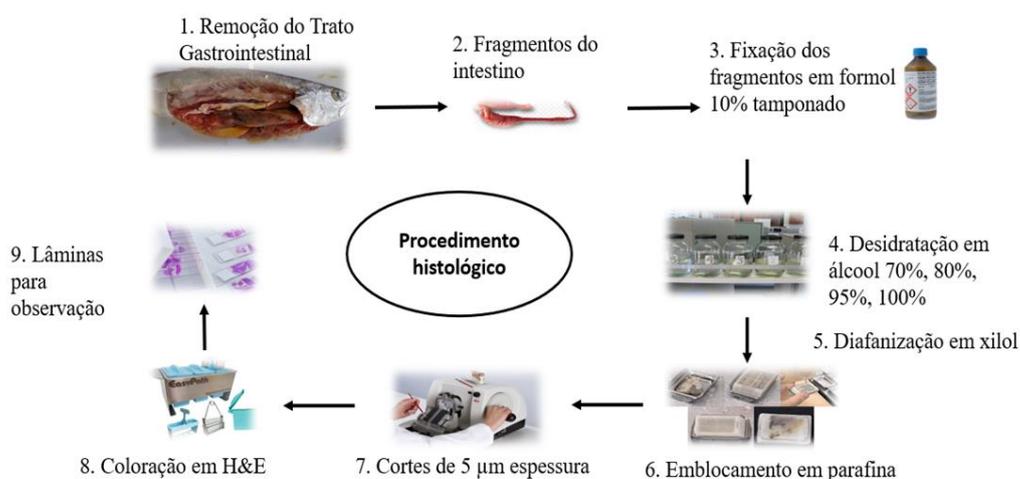


Figura 3. Processamento histopatológico. **1.** Remoção do trato gastrointestinal; **2.** Coleta de amostras de fragmentos do intestino de indivíduos de *Colossoma macropomum*; **3.** Fixação das amostras de fragmentos

intestinais em formol 10% tamponado; **4.** Desidratação em álcool 70%, 80%, 95% e 100%; **5.** Diafanização em xilol; **6.** Emblocamento em parafina a 60 °C; **7.** Microtomia com corte de 5 µm de espessura; **8.** Coloração em H&E; **9.** Lâminas prontas para observação e captação de imagens.

A análise das imagens dos cortes histológicos foi realizada de forma semiquantitativa a fim de observar os possíveis danos na morfologia do intestino de *C. macropomum* causados pela ingestão de partículas de microplásticos. Para isso, foram utilizados os seguintes cálculos:

1) índice de alteração histopatológica (IAH) por meio da fórmula:

$$\text{IAH} = 100 \Sigma\text{I} + 101 \Sigma\text{II} + 102 \Sigma\text{III},$$

onde I, II e III compõem os graus que classificam as alterações histopatológicas

2) frequência de ocorrência (FO%), obtida pelo valor de IAH, classificada como: de 0 – 10, o qual não há o comprometimento do tecido; de 11 a 20, que representa danos entre leves e moderados; 21 – 50, que representa danos entre moderados e severos; 51 – 100, que representa danos severos e acima de 100, que representa danos irreversíveis (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic 1994).

#### Análise das atividades enzimáticas

Fragmentos da primeira porção intestinal selecionados para a análise das atividades enzimáticas, foram separadas e armazenadas a -80 °C. Posteriormente, essas amostras de intestino foram homogeneizadas em solução tampão (200mM Tris base; 1 mM EDTA; 1 mM DDT; 500 mM sacarose; 150 mM KCL;) em pH = 7,6, e centrifugadas a 9000 g durante 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para a análise das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

Para a análise da lipoperoxidação (LPO), amostras de intestino foram pesadas e lavadas com a utilização de soro fisiológico gelado e, em seguida, homogeneizadas (1:2 w/v) (Figura 4.B) com o mesmo tampão utilizado para SOD e CAT e centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

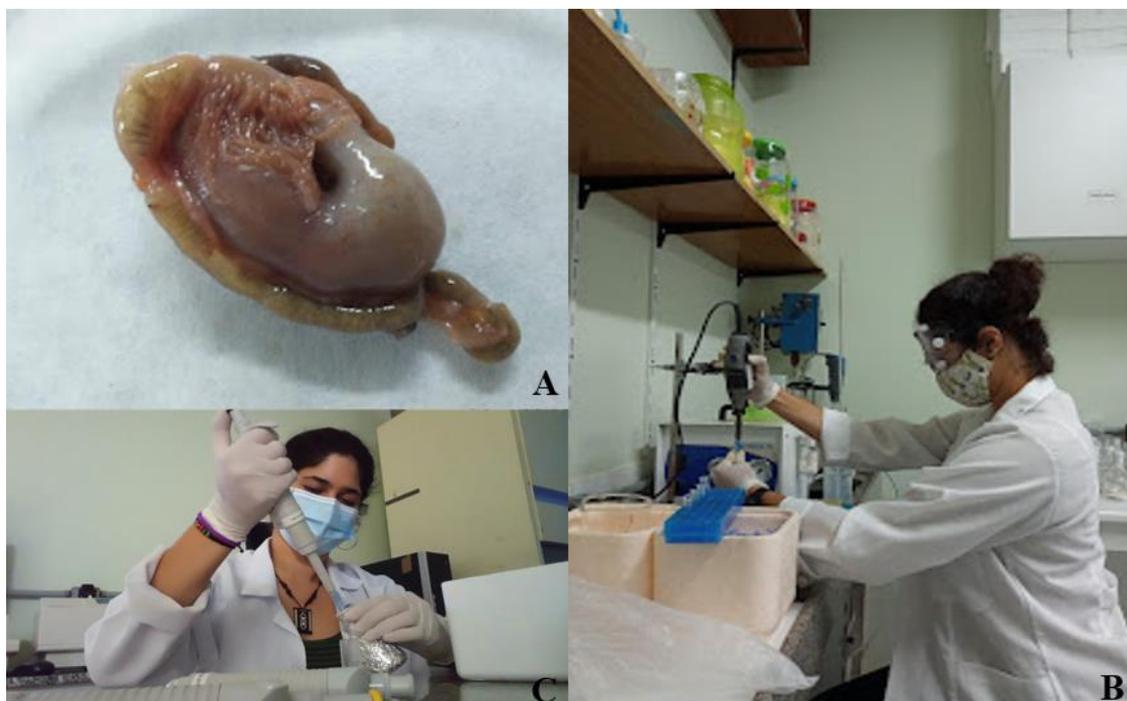


Figura 4. Análise da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT e lipoperoxidação lipídica (LPO). **A)** Trato gastrointestinal pós coleta preparado para serem retirados fragmentos da primeira porção intestinal; **B)** amostras de intestino após pesagem e lavagem com soro fisiológico gelado, passando pelo processo de homogeneização com tampão; **C)** Análise das enzimas antioxidantes em espectrofotômetro.

