



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Urutaí
Programa de Pós-Graduação em Conservação de
Recursos Naturais do Cerrado

**Toxicidade e transferência trófica do microplástico
polietileno de *Poecilia reticulata* para *Danio rerio*:
efeito da exposição via dieta e da captura direta**

AMANDA PEREIRA DA COSTA ARAÚJO

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Malafaia

Urutaí, fevereiro de 2020



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano

Reitor

Prof. Dr. Elias de Pádua Monteiro

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. Alan Carlos da Costa

Campus Urutaí

Diretor Geral

Prof. Dr. Paulo César Ribeiro da Cunha

Diretor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. Anderson Rodrigo da Silva

Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado

Coordenador

Prof. Dr. Daniel de Paiva Silva

Urutaí, fevereiro de 2020

AMANDA PEREIRA DA COSTA ARAÚJO

TOXICIDADE E TRANSFERÊNCIA TRÓFICA DO
MICROPLÁSTICO POLIETILENO DE *Poecilia reticulata*
PARA *Danio rerio*: EFEITO DA EXPOSIÇÃO VIA DIETA
E DA CAPTAÇÃO DIRETA

Orientador

Prof. Dr. Guilherme Malafaia

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano -
Campus Urutaí, como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do
Cerrado para obtenção do título de Mestre.

URUTAÍ (GO)

2020

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

AAR663 t Araújo, Amanda Pereira da Costa
Toxicidade e transferência trófica do
microplástico polietileno de *Poecilia reticulata*
para *Danio rerio*: efeito da exposição via dieta e da
captação direta / Amanda Pereira da Costa
Araújo; orientador Guilherme Malafaia . -- Urutaí,
2020.
51 p.

Dissertação (em Programa de Pós-Graduação em
Conservação de Recursos Naturais do Cerrado) --
Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí, 2020.

1. Poluição aquática. 2. Micropoluentes. 3. Cadeia
alimentar. 4. Vertebrados. 5. Plásticos. I. ,
Guilherme Malafaia, orient. II. Título.



FICHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Titulo da dissertação:	Toxicidade e transferência trófica do microplástico polietileno de <i>Psephenus reticulata</i> para <i>Ilex uruciana</i> : efeito da exposição via dieta e da captura direta
Orientador:	Prof. Dr. Guilherme Malafaia
Autora:	Amanda Pereira da Costa Araújo

Dissertação de Mestrado **APROVADA** em 27 de fevereiro de 2020, como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRA EM CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS DO CERRADO**, pela Banca Examinadora especificada a seguir:



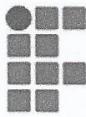
Prof. Dr. Guilherme Malafaia
Instituto Federal Goiano – Campus Urutai



Prof. Dr. André Luis da Silva Castro
Instituto Federal Goiano – Campus Urutai



Prof.ª Dra. Maria Alice Pires Moreira
Instituto Federal Goiano – Campus Urutai



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Amanda Pereira da Costa Araújo

Matrícula: 2018101330940021

Título do Trabalho: Atividade e transformações químicas dos micropólios gelatinosos de Placida reticulada para Purificação de água

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 17/03/20

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

União _____, 17 / 03 / 20
Local Data

Amanda P. P. Araújo

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

[Assinatura]
Assinatura do(a) orientador(a)

Aos meus pais, **Anivaldo e Maria Inez**, por sempre acreditarem em mim, por todo amor, incentivo, apoio e compreensão.

À minha irmã, **Mariane**, por ter sido meu apoio em poucas palavras.

À minha pequena afilhada, **Laura**,
por ter mudado a minha vida desde o seu nascimento.
Nada disso teria sentido se vocês não existissem na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter sido fortaleza em minha vida, especialmente nesses dois anos de mestrado. Por ter me mantido firme no propósito de realizar meus projetos e finalizar mais essa etapa.

Ao **Prof. Guilherme Malafaia**, pela orientação, competência e imensa dedicação em momentos tão especiais. A você agradeço, principalmente, por ter acreditado em mim. Sou enormemente grata pelo estímulo diário e pelas conversas motivacionais. Jamais chegaria nesse ponto sem seu apoio.

Aos membros da banca examinadora, **Profa. Dra. Maria Alice Pires Moreira** e **Prof. Dr. André Luis da Silva Castro**, que tão gentilmente aceitaram participar e contribuir com esta dissertação.

Aos membros do **Laboratório de Pesquisas Biológicas**, em especial ao Abner Marcelino, Alex Rodrigues, Ítalo Freitas e Thiarlen Marinho, pelos momentos de distração, preocupação demonstrada e risadas. A todos os demais colegas de trabalho, obrigada pelo convívio e apoio.

À minha **mãe** e ao meu **pai** deixo um agradecimento especial, por todas as lições de amor, companheirismo, amizade, compreensão pelo meu isolamento nos finais de semana e pelo perdão que me dão a cada novo dia. Sinto-me orgulhosa, motivada e privilegiada por terem pais tão especiais, e por terem abdicado de suas vidas em prol da minha felicidade. E à minha **irmã** querida, sempre pronta a me apoiar em tudo nesta vida.

Aos meus tios e afilhada (**Maria Beatriz, Roberto Júnior** e **Laura**). Vocês são muito importantes para mim e são parte das minhas conquistas.

Ao **Instituto Federal Goiano Campus Urutaí**, pela concessão de bolsa e oportunidades ofertadas desde à minha graduação ao mestrado.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. Microplástico.....	13
2.2. Modelos animais e cadeia alimentar experimental.....	13
2.3. Procedimentos experimentais e delineamento da pesquisa.....	14
2.3.1. Exposição e preparação de <i>P. reticulata</i> (Etapa I).....	14
2.3.2. Exposição de <i>Danio rerio</i> (Etapa II).....	14
2.4. Biomarcadores de toxicidade.....	15
2.4.1. Testes comportamentais.....	16
2.4.1.1. Teste do campo aberto e tanque novo.....	16
2.4.1.2. Teste de cardume: habituação e estímulos aquáticos.....	17
2.4.1.3. Teste de cardume: estímulo predatório aéreo.....	18
2.4.1.4. Avaliação da atividade dos animais estímulo.....	20
2.4.2. Mutagenicidade.....	20
2.4.3. Citotoxicidade.....	20
2.4.4. Glicemia.....	21
2.5. Quantificação de microplásticos.....	21
2.6. Qualidade físico-química das águas de exposição.....	22
2.7. Análises estatísticas.....	22
3. RESULTADOS	22
4. DISCUSSÃO	35
5. CONCLUSÃO	40
6. REFERÊNCIAS	40
7. MATERIAL SUPLEMENTAR	51

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Desenho esquemático das etapas I (A) e II (B) e delineamento geral do experimento. As cores são meramente ilustrativas. MP PE: microplástico de polietileno.....15
- Figura 2.** Desenhos esquemáticos do (A) aparato utilizado no teste do tanque novo, (B) campo aberto (com as demarcações das zonas central e periférica), da metodologia adotada na determinação da (C) distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto, (D) no cálculo dos escores de cluster utilizados na avaliação da coesão do cardume em todas as sessões e (E) na medição da distância entre os *D. rerio* e seu potencial predador e da (G) superfície d'água. (F) Representação do teste de resposta ao ataque simulado por um predador aéreo. (F₁) vista de cima para baixo e (F₂) vista lateral. As cores são meramente ilustrativas.....19
- Figura 3.** (A-C) Número de MPs PE identificados nos órgãos dos peixes (*Danio rerio*). (D) Imagens dos MPs PE no trato gastrointestinal de alevinos de *P. reticulata*.23
- Figura 4.** Número de MPs PE identificados nos órgãos de *Danio rerio*.....24
- Figura 5.** (A-J) Parâmetros relativos aos testes preditivos de ansiedade avaliados individualmente nos diferentes grupos de *Danio rerio*.....25
- Figura 6.** (A-B) Scores de cluster do comportamento dos *D. rerio* na ausência e presença dos estímulos predatórios no teste para avaliação do cardume.....27
- Figura 7.** (A) Distância dos peixes na ausência e presença dos estímulos predatórios no teste para avaliação do cardume. (B) Distância do cardume da lâmina d'água antes e depois do estímulo predatório aéreo. NP: não predador (*M. affinis*); P: predador (*G. brasiliensis*); A: antes do estímulo; D: depois do estímulo.....28
- Figura 8.** Distância percorrida (cm) pelos estímulos (A) não predatório e (B) predatório durante as distintas sessões dos testes.....28
- Figura 9.** (A) Frequência total de anormalidades nucleares encontradas nos *Danio rerio* expostos ou não aos MPs PE.....29
- Figura 10.** (A-F) Frequência de anormalidades nucleares eritrocitárias identificadas em adultos de *Danio rerio* expostos ou não aos MPs PE.....30
- Figura 11.** Área e volume citoplasmático e nuclear de eritrócitos de *D. rerio* submetidos ou não aos MPs PE.....31

Figura 12. Elongação e circularidade dos eritrócitos e de seus núcleos de <i>D. rerio</i> submetidos ou não aos MPs PE.....	32
Figura 13. Glicemia de <i>D. rerio</i> submetidos ou não aos MPs PE.....	33

RESUMO

Embora a toxicidade dos microplásticos (MPs) já tenha sido relatada, sua potencial transferência entre vertebrados do mesmo grupo taxonômico, bem como seus impactos em níveis tróficos superiores são aspectos ainda pouco explorados. Assim, a partir do estabelecimento de uma cadeia alimentar experimental envolvendo duas espécies de peixes, testamos a hipótese de que os MPs de polietileno (MPs PE) podem se acumular nos animais e causar alterações comportamentais, mutagênicas e citotóxicas no nível trófico superior. Para isso, expusemos alevinos de *Poecilia reticulata* aos MPs PE (por 48 h) e na sequência os oferecemos a adultos de *Danio rerio* (i.e.: sistema-modelo representante do nível superior da cadeia alimentar) por um período de 10 dias. A quantificação dos MPs PE nos alevinos e em diferentes tecidos de *Danio rerio* revelou o acúmulo desses poluentes nos dois níveis tróficos avaliados, sugerindo sua absorção, aderência e translocação dentro dos organismos. No nível trófico superior, esse acúmulo (também observado em *D. rerio* expostos diretamente aos MPs) foi associado aos distúrbios comportamentais. Ao serem confrontados com um potencial predador aquático (*Geophagus brasiliensis*), esses animais exibiram comportamento sugestivo de déficit de resposta antipredatória (inferida pela menor coesão do cardume, menor profundidade do cardume e menor distanciamento do potencial predador). Além disso, os animais expostos aos MPs exibiram maiores taxas de anormalidades nucleares e alterações no tamanho e forma dos eritrócitos e seus núcleos, sugerindo efeito mutagênico e citotóxico, respectivamente. Em uma perspectiva mais ampla, nossos resultados demonstram pioneiramente que os microplásticos são transferidos via cadeia alimentar simples (envolvendo dois vertebrados), adentram nos órgãos, alteram o comportamento e são capazes de induzir mutagenicidade e citotoxicidade nos animais, o que pode ter consequências ecológicas drásticas nos ecossistemas dulcícolas.

Palavras-chaves: Poluição aquática, micropoluentes, plásticos, cadeia alimentar, vertebrados.

ABSTRACT

Although the toxicity of microplastics (MPs) has already been reported, their potential transfer between vertebrates of the same taxonomic group, as well as their impacts on higher trophic levels are aspects that are still little explored. Thus, from the establishment of an experimental food chain involving two species of fish, we tested the hypothesis that polyethylene MPs (PE MPs) can accumulate in animals and cause behavioral, mutagenic and cytotoxic changes at the upper trophic level. For this, we exposed *Poecilia reticulata* fingerlings to PE MPs (for 48 h) and then we offered them to *Danio rerio* adults (i.e., model system representing the upper level of the food chain) for a period of 10 days. The quantification of PE MPs in fry and in different tissues of *Danio rerio* revealed the accumulation of these pollutants in the two trophic levels evaluated, suggesting their absorption, adherence and translocation within the organisms. At the upper trophic level, this accumulation (also seen in *D. rerio* exposed directly to MPs) was associated with behavioral disorders. When confronted with a potential aquatic predator (*Geophagus brasiliensis*), these animals exhibited behavior suggestive of deficit of anti-predatory response (inferred by the lower cohesion of the school, less depth of the school and less distance from the potential predator). In addition, animals exposed to MPs exhibited higher rates of nuclear abnormalities and changes in the size and shape of erythrocytes and their nuclei, suggesting mutagenic and cytotoxic effects, respectively. In a broader perspective, our results demonstrate pioneeringly that microplastics are transferred via a simple food chain (involving two vertebrates), enter the organs, alter behavior and are capable of inducing mutagenicity and cytotoxicity in animals, which can have drastic ecological consequences in freshwater ecosystems.

Keywords: Water pollution, micropollutants, plastics, food chain, vertebrates.

1. INTRODUÇÃO

É sabido que uma das relações interespecíficas de importância ecológica essencial se refere à interação presa-predador em cadeias alimentares (Suedel et al., 1994). Tal interação oportuniza as relações alimentares entre as espécies dentro de uma comunidade e, conseqüentemente, a transferência de energia a partir de uma fonte (presa). Por outro lado, estudos têm demonstrado que a transferência trófica de poluentes favorece a dissipação de contaminantes entre cadeias alimentares para locais muito distantes da fonte de poluição. Isso tem sido observado por exemplo, em estudos com enfoque em diferentes poluentes, tais como metais pesados (Ali et al., 2019; Wang et al., 2020), agrotóxicos (Kim et al., 2019), poluentes orgânicos (Corsolini & Sarà, 2017; Ding et al., 2020), além daqueles de tamanho reduzido (e.g.: micropoluentes) e considerados emergentes, dado às baixas concentrações que podem ser encontradas nos ambientes naturais (Lailson-Brito et al., 2008).

Um caso particular, refere-se à dissipação dos microplásticos (MPs) nos ambientes dulcícolas, bem como seus efeitos na biota aquática. O grande volume de estudos sobre a toxicidade desses micropoluentes em animais marinhos (Cole et al., 2011; Wright et al., 2013; Sá et al., 2018; Bellas & Gil, 2020; Piccardo et al., 2020; Li et al., 2020; Choi et al., 2020), denuncia a carência de trabalhos sobre seus efeitos em organismos de água doce, além de sua possível transferência alimentar e impacto nos níveis tróficos superiores. Tal lacuna fica ainda mais evidente quando se analisa os estudos revistos por Au et al. (2017). De acordo com os autores, a identificação de MPs em predadores de nível trófico superior que habitam distintos habitats sugere fortemente que a transferência desses poluentes nas cadeias alimentares pode ser um fenômeno comum nos ecossistemas aquáticos. No entanto, em que nível trófico esse fenômeno pode ser mais comum e quais os efeitos ao serem absorvidos por consumidores de presas contaminadas são muito pouco conhecidos.

No ambiente aquático, a transferência física dos MPs entre invertebrados pode ser observada, por exemplo, de *Mytilus edulis* a *Carcinus maenas* (Farrell & Nelson, 2013), de *M. edulis* a *Necora puber* (Crooks et al., 2019) e de mesozooplâncton a macrozooplâncton (Setälä et al., 2014). Já a transferência trófica desses poluentes entre invertebrados e vertebrados foi demonstrada nos estudos de Cedervall et al. (2012), Batel et al. (2016), Tosetto et al. (2017), Bour et al. (2018) e, mais recentemente, por Walkinshaw et al. (2020). É indubitável a contribuição desses estudos para compreensão da dispersão dos MPs ao longo das cadeias/teias tróficas, dos fatores que colaboram para o acúmulo nos distintos níveis tróficos, assim como para a identificação dos organismos mais ou menos susceptíveis à bioacumulação e biomagnificação desses micropoluentes. Entretanto, grande parte desses e de outros estudos da área têm dado

enfoque em cadeias alimentares constituídas por organismos marinhos, sendo menor o número de trabalhos que investigaram a transferência dos MPs em cadeias alimentares fluviais.

