



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Urutaí

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

**MÚLTIPLOS *ENDPOINTS* DA TOXICIDADE DO  
BIOMICROPLÁSTICO DE ÁCIDO POLILÁTICO  
EM ADULTOS DE *ZEBRAFISH* (*Danio rerio*)**

**THALES QUINTÃO CHAGAS**

**Orientador: Prof. Dr. Guilherme Malafaia**

Urutaí, novembro 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, novembro de 2020

THALES QUINTÃO CHAGAS

**MÚLTIPLOS *ENDPOINTS* DA TOXICIDADE DO  
BIOMICROPLÁSTICO DE ÁCIDO POLILÁTICO EM  
ADULTOS DE *ZEBRAFISH* (*Danio rerio*)**

*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**

C433m Chagas, Thales Quintão  
MÚLTIPLOS ENDPOINTS DA TOXICIDADE DO  
BIOMICROPLÁSTICO DE ÁCIDO POLILÁTICO EM ADULTOS DE  
ZEBRAFISH (Danio rerio) / Thales Quintão Chagas;  
orientador Guilherme Malafaia Pinto. -- Urutaí, 2020.  
58 p.

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

1. Biopolímeros. 2. Biomicroplásticos. 3. Peixes.  
4. Toxicologia comportamental. 5. Comportamento  
animal. I. Malafaia Pinto, Guilherme, orient. II.  
Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA  
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Ata nº 66/2020 - CREPG-UR/DPGPI-UR/CMPURT/IFGOIANO

## PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO

ATA Nº/61

### BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos vinte e cinco dias do mês de novembro do ano de dois mil e vinte, às treze horas, reuniram-se os componentes da banca examinadora em sessão pública realizada por videoconferência, para procederem à avaliação da defesa de dissertação, em nível de mestrado, de autoria de **Thales Quintão Chagas**, discente do **Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado do Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí**. A sessão foi aberta pelo presidente da banca examinadora, **Prof. Dr. Guilherme Malafaia Pinto**, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da dissertação para em 30min., proceder à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se a avaliação da defesa. Tendo-se em vista as normas que regulamentam o Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado, e procedidas às correções recomendadas, a dissertação foi **APROVADA**, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **MESTRE EM CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS DO CERRADO**, na área de concentração em **Ciências Ambientais**, pelo Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções. Assim sendo, a defesa perderá a validade se não cumprida essa condição, em até **sessenta dias** de sua ocorrência. A banca examinadora recomendou a publicação do artigo científico oriundo dessa dissertação em periódico após procedida as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades da pauta, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação de mestrado, e para constar, foi lavrada a presente Ata, que, após lida e achada conforme, será assinada eletronicamente pelos membros da banca examinadora.

Membros da Banca Examinadora:

Nome	Instituição	Situação no Programa
Prof. Dr. Guilherme Malafaia	IF Goiano	Presidente
Profa. Dra. Ana Carolina Luchiari	UFRN	Membro externo
Dra. Juliana Moreira Mendonça Gomes	USP	Membro externo

*Juliana Moreira Mendonça Gomes*

Documento assinado eletronicamente por:

- Ana Carolina Luchiari, Ana Carolina Luchiari - Professor Avaliador de Banca - Instituto Federal Goiano (1), em 08/12/2020 14:40:34.
- Guilherme Malafaia Pinto, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 01/12/2020 04:28:51.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 20/11/2020. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 212908  
Código de Autenticação: a37499e943



**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**

- Tese  Artigo Científico  
 Dissertação  Capítulo de Livro  
 Monografia – Especialização  Livro  
 TCC - Graduação  Trabalho Apresentado em Evento  
 Produto Técnico e Educacional - Tipo: \_\_\_\_\_

Nome Completo do Autor: **THALES QUINTÃO CHAGAS**

Matrícula: **2019 1013 3094 0167**

Título do Trabalho: **MÚLTIPLOS ENDPOINTS DA TOXICIDADE DO BIOMICROPLÁSTICO DE ÁCIDO POLILÁTICO EM ADULTOS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

**Restrições de Acesso ao Documento**

Documento confidencial:  Não  Sim, justifique: \_\_\_\_\_

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 21/01/2021

O documento está sujeito a registro de patente?  Sim  Não

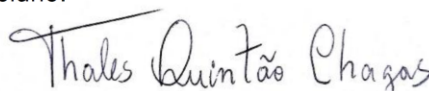
O documento pode vir a ser publicado como livro?  Sim  Não

**DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA**

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

1. 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;
2. 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;
3. 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.

Urutai - GO, 21/01/2021.



Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)

*Aos meus pais **Josiane Quintão** e **Edivar Chagas**,  
e à minha irmã **Thaís Quintão**,  
por mesmo de tão longe, estarem sempre ao meu lado.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus**, por ter sido força espiritual em tantos momentos e por ter a mim confiado tantas experiências e oportunidades durante toda a minha jornada acadêmica.

À minha **família**, que em **TODOS** os momentos estiveram presentes nos desafios que surgiram durante essa fase, em especial à minha amiga, professora e mãe **Josiane Quintão**, por ser a melhor mãe e exemplo que eu poderia ter.

À minha querida companheira **Tenilce Gabriela**, que desde antes de tudo isso acontecer, me falou sobre Urutaí e me fez acreditar em mim mesmo quando eu não acreditava. Devo muito de tudo o que já fiz e o que sou hoje a você meu bem!

Ao **Instituto Federal Goiano** campus Urutaí, em especial ao Programa de Pós-Graduação em **Conservação de Recursos Naturais do Cerrado** pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Programa de Educação Tutorial - **PET Bio Urutaí**, que me ensinou a dar os primeiros passos na minha vida acadêmica. Aos meus queridos colegas que me acolheram e me ensinaram a ser petiano. E é claro, ao meu professor e amigo **André Castro**, que tanto contribuiu para minha formação.

Ao **Laboratório de Pesquisas Biológicas** que me acolheu e me mostrou os valores da pesquisa científica. Aos meus queridos colegas de laboratório que sempre se coloraram à disposição para juntos fazermos ciência. Em especial aos colegas/ pesquisadores Tenilce Gabriela, Ítalo Nascimento, Mateus Montalvão, Abner Marcelino, Abraão Tiago e Amanda Araújo pelas contribuições no desenvolvimento do presente estudo. Por fim, ao meu querido professor e orientador **Guilherme Malafaia**. O sr. é minha maior referência de profissional dedicado e competente.

Obrigado por tudo professor Guilherme!!!