A atividade da SOD foi realizada de acordo com o método descrito por Flohé e Otting (1984), que consiste em mensurar a inibição da taxa de redução do citocromo C pelo radical superóxido a 550 nm a 25 °C, sendo a atividade da enzima expressa como U SOD.mg proteína<sup>-1</sup>, onde uma U de SOD corresponde à quantidade de enzima que inibe 50% do citocromo C. A atividade de CAT foi determinada seguindo a metodologia de Beutler (1975), que mede a velocidade de degradação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio) a 240 nm. A lipoperoxidação lipídica (LPO) foi quantificada pelo método FOX (*Ferrous Oxidation/ Xylenol Orange*) segundo Jiang et al. (1992), que se baseia na rápida oxidação de Fe<sup>2+</sup> por hidroperóxidos em condições ácidas e, conseqüente formação de Fe<sup>3+</sup> - laranja

de xilenol, na presença do estabilizador (BHT) butilato hidroxitolueno. As leituras para LPO foram realizadas em espectrofotômetro a 560 nm (Figura 4.C). O teor de proteínas totais no intestino foi quantificado em espectrofotômetro a 595 nm com albumina de soro bovino como padrão de acordo com Bradford (1976).

#### Análise estatística

Os dados para avaliar os danos na morfologia do intestino de indivíduos de *C. macropomum* foram submetidos a um teste de normalidade de Kolmogorov-Sminorv, D'Agostino e Pearson Shapiro-Wilk. Em seguida, foi realizada uma análise estatística com ANOVA one way e testes não paramétricos, Kruskall-Wallis teste, que não demonstrou diferença significativa entre as médias ( $p = 0,05$ ). O teste post-roc de Dunn's também não acusou diferença entre as médias de tratamento. A análise de dados foi realizada no programa estatístico PRISM. Os dados obtidos para a avaliação das atividades das enzimas antioxidantes foram submetidos a teste de normalidade e variância, teste de Tukey e ANOVA one way, realizados por meio programa estatístico SigmaStat.

## RESULTADOS

#### Parâmetros da qualidade da água durante o experimento

Os parâmetros da qualidade da água foram monitorados e mantiveram-se estáveis durante todo o período de execução do experimento, não sendo encontradas diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os parâmetros da água com os tratamentos experimentais ( $p > 0,05$ ). As médias e desvios padrões para cada parâmetro analisado (pH, OD e temperatura) são expressas apresentadas na Tabela 2.

#### Biometria dos indivíduos submetidos ao experimento

Foram obtidas medidas do comprimento e peso corporal, assim como o comprimento e o peso do trato gastrointestinal dos indivíduos submetidos ao experimento, representado pelas médias e desvio padrões apresentadas na Tabela 1. Não

foram observadas alterações entre a biometria de indivíduos do grupo controle e indivíduos do grupo experimental.

#### Efeitos na morfologia do intestino

A observação dos microplásticos no interior do tecido intestinal foi possibilitada por meio de um microscópio de Luz polarizada (MLP). A verificação dos efeitos dos microplásticos sobre a mucosa e submucosa intestinal, ambas camadas mais próximas ao lúmen, foi realizada por meio da observação dos índices de alterações histopatológicas IAH, que indicaram na camada mucosa o aumento da frequência de ocorrência da alteração do tipo abrasão das vilosidades (Figura 5.C (setas)) sendo diretamente proporcional ao aumento do tempo de exposição a ração contaminada (3h = 21,17%; 6h = 26,86%; 24h = 28,12%) e declínio da hipertrofia das células caliciformes (Figura 5.B (setas)) (0h = 16,66%; 3h = 11,76%; 6h = 2,98%; 24h = 7,81%). Na submucosa foi observado um aumento acentuado da alteração do tipo obstrução vascular (Figura 5.D (\*)) no tempo 3h (12%), que se manteve elevado no decorrer do experimento.