Portanto, é imperativo reconhecer que o entendimento sobre seus efeitos em organismos de água doce (especialmente vertebrados) ainda é muito superficial (Eerkes-Medrano et al., 2015; Horton et al., 2017), quando comparado ao que sabemos sobre a presença e efeito dos MPs no ambiente marinho (Andrady, 2011; Hidalgo-Ruz et al., 2012; Cole et al., 2011; Bessa et al., 2018, Jiang, 2018). Particularmente, em relação aos peixes dulcícolas, nosso conhecimento sobre os efeitos da poluição de seus habitats por MPs concentra-se em avaliações experimentais em nível individual, utilizando concentrações muito superiores àquelas possivelmente encontradas nos ambientes naturais (Oliveira et al., 2013; Lu et al., 2016; Karami et al., 2016; Ding et al., 2018; Lu et al., 2018; Pannetier et al., 2020; Wang et al., 2020). Além de desconhecermos a possível transferência desses poluentes entre vertebrados do mesmo grupo taxonômico (i.e., de peixe dulcícolas para peixes dulcícolas), nada sabemos sobre sua subletalidade nesses animais. Logo, evidencia-se a necessidade de mais pesquisas para melhor entendimento dos impactos dos poluentes absorvidos na transferência trófica de MPs em sistemas de água doce, onde as interações químicas entre organismos e os poluentes podem diferir daquelas ocorridas em ambientes marinhos.

Nesse sentido, objetivamos investigar a transferência trófica dos MPs de polietileno utilizando alevinos de *Poecilia reticulata* (como presas) e adultos de *Danio rerio* (como consumidores de nível trófico superior), simulando uma cadeia alimentar estabelecida em diferentes ambientes dulcícolas. Além disso, visando identificar as consequências da ingestão de presas contaminadas com MPs e da exposição direta ao poluente, avaliamos possíveis alterações comportamentais (em nível individual e social), bem como efeitos mutagênicos e citotóxicos no nível trófico superior da cadeia alimentar experimental. Além de pressupormos a ocorrência da transferência trófica entre os distintos níveis tróficos, testamos a hipótese de que os MPs (absorvidos pela via dietética e direta) induzem comportamento preditivo de ansiedade, alterações locomotoras e déficit de resposta defensiva antipredatória social, além do aumento na frequência de micronúcleos (e outras anormalidades nucleares) e alterações morfométricas em eritrócitos circulantes. A partir de diferentes biomarcadores de toxicidade, nosso estudo expande o conhecimento sobre os riscos ecotoxicológicos dos MPs quando presentes em águas doces.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microplástico

Utilizamos em nosso estudo microplásticos de polietileno (PE MPs) (Sigma-Aldrich; CAS number 9002-88-4, densidade de 0.94 g/mL), escolhido em razão de serem um dos polímeros mais utilizados para a produção de materiais plásticos (Horton et al., 2017). Conforme caracterização química detalhada apresentada em estudo prévio do nosso grupo (Araújo et al., 2020), os MPs utilizados são heterogêneos, apresentando tamanho (diâmetro médio: 35,46 μm \pm 18,17 μm (média \pm SD) e formato variados.

2.2. Modelos animais e cadeia alimentar experimental

A cadeia alimentar experimental estabelecida foi composta por dois níveis tróficos. O primeiro nível foi composto por alevinos de lebiste selvagem (*Poecilia reticulata*) adquiridos no setor de piscicultura do Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí (Goiás, Brasil). Esses animais são nativos da América do Sul e amplamente distribuídos em diferentes países (Parenti, 1981; Bisazza, 1993) e considerados bons modelos experimentais de acordo com a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) (OECD, 1992). Além disso, a espécie tem sido utilizada em diversos estudos (eco)toxicológicos (Saaristo et al., 2017; Qualhato et al., 2017; Deacon et al., 2019). Após a coleta, os animais foram mantidos no Laboratório de Pesquisas Biológicas do IF Goiano - Campus Urutaí (Urutaí, GO, Brasil) até o início do experimento em ambiente com controle de luminosidade (fotoperíodo de 12 h claro/escuro) e temperatura (24° C \pm 2° C).

O segundo nível trófico foi composto por adultos de *Danio rerio* conhecidos popularmente como “peixe-zebra”. Esses animais foram adquiridos em criadouro comercial (Goiânia, GO, Brasil) e seu manejo foi realizado sob condições sanitárias convencionais para criação de peixes em laboratório (Dammski et al., 2011). O período de aclimatação dos animais, antes de iniciar o experimento, foi de 30 dias. Vale salientar que a escolha desses animais se deu em função de representarem espécies consumidoras de pequenos alevinos, serem um dos modelos de vertebrados mais utilizados na avaliação da toxicidade de diferentes xenobióticos, bem como na avaliação de riscos ecológicos em espécies de água doce (He et al., 2014; Chagas et al., 2019; Malafaia et al., 2020).

2.3. Procedimentos experimentais e delineamento da pesquisa

2.3.1. Exposição e preparação de *P. reticulata* (Etapa I)

O delineamento experimental adotado foi composto por diferentes etapas. Na primeira, os alevinos de *P. reticulata* foram distribuídos em dois grupos experimentais [aproximadamente 28 g de *P. reticulata* foram capturados para comporem a dieta dos *Danio rerio*, i.e., ± 2 mil indivíduos]. O grupo controle (C) ($n = \pm 1000$ alevinos) foi composto por alevinos mantidos em aquário contendo água desclorada naturalmente (sem a adição de qualquer poluente) e o grupo microplástico (MP PE) foi composto por animais mantidos por 48 h em água (também desclorada) ($n = \pm 1000$ alevinos); porém, contendo 60 mg/L de MP PE (Figura 1A). Tal concentração é aproximadamente 7 vezes inferior àquela avaliada por Rehse et al. (2016) (400 mg/L), considerada uma concentração muito acima daquela que pode ser identificada no ambiente natural. Logo, a concentração de exposição adotada no presente estudo (60 mg/L) aproxima nosso delineamento à uma condição realista de poluição, pois conforme discutido por Anbumani (2018), as concentrações de MPs em águas superficiais podem variar muito, sendo de 2 a 7 vezes inferiores àquelas que comumente são testadas em laboratório.

Vale salientar que nessa etapa, adotamos um sistema estático de exposição, em que não houve renovação da água durante o período de 48 h. Ambos os grupos foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial triturada para peixes (níveis de garantia: 45% de proteína bruta, 14% de extrato etéreo, 5% de fibra bruta, 14% de matéria mineral e 87% de matéria seca). Ao final do período de exposição, os animais (de ambos os grupos) foram pesados e separados em porções de 0,24 g para servirem de alimento aos peixes-zebra. Anteriormente à separação das porções, os animais do grupo exposto ao MP PE foram lavados com água purificada (via osmose reversa), a fim de eliminar as partículas que porventura estivessem aderidas à superfície corporal.

2.3.2. Exposição de *Danio rerio* (Etapa II)

A segunda fase da pesquisa consistiu em distribuir 120 indivíduos adultos de *Danio rerio*, de ambos os sexos (biomassa: $0,54 \pm 0,129$ g; comprimento: $5 \text{ cm} \pm 0,71 \text{ cm}$), em três grupos experimentais ($n = 40/\text{grupo}$). O primeiro foi composto por *D. rerio* mantidos em água desclorada (potes de vidro contendo 2,2 L de água), sem a adição de qualquer poluente [grupo controle (C)], os quais foram alimentados com alevinos de lebiste selvagem não expostos aos MPs PE. Já o segundo grupo foi composto por peixes mantidos nas mesmas condições anteriores, mas que receberam como alimento, alevinos expostos aos MPs (correspondendo ao grupo de exposição dietética) (Figura 1B). O grupo de exposição direta e/ou captação direta foi composto por animais mantidos em água contendo MP PE (60mg/L) e foram alimentados com

alevinos de *P. reticulata* não expostos. As águas dos recipientes dos peixes foram renovadas completamente em intervalos de 48 h e os parâmetros físico-químicos foram aferidos a cada troca. As porções de alimento foram oferecidas duas vezes ao dia (por um período de dez dias), cujas quantidades foram correspondentes à 5 % da biomassa corpórea média de cada animal (10 animais/pote = 5,4 g; 0,24 g de alevinos/porção).

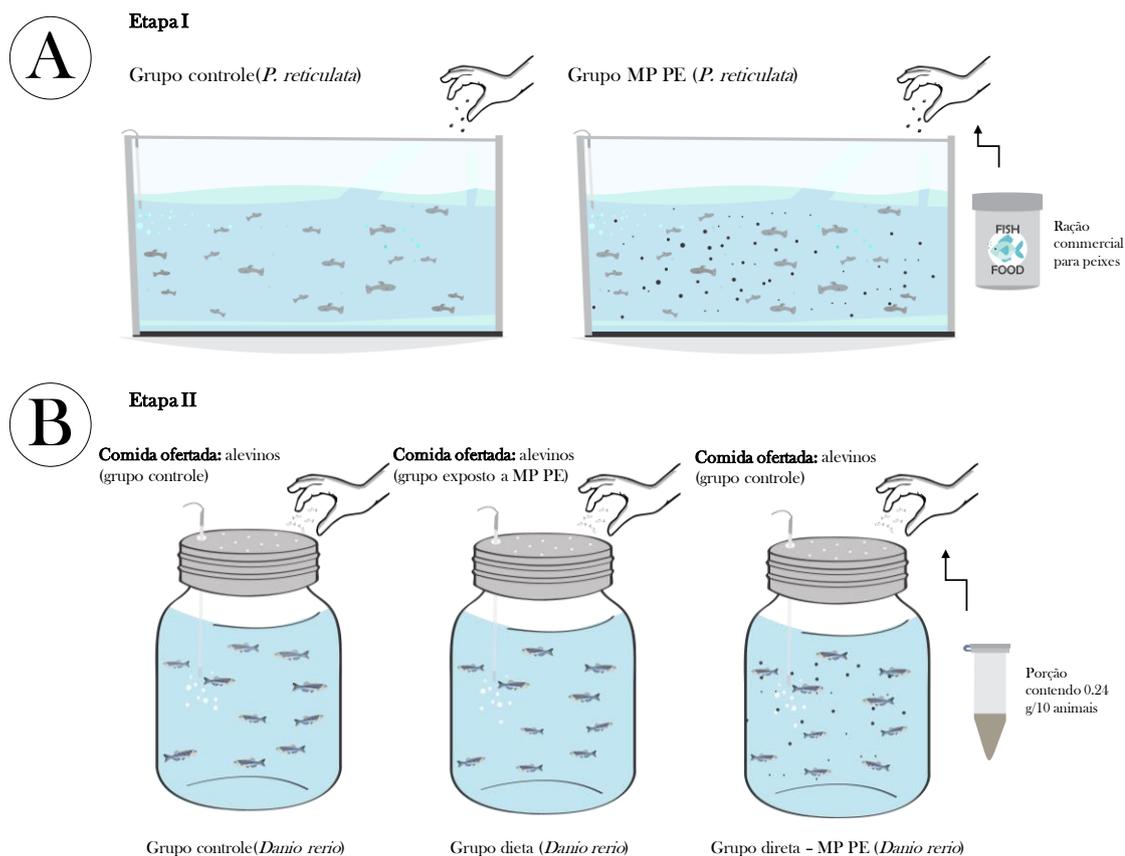


Figura 1. Desenho esquemático das etapas I (A) e II (B) e delineamento geral do experimento. As cores são meramente ilustrativas. MP PE: microplástico de polietileno.

2.4. Biomarcadores de toxicidade

Ao final da fase II, no 10^o e 11^o dia experimental a atividade locomotora dos animais, possível efeito ansiogênico ou ansiolítico, bem como prováveis alterações na resposta defensiva antipredatória do principal consumidor induzidas pelos tratamentos foram elencados como biomarcadores de neurotoxicidade. Após essas avaliações, os animais foram eutanasiados e investigamos a possível mutagenicidade mediante avaliação da presença de micronúcleos e outras anormalidades nucleares eritrocitárias. A citotoxicidade foi avaliada a partir de medições geométricas e descritores numéricos dos eritrócitos circulantes e de seus núcleos.

2.4.1. Testes comportamentais

2.4.1.1. Teste do campo aberto e tanque novo

Para avaliar se a exposição ao microplástico foi capaz de alterar as habilidades locomotoras, bem como os aspectos da emocionalidade dos animais, os peixes foram submetidos ao teste de campo aberto e tanque novo, os quais foram realizados no 10º dia experimental. O teste do tanque novo, adaptado de Grossman et al. (2010), foi realizado em um aquário com as seguintes dimensões: 16 cm de altura x 12 cm de comprimento x 11,5 cm de largura. Resumidamente, o teste consistiu em inserir cada animal individualmente em um tanque dividido em duas porções horizontais iguais (topo e base) (n=12/grupo) e avaliá-lo durante 5 min, quanto à latência para atingir o topo (s); tempo de permanência no topo (s); distância percorrida (cm) e velocidade de natação (cm/min) (Fig. 2A).

Outro teste utilizado para avaliar os comportamentos preditivos de ansiedade, foi o teste do campo aberto, um paradigma experimental utilizado comumente em roedores, mas que vem sendo largamente inserido em protocolos para mensurar aspectos da emocionalidade e habilidades locomotoras em outros animais, como anfíbios, peixes e aves (Faria et al., 2018; Hope et al., 2019; Araújo & Malafaia, 2020;). O campo aberto foi representado por uma arena circular ($\emptyset = 15$ cm; altura da lâmina d'água = 3 cm) e seguiu protocolos preestabelecidos (Choleris et al., 2001; Stewart et al., 2010), com pequenas modificações. O teste consistiu em introduzir cada animal individualmente (n=16/grupo) no centro da arena e filmá-los por 3 min para posterior avaliação dos seguintes parâmetros: distância percorrida (em cm), velocidade da locomoção (em cm/s) e índice de ansiedade, conforme descrito por Estrela et al. (2015), o qual leva em consideração o comportamento dos animais na zona periférica e central (Fig. 2B).

A avaliação da distância percorrida e da velocidade de natação em ambos os testes foram avaliadas durante 3 min. Para isso, os registros de vídeos foram transformados em imagens sequenciais (totalizando 60 frames - durante 180 s - com intervalo de 3 s entre cada imagem) (Fig. 2C). A distância percorrida dos animais foi analisada via software ImageJ/Fiji (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>), em que o movimento dos animais foi registrado utilizando a ferramenta “linha segmentada”. A cada imagem um novo ponto da linha era inserido na região central da cabeça do animal e a distância percorrida foi equivalente ao comprimento do total de linhas traçadas.

Ressalta-se que, para descartar possíveis influências de um teste comportamental sob outro, os animais utilizados para investigação dos parâmetros no campo aberto, não foram os mesmos submetidos ao teste do tanque novo.

2.4.1.2. Teste de cardume: habituação e estímulos aquáticos

Para avaliarmos a influência dos MPs PE no comportamento de cardume diante da presença de um predador, os *D. rerio* de cada tratamento foram divididos em oito grupos de cinco indivíduos, semelhante a estudos anteriores (Parker et al., 2013; Parker et al., 2014). Os cardumes foram submetidos separadamente a quatro sessões comportamentais, realizadas no 11º dia experimental. Cada sessão do teste consistiu em avaliar o cardume em um aquário (dimensões: 40 cm de comprimento x 25 cm de largura x 35 cm de altura), contendo água desclorada naturalmente. A primeira sessão representou o período de habituação à novidade (7 min), considerando que essa etapa pode amenizar os efeitos de manipulações experimentais e fatores externos sofridos anteriormente (Thompson & Spencer, 1996; Leussis & Bolivar, 2006). Após isso, a atividade locomotora dos animais foi registrada durante 3 min (sem a adição de estímulos).

Posteriormente, um peixe heteroespecífico não predador (*Macrotocinclus affinis*) foi inserido no aquário. Essa etapa serviu de “controle” experimental, a fim de avaliar se as respostas dos cardumes ocorriam em decorrência de qualquer estímulo ou se eram consequentes do confronto entre presas-predador. Para evitar possíveis influências do comportamento desses animais ao longo das sessões, utilizamos cinco espécimes. Tais indivíduos tinham entre 2-3 cm de comprimento padrão e 0,50 g de biomassa corpórea. A atividade dos animais na presença do heteroespecífico foi registrada por 3 min. Por outro lado, para avaliar a resposta do cardume a um potencial predador, o confronto direto presa-predador foi proporcionado. Nesse caso, o predador aquático *Geophagus brasiliensis* (conhecido popularmente como acará) foi introduzido no aquário e os animais foram novamente avaliados por 3 min. Os potenciais predadores utilizados tinham entre 9-12 cm de comprimento padrão e 46 g de biomassa corpórea, os quais foram alimentados previamente para evitar a predação dos *D. rerio* durante a sessão de teste.