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	15
2.1. Animais e delineamento experimental .....	15
2.2. Biomicroplástico de ácido polilático (BioMPs de PLA).....	16
2.3. Biomarcadores de toxicidade .....	18
2.3.1. Testes comportamentais .....	18
2.3.1.1. Teste do campo aberto .....	19
2.3.1.2. Teste do tanque novo.....	20
2.3.1.3. Interação social coespecífica .....	20
2.3.1.4. Interação social com não-predador .....	21
2.3.1.5. Interação social com predador terrestre.....	23
2.3.1.6. Interação social com predador aquático .....	23
2.3.1.7. Análise comportamental dos estímulos.....	24
2.3.2. Avaliações bioquímicas .....	25
2.3.2.1. Indicadores bioquímicos do <i>status</i> nutricional.....	25
2.3.2.4. Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) .....	26
2.3.2.5. Estresse oxidativo .....	26
2.3.2.6. Parâmetros relacionados à atividade antioxidante .....	27
2.3.3. Análise de pigmentação e parâmetros biométricos.....	28
2.3.4. Acumulação dos biomicroplásticos de PLA .....	29
2.4. Análises estatísticas .....	29
<b>3. RESULTADOS</b> .....	30
3.1. Caracterização e quantificação dos biomicroplásticos.....	30
3.2. Biomarcadores comportamentais .....	32
3.3. Biomarcadores bioquímicos .....	38
3.4. Biometria e pigmentação.....	41
3.5. Qualidade físico-química das águas de exposição .....	43
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	43
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	48
<b>6. AGRADECIMENTOS</b> .....	49
<b>7. CONFORMIDADE COM AS NORMAS ÉTICAS</b> .....	49
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	50

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da sequência cronológica da exposição e de execução dos testes comportamentais com suas respectivas durações.....	16
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática do sistema montado para gravação de vídeos (câmeras filmadoras frontal e superior), dimensões do aquário onde os testes comportamentais foram realizados e indicações de controle de luminosidade, temperatura e isolamento acústico da sala de testes.....	19
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática dos testes comportamentais realizados.....	22
<b>Figura 4.</b> (A-D) Esquemas representativos das áreas externas dos <i>D. rerio</i> utilizadas para determinação dos efeitos dos tratamentos sobre a pigmentação dos animais e (E) Medidas biométricas aferidas nos animais.....	28
<b>Figura 5.</b> (A) Imagem do ponto da superfície analisada pela espectrometria de Raman, onde houve a deposição do filme de PLA; (B) Espectro de Raman; (C-G) eletromicrografias representativas obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em diferentes ampliações e (H) fotomicrografias representativas dos BioMPs de PLA analisados via microscopia óptica, em diferentes ampliações.....	30
<b>Figura 6.</b> Histogramas de frequência relativos aos parâmetros de forma e tamanho dos BioMPs de PLA utilizados em nosso estudo (n = 290 partículas). (A) Area; (B) Diameter; (C) Roundness (D) Solidity e (E) Aspect ratio das partículas.....	31
<b>Figura 7.</b> Concentração de ácido lático na carcaça, fígado, brânquias e cérebro de adultos de <i>D. rerio</i> expostos aos BioMPs de PLA (BP I: 2,5 mg/L e BP II: 5 mg/L).....	32
<b>Figura 8.</b> (A) Distância percorrida, (B) velocidade média de natação e (C) índice de ansiedade avaliados no teste do campo aberto, ao qual adultos de <i>D. rerio</i> foram submetidos (previamente expostos ou não aos BioMPs de PLA).....	33
<b>Figura 9.</b> (A) Índice da distância dos peixes até a superfície d' água e (B) escores de cluster (obtidos no teste do tanque novo) de cardumes de adultos de <i>D. rerio</i> compostos por indivíduos expostos ou não aos BioMPs de PLA.....	34
<b>Figura 10.</b> (A) Índice da distância dos peixes até a superfície d' água; (B) escore de <i>cluster</i> ; (C) distância de cada peixe do cardume até o espelho e (D) frequência de interação com o espelho (avaliados no teste interação coespecífica) de cardumes de adultos de <i>D. rerio</i> expostos ou não aos BioMPs de PLA.....	34
<b>Figura 11.</b> (A) Índice da distância dos peixes até a superfície d' água; (B) escore de <i>cluster</i> ; (C) distância de cada <i>D. rerio</i> do cardume até o peixe intruso e (D) frequência de interação dos peixes	

testes ao não-predador no teste de interação social no qual os cardumes foram confrontados com um <i>P. reticulata</i> .....	35
<b>Figura 12.</b> (A) Índice da distância dos peixes até a superfície d' água; (B) escore de <i>cluster</i> e (C) frequência de exibição do comportamento de fuga explosivas de cardumes compostos por adultos de <i>D. rerio</i> expostos ou não aos BioMPs de PLA, quando submetidos ao teste de interação social com um potencial predador terrestre.....	37
<b>Figura 13.</b> (A) Índice da distância dos peixes até a superfície d' água; (B) escore de <i>cluster</i> ; (C) distância de cada peixe do cardume até a <i>O. niloticus</i> e (D) frequência de interação dos peixes testes com o estímulo predatório (no teste de interação social com potencial predador).....	38
<b>Figura 14.</b> (A) Concentrações sanguíneas de glicose (g/dL) e de (B) carboidratos totais (C) proteínas totais e triglicerídeos no cérebro de adultos de <i>D. rerio</i> expostos ou não aos BioMPs de PLA.....	39
<b>Figura 15.</b> Atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro de adultos de <i>D. rerio</i> expostos ou não aos BioMPs de PLA.....	39
<b>Figura 16.</b> (A) Concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, (B) produção de nitrito e (C) peróxido de hidrogênio no cérebro de adultos de <i>D. rerio</i> expostos ou não aos BioMPs de PLA.....	40
<b>Figura 17.</b> (A) Atividade da glutatona total, (B) súpéroxido dismutase e de (C) tióis totais no cérebro de adultos de <i>D. rerio</i> expostos ou não aos BioMPs de PLA.....	41
<b>Figura 18.</b> Percentual de área pigmentada em diferentes faixas de pigmentação corpórea de adultos de <i>D. rerio</i> expostos ou não aos BioMPs de PLA. D1: Faixa dorsal 1; D2: Faixa dorsal 2; V1: Faixa ventral 1 e V2: Faixa ventral 2.....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros biométricos corpóreos avaliados em adultos de <i>D. rerio</i> expostos ou não aos BioMPs de PLA.....	42
<b>Tabela 2</b> Parâmetros físico-químicos monitorados ao longo do período experimental.....	43

## RESUMO

Estudos tem relatado a toxicidade dos microplásticos convencionais (i.e.: derivados do petróleo) em diferentes organismos e incentivado a produção de materiais alternativos em substituição ao seu uso, tais como os bioplásticos. Porém, o conhecimento dos efeitos desses biopolímeros sobre os vertebrados aquáticos ainda é incipiente. Assim, o objetivo do presente estudo foi testar a hipótese de que adultos de *Danio rerio* expostos (por 30 dias) aos biomicroplásticos de ácido polilático (BioMPs de PLA) o acumulariam, culminando em alterações comportamentais/neurotóxicas, bioquímicas e morfológicas. Nossos resultados evidenciam que os BioMPs de PLA (nas concentrações de 2,5 e 5 mg/L) se acumularam no fígado, cérebro, brânquias e carcaça dos animais. No entanto, tal acúmulo não foi capaz de provocar prejuízos locomotores, tampouco o desencadeamento de comportamento *anxiety-like* nos animais. Por outro lado, foi suficiente para provocar alterações comportamentais preditivas de déficits em interações sociais coespecíficas e de respostas defensivas antipredatórias, provavelmente relacionadas com alterações colinérgicas (inferidas pelo aumento da acetilcolinesterase) e a um desequilíbrio REDOX, caracterizado pelo aumento da produção de espécies reativas, cujo sistema antioxidante não foi capaz de contrabalancear. Além disso, observamos que os tratamentos afetaram o padrão de pigmentação dos animais. Assim, nosso estudo evidencia o potencial toxicológico do biopolímero estudado, o que coloca em “xeque” a inocuidade desses materiais em relação aos microplásticos convencionais. Entretanto, dado o pioneirismo do nosso estudo, ressaltamos que investigações futuras serão úteis para ampliarmos nossa compreensão sobre como esses materiais afetam a ictiofauna de água doce, bem como para avaliarmos a magnitude dos riscos ecológicos desses materiais nos ecossistemas aquáticos.