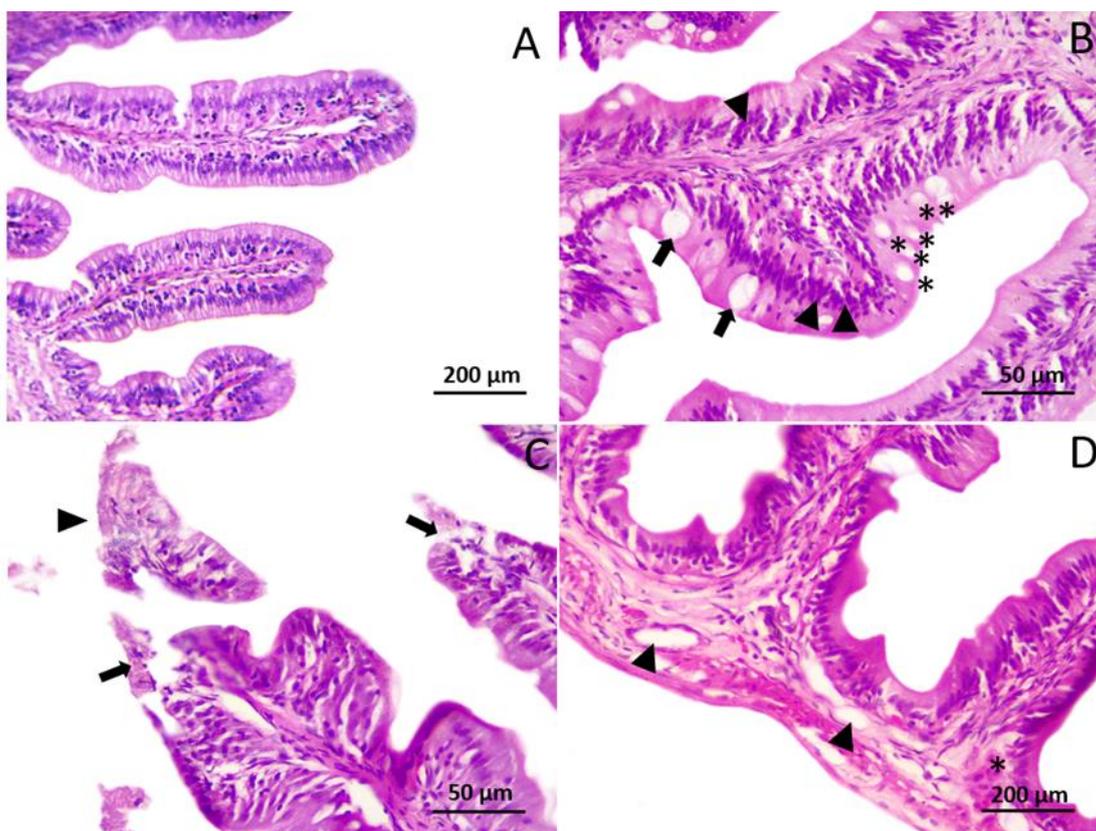


Figura 5. Fotomicrografias dos danos na morfologia do intestino de *Collossoma macropomum* expostos a 100 mg de microplásticos de polietileno (PE) por Kg de ração. A) Mucosa intestinal de *Collossoma*

*macropomum* (grupo controle); **B**) Hipertrofia (**setas**), hiperplasia (**asteriscos**) de células caliciformes e infiltração leucocitária (**cabeças de seta**); **C**) Descamação (**cabeças de seta**) e abrasão (**setas**); Edema (**cabeças de seta**) e obstrução vascular na submucosa (**asterisco**).

A maioria das alterações histopatológicas apresentaram-se como sendo de grau I, como: abrasão, descamação, hipertrofia das células caliciformes, infiltração leucocitária e edemas. Apenas os danos obstrução vascular e hiperplasia das células caliciformes (Figura 5.B) foram encontradas sendo classificadas como alterações de grau II. Não foram observadas alterações de grau III (necrose) nas camadas analisadas (Tabela 3). Também não foram encontradas diferenças significativas entre IAH e os tempos de exposição (0; 3; 6 e 24h) (Figura 6).

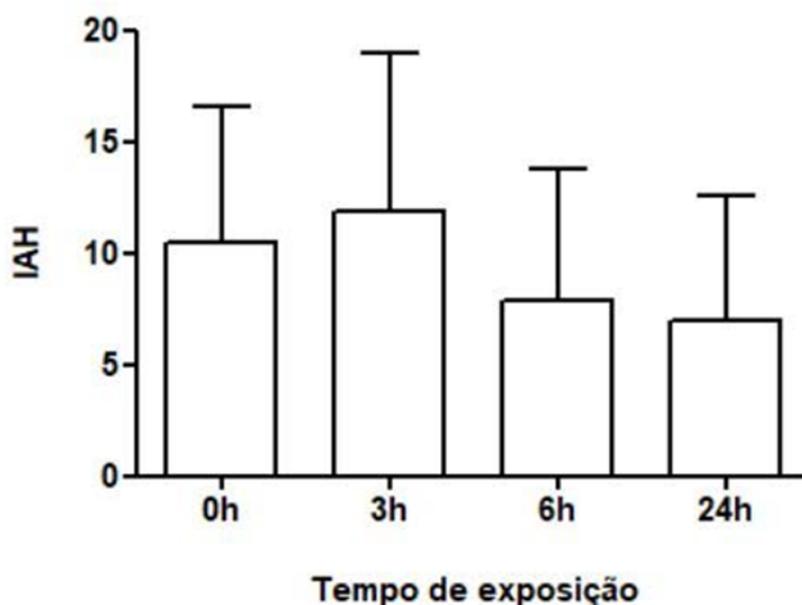


Figura 6. Ausência de diferenças entre os índices de alterações histopatológicas (**IAH**) em relação aos tempos de exposição (0, 3, 6 e 24h) ( $p>0,05$ ).

#### Análises das atividades das enzimas antioxidantes

A peroxidação lipídica (LPO) foi avaliada a fim de constatar possíveis danos de lipoperoxidação da membrana plasmática das células, causadas pela ingestão de ração contaminada com 100 mg de microplásticos para cada quilograma de ração comercial. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas nos danos de LPO na

comparação entre os diferentes tratamentos (controle e microplástico) e os tempos de exposição (0, 3h, 6h e 24h) ( $p > 0,05$ ) (Figura 7.A).

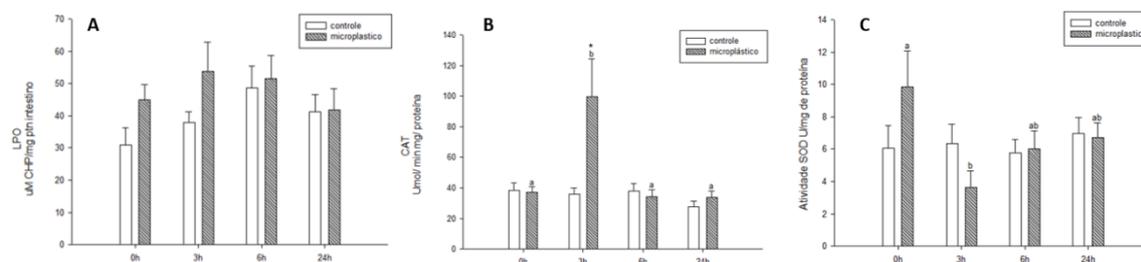


Figura 7. **A)** Ausência de diferenças significativas para lipoperoxidação lipídica (LPO) no intestino entre os grupos controle e tratamento com partículas de microplásticos entre os tempos de exposição (0, 3, 6 e 24h); **B)** Ausência de diferenças significativas (**a**) dentro do grupo controle para catalase (CAT), mas diferença significativa dentro do grupo experimental (**b**) ( $p=0,023$ ) no T= 3h (**asterisco**). **C)** Atividade da superóxido dismutase nos grupos controle e experimental ( $p=0,64$ ), sem diferenças significativas entre o tempo e os grupos ( $p=0,18$ ).