Ao final de cada sessão, o comportamento de cardume dos animais - tido como uma resposta defensiva - foi avaliado a partir da distribuição de escores de cluster, similarmente à Parker et al. (2014). Nesse caso, o aparato foi dividido em 32 compartimentos (medidas: 5 cm de altura x 6,25 de largura) e o número máximo de peixes em um compartimento era dividido pelo número total de compartimentos ocupados (Fig. 2D). O agrupamento foi registrado uma vez a cada 3 s ao longo de 180 s, totalizando 60 avaliações por cardume. Esses escores representavam maior ou menor agregação do cardume em resposta ou não a algum estímulo. Também registramos a distância de cada indivíduo do cardume do não-predador e do predador (Fig. 2E), com auxílio do software imageJ/Fiji, a partir da inserção das imagens sequenciais obtidas dos vídeos. A distância (cm) foi medida do centro da cabeça de cada indivíduo do cardume ao centro

da cabeça do não-predador/predador, sendo correspondente ao comprimento total da linha segmentada.

2.4.1.3. Teste de cardume: estímulo predatório aéreo

Além dos testes mencionados anteriormente, também avaliamos o comportamento do cardume em resposta à simulação do ataque de um predador aéreo, a fim de investigar se os tratamentos afetavam a coesão e a profundidade do cardume (i.e., distância entre os animais e a superfície d'água). Para isso, utilizamos um modelo de predador, de cor preta, simétrico e de borracha, o qual possuía envergadura de 24,4 cm. Tal modelo, que simulava uma ave, foi fixado acima do aquário a uma altura de 60 cm de distância da superfície d'água tendo conexão com o ambiente externo à sala de teste, de modo que o pesquisador pudesse controlar o momento exato de sua soltura (Fig. 2F). Assim, após um período de habituação de 3 min, o modelo foi solto, despenhando-se em queda livre acima do aquário. Ao tocar na superfície d'água, o modelo foi imediatamente recolhido, permanecendo imóvel na sua posição inicial. O contato do modelo com a superfície d'água (i.e., o ataque simulado) teve uma duração de 3 s.

O comportamento do cardume foi avaliado 30 s antes e 30 s depois do ataque, quanto a distância da lâmina d'água (Fig. 2G) e a agregação dos indivíduos (Fig. 2D). Tais parâmetros foram avaliados a partir das imagens sequenciais obtidas dos vídeos, com intervalos de 1,66 s a cada imagem durante toda a sessão, totalizando 18 avaliações em cada tempo.

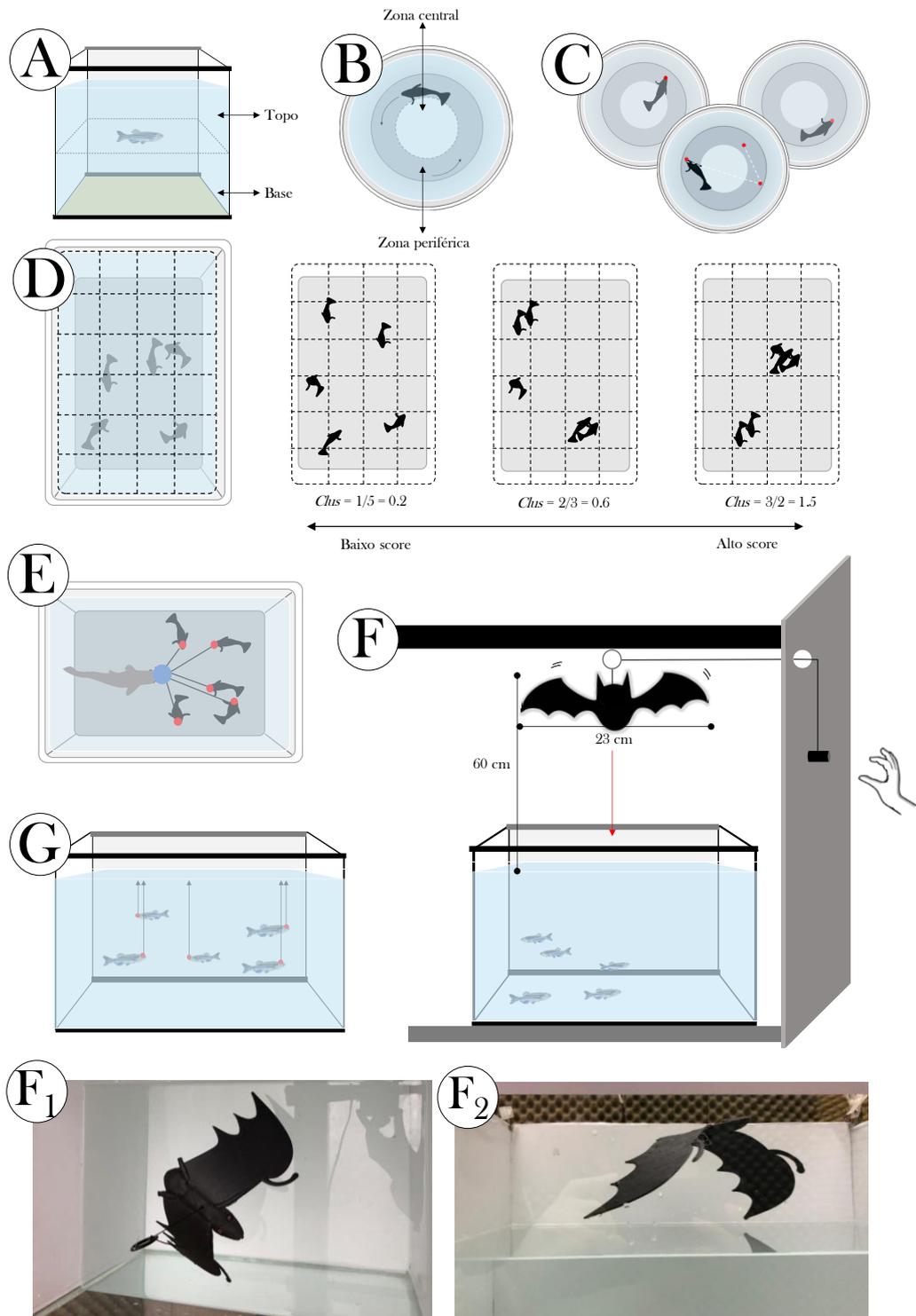


Figura 2. Esquema do (A) aparato utilizado no teste do tanque novo, (B) campo aberto (com as demarcações das zonas central e periférica), da metodologia adotada na determinação da (C) distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto, (D) no cálculo dos escores de cluster utilizados na avaliação da coesão do cardume em todas as sessões e (E) na medição da distância entre os *D. rerio* e seu potencial predador e da (G) superfície d'água. (F) Representação do teste de resposta ao ataque simulado por um predador aéreo. (F₁) vista de cima para baixo e (F₂) vista lateral. As cores são meramente ilustrativas.

2.4.1.4. Avaliação da atividade dos animais estímulo

Assumindo que o comportamento dos animais utilizados como estímulos pode influenciar a resposta defensiva da presa, também avaliamos o comportamento dos *M. affinis* e *G. brasiliensis* utilizados no teste de resposta ao não predador/predador (respectivamente), com o objetivo de descartar influências de diferenças comportamentais desses animais quando confrontados com os cardumes de *D. rerio*. Assim, a partir das imagens sequenciais dos testes avaliamos a distância percorrida (em cm) dos animais estímulo (i.e., *M. affinis* e *G. brasiliensis*) durante os testes, considerando que esse parâmetro pode modular a resposta defensiva dos *D. rerio*.

2.4.2. Mutagenicidade

O potencial mutagênico dos MPs PE foi avaliado por meio do teste do micronúcleo e outras anormalidades nucleares eritrocitárias, o qual tem sido amplamente utilizado em estudos (eco)toxicológicos (Amaral et al., 2018; Araújo et al., 2019; Borges et al., 2019). Brevemente, o teste foi realizado a partir da metodologia descrita em Montalvão & Malafaia (2017), a qual consistiu em coletar 10 µL de sangue (via punção venosa da veia caudal) para posterior confecção de esfregaços sanguíneos em lâminas previamente higienizadas (duas lâminas por animal - n=12/grupo). Em seguida, as lâminas foram fixadas em metanol a frio 100% (v/v) (Dinâmica®, São Paulo, Brasil) e coradas por 5 min com Panótico Rápido® (Laborclin®, Paraná, Brasil). As lâminas foram analisadas em microscopia óptica em objetiva de 100x (com óleo de imersão). No total, 1000 eritrócitos/peixe foram contados [similarmente à Bucker & Conceição (2012) e Hussain et al. (2018)] a fim de avaliar a presença de micronúcleos, com base em critérios relatados por Fenech (2007). Já a presença de outras anormalidades nucleares (i.e., núcleos entalhados, constrição assimétrica/simétrica, núcleo com broto, entre outras) foi avaliada com base nas descrições de Chagas et al. (2019).

2.4.3. Citotoxicidade

A morfometria eritrocitária também foi realizada utilizando-se o software ImageJ, conforme procedimentos descritos em Araújo et al. (2020). Para cada grupo experimental foram obtidas fotomicrografias de diferentes campos de visão das lâminas de esfregaço sanguíneo confeccionadas anteriormente (via microscopia óptica, objetiva de 100x, com óleo de imersão) (10 fotomicrografias/peixe, uma de cada lâmina confeccionada). Em cada campo de visão foram avaliados 10 eritrócitos, totalizando 100 células/peixe e 1200 células/grupo (n=12 peixes/cada). Os parâmetros “elongação” e “circularidade” foram utilizados para avaliação do efeito dos

tratamentos sobre a forma dos eritrócitos e seus núcleos. Já a área (μm^2) e o volume (μm^3) nuclear e citoplasmático foram tomados como descritores numéricos indicativos de alterações de tamanho. Os procedimentos utilizados no processamento das imagens e análise morfológica (via software ImageJ) são detalhados em Vieira et al. (2019).

2.4.4. Glicemia

Para investigar a possível interferência dos MPs no metabolismo energético, bem como sua relação com a resposta defensiva dos animais, a taxa glicêmica dos animais foi avaliada. A determinação da glicemia dos animais foi realizada por meio do método testado previamente para *D. rerio* (Gleeson et al., 2007; Capiotti et al., 2014), o qual consistiu coletar 10 μl de sangue via pulsão cardíaca e posterior utilização de sistema comercial de tiras-teste para quantificação de glicose (Accu-Chek Advantage Roche Diagnosis®), cujo princípio bioquímico consiste na reação da enzima glicose desidrogenase com a coenzima (PQQ), convertendo a glicose na amostra em gluconolactona. Esta reação cria uma corrente elétrica medida por um monitor que é interpretada como glicemia. Os dados coletados são expressos em mg/dL de sangue.

2.5. Quantificação de microplásticos

Para possível associação entre os resultados dos testes comportamentais, mutagênicos, citotóxicos e a absorção dos MPs PE, quantificamos os micropoluentes nas brânquias, fígado e cérebro dos animais do último nível trófico da cadeia alimentar (*D. rerio*). Além da quantificação nos tecidos de *D. rerio*, também investigamos a presença de MPs PE em doze indivíduos inteiros de *Poecilia reticulata* e na água das diferentes exposições ao longo do experimento. Para isso, adotamos a metodologia descrita em Araújo et al. (2020), cujos procedimentos incluíram, sequencialmente e resumidamente, a pesagem, digestão ácida dos tecidos, seguida de filtração da solução em bomba a vácuo, lavagem das membranas com água purificada, evaporação da água em chapa aquecedora, coloração do resíduo com o corante vermelho do Nilo (Sigma-Aldrich, CAS number 7385-67-3), adição de água purificada e nova filtração à vácuo. Posteriormente, as membranas filtradas foram fotografadas em aumento de 10x em microscopia de fluorescência (BEL Engineering®, modelo FLUO3, São Paulo, Brasil) para posterior quantificação dos MPs no software ImageJ.

Para a contagem dos MPs PE na água, nos *P. reticulata* e nos órgãos de *D. rerio* adotamos metodologia proposta pela Norma Técnica n. L5.303 da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) (CETESB, 2005). O número de MPs era obtido pelo

software ImageJ e, posteriormente, relativizado com o volume de água analisada e biomassa dos órgãos ou animais digeridos inicialmente.

2.6. Qualidade físico-química das águas de exposição

Ao longo do período de exposição, a qualidade físico-química das águas de exposição também foram monitoradas por meio de uma sonda multiparâmetro (Instrutemp®, modelo ITPH, São Paulo, Brasil). As medições foram realizadas a cada 48 h, período em que havia a renovação total das águas de exposição.

2.7. Análises estatísticas

Inicialmente a normalidade residual de todos os dados foi verificada utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram submetidos à one-way ANOVA (com pós-teste de Tukey) e o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as médias dos dados não-paramétricos, utilizando-se como pós-teste o teste de Dunn's (ambos a 5% de probabilidade). Por outro lado, os dados relativos à quantificação dos MPs nos órgãos dos animais foram analisados com teste pareado. Nesses casos, o teste *t* de Student foi utilizado para comparar os dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney foi aplicado aos não paramétricos, também a 5% de probabilidade. Ressalta-se que as análises estatísticas e elaboração dos gráficos foram conduzidas no software GraphPad Prism (versão 7.0).

3. RESULTADOS

3.1. Quantificação e caracterização dos MP PE

Tanto os *P. reticulata* do grupo "microplástico" expostos primeiramente, quanto os indivíduos de *D. rerio* expostos pela via dietética e captação direta acumularam partículas plásticas. Os MPs PE foram encontrados nas brânquias (Figura 1S), fígado (Figura 1S) e cérebro dos peixes que compuseram o nível trófico superior, em ambas as vias de exposições. Contudo, observamos um maior número de MPs PE nos animais expostos diretamente ao poluente, em comparação com o grupo exposto pela via dietética (Fig. 3). Além disso, identificamos MPs PE nas águas do grupo de captação direta, o que não ocorreu nos grupos controle (ambas as etapas) e no grupo "dieta". A concentração média na água, no grupo "direta", avaliada ao longo do experimento, foi de 55,22 mg/L, se aproximando da concentração nominal definida em nosso estudo. A média do número de MPs encontrados no organismo de *P. reticulata* foi de 38,08 MPs

PE/mg de peixe, os quais podem ser observados na Figura 3D, a qual demonstra fluorescência emitida pelos poluentes no corpo dos animais.