**Palavras-chaves:** Biopolímeros, biomicroplásticos, peixes, toxicologia comportamental.

## ABSTRACT

Studies have reported the toxicity of conventional microplastics (i.e., petroleum derivatives) in different organisms and encouraged the production of alternative materials to replace their use, such as bioplastics. However, the knowledge of the effects of these biopolymers on aquatic vertebrates is still incipient. Thus, the aim of the present study was to test the hypothesis that *Danio rerio* adults exposed (for 30 days) to polylactic acid biomicroplastics (PLA BioMPs) would accumulate, culminating in behavioral / neurotoxic, biochemical and morphological changes. Our results show that the PLA BioMPs (in concentrations of 2.5 and 5 mg / L) accumulated in the liver, brain, gills and carcass of the animals. However, such accumulation was not able to cause locomotor damage, nor the triggering of anxiety-like behavior in animals. On the other hand, it was enough to cause behavioral changes predictive of deficits in co-specific social interactions and anti-predatory defensive responses, probably related to cholinergic changes (inferred by the increase in acetylcholinesterase) and to a REDOX imbalance, characterized by increased production of reactive species, whose antioxidant system was not able to counterbalance. In addition, we observed that the treatments affected the pigmentation pattern of the animals. Thus, our study shows the toxicological potential of the studied biopolymer, which puts the safety of these materials in check compared to conventional microplastics. However, given the pioneering nature of our study, we emphasize that future research will be useful to broaden our understanding of how these materials affect freshwater ichthyofauna, as well as to assess the magnitude of the ecological risks of these materials in aquatic ecosystems.

**Keywords:** Biopolymers, biomicroplastics, fish, behavioral toxicology.

## 1. INTRODUÇÃO

É inegável que o crescimento populacional e o desenvolvimento social estão cada vez mais atrelados ao uso de tecnologias convertidas em materiais, produtos e serviços (Umanailo et al., 2019), empregados em vários setores com o intuito de auxiliarem no cotidiano e na logística particular e comunitária de populações com perfil cada vez mais consumidor. Com isso, a utilização de diferentes fontes como matéria-prima associadas à síntese de produtos e utensílios, parece ser inevitável. Nesse cenário, destaca-se o plástico, que por apresentar características consideradas vantajosas do ponto de vista produtivo é utilizado em larga escala em todo o mundo (Kor & Mehdinia et al., 2020). Leveza, versatilidade, inércia química e considerável resistência mecânica são algumas das características que justificam o emprego maciço dos plásticos em diferentes setores (Nielsen et al., 2020). Além disso, seu custo de produção é baixo, quando comparado a outros materiais alternativos tais como os plásticos biodegradáveis e/ou bioplásticos (Foschi & Bonoli, 2019), fato que contribui anualmente para uma produção estimada em mais de 335 milhões de toneladas (Shruti & Kutralam-Muniasamy, 2019).

Dentre os diferentes tipos de plásticos, aqueles considerados convencionais (PCs) são produzidos a partir do petróleo, sendo constituídos por uma mistura de compostos orgânicos e principalmente hidrocarbonetos (Botterell et al., 2019). Logo, esses materiais são classificados como recursos não renováveis, que apresentam baixa degradabilidade e consequentemente, demandam um longo período de tempo até seu desaparecimento total do ambiente (Wei et al., 2020). Desse modo, a gestão e/ou descarte incorretos desses materiais resulta no seu acúmulo em diferentes ambientes, especialmente nas proximidades dos grandes centros urbanos (Kor & Mehdinia et al., 2020). Entretanto, os riscos oferecidos por esses materiais aos organismos vão além do seu descarte nos variados compartimentos ambientais. Eles também levam em consideração a (i) ação intempérica que esses materiais sofrem ao longo do tempo, podendo transformá-los em fragmentos de tamanho reduzido e com propriedades físicas e químicas muito particulares [ex.: microplásticos (MPs) e nanoplásticos (NPs)] e (ii) a dispersão de partículas inicialmente sintetizadas em pequenos diâmetros (Anbumani & Kakkar, 2018), tais como pellets de resinas plásticas (Louro et al., 2017) e/ou microesferas utilizadas em produtos de higiene e cosméticos (Fendal & Sewell, 2009).

O destaque que os MPs e NPs têm ganhado, particularmente nos últimos anos, se deve ao relato de diferentes estudos que evidenciam que o tamanho dessas partículas é preponderante para a magnitude dos efeitos que elas causam na biota (Koelmans, Besseling & Shim, 2015; Guimarães et al., 2020). Quanto menor forem as partículas, maior tem sido o risco de agirem sobre os sistemas biológicos, podendo afetar drasticamente a biodiversidade, especialmente aquela representada por organismos que habitam ambientes poluídos, além de causar prejuízos à saúde humana em sua última instância (Prata et al., 2020). Os estudos revistos por Naqash et al. (2020) e Prinz & Korez (2020) destacam o potencial toxicológico desses materiais, sobretudo, ao associarem os MPs à

prejuízos no metabolismo energético; danos intestinais; alterações no desempenho reprodutivo; efeitos histopatológicos, comportamentais, bioquímicos, genotóxicos, mutagênicos, dentre outros. Além disso, o potencial efeito sinérgico, aditivo ou antagonístico que outros xenobióticos podem exercer sobre os MPs, tem sido demonstrado em estudos prévios (Burrows et al., 2020; Tang et al., 2020; Xu et al., 2020).

Diante disso, tem sido valorizado cada vez mais o uso das tecnologias para a produção de materiais alternativos aos PCs e, potencialmente sustentáveis, a exemplo dos plásticos produzidos a partir de recursos naturais, conhecidos popularmente por bioplásticos (BPs) (Walker & Rothman, 2020). Tais materiais são biopolímeros derivados de matérias-primas de fontes renováveis, sendo biodegradáveis especialmente aqueles produzidos a partir de produtos vegetais e animais, tais como a celulose, amido, quitina, etc., que ocorrem em grande abundância em meio natural e em cultivares (Gironi & Piemonte, 2011). Logo, isso representa uma das vantagens dos BPs em relação aos PCs, visto que seu tempo de degradação ambiental é significativamente menor, desde que as condições ambientais sejam ideais (ex.: forças abrasivas, aquecimento - resfriamento, umedecimento - secagem dentre outras) (Klein et al., 2018; Muthusamy & Pramasivam, 2019). Além disso, o uso desses materiais pode contribuir positivamente para redução da flutuação do preço do petróleo, comumente observada nos dias atuais devida à sua escassez em todo o planeta (Chen, 2014; Ezgi, 2015).

Nesse sentido, já é possível encontrar no mercado diferentes tipos de BPs, tais como os polímeros de ácido polilático (PLA), poli-butileno adipato co-tereftalato (PBAT), polibutileno succinato (PBS), polihidroxibutirato (PHB), policaprolactona (PCL), amido termoplástico (TPS) dentre outros (Polman et al., 2020; Naveena & Sharma, 2020). Entre eles, o PLA tem ganhado destaque especial em setores como agricultura, farmácia, biomedicina, embalagens, etc., especialmente por ser, além de biodegradável, biocompatível e bioabsorvível química e mecanicamente (Shruti & Kutralam-Muniasamy, 2019). Estudos têm descrito suas aplicações como filme mulching, dispositivos médicos, sacolas, embalagens alimentares, dentre outros (Gironi & Piemonte, 2011; Rudeekit et al., 2012; Tyler et al., 2016).