Não foram observadas diferenças na atividade da enzima catalase (CAT) no grupo controle ( $p > 0,05$ ); porém, no grupo tratado com microplásticos houve aumento significativo da atividade da CAT ( $p=0,015$ ) no tempo 3h em relação aos demais tempos (0, 6 e 24h). Foram encontradas, ainda, diferenças ( $p=0,023$ ) entre os grupos controle e tratados com microplásticos no tempo 3h (Figura 7.B).

Na análise da atividade da superóxido dismutase (SOD), foram encontradas diferenças significativas entre os tempos ( $p=0,041$ ) (Figura 7.C). Além disso, foram encontradas diferenças dentro do grupo tratado com microplásticos entre os tempos 0h e 3h (Figura 9 (a) e (b)) ( $p=0,049$ ), quando houve uma diminuição da SOD no tempo 3 horas, porém estabilizou-se com o passar do tempo de exposição aos microplásticos de polietileno (PE) (Figura 7.C (ab)).

## DISCUSSÃO

O intestino de *C. macropomum* é histologicamente caracterizado pela estrutura básica encontrada em teleósteos composta por quatro camadas histológicas, sendo elas a camada mucosa, formada por epitélio cilíndrico simples com microvilosidades, células caliciformes e lâmina própria; a camada submucosa formada por tecido conjuntivo frouxo com fibroblastos presentes para a atuação no reparo tecidual; a camada muscular composta por fibras musculares estriadas e mais externamente a camada serosa formada por epitélio pavimentoso simples (Diaz et al. 2006, de Matos et al. 2017).

No presente estudo foram observadas apenas alterações histológicas nas duas primeiras camadas intestinais (mucosa e submucosa), em indivíduos de *C. macropomum*, expostos a 100 mg de partículas de microplásticos/Kg de ração comercial durante 24h. Alterações como abrasão, hiperplasia das células caliciformes, hipertrofia, obstrução vascular e inflamação foram encontradas podendo estar associadas ao início de alterações consideradas mais graves se a ração com MP for administrada em maior concentração e tempo de exposição (Rodriguez-Seijo et al. 2017, Hamed et al. 2019, Qiao et al. 2019b, Ahrendt et al. 2020, Malafaia et al. 2020).

A abrasão, alteração tecidual caracterizada em desgaste por fricção ou atrito por meio de alimentos e/ou outros compostos ingeridos, foi encontrada no presente estudo, em intestinos de *C. macropomum* em resposta ao atrito das partículas de microplásticos com o epitélio intestinal. Segundo Eerkes-Medrano et al. (2015) por se apresentarem como pequenas partículas sendo facilmente confundidas com alimentos, os microplásticos quando ingeridos podem causar lesões como abrasão interna e bloqueios. Ahrendt et al. (2020) observaram que a presença da abrasão em indivíduos de *Girella laevifrons* expostos por 45 dias a microplásticos de poliestireno (PS) resultou em perda e encurtamento das células das vilosidades intestinais. No presente estudo, não foi observado encurtamento das células das vilosidades intestinais devido ao tempo de exposição (24h); no entanto, a constante abrasão pode resultar em encurtamento das vilosidades intestinais (Zhang et al. 2022).

Além dessas alterações, Mbugani et al. (2022) encontraram modificações na largura e comprimento das vilosidades intestinais em larvas de *Oreochromis urolepis* expostas a partículas de microplásticos de polietileno (PE) de 45 µm por 65 dias. A abrasão nas vilosidades intestinais pode resultar em um desgaste e perda das células

dessas vilosidades como demonstrado por Ahrendt et al. (2020) e, conseqüentemente, em danos para o organismo exposto aos microplásticos, já que a presença e o tamanho das vilosidades intestinais estão intimamente relacionados com a absorção de nutrientes (Rotta 2003, Aguiar et al. 2018). Esses resultados corroboram os achados de Qiao et al. (2019) que ao expor juvenis de *zebrafish* a microplásticos de poliestireno (PS) por 21 dias, observaram danos nas vilosidades, no epitélio e na parede intestinal seguidos da presença de inflamação em 86% dos cortes histológicos analisados. Diversos trabalhos que descrevem os danos histopatológicos relacionados a exposição a microplásticos têm demonstrado danos intestinais semelhantes (Rodriguez-Seijo et al. 2017, Zhang et al. 2020a, Abarghouei et al. 2021).

No presente estudo, a alta produção de células mucosas pode estar relacionada à tentativa de proteção do tecido intestinal à abrasão. Limonta et al. (2019) observaram alterações na integridade do epitélio da mucosa, deslocamento epitelial e hipersecreção da mucosa, respondendo aos microplásticos. Sendo assim, sugere-se que as células mucosas são encontradas em maior quantidade em peixes expostos a microplásticos como resposta protetiva à abrasão. A hipertrofia (aumento no volume) e hiperplasia (aumento do número) das células caliciformes podem explicar o aumento do volume do muco encontrado no intestino (Jin et al. 2018). O aumento da produção e do volume de células caliciformes estão associados a proteção do tecido contra patógenos (Bosi and Sayyaf Dezfuli 2015) mas, também, podem estar associadas com a presença de microplásticos no tecido epitelial do intestino de indivíduos de *C. macropomum* expostos à partículas de microplásticos, como no caso do presente estudo.

A inflamação intestinal nada mais é do que uma resposta à lesão do tecido, que pode ocorrer para diminuir os efeitos e potencializar os reparos causados pela exposição aos microplásticos, podendo causar alterações na permeabilidade do intestino (Alhamoruni et al. 2012). Outros estudos têm observado a presença da inflamação intestinal em indivíduos expostos a microplásticos por 24h e 21 dias, respectivamente (Jeong et al. 2017, Qiao et al. 2019). Von Moos et al. (2012) observaram forte reposta inflamatória em mexilhões da espécie *Mytilus edulis* expostos a partículas de microplásticos de polietileno (PE) por 6h, devida à alta quantidade de granulocitomas encontrados. No presente trabalho foram encontrados focos inflamatórios na lâmina própria e submucosa tendo como consequência o aumento da presença de células de defesa. A presença de células de defesa e ocorrência de infiltrações leucocitárias indicam

que os indivíduos de *C. macropomum* estão respondendo à inflamação devido à exposição à partículas de microplásticos de polietileno (PE), semelhante ao encontrado por Ahrendt et al. (2020) que observaram inflamações por infiltração leucocitária e perda de células das vilosidades provocadas pela ação física causada pelo contato com partículas de microplásticos de poliestireno (PS) em *Girella laevis*.