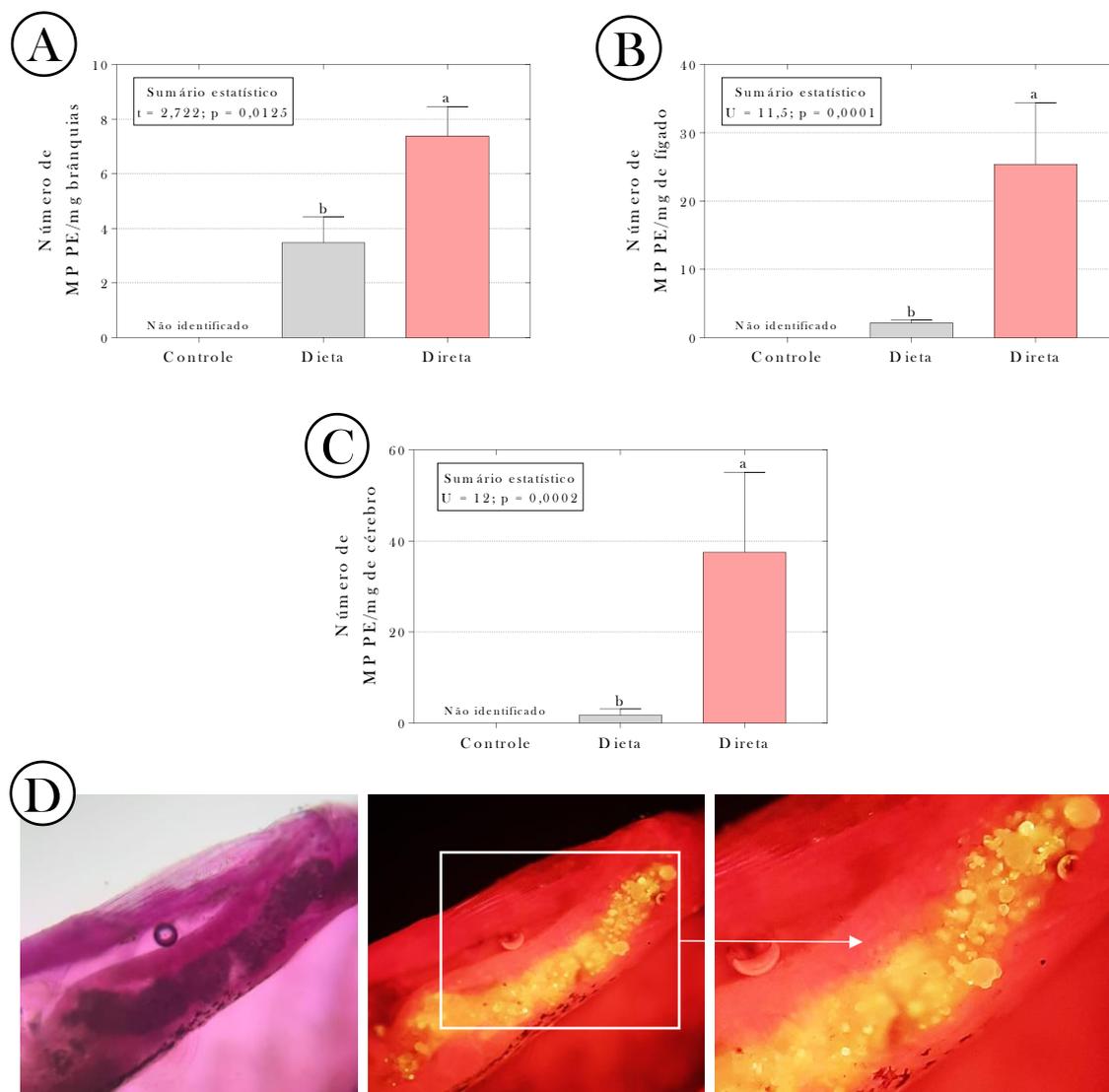


Figura 3. (A-C) Número de MPs PE identificados nos órgãos dos peixes (*Danio rerio*). (D) Imagens dos MPs PE no trato gastrointestinal de alevinos de *P. reticulata*, a seta branca indica a presença de microplásticos (em amarelo) no trato gastrointestinal. As barras indicam a média, cujos dados foram submetidos ao teste *t* de Student para comparar os dados paramétricos (em “A”) e o teste de Mann-Whitney foi aplicado aos não paramétricos (em “B” e “C”), ambos a 5% de probabilidade. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos. MP PE: microplástico de polietileno.

Não observamos diferenças significativas no número de partículas entre os órgãos dos animais do grupo dieta (Fig. 4). Entretanto, os números de MPs PE acumulados nas brânquias, fígado e cérebro do grupo exposto diretamente foram de 7,37, 25,39 e 40,76/mg de peso,

respectivamente. Notavelmente, nesse mesmo grupo, as partículas plásticas se acumularam principalmente nos tecidos internos (fígado e cérebro), e uma quantidade menor de partículas ficaram retidas no tecido externo avaliado (brânquia) (Fig. 4).

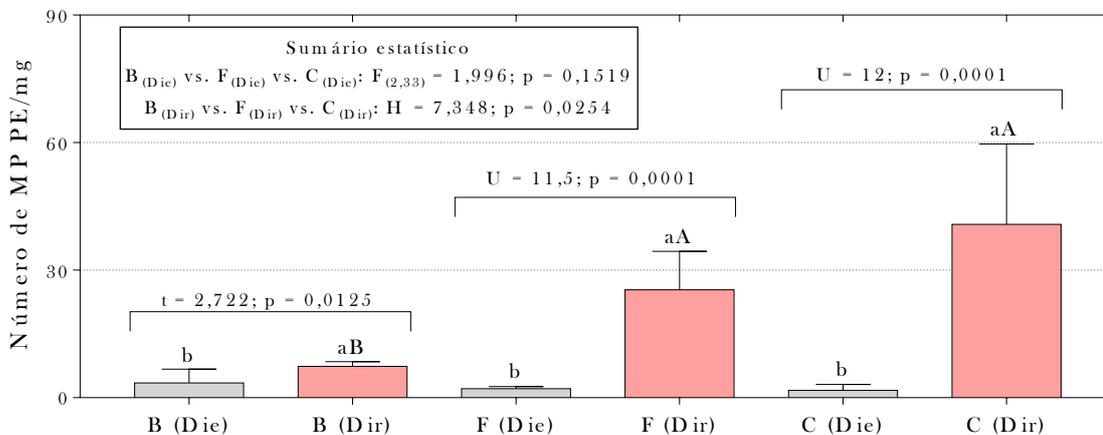


Figura 4. Número de MPs PE identificados nos órgãos de *Danio rerio*. As barras indicam a média, em que os dados paramétricos foram submetidos à one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as médias dos dados não-paramétricos, utilizando-se como pós-teste o teste de Dunn's (ambos a 5% de probabilidade). A comparação par a par entre os mesmos órgãos, nos diferentes grupos, foi feita através do teste *t* de Student para dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney foi aplicado aos não paramétricos, ambos a 5% de probabilidade. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os órgãos (i.e.: brânquia_{DIE} vs. brânquia_{DIR}) e as letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os distintos órgãos do mesmo grupo (i.e.: brânquia_{DIE} vs. fígado_{DIE} vs. cérebro_{DIE}). MP PE: microplástico de polietileno; B: brânquia; F: cérebro; DIE: grupo exposto dieteticamente; DIR: grupo exposto por captação direta na água.

3.2. Biomarcadores comportamentais

Por outro lado, nos testes de tanque novo e campo aberto, pudemos observar que os tratamentos não afetaram os comportamentos de emocionalidade dos animais e suas habilidades locomotoras (Fig. 5). No entanto, o acúmulo de MPs PE nos tratamentos foi associado às alterações observadas no teste de cardume, em que os grupos expostos apresentaram comportamento distinto dos peixes do grupo controle. Enquanto o aumento dos scores de cluster desse último revela maior coesão do cardume na presença do potencial predador aquático e no ataque de predação aérea simulada, nos demais grupos não observamos diferenças entre as distintas sessões do teste (sem e com o *G. brasiliensis*) (Fig. 6A-B). Conforme observado na

Figura 7A, na sessão do estímulo predatório aquático, todos os tratamentos diferiram entre as sessões (com e sem predador), quanto ao parâmetro de “distância presa-predador”. Contudo, o grupo controle permaneceu ainda mais distante do potencial predador, o que revela um déficit parcial dos tratamentos ao terem um menor distanciamento. Na avaliação do cardume frente ao estímulo aéreo, a disparidade comportamental exibida pelos tratamentos em comparação com o grupo controle, foi inferida pela menor profundidade do cardume após o ataque simulado (Fig. 7B).

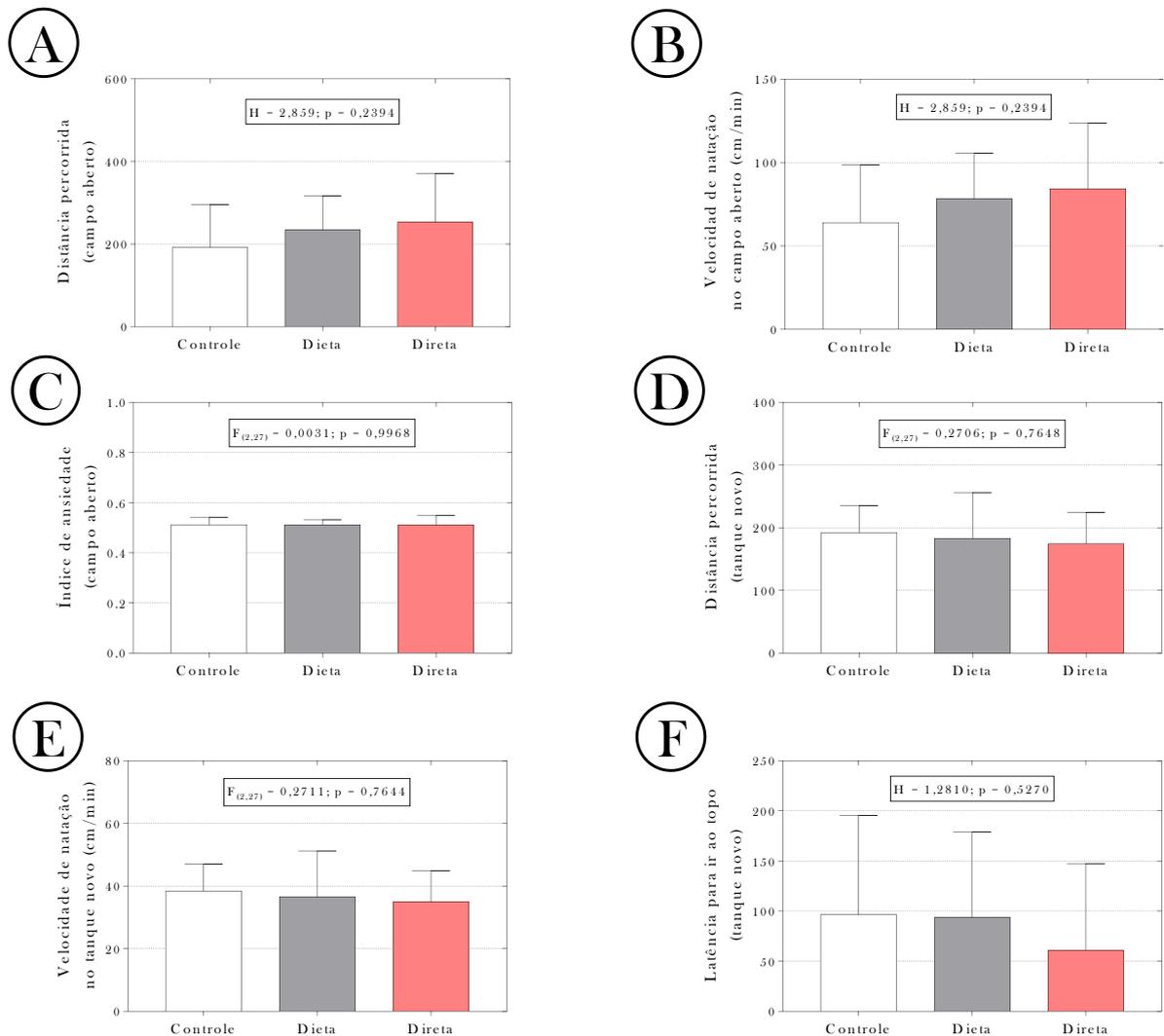
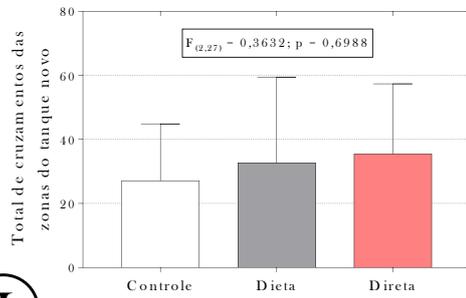
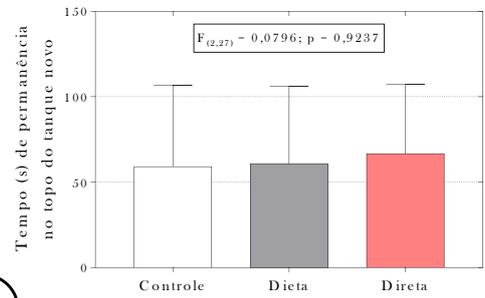


Figura 5. (A-J) Parâmetros relativos aos testes preditivos de ansiedade avaliados individualmente nos diferentes grupos de *Danio rerio*. As barras indicam a média, em que os dados paramétricos foram submetidos à one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as médias dos dados não-paramétricos, utilizando-se como pós-teste o teste de Dunn's.

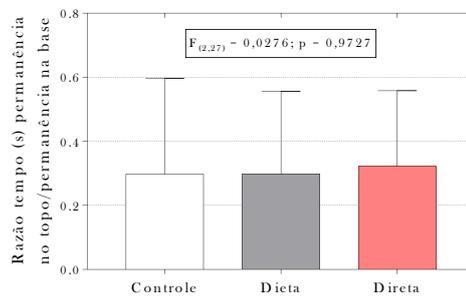
G



H



I



J

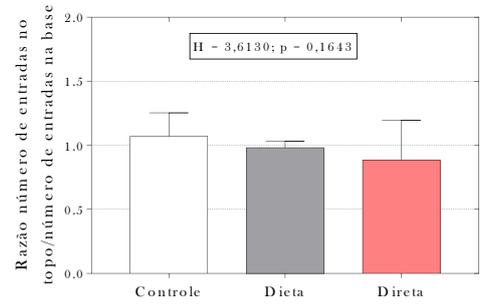


Figura 5. Continuação.

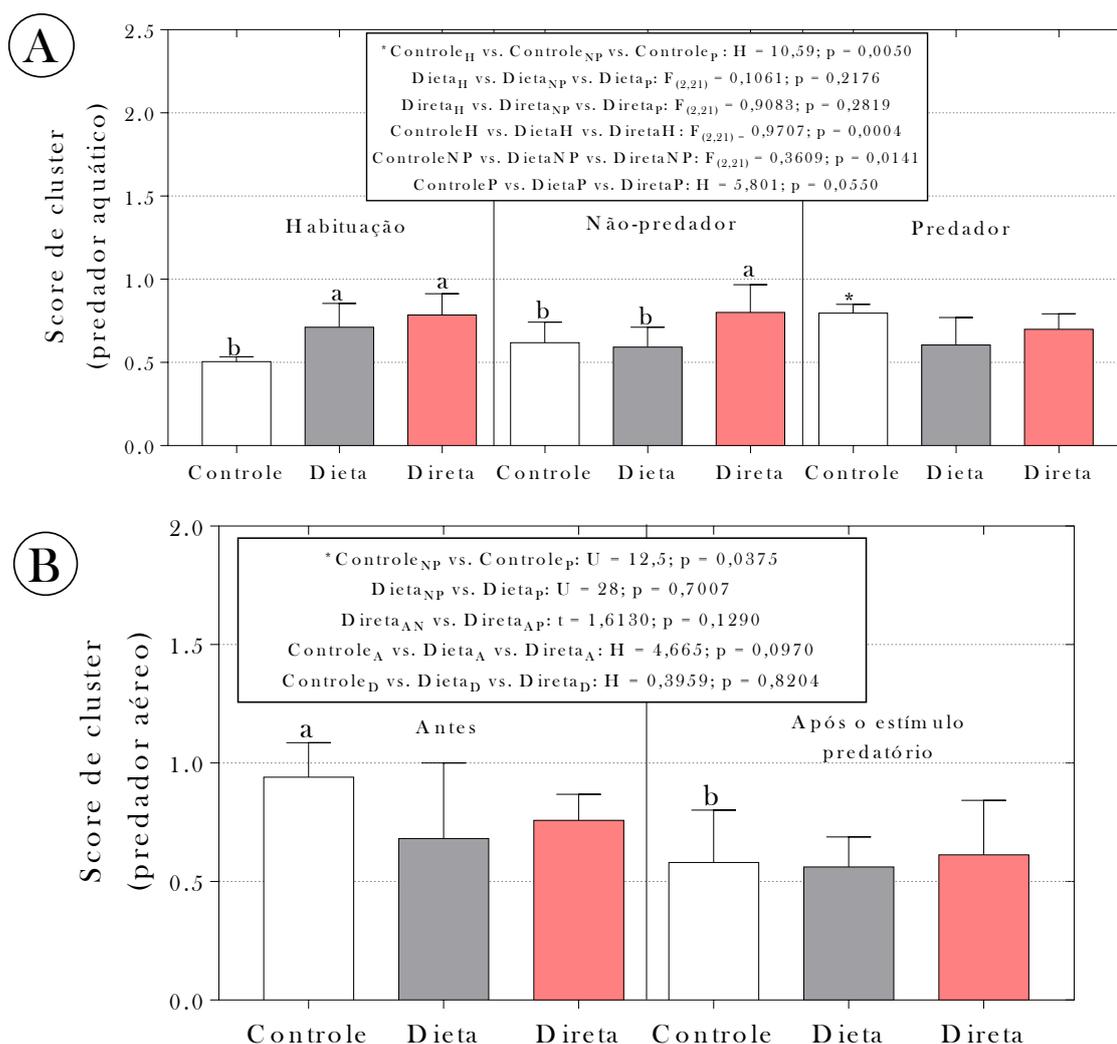


Figura 6. (A-B) Scores de cluster do comportamento dos *D. rerio* na ausência e presença dos estímulos predatórios no teste para avaliação do cardume. As barras indicam a média. Em “A”, os dados paramétricos foram submetidos à one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as médias dos dados não-paramétricos, utilizando-se como pós-teste o teste de Dunn’s. Em “B”, os dados foram comparados par a par pelo teste *t* de Student para dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney foi aplicado aos não paramétricos, ambos a 5% de probabilidade. O antes e depois do estímulo predatório foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos. H: habituação; NP: não predador (*M. affinis*) e P: predador (*G. brasiliensis*).