Contudo, a segurança (eco)toxicológica destes biopolímeros ainda é pouco conhecida, fato que têm gerado questionamentos a respeito da sua efetividade na redução dos impactos ambientais quando comparados aos PCs. Alguns estudos, por exemplo, já associaram a exposição aos biomicroplásticos (BioMPs) de PLA a prejuízos equiparáveis aos induzidos pelos PCs, a partir de estudos envolvendo microorganismos, vegetais e até mesmo vertebrados (Souza et al., 2013; Green et al., 2016; Zhang et al., 2019). Mais recentemente, Oliveira et al. (2020) relataram pioneiramente que a exposição de larvas de *Danio rerio* aos BioMPs de PLA provocou alterações comportamentais, disfunções bioquímicas, além de terem se acumulado em tecidos dos animais. No entanto, quais seriam as consequências da exposição de peixes adultos a esses biomateriais? O

quanto essas consequências podem afetar a saúde dos indivíduos e a dinâmica de suas populações naturais?

Assim, inspirados nos questionamentos acima, objetivamos avaliar – a partir de diferentes biomarcadores – a toxicidade dos BioMPs de PLA em adultos de *D. rerio*, considerado um modelo experimental representativo dos peixes de água doce (Trigueiro et al., 2020). Partimos da hipótese de que o acúmulo desses biopolímeros induz alterações biomorfológicas e mudanças comportamentais (em cardume) associadas a disfunções nos sistemas REDOX e a efeitos neurotóxicos. Acreditamos que nosso estudo contribua para a compreensão de como esses materiais podem afetar a ictiofauna de ecossistemas dulcícolas e, conseqüentemente, na avaliação do risco ecológico associado ao uso desses biomateriais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Animais e delineamento experimental

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisas Biológicas do Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí (GO, Brasil) e utilizou adultos de zebrafish (*Danio rerio*) (aproximadamente 8 meses de idade e biomassa corpórea entre 0,3 e 0,4 g) de sexo misto, provenientes de um criatório comercial (Goiânia, GO, Brasil). Após a chegada no laboratório, os animais foram aclimatados às condições laboratoriais por um período de 60 dias, tendo sido mantidos coletivamente em um aquário (85 cm de comprimento x 40 cm de largura x 40 cm de altura) preenchido com 100 L de água desclorada naturalmente, com temperatura regulada por termostato ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ), filtração e aeração constantes, além de fotoperíodo claro/escuro de 12 h. Nesse período, os animais foram alimentados com ração comercial para peixes, duas vezes ao dia, em quantidade correspondente a 5% da biomassa corpórea viva conforme (Lawrence et al., 2012), tendo sido a água do aquário renovada completamente em intervalos de 72 h.

Posteriormente ao período de aclimação, 90 animais foram distribuídos em três grupos experimentais (n = 30/cada), cujas biomassas corpóreas foram contrabalanceadas de modo que não houvesse diferença entre eles:

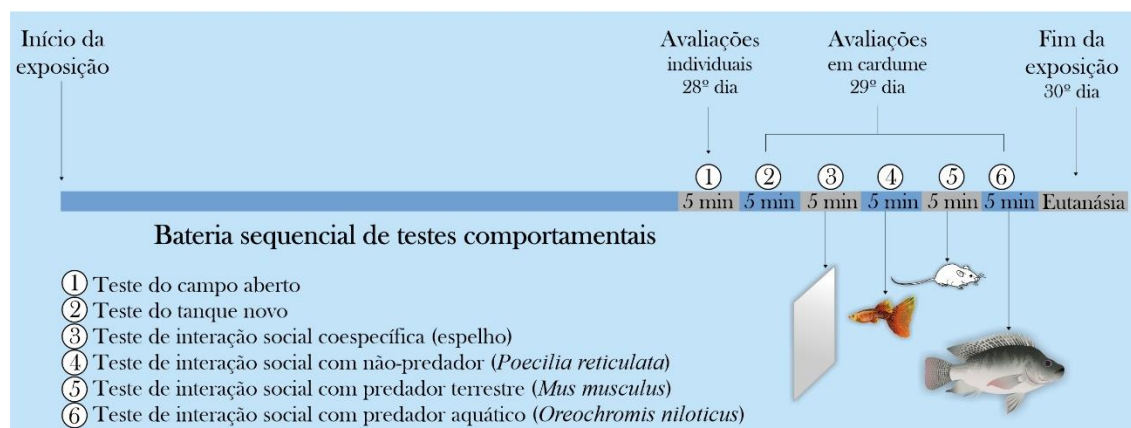
- i. **Controle (C)** - composto por animais mantidos em água desclorada sem qualquer poluente,
- ii. **Biomicroplástico de Ácido polilático (BP I)** - composto por animais expostos à água desclorada; porém, acrescida de BioMPs de PLA na concentração de 2,5 mg/L e,
- iii. **Biomicroplástico de Ácido polilático (BP II)** - compostos por animais cujas águas de exposição continha 5 mg/L de BioMPs de PLA, correspondente ao dobro da concentração anterior.

Os animais foram expostos em aquários de vidro (dimensões: 30 cm de comprimento x 15 cm de largura x 20 cm de altura) contendo 6 L de água, de forma semelhante ao sistema adotado



por Grünspar et al. (2018). Os animais permaneceram expostos por um período de 30 dias e, a partir do 28º dia, foram submetidos a distintos testes comportamentais, conforme cronologia esquematizada na Figura 1. As concentrações dos BioMPs de PLA (2,5 e 5 mg/L) foram definidas com base nos estudos de Malafaia et al., 2020 e Costa Araújo & Malafaia (2020), os quais avaliaram o efeito dos MPs de polietileno em diferentes modelos animais. Tal decisão fundamentou-se na ausência, até o momento, de qualquer estudo que tenha identificado ou estimado concentrações de BioMPs de PLA em ambientes aquáticos naturais. Assumimos que as concentrações avaliadas em nosso estudo (2,5 e 5 mg/L) podem ser superiores àquelas possivelmente encontradas no ambiente. Por outro lado, tais concentrações podem representar um cenário altamente pessimista de poluição, plausível de ser identificado nas proximidades de algum ponto de descarte de efluentes. Além disso, conforme destacado por Anbumani & Kakkar, 2018, a utilização de concentrações possivelmente acima daquelas consideradas ambientais são importantes para otimização das avaliações (eco)toxicológicas.

Ressalta-se que ao longo do experimento, os parâmetros físico-químicos das águas foram aferidos periodicamente (a cada 72 horas), por meio de uma sonda multiparamétrica (Instrutemp ITPH-3000, Taiwan), tendo sido aferido o potencial hidrogeniônico (pH), temperatura (°C) e salinidade (%). O oxigênio dissolvido (mg/L) foi aferido por meio de um oxímetro (Oxímetro AT 155). Tais parâmetros foram importantes para avaliarmos a influência dos tratamentos na qualidade físico-química das águas de exposição, uma vez que qualquer alteração dessa natureza pode, por si só, induzir efeitos danosos nos animais e, portanto, “mascarar” os efeitos dos tratamentos (Campos et al., 2019).



**Figura 1.** Representação esquemática da sequência cronológica da exposição e de execução dos testes comportamentais com suas respectivas durações.

## 2.2. Biomicroplástico de ácido polilático (BioMPs de PLA)

Em nosso estudo, utilizamos os BioMPs de PLA por serem um dos que mais vêm ganhando destaque no cenário comercial (Muthusamy & Pramasivam, 2019), além de ser biodegradável e produzido a partir de fontes naturais (Shruti & Kutralam-Muniasamy, 2019).