Com relação aos efeitos fisiológicos encontrados no intestino de indivíduos de *C. macropomum* expostos a partículas de microplásticos de polietileno (PE), foram avaliados os níveis de lipoperoxidação lipídica (LPO) e as atividades das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Quando há um desequilíbrio entre as substâncias oxidantes e antioxidantes, ocorre o que chamamos de estresse oxidativo (Sies 1985) possibilitando a ação de espécies reativas de oxigênio. Para redução dos níveis do estresse oxidativo, são necessárias defesas antioxidantes, entre outras ação de enzimas como SOD (superóxido dismutase) e a CAT (catalase). O estresse oxidativo ocorre quando a produção das espécies reativas de oxigênio é maior do que a capacidade das defesas antioxidantes (Costa and Moradas-Ferreira 2001).

Uma vez que os microplásticos exercem efeitos tóxicos relacionados ao dano oxidativo, a determinação da atividade da LPO tem sido um importante biomarcador em testes ecotoxicológicos (Vieira et al. 2009). Nossos resultados apontam que a lipoperoxidação lipídica (LPO) apresentou tendência de aumento no tempo 3h no grupo experimental exposto ao microplástico, enquanto nos demais tempos manteve níveis similares no intestino. Nossos resultados contrastam com os de Barboza et al. (2018) que, analisando danos na membrana plasmática em células do cérebro, observaram aumento de LPO em exposição de indivíduos da espécie de peixe *Dicentrarchus labrax* a partículas de microplásticos a partir de 96h. Esses dados sugerem que a atividade de LPO pode ser alterada com o aumento do tempo de exposição a essas partículas de microplásticos fornecidas aos organismos experimentais e que, no decorrer do experimento essa enzima alcança momentos de pico, porém voltam aos níveis do controle.

Em *C. macropomum* o tempo de exposição de 24h pode não ter sido suficiente para desencadear danos de lipoperoxidação celular, embora os achados histopatológicos tenham evidenciado a inflamação e a abrasão do epitélio intestinal. Em contrapartida, o aumento da CAT no tempo 3h com a ingestão de ração com microplásticos pode ter sido um efeito de proteção contra os danos de lipoperoxidação por meio do estresse oxidativo, explicando a manutenção dos níveis de LPO. O aumento da atividade da CAT pode

apresentar-se como uma resposta aguda no tempo 3h no grupo exposto ao microplástico em decorrência da própria digestão e sinais de pré-inflamação. Talvez em uma exposição crônica, ou seja, mais de 24h de exposição, o organismo tenha um primeiro pico de atividade da CAT, que ocorre nas primeiras horas, mas depois mantém-se e somente quando o tempo de exposição aos microplásticos aumenta a atividade das enzimas volta a aumentar.

Abarghouei et al. (2021) observaram em exemplares de *Carassius auratus* expostos à partículas de microplásticos de poliestireno (PS), os níveis de SOD aumentados no decorrer de 28 dias. Diferentemente do presente estudo, o qual a enzima SOD apresentou tendência de aumento de suas atividades em indivíduos de *C. macropomum* ainda no tempo 0. Essa questão pode se basear no fato dos indivíduos estarem em condição de privação alimentar no período anterior ao experimento. Bayir et al. (2011) explicam que a privação prolongada (48h) aumenta as atividades enzimáticas de SOD em *Salmo trutta*, podendo até induzir estresse oxidativo. Porém, três horas após os indivíduos de *C. macropomum* serem alimentados com ração contendo microplásticos, SOD apresentou um declínio em (T=3h), indicando uma queda nas primeiras horas pós ingestão de ração contaminada com microplásticos, seguido de tendência de aumento e estabilização conforme o tempo de exposição aumentou, intimamente associada com a enzima CAT.

De forma geral, os níveis de LPO não apresentaram diferenças significativas em decorrência da ação da CAT no intestino contra as espécies reativas de oxigênio. Enquanto a CAT estava ativa impedindo o acúmulo do radical  $\text{OH}^+$ , principal iniciador da lipoperoxidação lipídica, LPO manteve seus níveis, não demonstrando oscilações (Barbosa et al. 2010). A SOD apresentou pico nas horas anteriores ao experimento devido à privação alimentar (Bayir et al. 2011) e, mesmo com o aumento da exposição aos microplásticos, manteve seus níveis de atividade constantes. A resposta das enzimas antioxidantes em intestino sugere que os indivíduos de *C. macropomum* neutralizam o ataque das espécies reativas de oxigênio por meio das defesas antioxidantes, impedindo o ataque delas sobre as membranas plasmáticas, protegendo-as da lipoperoxidação lipídica (Ribeiro F. 2016).

## CONCLUSÃO

Considerando-se os aspectos relatados, o trato gastrointestinal dos indivíduos analisados, em especial a primeira porção intestinal, apresentou efeitos de grau I, reversíveis durante a exposição aguda a partículas de microplásticos.

As alterações na morfologia do tecido intestinal de indivíduos de *C. macropomum* expostos a microplásticos de polietileno (PE) até 24h, foram: abrasão, hipertrofia e hiperplasia das células caliciformes, obstrução vascular e inflamação intestinal.

As atividades das enzimas CAT e SOD e a lipoperoxidação lipídica (LPO) não demonstraram graves danos, porém apresentaram início de indução de estresse oxidativo em indivíduos de *C. macropomum* expostos a partículas de microplásticos de polietileno na ração nas primeiras 24h experimentais.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir de tudo que foi explanado anteriormente, sugerimos que trabalhos futuros concentrem suas pesquisas em fatores abióticos como a sazonalidade da região (seca, cheia, vazante, enchente); e como o pulso de inundação pode interferir no processo de aceleração da fragmentação, no transporte e no contato com a biota da região amazônica, bem como uma possível influência dos diferentes tipos de águas (preta, branca e clara) sobre esses processos.