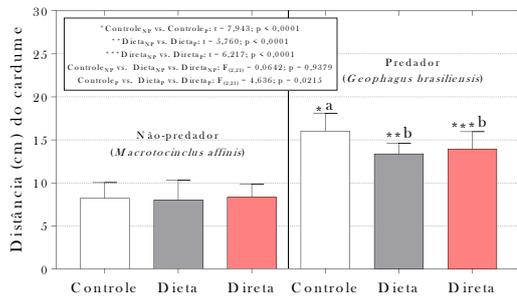
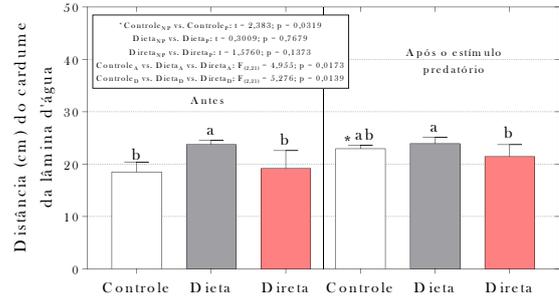
A**B**

Figura 7. (A) Distância dos peixes na ausência e presença dos estímulos predatórios no teste para avaliação do cardume. (B) Distância do cardume da lâmina d'água antes e depois do estímulo predatório aéreo. NP: não predador (*M. affinis*); P: predador (*G. brasiliensis*); A: antes do estímulo; D: depois do estímulo.

Além disso, nossos dados demonstram que o comportamento dos *D. rerio* não foi influenciado pelo comportamento dos animais estímulo [i.e., não-predador (*M. affinis*) e predador (*G. brasiliensis*)], cuja distância percorrida (em cm) avaliada foi semelhante nos testes dos distintos grupos (Fig. 8A-B).

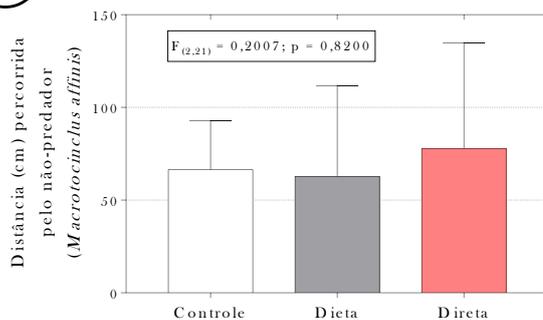
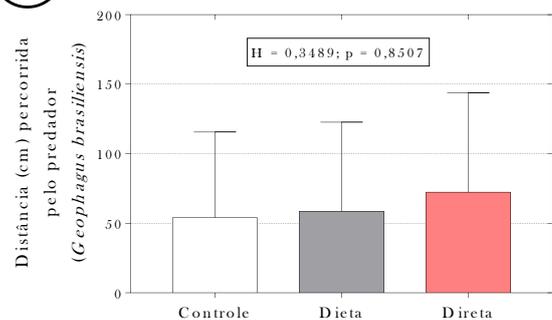
A**B**

Figura 8. Distância percorrida (cm) pelos estímulos (A) não predatório e (B) predatório durante as distintas sessões dos testes. As barras indicam a média, os dados paramétricos foram submetidos à one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as médias dos dados não-paramétricos, utilizando-se como pós-teste o teste de Dunn's a 5% de probabilidade.

3.3. Mutagenicidade

Na avaliação mutagênica, observamos que os animais expostos aos MPs PE (grupos “dieta” e “direta”) apresentaram frequência total de anormalidades nucleares 5,71 e 5,06 vezes maior que a do grupo controle, após 10 dias de exposição, respectivamente (Fig. 9A). O total de anormalidades encontradas incluía núcleos eritrocitários com constrição nuclear (Fig. 9D-E), eritrócitos binucleados (Fig. 9F), núcleos multilobados (Fig. 9M), com a presença de brotos (Fig. 9L), em forma de rim (Fig. 9G), núcleo deslocado (Fig. 9H), presença de micronúcleos (Fig. 9C), vacúolo nuclear (Fig. 9J) e núcleos entalhados (Fig. 9KJ). Com relação à frequência individual das anormalidades eritrocitárias encontradas, notamos que para a maioria não houve diferença significativa entre os grupos “dieta” e “direta” (Fig. 10A-E).

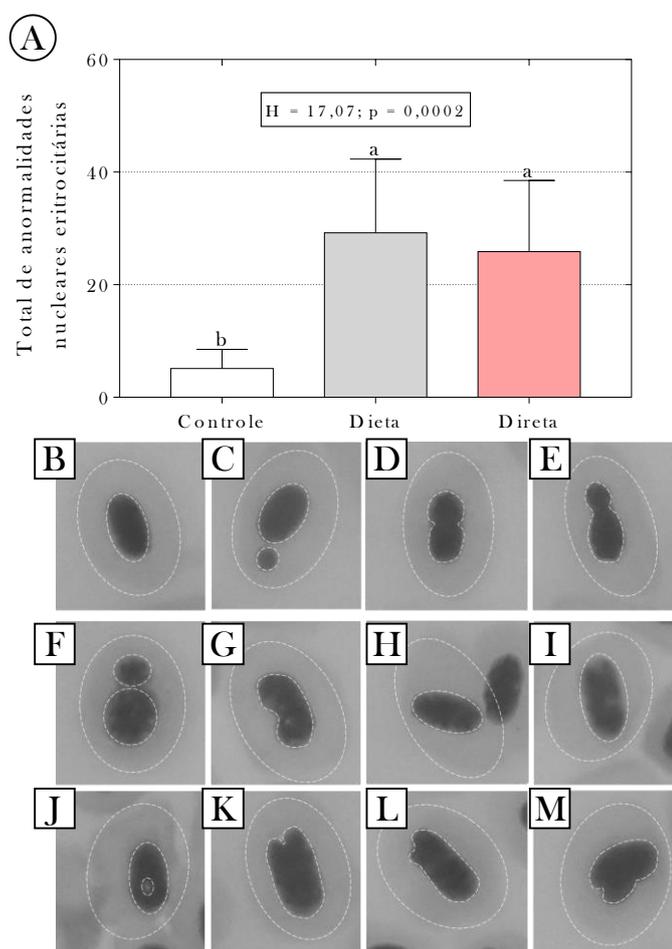


Figura 9. (A) Frequência total de anormalidades nucleares encontradas nos *Danio rerio* expostos ou não aos MPs PE. As barras indicam a média dos dados. Letras minúsculas distintas indicam diferença entre os grupos. (B-M) Fotomicrografias representativas dos eritrócitos de *Danio rerio* expostos ou não a MPs PE. As linhas pontilhadas destacam os limites celulares e os núcleos eritrocitários. Eritrócito normal (B), com micronúcleo (C), constrições nucleares (D e E), eritrócito binucleado (F), em forma de rim (G), núcleo movido/deslocado (H e I), vacúolo nuclear (J), núcleo entalhado (K), núcleo com broto (L) e eritrócito multilobado (M).

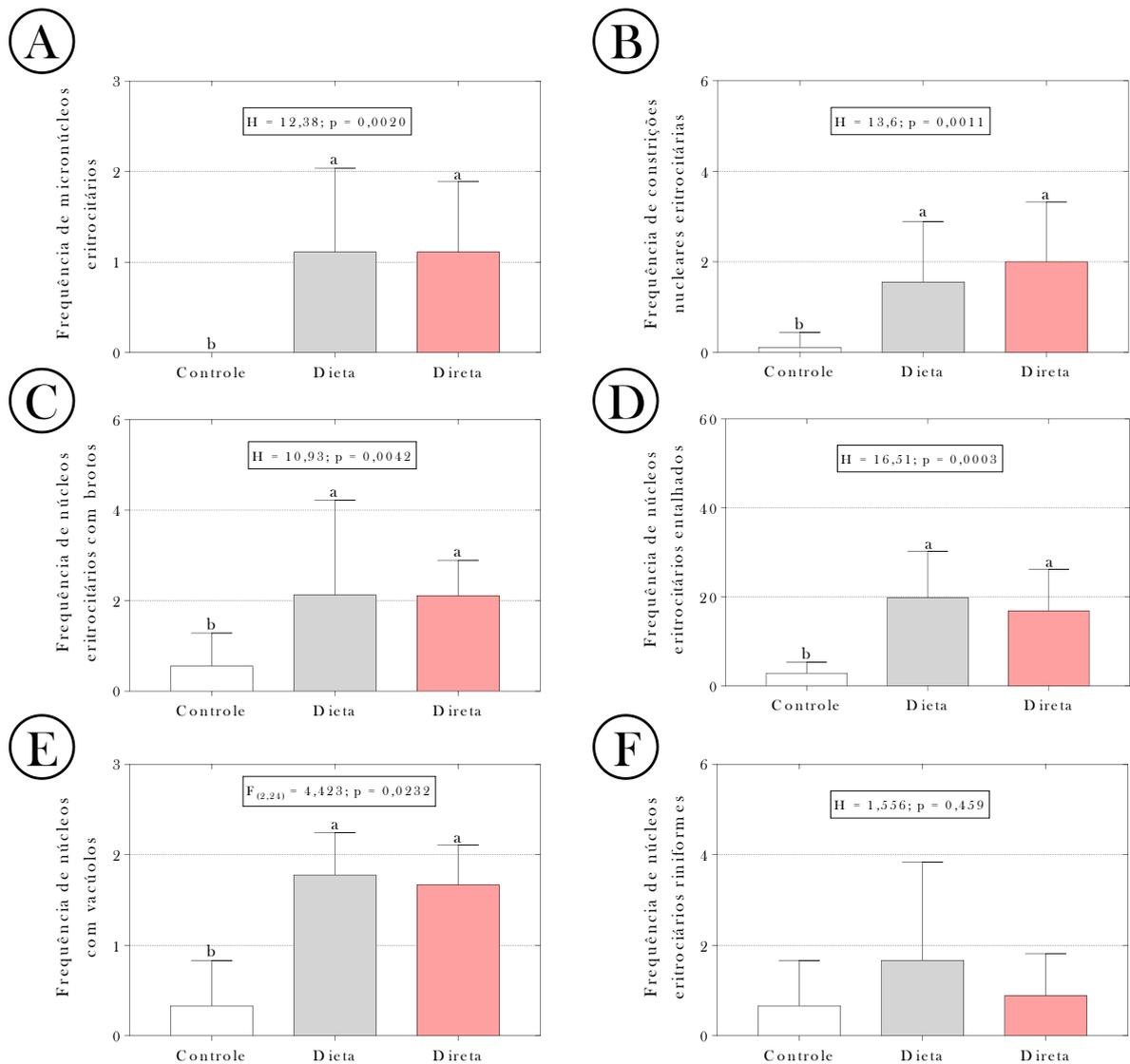


Figura 10. (A-F) Frequência de anormalidades nucleares eritrocitárias identificadas em adultos de *Danio rerio* expostos ou não aos MPs PE. As barras indicam a média, cujos dados paramétricos foram submetidos à one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as médias dos dados não-paramétricos, utilizando-se como pós-teste o teste de Dunn's a 5% de probabilidade. Letras minúsculas distintas indicam diferença entre os grupos.

3.3. Citotoxicidade e glicemia

Na avaliação da citotoxicidade, observamos que os tratamentos induziram alterações no tamanho e na forma dos eritrócitos e de seus núcleos. Tanto a ingestão de *P. reticulata* expostos previamente aos MPs PE, quanto a exposição direta dos *D. rerio* ao poluente foram associadas à reduzida área e volume das células (e seus núcleos) (Fig. 11A-D). As alterações na forma dos

eritrócitos (e de seus núcleos), o que podem ser inferidas pela maior alongação e menor circularidade (Fig. 12A-D). Já em relação à glicemia, tida como parâmetro indicativo de alterações no metabolismo energético, observamos efeito hipoglicêmico dos MPs nos animais tanto dos grupos “direta”, quanto “dieta” (Figura 13).

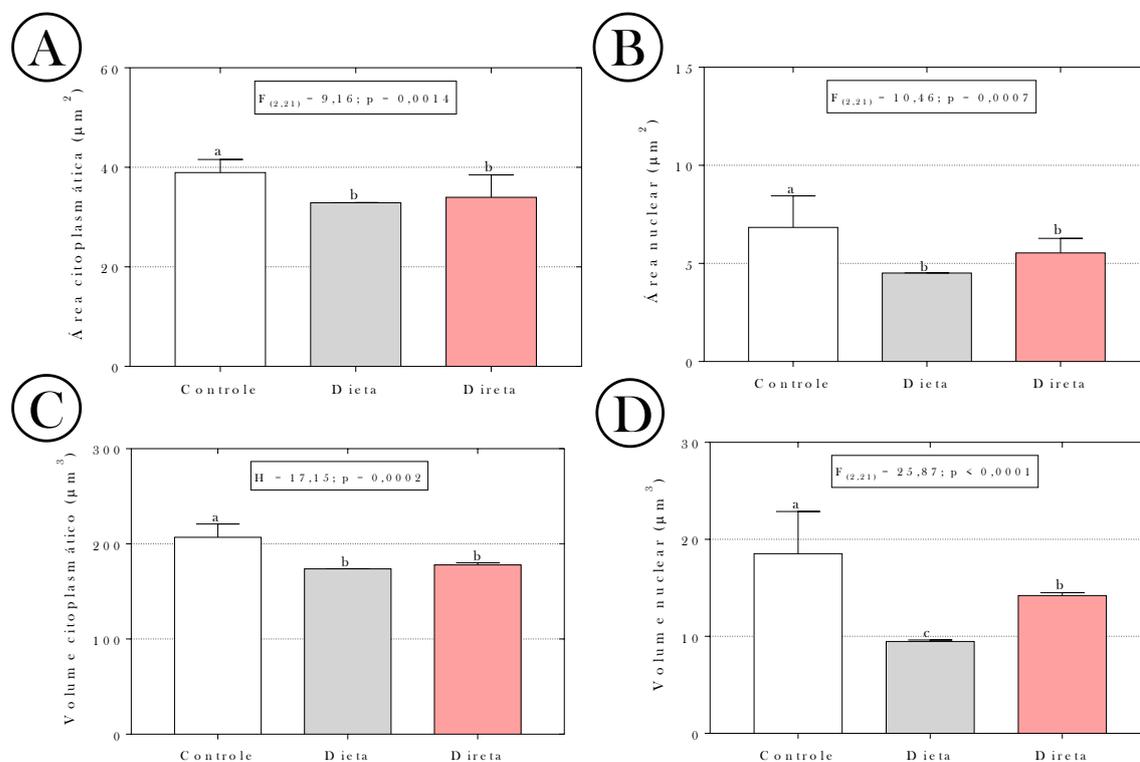


Figura 11. Área e volume citoplasmático e nuclear de eritrócitos de *D. rerio* submetidos ou não aos MPs PE. As barras indicam a média + desvio padrão, cujos dados paramétricos foram submetidos à one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as médias dos dados não-paramétricos, utilizando-se como pós-teste o teste de Dunn's a 5% de probabilidade. Letras minúsculas distintas indicam diferença entre os grupos.