Inicialmente, pellets de PLA (diâmetro de 3 mm), adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich - produto n. GF45989881), foram triturados visando a formação de micropartículas, de forma similar aos procedimentos adotados por Oliveira et al. (2020). Essa etapa visou simular o processo de fragmentação/degradação natural dos plásticos (quando dispostos no ambiente), especialmente em decorrência da ação intempérica, o que resulta, em tese, na formação de micropartículas de tamanhos e formatos heterogêneos (Vasilakis, 2017).

Para isso, os pellets de PLA foram misturados à etanol PA e processados em um liquidificador industrial, perfazendo um total de 30 ciclos de moagem (frequência: 25 Hz) de 3 min, intercalados com períodos intermediários de resfriamento de 10 min. Posteriormente à trituração, as partículas foram passadas por uma peneira (malhas de aço, tyler/mesh = 100), visando a separação das micropartículas com diâmetro inferior a 150 µm. Em seguida, o material peneirado foi submetido a filtração à vacuo (TE-0591 TECNAL, utilizando membranas NC quadriculada estéril s/pad 0,45 µm) para a reunião das micropartículas e extração do etanol PA. Posteriormente, a fim de evitar contaminação externas por outras partículas, os BioMPs foram acondicionados em um béquer coberto com papel alumínio, o qual foi mantido em temperatura ambiente por 48 h, para secagem do material.

Em seguida, foi preparada uma solução estoque de 1 mg/mL, utilizando água purificada (via osmose reversa), da qual foram retiradas as alíquotas utilizadas nas exposições dos animais. Para confirmação da composição química do PLA, foi utilizado espectrômetro Raman (Horiba Labram HR Evolution) equipado com um *Single Mode Open Beam Laser Diode* (Innovative Photonic Solutions), operando em comprimento de onda de 630 nm acoplado a um detector de dispositivo de carga (Horiba Synapse). Já para a caracterização da forma e tamanho dos BioMPs de PLA, foram capturadas imagens de microscopia de fluorescência das partículas coradas com corante vermelho do Nilo (Sigma-Aldrich, CAS number 7385-67-3), as quais foram posteriormente analisadas via *software* ImageJ 1.52av. (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). As formas das partículas foram avaliadas a partir da *circularity* (C), *roundness* (R), *solidity* (S) e *aspect ratio* (AR) (n=290 partículas), calculadas conforme as equações apresentadas a seguir. Além disso, os BioMPs de PLA foram analisados em microscopia eletrônica de varredura com “emissão de campo” [i.e.: Canhão de Emissão por Campo (*Field Emission Gun - FEG*)].

$$C = 4 \times \frac{\text{Área}}{\text{Perímetro}^2} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$R = 4 \times \frac{\text{Área}}{\pi \times [\text{Maior eixo}]^2} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$S = \frac{\text{Área}}{\text{Área sólida}} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$AR = \frac{\text{Comprimento mínimo de Feret}}{\text{Comprimento máximo de Feret}} \quad (\text{Eq. 4})$$

### 2.3. Biomarcadores de toxicidade

Com o intuito de investigar os possíveis efeitos danosos dos BioMPs de PLA sobre os *D. rerio*, diferentes biomarcadores foram avaliados, incluindo aqueles (i) preditivos de déficits comportamentais, (ii) alterações nutricionais, (iii) desbalanço nos sistemas de redução-oxidação (REDOX), (iv) neurotoxicidade, (v) alterações na morfologia externa dos animais, além do (vi) acúmulo dos BioMPs de PLA em distintos órgãos.

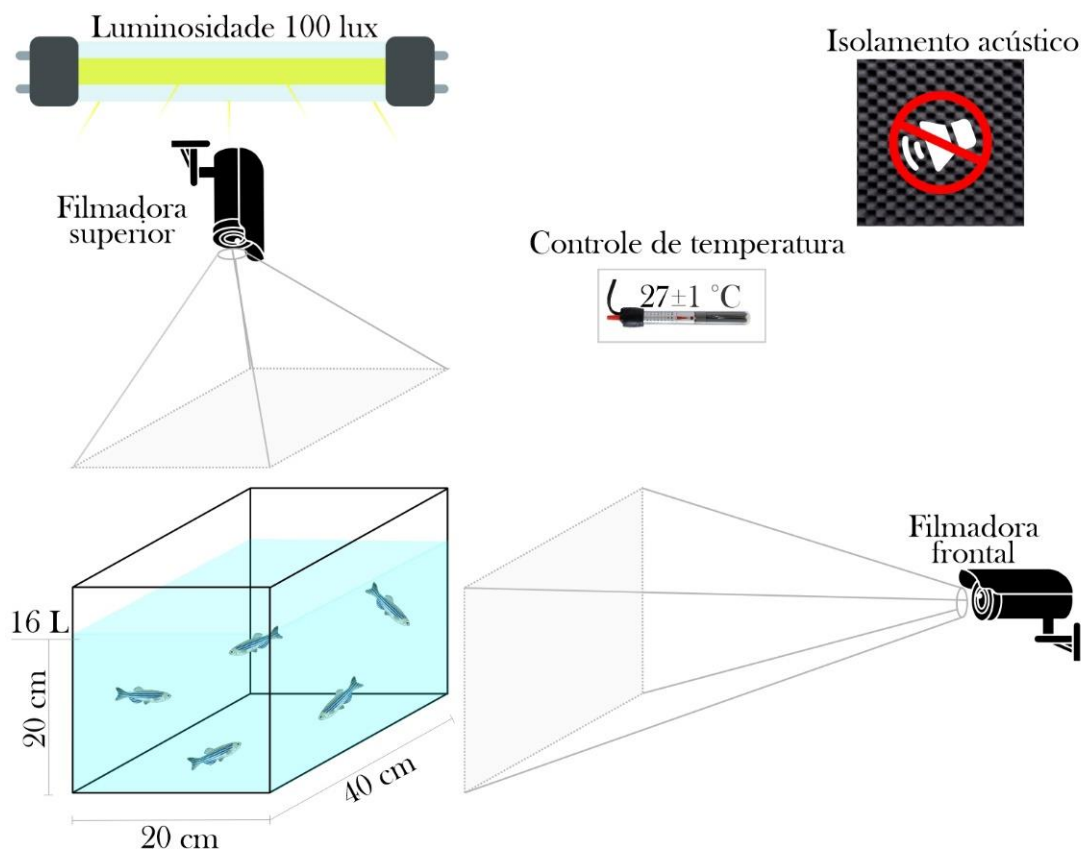
#### 2.3.1. Testes comportamentais

Ao final do período de exposição, os animais foram submetidos a diferentes testes comportamentais (Figura 1), visando avaliar se os BioMPs de PLA foram capazes de provocar alterações no comportamento individual e de cardume dos *D. rerio*. Para os testes em cardume, cada grupo experimental (n=30 animais) foi subdividido aleatoriamente em cinco cardumes (n=5 animais/cada), conforme também adotado por Parker et al. (2014).