Sugerimos ainda, uma padronização de amostragem para cada ambiente da região, que devido a heterogeneidade de habitats (lagos, praias, rios, estuários), demanda certa especificidade de métodos. Pesquisas futuras devem focar ainda nos efeitos dos microplásticos na saúde alimentar humana da região que possui o maior consumo de proteína de peixe do país, garantindo assim, maior segurança alimentar para os povos dessa região. Sugerimos também, uma avaliação na possível contribuição da bacia amazônica para a poluição dos oceanos.

Quanto aos efeitos causados por partículas de microplásticos, sugerimos que maior tempo de exposição seja explorado. Sugerimos, ainda, que experimentos sejam realizados com diferentes espécies de peixes amazônicas para determinar que grau de vulnerabilidade essas espécies apresentam mediante aos microplásticos e até mesmo

combinados com estressores já conhecidos da região, como alta incidência de luz solar, altas temperaturas e hipóxia, por exemplo. Analisar os efeitos dos vários tipos de microplásticos (PS, PP, PET, PVC) encontrados nos ambientes amazônicos na morfologia e fisiologia dos peixes da região é recomendável. Investigar e explorar novos marcadores de efeitos deletérios como alterações na expressão gênica, desregulação endócrina, transferência transgeracional, também é importante para desenhar estratégias de conservação na Amazônia.

Com isso, a partir dos efeitos aqui explanados, sobre a ingestão de microplásticos por indivíduos de *C. macropomum* durante 24h de exposição, é imprescindível a ação de especialistas ambientais na conscientização de autoridades e comunidade, unindo-se para formar uma corrente de boas maneiras e políticas públicas aplicáveis para que o uso do plástico na região seja administrado de forma correta afim de diminuir o uso de plásticos de uso único e garantir meios de destinação correta para todos os demais tipos plásticos, para manter a sobrevivência dessa e de outras espécies de peixes, garantindo ainda, a segurança alimentar da comunidade.

## LEGENDA DE TABELAS

Tabela 1. Biometria dos indivíduos de *Colossoma macropomum* do grupo controle e de tratamento com partículas de microplásticos de polietileno. Na tabela são listadas médias e desvios padrões do comprimento e peso corporal e comprimento e peso do intestino.

Tabela 2. Médias e desvios padrões de pH, oxigênio dissolvido (OD) e temperatura da água utilizada no experimento.

Tabela 3. Alterações histopatológicas observadas no intestino de *Colossoma macropomum* expostos a partículas de microplásticos de polietileno (PE). Em destaque o aumento da presença de abrasão no decorrer do tempo de exposição e obstrução vascular que pode ser classificada como alteração histopatológica de grau II.

Tabela 1.

<b>Grupo</b>	<b>Comprimento corporal</b>	<b>Peso corporal</b>	<b>Comprimento intestinal</b>	<b>Peso trato gastrointestinal</b>
Controle	11,41±0,79	48,92±7,07	18,87±2,82	2,66±0,87
Tratamento	11,29±0,84	49,56±10,52	20,16±3,25	2,96±1,07

Tabela 2

<b>Grupo</b>	<b>pH</b>	<b>OD</b>	<b>Temperatura</b>
Controle	6,43±0,64	6,73±0,60	25,83±0,93
Tratamento	6,46±0,51	6,56±0,47	25,79±0,89

Tabela 3.

Intestinal Layer	Alteration	Damage Stage	Treatments (Relative frequency of occurrence %)				
			0h	3h	6h	24h	
<b>Mucosa</b>	Desquamation	I	1,51	4,70	8,95	7,81	
	Abrasion	I	4,54	<b>21,17</b>	<b>26,86</b>	<b>28,12</b>	
	Compression	I	0	0	0	0	
	Villi hipertrophy	I	0	0	0	0	
	Globet cell hypertrophy	I	16,66	11,761	2,98	7,81	
	Hemorrhage	I	0	1,17	0	0	
	Leukocyte infiltration	I	48,48	40	44,77	45,31	
	Villi disappearance	II	0	0	0	0	
	Globet cell hyperplasia	II	28,78	21,17	16,41	10,93	
	Fibrosis	II	0	0	0	0	
	Necrosis	III	0	0	0	0	
	<b>Submucosa</b>	Metaplasia	I	0	0	0	0
		Leukocyte infiltration	I	42,62	45,33	45,28	45,09
		Vascular edema	I	50,81	42,66	50,94	50,98
Hyperplasia Vascular		II	0	0	0	0	
obstruction		II	6,55	<b>12</b>	3,77	3,92	
Fibrosis		II	0	0	0	0	
Necrosis		III	0	0	0	0	

## REFERÊNCIAS

- Abarghouei, S.; Hedayati, A.; Raeisi, M.; Hadavand, B.S.; Rezaei, H.; Abed-Elmdoust, A. 2021. Size-dependent effects of microplastic on uptake, immune system, related gene expression and histopathology of goldfish (*Carassius auratus*). *Chemosphere* 276: 129977.
- Abbasi, S.; Soltani, N.; Keshavarzi, B.; Moore, F.; Turner, A.; Hassanaghahi, M. 2018. Microplastics in different tissues of fish and prawn from the Musa Estuary, Persian Gulf. *Chemosphere* 205: 80–87.
- Aguiar, L.S.; de Oliveira, M.I.B.; de Matos, L.V.; Gomes, A.L.S.; da Costa, J.I.; da Silva, G.S. 2018. Distribution of the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* and semiquantitative analysis of histopathological damage in the intestine of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Parasitology Research* 117: 1689–1698.
- Ahrendt, C.; Perez-Venegas, D.J.; Urbina, M.; Gonzalez, C.; Echeveste, P.; Aldana, M.; et al. 2020. Microplastic ingestion cause intestinal lesions in the intertidal fish *Girella laevis*. *Marine Pollution Bulletin* 151: 110795.
- Alhamoruni, A.; Wright, K.L.; Larvin, M.; O’Sullivan, S.E. 2012. Cannabinoids mediate opposing effects on inflammation-induced intestinal permeability. *British Journal of Pharmacology* 165: 2598–2610.
- Amato-Lourenço, L.F.; dos Santos Galvão, L.; de Weger, L.A.; Hiemstra, P.S.; Vijver, M.G.; Mauad, T. 2020. An emerging class of air pollutants: Potential effects of microplastics to respiratory human health? *Science of the Total Environment* 749: 141676.
- Araújo, F.G. 1998. Adaptação do índice de integridade biótica usando a comunidade de peixes para o rio Paraíba do Sul. *Revista Brasileira de Biologia* 58: 547–558.