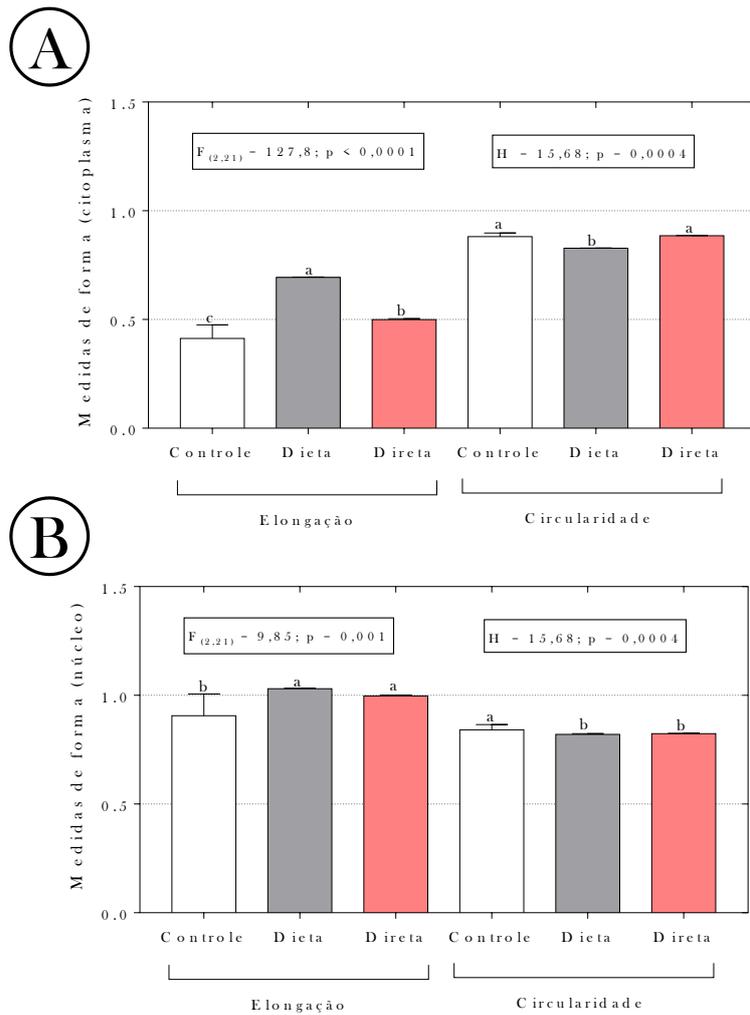


Figura 12. Elongação e circularidade dos eritrócitos e de seus núcleos de *D. rerio* submetidos ou não aos MPs PE. As barras indicam a média + desvio padrão, cujos dados paramétricos foram submetidos à one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as médias dos dados não-paramétricos, utilizando-se como pós-teste o teste de Dunn's a 5% de probabilidade. Letras minúsculas distintas indicam diferença entre os grupos.

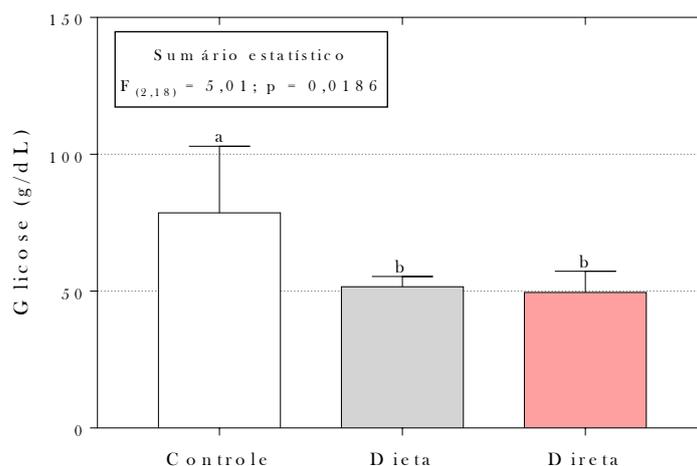


Figura 13. Glicemia de *D. rerio* submetidos ou não aos MPs PE. As barras indicam a média + desvio padrão, cujos dados paramétricos foram submetidos à one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey, 5% de probabilidade. Letras minúsculas distintas indicam diferença entre os grupos

3.5. Qualidade físico-química das águas de exposição

Nós também avaliamos se os MPs PE poderiam afetar a qualidade da água e, por conseguinte, ocasionar alterações biológicas que pudessem “mascarar” os efeitos desses poluentes. No entanto, nenhum dos parâmetros físico-químicos avaliados foram alterados (Tabela 1), o que descarta a hipótese de influência dessas variáveis sobre as alterações reportadas anteriormente.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos medidos ao longo do período experimental.

Parâmetros avaliados	Grupos experimentais*			Sumário estatístico**
	C	DIE	DIR	
pH	8,296 ± 0,2923	8,068 ± 0,2052	7,928 ± 0,2312	$F_{(2,12)} = 2,859$; $p = 0,0965$
Temperatura (°C)	22,5 ± 0,8888	22,46 ± 0,9182	21,76 ± 1,339	$F_{(2,12)} = 0,7583$; $p = 0,4896$
Salinidade (‰)	0,11 ± 0,02236	0,10 ± 0	0,12 ± 0,04472	$H = 1,086$; $p > 0,999$
Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	91,06 ± 4,278	90,09 ± 3,518	91,26 ± 3,112	$H = 0,26$; $p = 0,8980$
Sólidos totais dissolvidos	45,54 ± 2,066	45,53 ± 1,971	45,64 ± 1,539	$H = 0,26$; $p = 0,8980$
Resistividade elétrica (Ωm)	10,98 ± 0,5034	11 ± 0,4284	10,96 ± 0,3626	$H = 0,26$; $p = 0,8980$
Oxigênio dissolvido (mg/L)	7,77 ± 0,67	8,19 ± 0,80	8,66 ± 0,39	$F_{(2,12)} = 2,341$; $p = 0,1386$

*C: grupo controle; DIE: grupo exposto ao MP PE via *P. reticulata*; DIR: grupo exposto ao MP PE diretamente na água. Os dados numéricos representam a média ± SEM.

**Os dados foram submetidos a one-way ANOVA ou em caso de dados não-paramétricos ao Kruskal Wallis, a 5 % de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

A compreensão da magnitude dos efeitos danosos dos poluentes sobre os organismos, perpassa, inevitavelmente, pelo desenvolvimento de estudos como o nosso (i.e., de identificação de efeito toxicológico). Inicialmente, confirmamos a hipótese de que os MPs PE podem ser transferidos do nível trófico inferior (*P. reticulata*) para seu consumidor (*D. rerio*) na cadeia alimentar experimental, inferido especialmente pela quantificação desses poluentes realizada nas brânquias, fígado e cérebro dos animais (Fig. 3). Se por um lado, esses dados corroboram estudos prévios que demonstram a transferência desses poluentes entre diferentes níveis tróficos (Farrell & Nelson, 2013; Cedervall et al., 2012; Setälä et al., 2014; Batel et al., 2016; Tosetto et al., 2017; Bour et al., 2018; Crooks et al., 2019; Walkinshaw et al., 2020), de outro, avançam o conhecimento existente ao demonstrar pioneiramente que essa transferência também ocorre entre vertebrados do mesmo grupo taxonômico que, porventura, habitam ambientes dulcícolas contaminados com os MPs.

Interessantemente, evidenciamos que a quantidade de MPs PE absorvidos pelos *D. rerio* tem relação direta com a via de exposição, sendo observada maior absorção de MPs PE pelos animais expostos diretamente a esses poluentes, quando comparados àqueles que se alimentaram de presas (*P. reticulata*) previamente expostas aos MPs (Fig. 4). O número de MPs PE presentes nas brânquias, fígado e cérebro desses animais foi 2,1, 11,8 e 23,9 vezes menor (respectivamente) do que o observado nos mesmos órgãos dos animais expostos diretamente ao poluente diluído em água (Fig. 4). Embora a literatura não apresente investigações cujo delineamento aborda comparações dessa natureza, tais diferenças podem ser explicadas por fatores peculiares realizados à via de absorção. No primeiro caso, o contínuo contato com os MPs em suspensão na superfície e/ou na coluna d'água, durante todo o período experimental, pode ter sido preponderante para sua maior absorção. Embora as brânquias atuem também como órgãos filtradores, retendo partículas/poluentes que adentrariam os animais (Mallatt, 1985; Powell et al., 1992), dependendo de seus tamanhos, tal função pode ser insuficiente para impedir a entrada deles nos organismos. Nesse caso, assim como em outros trabalhos (Lu et al., 2016; Barboza et al., 2019), sugerimos que os MPs identificados nesses órgãos sejam aqueles retidos pelo muco presente nas superfícies lamelares. Por outro lado, a ingestão das partículas presente na água, juntamente com os alimentos oferecidos, possivelmente tenha potencializado a absorção desses poluentes, assim como já evidenciado em distintos estudos prévios (Lu et al., 2016; Bellas et al., 2016; Cannon et al., 2016; Güven et al., 2017; Horton et al., 2018; Critchell et al., 2018; Xia et al., 2020).

Em compensação, não observamos associação entre a presença dos MPs nos órgãos avaliados com efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos, tampouco mudanças na atividade locomotora dos *D. rerio* (hiper- ou hipoatividade) (Fig. 5). Esses últimos resultados são semelhantes aos reportados por alguns estudos prévios, a exemplo daqueles desenvolvidos por Tosetto et al. (2017) e Chen et al. (2017). No primeiro, ao exporem *Bathygobius kreffii* via ingestão de presas (*Platorchestia smithi*) previamente contaminadas com microesferas de PE, os autores não evidenciaram alterações nos comportamentos de ousadia e exploração dos animais, avaliados nos testes de emergência e do campo aberto. Já Chen et al. (2017), não observaram alterações locomotoras em larvas de *D. rerio* expostas a MPs ($\varnothing = 45 \mu\text{m}$) e nanoplásticos (NPs) ($\varnothing = 50 \text{nm}$) de poliestireno (PS). Conforme discutido previamente por distintos autores, alterações na atividade locomotora de *D. rerio* pode fornecer um índice abrangente de alterações fisiológicas, revelando informações relacionadas à função cerebral, função visual e desenvolvimento do sistema nervoso (Ali et al., 2011, Steenbergen et al., 2011). Logo, nossos dados sugerem inocuidade dos MPs em afetar tais funções fisiológicas. Já a ausência de efeitos ansiogênico ou ansiolítico sugere que os poluentes não afetaram circuitos neurais que modulam o comportamento preditivo de ansiedade dos animais. Isso permite excluirmos, por exemplo, efeitos dos MPs em estruturas neurológicas envolvidas na expressão de respostas relacionadas à ansiedade, tais como o núcleo leito da estria terminal (estrutura límbica) (Kim et al., 2013), porção ventral do hipocampo (Fanselow & Dong, 2010; Strange et al., 2014), em circuitos intra- e entre os subnúcleos da amígdala (Etkin & Wager, 2013; Grupe & Nitschke, 2013) e na funcionalidade do sistema septo-hipocampal (Gray & McNaughton, 2000; Sheehan et al., 2004; Guzman et al., 2013).

Entretanto, a resposta comportamental do cardume frente a estímulos não-predatório e predatório, foi diferente daquelas observadas em nível individual no teste do tanque novo. O aumento do score de agregação observado dos animais do grupo controle quando confrontados com possível predador aquático (Fig. 6A) e a redução do comportamento agregário após o ataque aéreo simulado (Fig. 6B), sugere um comportamento ansiogênico desencadeado pelas ameaças predatórias representadas pelo *G. brasiliensis* e pelo modelo de borracha (Fig. 2F), respectivamente. Logo, isso vai ao encontro de estudos prévios que confirmam que a predação pode moldar o comportamento coletivo dos peixes (Seghers, 1974; Huizinga et al., 2009; Herbert-Read et al., 2017; Fiori et al., 2018), o qual é dependente, dentre outros fatores, da percepção e reconhecimento de substâncias químicas de alarme pelo sistema olfatório dos integrantes do cardume (Pfeiffer, 1977; Gerlai, 2010), da comunicação social antipredatória

entre os indivíduos do cardume (Herbert-Read et al., 2017) e da acuidade visual desses animais (Hall & Suboski, 1995; Bass & Gerlai, 2008; Gerlai, 2010),

No entanto, esse comportamento não foi observado nos animais expostos aos MPs, tanto pela via dietética, quanto pela via direta. A coesão dos cardumes dos animais desses grupos não foi alterada na presença ou ausência dos estímulos fornecidos (não-predatório e predatório) (Fig. 6), o que sugere a inabilidade responsiva ao *G. brasiliensis*, em comparação com os animais não expostos ao poluente. Além disso, o típico comportamento de fuga explosiva do cardume (inferido pela redução do score de cluster), esperado após o ataque aéreo não foi evidenciado nos indivíduos que ingeriram presas contaminadas ou que foram expostos diretamente aos MPs (Fig. 6). Se do ponto de vista experimental esses dados sugerem efeito neurotóxico dos MPs com impacto direto no comportamento social dos *D. rerio*; do ponto de vista ecológico, nos permitem inferir que ambientes contaminados por esses poluentes podem impactar as populações de peixes, reduzindo a eficiência da vigilância e proteção do grupo contra predadores, assim como aumentando a probabilidade de detecção individual (pelos predadores) (Davies et al., 2012). Além disso, conforme destacado por Tu et al. (2010), a agregação social em peixes também pode ser vantajosa para a captura de alimentos e, quando ausente, pode culminar em efeitos danosos aos indivíduos.

Apesar da inexistência de relatos semelhantes aos nosso (em peixes expostos aos MPs PE), resultados semelhantes já foram reportados em estudos envolvendo outros modelos animais. Esse é o caso, por exemplo, dos trabalhos de Seuront (2018) e Araújo & Malafaia (2020). No primeiro, os autores mostraram que lixiviados de MPs de polipropileno alteraram significativamente o comportamento defensivo do gastrópode *Littorina littorea* à presença de sinais químicos de *Carcinus maenas*, sem afetar a performance neuromuscular dos animais. Já no segundo, foi demonstrado que a exposição de girinos de *Physalaemus cuvieri* a MPs PE ocasionou alterações comportamentais preditivas de déficit de resposta defensiva quando confrontados diretamente com juvenis de *Cyprinus carpio* (seus potenciais predadores) (Araújo & Malafaia, 2020).

Na ocasião, nenhum mecanismo de ação específico dos MPs foi avaliado nos referidos estudos, assim como em nossa investigação. No entanto, de acordo com Scott & Sloman (2004) e Weis & Candelmo (2012), os vínculos mais comumente observados nos déficits de resposta gregária antipredatória incluem a inibição da colinesterase (ChE), níveis alterados de neurotransmissores cerebrais, privação sensorial e níveis comprometidos de hormônios gonadal ou tireoidiano. Nesse caso, é possível que os MPs PE tenham induzido alterações semelhantes nos *D. rerio* avaliados em nosso estudo, as quais devem ser melhor investigadas futuramente. A

presença de MPs no cérebro dos *D. rerio* dos grupos “direta” e “dieta” (Fig. 3 e 4) fornece perspectivas promissoras de investigação sobre a ação neurotóxica desses poluentes. Por outro lado, é tentador especular que a possível interferência dos MPs na digestão e absorção dos alimentos e, conseqüentemente no metabolismo energético também, tenha afetado a resposta defensiva dos animais. Além dos níveis sanguíneos de glicose reduzidos nos *D. rerio* expostos aos MPs (Fig. 13) reforçarem essa hipótese, a estreita relação entre o metabolismo energético e a habilidade de responder a potenciais predadores ou pistas químicas de alarme é bem documentada na literatura (Stoks et al., 2005; Steiner, 2007; Slos & Stoks, 2008; Briceño et al., 2018; Paul et al., 2018; Koemel et al., 2019; Araújo & Malafaia, 2020).

Nossos dados também revelam associação entre o acúmulo de MPs PE nos diferentes órgãos avaliados e alterações mutagênicas e citotóxicas observadas nos eritrócitos circulantes (Fig. 9-12), semelhantemente aos relatos de Araújo et al. (2020), ao também exporem girinos de *P. cuvieri* a concentração ambientalmente relevante de MPs PE. Enquanto o efeito mutagênico dos MPs foi inferido pela presença de núcleos eritrocitários com constrição nuclear, eritrócitos binucleados, núcleos multilobados, com a presença de brotos, em forma de rim, núcleo deslocado, presença de micronúcleos, vacúolo nuclear e núcleos entalhados (Fig. 9), os efeitos citotóxicos foram associados às alterações de tamanho e forma dos MPs (Fig. 11-12). Logo, esses dados ratificam a toxicidade dos MPs tanto nos animais alimentados com presas contaminadas, quanto nos expostos diretamente ao poluente, o que também pode afetar a sobrevivência, reprodução e a herança genética dos animais através da indução de mutações.