Inicialmente, os animais de cada cardume foram cuidadosamente introduzidos em um aquário de vidro (dimensões: 40 cm de comprimento x 20 cm de largura x 20 cm de altura) preenchido com 16 L de água desclorada (Figura 2), os quais foram submetidos à uma bateria de testes sequenciais. Conforme discutido por Campos et al. (2019), essa dinâmica evita o estresse dos animais pelo manuseio repetitivo, observado quando os mesmos indivíduos são submetidos a distintos testes em horário, dias ou locais diferenciados. Conforme esquematizado na Figura 1, os seguintes testes comportamentais foram realizados: tanque novo, interação social coespecífica, interação social heteroespecífica com um não-predador, interação com um potencial predador terrestre e interação com um predador aquático. Tais testes foram realizados entre 8h00min e 16h00min, utilizando água desclorada (livre de qualquer poluente), a qual foi renovada por completo entre o teste de um cardume e outro, eliminando possíveis interferências provocadas por pistas químicas deixadas pelos animais expostos ou pelos estímulos utilizados, além de manter bons níveis de oxigênio dissolvido durante os testes (Quintão et al., 2019).

Ressalta-se que todos os testes comportamentais foram realizados em sala específica que continha isolamento acústico, controle de temperatura e luminosidade (100 lux), além de ser equipada com câmeras (infravermelho) para gravação e sistema de armazenamento de vídeos (Figura 2). Além disso, as paredes laterais dos aquários utilizados nos testes foram revestidas com adesivo de cor branca, similarmente ao procedimento adotado por Pritchard et al. (2001), ficando livre apenas as partes superior e frontal do aquário, permitindo a filmagem dos testes. Tal revestimento permitiu melhor visualização dos animais no aquário, possibilitando, assim, a detecção mais precisa de alguns comportamentos durante a análise dos vídeos. Em adição, os animais foram filmados por duas câmeras simultaneamente, uma posicionada frontalmente (a uma

distância de 40 cm do aquário) e a outra na porção superior (posicionada a uma distância de 30 cm do aquário) (Figura 2).



**Figura 2.** Representação esquemática do sistema montado para gravação de vídeos (câmeras filmadoras frontal e superior), dimensões do aquário onde os testes comportamentais foram realizados e indicações de controle de luminosidade, temperatura e isolamento acústico da sala de testes.

### 2.3.1.1. Teste do campo aberto

Inicialmente, para investigar se a exposição aos BioMPs de PLA foi capaz de afetar habilidades locomotoras e/ou induzir efeitos ansiogênicos ou ansiolíticos, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto. Tal teste foi proposto inicialmente para avaliações em roedores (Carola et al., 2002); mas, vem sendo amplamente empregado na avaliação comportamental em diferentes modelos animais, incluindo os peixes (Grossman et al., 2010), anfíbios (Costa Araújo & Malafaia, 2020) e aves (Faria et al., 2018). No presente estudo, o referido teste consistiu em introduzir os animais (n=15/grupo; avaliados um a um) no centro de uma arena circular ( $\varnothing = 15$  cm; altura da lâmina d'água = 4,5 cm). Após 30 s da introdução (aclimatação), o comportamento dos animais foi filmado por 5 min para posterior registro da distância percorrida (cm), velocidade média de natação (cm/s) e do índice de ansiedade. Esse último foi calculado a partir da razão entre a locomoção dos animais no centro da arena e o tempo total de duração do

teste (vide maiores detalhes em Estrela et al. (2015) e Quintão et al. (2018). Para tais avaliações, a arena circular foi virtualmente dividida em uma zona central e uma periférica (Figura 3A), compostas por 12 compartimentos (300 mm<sup>2</sup> - 6 em cada zona).

### 2.3.1.2. Teste do tanque novo

Na sequência, os animais de cada grupo foram agrupados em cardumes (vide item “2.3.1”), os quais foram submetidos ao teste do tanque novo, de acordo com Rosemberg et al. (2011), com algumas modificações. Quando realizado para avaliação do comportamento individual dos peixes, o referido teste possibilita aferir aspectos da locomoção e exploração do ambiente, além de comportamentos preditivos de comportamento *anxiety-like* (Stewart et al., 2012). No entanto, no presente estudo utilizamos os paradigmas do teste para avaliação da resposta comportamental em cardume. Para isso, cada cardume (n=5 peixes/cada) logo após ser introduzido no aquário-teste foi filmado por 5 min, não tendo sido submetido a nenhum estímulo (Figura 3B). Posteriormente, a distância (cm) de cada peixe até a superfície d’água e os escores de cluster foram registrados, a partir de imagens sequenciais (totalizando 100 *frames* - durante 300 s - com intervalo de 3 s entre cada imagem) conforme também utilizado por Dlugos & Rabin et al. (2003) e Grossman et al. (2010), para cada réplica (5 réplicas = 5 cardumes/grupo).

Enquanto a distância até a superfície d’água foi aferida utilizando o software ImageJ 1.52av (Figura 3B<sub>i</sub>) [conforme Webber & Haines (2003)], os escores de cluster (EC) foram gerados utilizando-se a metodologia proposta por Parker et al. (2014), a partir da análise da dispersão dos peixes em 32 quadrantes (5 cm<sup>2</sup>) traçados virtualmente na tela do computador (Figura 3F). Para isso, levamos em consideração o número máximo de animais posicionados em apenas um quadrante e dividimos esse número pelo total de quadrantes ocupados, conforme a equação a seguir e ilustração na Figura 3G.

$$EC = \frac{\text{n}^\circ \text{máximo de indivíduos em um quadrante}}{\text{n}^\circ \text{total de quadrantes ocupados}} \quad (\text{Eq. 5})$$