- Barbosa, K.B.F.; Costa, N.M.B.; De Cássia Gonçalves Alfenas, R.; De Paula, S.O.; Minim, V.P.R.; Bressan, J. 2010. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutricao* 23: 629–643.
- Barboza, A.; Russo, L.; Branco, V.; Figueiredo, N.; Carvalho, F.; Carvalho, C.; et al. 2018. Microplastics cause neurotoxicity , oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass, *Dicentrarchus labrax* ( Linnaeus , 1758 ). *Aquatic Toxicology* 195: 49–57.
- Barletta, M.; Lima, A.R.A.; Costa, M.F. 2019. Distribution, sources and consequences of nutrients, persistent organic pollutants, metals and microplastics in South American estuaries. *Science of the Total Environment* 651: 1199–1218.
- Barnes, D.K.A.; Galgani, F.; Thompson, R.C.; Barlaz, M. 2009a. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364: 1985–1998.
- Bayir, A.; Sirkecioglu, A.N.; Bayir, M.; Haliloglu, H.I.; Kocaman, E.M.; Aras, N.M. 2011. Metabolic responses to prolonged starvation, food restriction, and refeeding in the brown trout, *Salmo trutta*: Oxidative stress and antioxidant defenses. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 159: 191–196.
- Beutler, E. 1975. Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. *The Pacific Basin*: 195–203.
- Bezerra, R.F. 2013. Abordagens bioquímicas e biotecnológicas dos peixes amazônicos pirarucu (*Arapaima gigas*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*). : 151.
- Bosi, G.; Sayyaf Dezfuli, B. 2015. Responses of *Squalius cephalus* intestinal mucous cells to *Pomphorhynchus laevis*. *Parasitology International* 64: 167–172.

- Bradford, M.M. 1976. Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. *Crop Journal* 5: 407–415.
- Caruso, G.; Pedà, C.; Cappello, S.; Leonardi, M.; La Ferla, R.; Lo Giudice, A.; et al. 2018. Effects of microplastics on trophic parameters, abundance and metabolic activities of seawater and fish gut bacteria in mesocosm conditions. *Environmental Science and Pollution Research* 25: 30067–30083.
- Cera, A.; Scalici, M. 2021. Freshwater wild biota exposure to microplastics: A global perspective. *Ecology and Evolution* 11: 9904–9916.
- Cole, M.; Galloway, T.S. 2015. Ingestion of nanoplastics and microplastics by Pacific oyster larvae. .
- Cole, M.; Lindeque, P.; Fileman, E.; Halsband, C.; Goodhead, R.; Moger, J.; et al. 2013. Microplastic ingestion by zooplankton. *Environmental Science and Technology* 47: 6646–6655.
- Costa, V.; Moradas-Ferreira, P. 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: Insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine* 22: 217–246.
- Diaz, A.O.; Escalante, A.H.; García, A.M.; Goldemberg, A.L. 2006. Histology and histochemistry of the pharyngeal cavity and oesophagus of the silverside *Odontesthes bonariensis* (Cuvier and Valenciennes). *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia* 35: 42–46.
- Ding, J.; Zhang, S.; Razanajatovo, R.M.; Zou, H.; Zhu, W. 2018. Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Pollution* 238: 1–9.

- Eerkes-Medrano, D.; Thompson, R.C.; Aldridge, D.C. 2015. Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water Research* 75: 63–82.
- Espinosa, C.; García Beltrán, J.M.; Esteban, M.A.; Cuesta, A. 2018. In vitro effects of virgin microplastics on fish head-kidney leucocyte activities. *Environmental Pollution* 235: 30–38.
- F., F.L. and O. 1984. [10] Assays. *Methods* 105: 93–104.
- Fausch, K.D.; Lyons, J.; Karr, J.R.; Angermeier, P.L. 1990. Fish communities as indicators of environmental degradation. *American Fisheries Society Symposium* 8: 123–144.
- Fendall, L.S.; Sewell, M.A. 2009. Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Marine Pollution Bulletin* 58: 1225–1228.
- Francisca Inês Gomes Novais Ribeiro. 2016. Polystyrene Microplastics Accumulation and Biomarkers Response in *Scrobicularia plana*. *Universidade de Algarve* 3.
- Geyer, R.; Jambeck, J.R.; Law, K.L. 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made - Supplementary Information. *Science Advances* 3: 19–24.
- Guilhermino, L.; Vieira, L.R.; Ribeiro, D.; So, A.; Cardoso, V.; Alves, A.; et al. 2018. Science of the Total Environment Uptake and effects of the antimicrobial flufenicol, microplastics and their mixtures on freshwater exotic invasive bivalve *Corbicula fluminea*. 623: 1131–1142.
- Hamed, M.; Soliman, H.A.M.; Osman, A.G.M.; Sayed, A.E.D.H. 2019. Assessment the effect of exposure to microplastics in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) early juvenile: I. blood biomarkers. *Chemosphere* 228: 345–350.

- Horton, A.A.; Walton, A.; Spurgeon, D.J.; Lahive, E.; Svendsen, C. 2017. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Science of the Total Environment* 586: 127–141.
- Ivar do Sul, J.A. 2014. Contaminação ambiental por microplásticos em Fernando de Noronha , Abrolhos e Trindade.
- Jeong, C.B.; Kang, H.M.; Lee, M.C.; Kim, D.H.; Han, J.; Hwang, D.S.; et al. 2017. Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclopsina nana*. *Scientific Reports* 7: 1–11.
- Jiang, Z.Y.; Hunt, J. V.; Wolff, S.P. 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry* 202: 384–389.
- Jin, Y.; Xia, J.; Pan, Z.; Yang, J.; Wang, W.; Fu, Z. 2018. Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish. *Environmental Pollution* 235: 322–329.
- Lebreton, L.; Andrady, A. 2019. Future scenarios of global plastic waste generation and disposal. *Palgrave Communications* 5: 1–11.
- Lei, L.; Wu, S.; Lu, S.; Liu, M.; Song, Y.; Fu, Z.; et al. 2018. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science of the Total Environment* 619–620: 1–8.
- Leslie, H.A.; Velzen, M.J.M. Van; Brandsma, S.H.; Garcia-vallejo, J.J.; Lamoree, M.H. 2022. blood. *Environment International*: 107199.