Em relação à formação das anormalidades nucleares supracitadas, é possível que elas tenham origem em eventos aneuplóidicos que levam à formação de micronúcleos, conforme já discutido por distintos autores, tais como Ghadially (1982), Tice & Ivett (1985), Shimizu et al. (1998) e Shimizu et al. (2000), ou após a quebra de pontes nucleoplasmáticas na citocinese, conforme reportado em outros estudos (Lindberg et al., 2007; Anbumani & Mohankumar, 2011; Pampalona et al., 2010; Utani et al., 2010). O aumento da frequência de eritrócitos com núcleos deslocados (nos grupos expostos ao MPs PE), em particular (Fig. 9H-I), pressupõe que os MPs também podem agir sobre as estruturas que mantêm o núcleo em posição central, tais como os elementos do citoesqueleto ou similares. Apesar da literatura ser escassa em estudos que relataram essa alteração em animais expostos a contaminantes (Souza et al., 2018; Sampaio et al., 2019; Araújo et al., 2020); é plausível supor que a depleção ou alteração de filamentos intermediários nos eritrócitos poderia contribuir para o deslocamento nuclear.

Embora a etiologia dessa e das outras anormalidades nucleares eritrocitárias que identificamos seja multifuncional, tem sido fortemente sustentado que as reações de estresse

oxidativo (como fontes de radicais livres que danificam o material genético) constitui um mecanismo comum, independentemente da origem do estressor (natural ou antropogênico) (Strunjak-Perovic et al., 2009; Braham et al., 2017; Valskienė et al., 2019). Nesse caso, é possível que os MPs PE absorvidos pelos *D. rerio* tenham interferido nos mecanismos antioxidantes dos eritrócitos [vide detalhes em Franco et al. (2019)], sendo estes incapazes de impedir ou reparar os danos observados. Estudos anteriores relatam que os MPs são capazes de induzir estresse oxidativo, interferindo da integridade do DNA, o que reforça nossa hipótese.

Dentre esses estudos, destacam-se os trabalhos de Avio et al (2015), Ribeiro et al. (2017) e Berber (2019), os quais evidenciam que os MPs PS induzem efeito genotóxico em *Mytilus galloprovincialis*, *Scrobicularia plana* e *Neocaridina davidi*, respectivamente, cuja análise sistêmica de seus resultados sugerem que o efeito mutagênico dos MPs PE sobre os eritrócitos tenha sido indireto, i.e., induzido pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. O estudo de Jeong et al. (2016) também reforçam essa suposição ao reportar aumento dos níveis intracelulares de ROS em *Brachionus koreanus* expostos a MPs PS por apenas 24 horas ($\emptyset = 0,05, 0,5$ e $6 \mu\text{m}$), com efeito tamanho dependente.

Por outro lado, a redução das medidas morfométricas observadas nos eritrócitos/núcleos dos *D. rerio* expostos aos MPs (Fig. 11-12), reforça a hipótese de alterações no metabolismo energético induzidas pelos MPs, bem como a interferência desses poluentes na eficiência do transporte de oxigênio. No entanto, diferentemente de estudos prévios que associaram o aumento do volume citoplasmáticos a mecanismos compensatórios para atendimento de maior demanda de oxigênio pelo metabolismo antioxidante (Montalvão et al., 2019; Vieira et al., 2019; Araújo et al., 2019), supõe-se uma inabilidade antioxidante nos *D. rerio* expostos ao MPs o que pode explicar os efeitos mutagênicos e citotóxicos observados.

Por fim, considerando o pioneirismo do nosso estudo, é salutar reconhecer que nossas limitações devem ser superadas em estudos futuros. Além dos mecanismos de ação dos MPs PE não terem sido investigados, pode-se questionar se resultados semelhantes seriam observados em indivíduos de diferentes idades e sexo ou em outros distintos contextos tróficos envolvendo cadeias alimentares mais abrangentes envolvendo vertebrados de mesmo grupo taxonômico. Além disso, nada sabemos sobre as consequências reprodutivas e na dinâmica populacional advindas da exposição aos MPs (tanto pela via dietética, quando pela captura direta), cujo conhecimento, indubitavelmente, contribuiria para a compreensão da magnitude dos impactos causados por esses poluentes nos ecossistemas dulcícolas.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos dados confirmam a hipótese de que os MPs podem ser transferidos entre os níveis tróficos que compuseram a cadeia experimental estabelecida, bem como causar efeitos preditivos de déficit de resposta defensiva antipredatória em peixes, diante do confronto direto de um ataque aéreo simulado. Embora as exposições ao MP PE não tenham afetado aspectos da emocionalidade dos *D. rerio* e suas atividades locomotoras, seu potencial mutagênico e citotóxico foi confirmado, o que amplia nosso conhecimento sobre como esses micropoluentes podem afetar a saúde dos organismos aquáticos que habitam ambientes fluviais contaminados, demonstrando então que essa classe de contaminantes representa um risco ecotoxicológico tanto para os animais que entram em contato direto com o microplástico disperso na água, quanto para aqueles que se alimentam de presas expostas ao poluente.

6. REFERÊNCIAS

- Ali, H., & Khan, E. Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs—Concepts and implications for wildlife and human health. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 25(6), 1353-1376, 2019.
- Ali, S., Champagne, D. L., Alia, A., & Richardson, M. K. Large-scale analysis of acute ethanol exposure in zebrafish development: a critical time window and resilience. *PloS one*, 2011.
- Anbumani S, Kakkar P. Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018.
- Anbumani, S., & Mohankumar, M. N. Nuclear and cytoplasmic abnormalities in the fish *Catla catla* (Hamilton) exposed to chemicals and ionizing radiation. *Research Journal of Environmental Sciences*, 5(12), 867-877, 2011.
- Andrady A. Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 62(8): 1596-1605, 2011.
- Araújo, Amanda Pereira et al. How much are microplastics harmful to the health of amphibians? A study with pristine polyethylene microplastics and *Physalaemus cuvieri*. *Journal of hazardous materials*, 382, 121066, 2020.
- Araújo, Amanda Pereira et al. Anti-cancer drugs in aquatic environment can cause cancer: insight about mutagenicity in tadpoles. *Science of The Total Environment*, v. 650, p. 2284-2293, 2019.
- Araújo, Amanda Pereira; Malafaia, Guilherme. Can short exposure to polyethylene microplastics change tadpoles' behavior? A study conducted with neotropical tadpole

- species belonging to order anura (*Physalaemus cuvieri*). *Journal of Hazardous Materials*, p. 122214, 2020.
- Au, S. Y., Lee, C. M., Weinstein, J. E., van den Hurk, P., & Klaine, S. J. Trophic transfer of microplastics in aquatic ecosystems: identifying critical research needs. *Integrated environmental assessment and management*, 2017.
- Avio, C. G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., ... & Regoli, F. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution*, 198, 211-222, 2015.
- Barboza, L. G. A., Lopes, C., Oliveira, P., Bessa, F., Otero, V., Henriques, B., ... & Guilhermino, L. Microplastics in wild fish from North East Atlantic Ocean and its potential for causing neurotoxic effects, lipid oxidative damage, and human health risks associated with ingestion exposure. *Science of The Total Environment*, 2019.
- Bass, S. L., & Gerlai, R. Zebrafish (*Danio rerio*) responds differentially to stimulus fish: the effects of sympatric and allopatric predators and harmless fish. *Behavioural Brain Research*, 186(1), 107-117, 2008.
- Batel, A., Linti, F., Scherer, M., Erdinger, L., & Braunbeck, T. Transfer of benzo [a] pyrene from microplastics to *Artemia nauplii* and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants. *Environmental toxicology and chemistry*, 2016.
- Bellas, J., & Gil, I. Polyethylene microplastics increase the toxicity of chlorpyrifos to the marine copepod *Acartia tonsa*. *Environmental Pollution*, 2020.
- Berber, A. A. Genotoxic evaluation of polystyrene microplastic. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 23(3), 358-367, 2019.
- Bessa F, Barría P, Neto JM, Frias JPGL, Otero V, Sobral P, Marques JC. Occurrence of microplastics in commercial fish from a natural estuarine environment. *Mar Pollut Bull*, 2018.
- Bisazza, Angelo. Male competition, female mate choice and sexual size dimorphism in poeciliid fishes. *Marine & Freshwater Behaviour & Phy*, v. 23, n. 1-4, p. 257-286, 1993.
- Boerger CM, Lattin GL, Moore SL, Moore CJ. Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre. *Mar Pollut Bull*, 2010.
- Borges, R. E., de Souza Santos, L. R., Benvindo-Souza, M., Modesto, R. S., Assis, R. A., & de Oliveira, C. Genotoxic evaluation in tadpoles associated with agriculture in the Central Cerrado, Brazil. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 77(1), 22-28, 2019.

- Bour A, Avio CG, Gorbi S, Regoli F, Hylland K. Presence of microplastics in benthic and epibenthic organisms: Influence of habitat, feeding mode and trophic level. *Environ Pollut*, 2018.
- Braham, R. P., Blazer, V. S., Shaw, C. H., & Mazik, P. M. Micronuclei and other erythrocyte nuclear abnormalities in fishes from the Great Lakes Basin, USA. *Environmental and molecular mutagenesis*, 58(8), 570-581, 2017.
- Briceño, F. A., Polymeropoulos, E. T., Fitzgibbon, Q. P., Dambacher, J. M., & Pecl, G. T. Changes in metabolic rate of spiny lobster under predation risk. *Marine Ecology Progress Series*, 598, 71-84, 2018.
- Bücker, A.; da Conceição, M. B. Genotoxicity evaluation of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to waters from two sites of Itajaí-Açu River (SC, Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, v. 7, n. 2, 2012.
- Cannon SME, Lavers JL, Figueiredo B. Plastic ingestion by fish in the Southern Hemisphere: A baseline study and review of methods. *Mar Pollut Bull*, 2016.
- Capiotti, K. M., Junior, R. A., Kist, L. W., Bogo, M. R., Bonan, C. D., & Da Silva, R. S. Persistent impaired glucose metabolism in a zebrafish hyperglycemia model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 171, 58-65, 2014.
- Cedervall, T., Hansson, L. A., Lard, M., Frohm, B., & Linse, S. Food chain transport of nanoparticles affects behaviour and fat metabolism in fish. *PLoS one*, 2012.
- Chagas, Thales Quintão et al. Behavioral toxicity of tannery effluent in zebrafish (*Danio rerio*) used as model system. *Science of the Total Environment*, v. 685, p. 923-933, 2019.
- Choi, J. S., Hong, S. H., & Park, J. W. Evaluation of microplastic toxicity in accordance with different sizes and exposure times in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Marine environmental research*, 2020.
- Choleris, E., Thomas, A. W., Kavaliers, M., & Prato, F. S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2001.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine pollution bulletin*, 2011.
- Corsolini, S., & Sarà, G. (2017). The trophic transfer of persistent pollutants (HCB, DDTs, PCBs) within polar marine food webs. *Chemosphere*, 177, 189-199.
- Critchell, K., & Hoogenboom, M. O). Effects of microplastic exposure on the body condition and behaviour of planktivorous reef fish (*Acanthochromis polyacanthus*). *PLoS one*, 2018.

- Crooks, N., Parker, H., & Pernetta, A. P. Brain food? Trophic transfer and tissue retention of microplastics by the velvet swimming crab (*Necora puber*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2019.
- Dammski, Ana Paula; Müller, Bruno Roberto; Gaya, Carolina. *Manual de Criação em Biotério*, 2011.
- Davies, N. B., J. R. Krebs & S. A. West. *An Introduction to Behavioural Ecology*. Wiley, Hoboken, NJ, 2012.
- Faria, Denise Braga Gomes et al. Behavioral changes in Japanese quails exposed to predicted environmentally relevant abamectin concentrations. *Science of The Total Environment*, v. 636, p. 1553-1564, 2018.
- De Sá, Luís Carlos et al. Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: what do we know and where should we focus our efforts in the future?. *Science of the total environment*, v. 645, p. 1029-1039, 2018.
- Deacon, Amy E. et al. Predatory behaviour of female guppies (*Poecilia reticulata*) in a mosquito control context: the importance of social and habitat factors. *Aquatic Invasions*, v. 14, n. 3, p. 478-489, 2019.
- Ding, J., Chen, S., Qu, M., Wang, Y., & Di, Y. Trophic transfer affects cytogenetic and antioxidant responses of the mussel *Mytilus galloprovincialis* to copper and benzo (α) pyrene. *Marine Environmental Research*, 2020.
- Ding, J., Zhang, S., Razanajatovo, R. M., Zou, H., & Zhu, W. Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental pollution*, 2018.
- Amaral, Diogo Ferreira et al. Behavioral and mutagenic biomarkers in tadpoles exposed to different abamectin concentrations. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 13, p. 12932-12946, 2018.
- Eerkes-Medrano D, Thompson RC, Aldridge DC. Microplastics in freshwater systems: a review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water Res*, 2015.
- Estrela DC, da Silva WA, Guimarães AT, de Oliveira Mendes B, da Silva Castro AL, da Silva Torres IL, Malafaia G. Predictive behaviors for anxiety and depression in female Wistar rats subjected to cafeteria diet and stress. *Physiol Behav*, 2015.
- Etkin, A. & Wager, T. D. Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. *Am. J. Psychiatry* 164, 1476-1488, 2007.

- Fanselow, M. S. & Dong, H. W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65, 7-19, 2010.
- Farrel P, Nelson K. Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environmental Pollution*, 177: 1-3, 2013.
- Fenech, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, 2(5), 1084, 2007.
- Fiori, L. F., Figueiredo, B. R., Pavanello, A., Alves, V. S., Mathias, P. C. D. F., & Benedito, E. Physiological responses of anti-predation in prey fish to the threat of piscivorous fish in different underwater visibility conditions. *Iheringia. Série Zoologia*, 2018.
- Franco, R., Navarro, G., & Martínez-Pinilla, E. Antioxidant defense mechanisms in erythrocytes and in the central nervous system. *Antioxidants*, 8(2), 46, 2019.
- Gerlai, R. (2010). Zebrafish antipredatory responses: a future for translational research?. *Behavioural brain research*, 207(2), 223-231, 2010.
- Ghadially, F.N., 1982. *Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix*. Butterworths, London.
- Gleeson, M., Connaughton, V., & Arneson, L. S. Induction of hyperglycaemia in zebrafish (*Danio rerio*) leads to morphological changes in the retina. *Acta diabetologica*, 44(3), 157-163, 2007.
- Gray, J. A. & McNaughton, N. *The Neuropsychology of Anxiety* (Oxford Univ. Press, 2000).
- Grossman, Leah et al. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. *Behavioural brain research*, v. 214, n. 2, p. 277-284, 2010.
- Grupe, D. W. & Nitschke, J. B. Uncertainty and anticipation in anxiety: an integrated neurobiological and psychological perspective. *Nature Rev. Neurosci.* 14, 488-501, 2013.
- Güven O, Güokdag K, Jovanovic B, KıdeySs AE. Microplastic litter composition of the Turkish territorial waters of the Mediterranean Sea, and its occurrence in the gastrointestinal tract of fish. *Environ Pollut* 223:286-294, 2017.
- Guzman, Y. F. et al. Fear-enhancing effects of septal oxytocin receptors. *Nature Neurosci.* 16, 1185-1187, 2013.
- Hall D, Suboski MD. Visual and olfactory stimuli in learned release of alarm reactions by zebra danio fish (*Brachydanio rerio*). *Neurobiol Learn Mem*, 1995.
- Herbert-Read, J. E., Rosén, E., Szorkovszky, A., Ioannou, C. C., Rogell, B., Perna, A., ... & Sumpter, D. J. How predation shapes the social interaction rules of shoaling fish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2017.
- Hidalgo-Ruz V, Gutow L, Thompson RC, Thiel M. Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environ Sci Technol*, 2012.