### 2.3.1.3. Interação social coespecífica

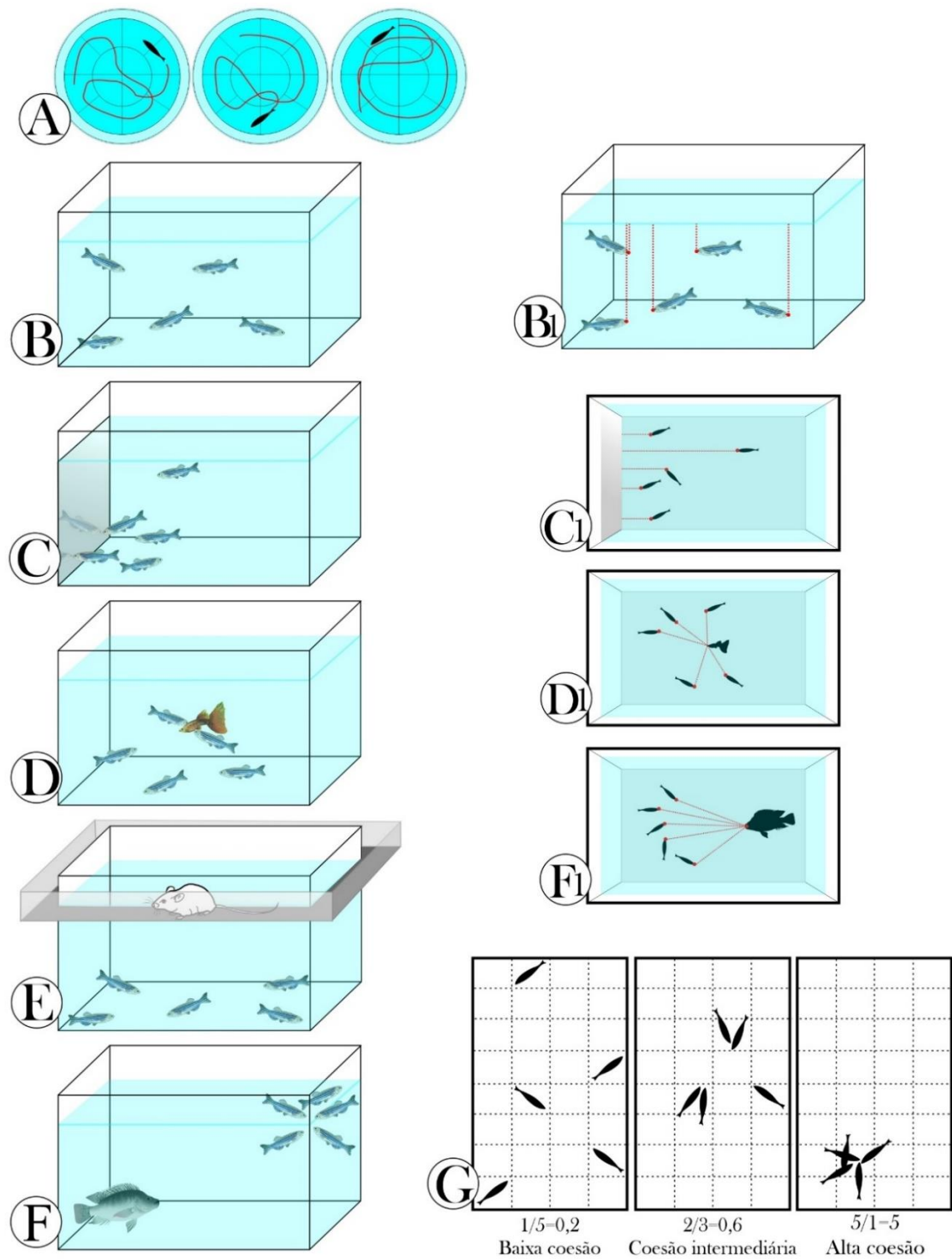
Logo após o teste do tanque novo, os animais foram submetidos ao teste de interação social coespecífica, o qual consiste comumente em inserir um espelho em uma das laterais do aquário, permitindo a interação dos animais com suas próprias imagens (Pham et al., 2012), os quais tendem a interpretar como rivais da mesma espécie (Kohda et al., 2019). No presente estudo, um espelho foi previamente posicionado em uma das laterais do aquário e permaneceu oculto por uma divisória externa de cor branca. Logo depois do teste do tanque novo, a divisória foi cuidadosamente retirada, permitindo a interação dos animais com suas imagens refletidas (Figura 3C) por um período de 5 min. Posteriormente, os seguintes parâmetros foram avaliados: distância (cm) de cada peixe até a superfície d’água (Figura 3B<sub>i</sub>), EC (Figura 3G), distância (cm) de cada peixe

até o espelho (Figura 3C.) e ainda a quantidade de *frames* em que ao menos um indivíduo do cardume estava na zona de interação com o espelho, i.e., distância mínima de 2 cm do espelho. Tais análises foram realizadas a partir de imagens sequenciais (totalizando 100 *frames* - durante 300 s - com intervalo de 3 s entre cada imagem), para cada réplica. Após o teste, a visualização do espelho foi cessada com o retorno da divisória branca e a bateria de testes foi interrompida por 3 min para oxigenação da água (via compressor de ar).

#### 2.3.1.4. Interação social com não-predador

Após a realização do teste de interação social coespecífica e oxigenação da água, o teste de interação social com um indivíduo não-predador aquático foi realizado, utilizando *Poecilia reticulata* como estímulo não predatório ao cardume. No total, utilizamos cinco machos adultos de *P. reticulata* (utilizados alternadamente nas sessões testes), os quais possuíam padrão de coloração amarelada, biomassa corpórea de  $0,311 \pm 0,07$  g (média  $\pm$  desvio padrão) e comprimento total de  $2,25 \pm 0,12$  cm). Esses animais foram adquiridos em um criatório comercial (Goiânia - GO) de peixes para aquarismo. Tal espécie possui dieta onívora alimentando-se principalmente de detritos orgânicos, larvas de invertebrados e plânctons, não sendo predadora de outros peixes (Dahlg, 1980).

Resumidamente, o teste consistiu em introduzir cuidadosamente o espécime de *P. reticulata* no centro do aquário (Figura 3D), com o auxílio de um puçá, deixando-o explorar o ambiente livremente. Após 5 min de filmagem, a resposta/ interação do cardume de *D. rerio* foi avaliada por meio dos seguintes parâmetros: distância (cm) de cada peixe do cardume até a superfície d'água (Figura 3B.), EC (Figura 3G) e a distância entre cada *D. rerio* do cardume e o *P. reticulata* (Figura 3D.). Tais análises também foram realizadas a partir de imagens sequenciais (totalizando 100 *frames* - durante 300 s - com intervalo de 3 s entre cada imagem) para cada réplica. Além disso, a interação entre os peixes do cardume e o estímulo não-predatório foi analisada também por meio do registro do número de *frames* em que ao menos um *D. rerio* estava posicionado em um raio de pelo menos 2 cm de distância do não-predador, bem como a frequência de “ataques” dos *D. rerio*, tidos como contato físico com mordidas direcionadas.



**Figura 3.** Representação esquemática dos testes realizados em nosso estudo. (A) teste do campo aberto, com destaque para as zonas (periférica e central) e os compartimentos traçados virtualmente no aparato utilizado; (B) teste do tanque novo (sem estímulo); (B1) distância individual dos peixes até a superfície; (C) teste de interação social coespecífica (com um espelho em uma das laterais do aquário); (C1) distância individual dos peixes até o espelho; (D) teste de interação social com um não-predador (presença de um *P. reticulata*); (D1) distância individual entre cada *D. rerio* e o *P. reticulata*; (E) teste de resposta ao predador terrestre (presença de um camundongo Swiss sobre a

plataforma acoplada ao aquário); (F) teste de interação social com predador aquático (presença de um *O. niloticus*); (F) distância individual entre cada *D. rerio* e o *O. niloticus* e (G) exemplos de como os escores de cluster foram calculados.

#### 2.3.1.5. Interação social com predador terrestre

Em sequência ao teste anteriormente descrito, os cardumes foram submetidos ao teste de resposta social a um estímulo predatório terrestre, o qual simulou a aproximação de um potencial predador do habitat dos peixes. Para isso, utilizamos como estímulos, machos adultos de camundongos Swiss (*Mus musculus*) [biomassa corpórea:  $25,92 \pm 2,36$  g (média  $\pm$  desvio padrão) e comprimento naso-caudal:  $16,75 \pm 0,65$  cm] oriundos do Biotério de Pequenos Roedores do Laboratório de Pesquisas Biológicas do IF Goiano (Urutaí/GO/Brasil). Para cada cardume um indivíduo de *M. musculus* foi utilizado, totalizando um rodízio de 5 animais por grupo experimental. Reconhecemos que os camundongos utilizados em nosso estudo estavam habituados à dieta composta apenas por ração padrão para roedores e que, no ambiente natural, os indivíduos da espécie *M. musculus* se alimentam principalmente de sementes, raízes, folhas, caules, insetos, anelídeos, dentre outros (Arlettaz et al., 1996). Por outro lado, no contexto do teste realizado, esses animais simularam a presença de pequenos roedores e/ou marsupiais que exibem adaptações associadas à caça de girinos, insetos ou pequenos peixes, ao longo de riachos, rios e lagos, a exemplo de animais dos gêneros *Hydromys*, *Crossomys* e *Colomys* (Rowe, Achmadi & Esselstyn, 2014).