- Li, D.; Shi, Y.; Yang, L.; Xiao, L.; Kehoe, D.K.; Gun'ko, Y.K.; et al. 2020. Microplastic release from the degradation of polypropylene feeding bottles during infant formula preparation. *Nature Food* 1: 746–754.
- Limonta, G.; Mancina, A.; Benkhalqui, A.; Bertolucci, C.; Abelli, L.; Fossi, M.C.; et al. 2019. Microplastics induce transcriptional changes, immune response and behavioral alterations in adult zebrafish. *Scientific Reports* 9: 1–11.
- Malafaia, G.; de Souza, A.M.; Pereira, A.C.; Gonçalves, S.; da Costa Araújo, A.P.; Ribeiro, R.X.; et al. 2020. Developmental toxicity in zebrafish exposed to polyethylene microplastics under static and semi-static aquatic systems. *Science of the Total Environment* 700: 134867.
- de Matos, L. V.; de Oliveira, M.I.B.; Gomes, A.L.S.; da Silva, G.S. 2017. Morphological and histochemical changes associated with massive infection by *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in the farmed freshwater fish *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 from the Amazon State, Brazil. *Parasitology Research* 116: 1029–1037.
- Mbugani, J.J.; Machiwa, J.F.; Shilla, D.A.; Kimaro, W.; Joseph, D.; Khan, F.R. 2022. Histomorphological Damage in the Small Intestine of Wami Tilapia (*Oreochromis urolepis*) (Norman, 1922) Exposed to Microplastics Remain Long after Depuration. *Microplastics* 1: 240–253.
- Von Moos, N.; Burkhardt-Holm, P.; Köhler, A. 2012. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environmental Science and Technology* 46: 11327–11335.
- Prata, J.C.; da Costa, J.P.; Lopes, I.; Duarte, A.C.; Rocha-Santos, T. 2020. Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Science of the Total Environment* 702: 134455.
- Qiao, R.; Sheng, C.; Lu, Y.; Zhang, Y.; Ren, H.; Lemos, B. 2019a. Microplastics induce

intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish. *Science of the Total Environment* 662.

Qiao, R.; Deng, Y.; Zhang, S.; Wolosker, M.B.; Zhu, Q.; Ren, H.; et al. 2019b. Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish. *Chemosphere* 236: 124334.

Ragusa, A.; Svelato, A.; Santacroce, C.; Catalano, P.; Notarstefano, V.; Carnevali, O.; et al. 2021. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment International* 146: 106274.

Rodriguez-Seijo, A.; Lourenço, J.; Rocha-Santos, T.A.P.; da Costa, J.; Duarte, A.C.; Vala, H.; et al. 2017. Histopathological and molecular effects of microplastics in *Eisenia andrei* Bouché. *Environmental Pollution* 220: 495–503.

Ross, M.H.; Pawlina, W. 2016. Ross: Histologia Texto e Atlas. *Society*: 1452.

Rotta, M.A. 2003. Aspectos Gerais da Fisiologia e Estrutura do Sistema Digestivo dos Peixes Relacionados à Piscicultura. .

de Sá, L.C.; Oliveira, M.; Ribeiro, F.; Rocha, T.L.; Futter, M.N. 2018. 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* 645: 1029–1039.

Santos, C.M.; Duarte, S.; Souza, T.G.L.; Ribeiro, T.P.; Sales, A.; Araújo, F.G. 2008. Histologia e caracterização histoquímica do tubo gastrintestinal de *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) no reservatório de Funil, Rio de Janeiro, Brasil. *Iheringia. Série Zoologia* 97: 411–417.

Sartori. 2012. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. .

- SIES, H. 1985. *Oxidative Stress: Introductory Remarks*. PERGAMON PRESS INC., 1–8p.
- Silva, A.B.; Marmontel, M. 2009. INGESTÃO DE LIXO PLÁSTICO COMO PROVÁVEL CAUSA MORTIS DE PEIXE-BOI AMAZÔNICO (*Trichechus inunguis* NATTERER, 1883). *Uakari*: 105–112.
- Val, A.L. 2019. Fishes of the Amazon: diversity and beyond. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 91 3: e20190260.
- Val, A.L.; Fearnside, P.M.; Almeida-Val, V.M.F. 2016. Environmental disturbances and fishes in the Amazon. *Journal of Fish Biology* 89: 192–193.
- Vieira, L.R.; Gravato, C.; Soares, A.M.V.M.; Morgado, F.; Guilhermino, L. 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere* 76: 1416–1427.
- Watts, A.J.R.; Urbina, M.A.; Goodhead, R.; Moger, J.; Lewis, C.; Galloway, T.S. 2016. Effect of Microplastic on the Gills of the Shore Crab *Carcinus maenas*. *Environmental Science and Technology* 50: 5364–5369.
- Zhang, C.; Pan, Z.; Wang, S.; Xu, G.; Zou, J. 2022. Size and concentration effects of microplastics on digestion and immunity of hybrid snakehead in developmental stages. *Aquaculture Reports* 22: 100974.
- Zhang, Y.; Wolosker, M.B.; Zhao, Y.; Ren, H.; Lemos, B. 2020a. Exposure to microplastics cause gut damage, locomotor dysfunction, epigenetic silencing, and aggravate cadmium (Cd) toxicity in *Drosophila*. *Science of the Total Environment* 744: 140979.
- Zhang, Y.; Kang, S.; Allen, S.; Allen, D.; Gao, T.; Sillanpää, M. 2020b. Atmospheric microplastics: A review on current status and perspectives. *Earth-Science Reviews*

203: 103118.