- Hope, Brittany V.; Hamilton, Trevor J.; Hurd, Peter L. Submerged plus maze: a novel test for studying anxiety-like behaviour in fish. *Behavioural brain research*, v. 362, p. 332-337, 2019.
- Horton, A. A., Jürgens, M. D., Lahive, E., van Bodegom, P. M., & Vijver, M. G. 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, 2018.
- Huizinga M, Ghilambor C, Reznick D. The genetic and environmental basis of adaptive differences in shoaling behaviour among populations of trinidadian guppies, *Poecilia reticulata*. *J. Evol. Biol.* 22, 1860–1866, 2009.
- Hussain, Bilal et al. Fish eco-genotoxicology: Comet and micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ biomarker of freshwater pollution. *Saudi journal of biological sciences*, v. 25, n. 2, p. 393-398, 2018.
- Jeong, C. B., Won, E. J., Kang, H. M., Lee, M. C., Hwang, D. S., Hwang, U. K., ... & Lee, J. S. Microplastic size-dependent toxicity, oxidative stress induction, and p-JNK and p-p38 activation in the monogonont rotifer (*Brachionus koreanus*). *Environmental Science & Technology*, 50(16), 8849-8857, 2016.
- Jiang JQ. Occurrence of microplastics and its pollution in the environment: A review. *Sustainable Production and Consumption*, 13: 16-23, 2018.
- Karami, A., Romano, N., Galloway, T., & Hamzah, H. Virgin microplastics cause toxicity and modulate the impacts of phenanthrene on biomarker responses in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Environmental research*, 2016.
- Kim, S. K. Trophic transfer of organochlorine pesticides through food-chain in coastal marine ecosystem. *Environmental Engineering Research*, 2019.
- Kim, S. Y. et al. Diverging neural pathways assemble a behavioural state from separable features in anxiety. *Nature* 496, 219–223, 2013.
- Koemel, N. A., Barnes, C. L., & Wilder, S. M. Metabolic and behavioral responses of predators to prey nutrient content. *Journal of insect physiology*, 116, 25-31, 2019.
- Lailson-Brito Jr, J., Dorneles, P. R., da Silva, V. M., Martin, A. R., Bastos, W. R., Azevedo-Silva, C. E., ... & Malm, O. Dolphins as indicators of micropollutant trophic flow in Amazon Basin. *Oecologia Brasiliensis*, 2008.
- Lekam Ralalage, S., Miranda, A., Ball, A., Shukla, R., & Nugegoda, D. The toxicity of coated silver nanoparticles to *Daphnia carinata* and trophic transfer from alga *Raphidocelis subcapitata*. *Plos one*, 2019.

- Leussis, Melanie P.; bolivar, Valerie J. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 30, n. 7, p. 1045-1064, 2006.
- Li, Y., Wang, J., Yang, G., Lu, L., Zheng, Y., Zhang, Q., ... & Ru, S. Low level of polystyrene microplastics decreases early developmental toxicity of phenanthrene on marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Journal of Hazardous Materials*, 2020.
- Lindberg, H. K., Wang, X., Järventaus, H., Falck, G. C. M., Norppa, H., & Fenech, M. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 617(1-2), 33-45, 2007.
- Lu, K., Qiao, R., An, H., & Zhang, Y. Influence of microplastics on the accumulation and chronic toxic effects of cadmium in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 2018.
- Lu, Y., Zhang, Y., Deng, Y., Jiang, W., Zhao, Y., Geng, J., ... & Ren, H. Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver. *Environmental science & technology*, 2016.
- Malafaia, Guilherme et al. Developmental toxicity in zebrafish exposed to polyethylene microplastics under static and semi-static aquatic systems. *Science of The Total Environment*, v. 700, p. 134867, 2020.
- Mallatt, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 42, p. 630-648, 1985.
- Montalvão, M. F., & Malafaia, G. Effects of abamectin on bullfrog tadpoles: insights on cytotoxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(29), 23411-23416, 2017.
- Nemati, T., Sarkheil, M., & Johari, S. A. Trophic transfer of CuO nanoparticles from brine shrimp (*Artemia salina*) nauplii to convict cichlid (*Amatitlania nigrofasciata*) larvae: uptake, accumulation and elimination. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019.
- OECD. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. Organization for Economic, 1994.
- Oliveira, M., Ribeiro, A., Hylland, K., & Guilhermino, L. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Ecological Indicators*, 2013.
- Pampalona, J., Soler, D., Genesca, A., & Tusell, L. Telomere dysfunction and chromosome structure modulate the contribution of individual chromosomes in abnormal nuclear morphologies. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 683(1-2), 16-22, 2010.

- Pannetier, P., Morin, B., Le Bihanic, F., Dubreil, L., Clérandeau, C., Chouvellon, F., ... & Cachot, J. Environmental samples of microplastics induce significant toxic effects in fish larvae. *Environment international*, 134, 2020.
- Parenti, Lynne R. A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 1981.
- Parker, Matthew O. et al. Behavioral phenotyping of casper mutant and 1-phenyl-2-thiourea treated adult zebrafish. *Zebrafish*, v. 10, n. 4, p. 466-471, 2013.
- Parker, Matthew O. et al. The utility of zebrafish to study the mechanisms by which ethanol affects social behavior and anxiety during early brain development. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 55, p. 94-100, 2014.
- Paul, N., Novais, S. C., Lemos, M. F., & Kunzmann, A. Chemical predator signals induce metabolic suppression in rock goby (*Gobius paganellus*). *PloS one*, 13(12), 2018.
- Pfeiffer W. The distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. *Copeia*. 1977.
- Piccardo, M., Provenza, F., Grazioli, E., Cavallo, A., Terlizzi, A., & Renzi, M. PET microplastics toxicity on marine key species is influenced by PH, particle size and food variations. *Science of The Total Environment*, 2020.
- Powell, M. D.; Speare, D. J.; Burka, J. F. Fixation of mucus on Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) gills for light and electron microscopy. *J. Fish Biol.*, v. 41, p. 813-824, 1992.
- Qualhato, Gabriel et al. Genotoxic and mutagenic assessment of iron oxide (maghemite- γ -Fe₂O₃) nanoparticle in the guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere*, v. 183, p. 305-314, 2017.
- Rehse, Saskia; Kloas, Werner; Zarfl, Christiane. Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, v. 153, p. 91-99, 2016.
- Ribeiro, F., Garcia, A. R., Pereira, B. P., Fonseca, M., Mestre, N. C., Fonseca, T. G., ... & Bebianno, M. J. Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. *Marine pollution bulletin*, 122(1-2), 379-391, 2017.
- Saaristo, Minna et al. Impacts of the antidepressant fluoxetine on the anti-predator behaviours of wild guppies (*Poecilia reticulata*). *Aquatic toxicology*, v. 183, p. 38-45, 2017.
- Sampaio, D. M. R., Estrela, F. N., de Oliveira Mendes, B., da Costa Estrela, D., Montalvão, M. F., Mesak, C., ... & de Lima Rodrigues, A. S. Ingestion of tannery effluent as a risk factor

- to the health of birds: A toxicological study using *Coturnix coturnix japonica* as a model system. *Science of The Total Environment*, 681, 275-291, 2019.
- Scott, G. R., & Sloman, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic toxicology*, 68(4), 369-392, 2004.
- Seghers BH. Schooling behavior in the guppy (*Poecilia reticulata*): an evolutionary response to predation. *Evolution* 28, 486-489, 1974.
- Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., & Lehtiniemi, M. Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environmental pollution*, 185, 77-83, 2014.
- Seuront, L. Microplastic leachates impair behavioural vigilance and predator avoidance in a temperate intertidal gastropod. *Biology letters*, 14(11), 2018.
- Sheehan, T. P., Chambers, R. A. & Russell, D. S. Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 46, 71-117, 2004.
- Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H., & Wahl, G. M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *The Journal of cell biology*, 140(6), 1307-1320, 1998.
- Shimizu, N., Shimura, T., & Tanaka, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 448(1), 81-90, 2000.
- Slos, S., & Stoks, R. Predation risk induces stress proteins and reduces antioxidant defense. *Functional Ecology*, 22(4), 637-642, 2008.
- Souza JM, Rabelo LM, de Faria DBG, Guimarães ATB, da Silva WAM, Rocha TL, Estrela FN, Chagas TQ, de Oliveira Mendes B, Malafaia G. The intake of water containing a mix of pollutants at environmentally relevant concentrations leads to defensive response deficit in male C57Bl/6J mice. *Sci Total Environ*, 2018.
- Steenbergen, P. J., Richardson, M. K., & Champagne, D. L. Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: a pharmacological study. *Behavioural brain research*, 222(1), 15-25, 2011.
- Steiner, U. K. Linking antipredator behaviour, ingestion, gut evacuation and costs of predator-induced responses in tadpoles. *Animal Behaviour*, 74(5), 1473-1479, 2007.
- Stewart, A., Kadri, F., DiLeo, J., Min Chung, K., Cachat, J., Goodspeed, J., & Elegante, M. The developing utility of zebrafish in modeling neurobehavioral disorders. *International Journal of Comparative Psychology*, 2010.

- Stoks, R., Block, M. D., Van De Meutter, F., & Johansson, F. Predation cost of rapid growth: behavioural coupling and physiological decoupling. *Journal of Animal Ecology*, 74(4), 708-715, 2005.
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S. & Moser, E. I. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Rev. Neurosci.* 15, 655-669, 2014.
- Strunjak-Perovic, I., Topic Popovic, N., Coz-Rakovac, R., & Jadan, M. Nuclear abnormalities of marine fish erythrocytes. *Journal of fish biology*, 74(10), 2239-2249, 2009.
- Suedel, B. C., Boraczek, J. A., Peddicord, R. K., Clifford, P. A. & Dillon, T. M. Trophic transfer and biomagnification potential of contaminants in aquatic ecosystems. *Rev. Environ. Contamin. Toxicol.* 136, 21-89, 1994.
- Thompson, Richard F.; spencer, William A. Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological review*, v. 73, n. 1, p. 16, 1966.
- Tice, R.R., Ivett, J.L.. Cytogenetic analysis of bone marrow damage. In: Irons, R.D. (Ed.), *Toxicology of the Blood and Bone Marrow*. Raven Press, New York, p. 182, 1985.
- Tosetto L, Williamson JE, Brown C. Trophic transfer of microplastics does not affect fish personality. *Animal Behavior*, 123: 159-167, 2017.
- Tu, S. Y., & Sayed, A. H. Foraging behavior of fish schools via diffusion adaptation. In 2010 2nd International Workshop on Cognitive Information Processing, 2010.
- Utani, K. I., Kohno, Y., Okamoto, A., & Shimizu, N. Emergence of micronuclei and their effects on the fate of cells under replication stress. *PloS one*, 5(4), 2010.
- Valskienė, R., Baršienė, J., Butrimavičienė, L., Pažusienė, J., Grygiel, W., Stankevičiūtė, M., & Rybakovas, A. Induction of nuclear abnormalities in herring (*Clupea harengus membras*), flounder (*Platichthys flesus*), and Atlantic cod (*Gadus morhua*) collected from the southern part of the Gotland Basin—the Baltic Sea (2010–2017). *Environmental Science and Pollution Research*, 26(13), 13366-13380, 2019.
- Vieira, J. E. A., de Oliveira Ferreira, R., dos Reis Sampaio, D. M., da Costa Araújo, A. P., & Malafaia, G. An insight on the mutagenicity and cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles in *Gallus gallus domesticus* (Phasianidae). *Chemosphere*, 231, 10-19, 2019.
- Walkinshaw C, Lindeque PK, Thompson R, Tollhurst T, Cole M. Microplastic and seafood: lower trophic organisms at highest risk of contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190: 110066, 2020.
- Wang, W., Ge, J., & Yu, X. Bioavailability and toxicity of microplastics to fish species: A review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2020.

- Wang, Y. M., Tang, D. D., Yuan, X. Y., Uchimiya, M., Li, J. Z., Li, Z. Y., ... & Sun, S. G. Effect of amendments on soil Cd sorption and trophic transfer of Cd and mineral nutrition along the food chain. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020.
- Weis, J. S., & Candelmo, A. Pollutants and fish predator/prey behavior: a review of laboratory and field approaches. *Current Zoology*, 58(1), 9-20, 2012.
- Wright, S. L., Thompson, R. C., & Galloway, T. S. The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. *Environmental pollution*, 2013.
- Xia, X., Sun, M., Zhou, M., Chang, Z., & Li, L. Polyvinyl chloride microplastics induce growth inhibition and oxidative stress in *Cyprinus carpio* var. larvae. *Science of The Total Environment*, 136479, 2020.

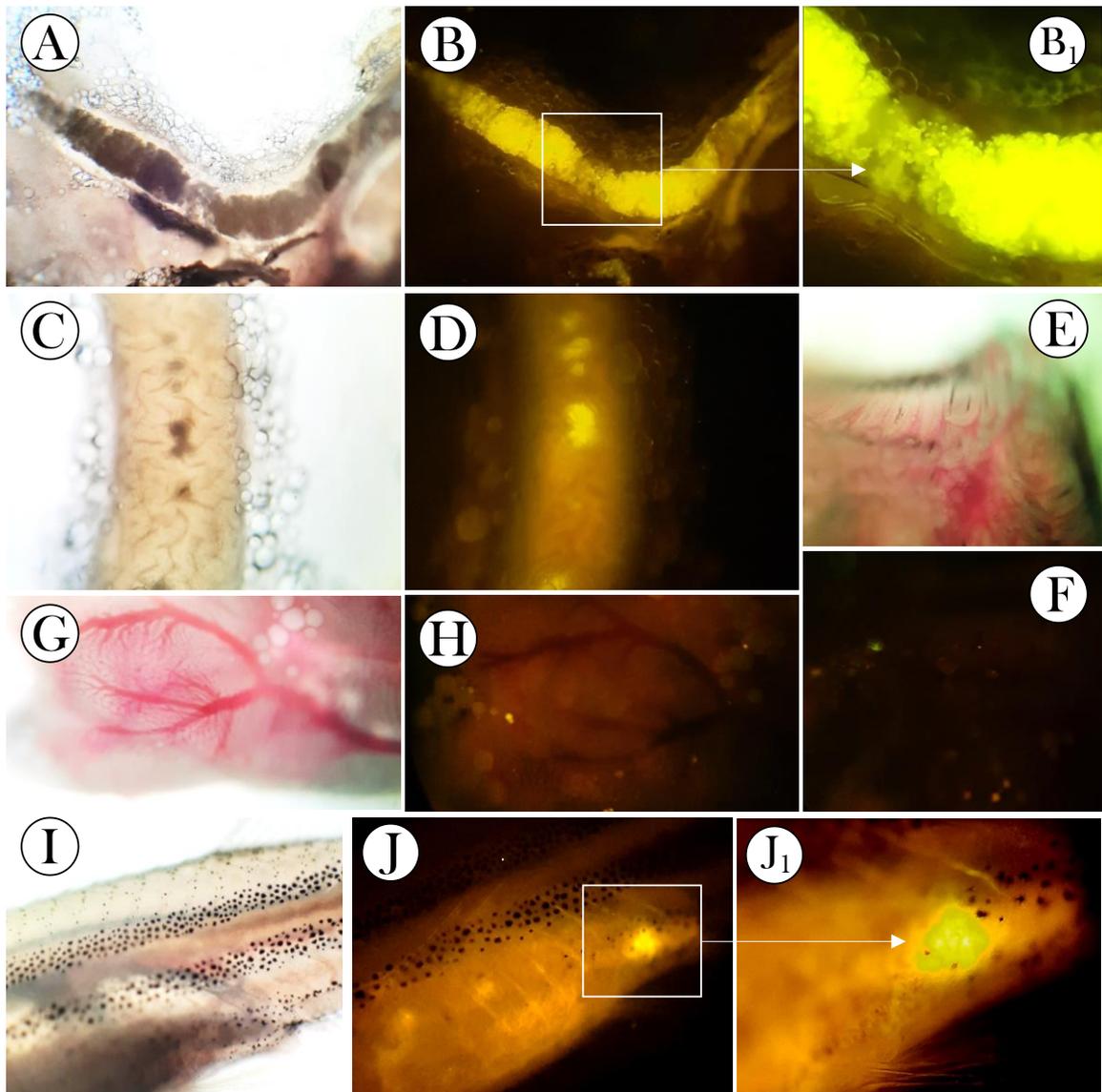


Figura 1S. Fotomicrografias de diferentes partes dos *D. rerio* expostos pela via direta aos MPs PE, indicando a presença dos poluentes emitindo fluorescência. (A-B-B₁) intestino; (C-D) estômago; (E-F) brânquias; (G-H) fígado; (I-J-J₁) vista lateral de um espécime.