O teste foi iniciado logo após a inserção do camundongo na plataforma translúcida acoplada ao aquário-teste (desde o início dos testes - Figura 3E), o qual explorou livremente o ambiente por 5 min. Posteriormente, a resposta do cardume foi analisada a partir dos seguintes parâmetros: distância (cm) de cada peixe do cardume até a superfície d'água (Figura 3B), EC (Figura 3G), bem como a frequência da exibição do comportamento de “fuga” em resposta à movimentação do camundongo. Tal comportamento foi caracterizado pela movimentação repentina e explosiva dos peixes em direção oposta ao deslocamento do estímulo predatório (camundongo). A análise da distância até a superfície e os ECs foram realizadas a partir de imagens sequenciais (totalizando 100 *frames* - durante 300 s - com intervalo de 3 s entre cada imagem) para cada cardume. Já o comportamento de fuga foi quantificado por meio da análise dos “vídeos corridos”.

#### 2.3.1.6. Interação social com predador aquático

O último teste ao qual os animais foram submetidos visou avaliar as respostas dos cardumes quando confrontados com um potencial predador aquático, representado, em nosso estudo por espécimes de machos adultos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), similarmente ao estudo de Quintão et al. (2019) [biomassa corpórea:  $68,02 \pm 8,74$  g (média  $\pm$  desvio padrão) e comprimento total:  $14,31 \pm 0,43$  cm], os quais foram obtidos no Departamento de Aquicultura do IF Goiano



(Urutai/GO/Brasil). Tal espécie foi utilizada como estímulo predatório, principalmente devido à sua semelhança morfológica com o predador simpátrico dos *D. rerio* em ambiente natural (i.e.: *Nandus nandus* - Gerlai, Fernandes & Pereira, 2009). Além disso, as tilápias apresentam hábito alimentar oportunista (embora sejam onívoras), sendo comum no ambiente natural a predação de alevinos ou pequenos peixes (Chou, 1996). Para cada réplica (cardume) um indivíduo de *O. niloticus* foi utilizado, totalizando um rodízio de 5 animais por grupo experimental. Brevemente, o teste consistiu em introduzir um espécime de *O. niloticus* no aquário-teste (Figura 3F), deixando-o explorar livremente o ambiente durante 5 min. A resposta do cardume foi avaliada através dos parâmetros distância (cm) de cada peixe do cardume até a superfície d'água (Figura 3B<sub>i</sub>), ECs (Figura 3F) e a distância (cm) entre cada *D. rerio* do cardume e seu potencial predador (*O. niloticus*) (Figura 3F<sub>i</sub>). A medição das distâncias foi feita da cabeça de cada *D. rerio* até a cabeça do *O. niloticus*.

#### 2.3.1.7. Análise comportamental dos estímulos

É sabido que em avaliações comportamentais que incluam a participação de outros animais (para além dos indivíduos-teste), é indispensável analisar/conhecer o comportamento desses animais, uma vez que seus desempenhos durante os testes podem influenciar direta ou indiretamente a resposta dos indivíduos-teste (Costa Araújo & Malafaia et al., 2020). Assim, é necessário que as respostas dos indivíduos-testes sejam relativizadas ao comportamento dos estímulos, evitando que a interpretação dos resultados seja enviesada pelo comportamento dos estímulos. Logo, todos os estímulos utilizados nos testes tiveram seus comportamentos analisados conforme descrito a seguir:

- *P. reticulata*: i) atividade locomotora - estimada por meio do total de quadrantes percorridos durante o teste, traçados virtualmente na tela do computador (32 quadrantes de 5 cm<sup>2</sup>/cada) e ii) distância (cm) do animal até a superfície d' água, aferida por meio do software ImageJ 1.52av.
- *M. musculus*: i) atividade locomotora - estimada por meio do total de quadrantes percorridos na plataforma acoplada ao aquário, traçados virtualmente na tela do computador (12 quadrantes de 10 cm<sup>2</sup>/cada); ii) frequência da exibição do comportamento de levantamentos - caracterizado pelo ato de inclinar-se verticalmente apoiando ou não as patas dianteiras na parede do aquário ou da plataforma (Campos et al., 2016); e iii) tempo em que os camundongos permaneceram exibindo o comportamento de *self-grooming* - caracterizado pelo ato de lambar-se ou limpar-se (Campos et al., 2016). Tais comportamentos foram analisados em função de provocarem vibrações na plataforma que possivelmente pudessem ser percebidas pelos peixes.
- *O. niloticus*: i) atividade locomotora - estimada por meio do total de quadrantes percorridos, traçados virtualmente na tela do computador (8 quadrantes de 10 cm<sup>2</sup>/cada) e

ii) distância (cm) até a superfície d' água, também aferida por meio do software ImageJ 1.52av.

A análise dos parâmetros locomotores, de levantamento e *self-grooming* foram realizadas através dos registros em vídeo (em tempo corrido). Já a análise da distância dos animais até a superfície d'água foi realizada através das mesmas imagens sequenciais utilizadas para a avaliação dos comportamentos dos *D. rerio* (100 frames - durante 300 s - com intervalo de 3 s entre cada imagem) para cada réplica, totalizando 500 imagens para cada grupo experimental. Em função das diferenças comportamentais dos estímulos utilizados nos testes (tanto intergrupos, quanto intragrupos), os dados referentes aos comportamentos dos *D. rerio* foram relativizados em função do comportamento dos estímulos, gerando índices específicos sumarizados, calculados a partir das equações a seguir:

$$Pr = \frac{\text{Parâmetros analisados nos indivíduos teste (Danio rerio)}}{(\text{Atividade locomotora}) \times (\text{distância dos } P. reticulata \text{ até a superfície d'água})} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

$$Mm = \frac{\text{Parâmetros analisados nos indivíduos teste (Danio rerio)}}{(\text{Atividade locomotora}) \times (\text{freq. levantamentos}) \times (\text{tempo de self-grooming})} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

$$On = \frac{\text{Parâmetros analisados nos indivíduos teste (Danio rerio)}}{(\text{Atividade locomotora}) \times (\text{distância dos } O. niloticus \text{ até a superfície d'gua})} \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

As siglas “Pr”, “Mm” e “On” referem-se aos índices dos comportamentos dos *D. rerio* relativos aos estímulos proporcionados pelos *P. reticulata*, *M. musculus* e *O. niloticus*, respectivamente.

### 2.3.2. Avaliações bioquímicas

A fim de avançarmos o conhecimento sobre os possíveis mecanismos de ação dos BioMPs de PLA no sistema nervoso central, realizamos diferentes avaliações bioquímicas que, em conjunto, são preditivas de déficit nutricional, desbalanço REDOX, bem como de neurotoxicidade. Para isso, fragmentos de cérebro foram coletados (30 mg) e, em seguida, macerados em 1 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS) e centrifugados a 13.000 rpm, por 5 min, a 4°C. Em seguida, 900 µL do sobrenadante das amostras foram transferidos para outro microtubo e o volume final foi completado para 1200 µL, com PBS, sendo essas amostras utilizadas nas avaliações descritas a seguir.

#### 2.3.2.1. Indicadores bioquímicos do *status* nutricional

Para avaliarmos os possíveis efeitos do poluente sobre a condição nutricional dos animais (n=10/grupo), os seguintes parâmetros foram aferidos no cérebro: carboidratos solúveis totais

(mg/g), proteínas totais (g/dL) e triglicérides (mg/dL), adotando-se as metodologias propostas por Dubois et al. (1956), Lowry et al. (1951) e Kalia & Pundir (2004), respectivamente. Para avaliação das concentrações sanguíneas de glicose utilizamos fitas reagentes, as quais promovem a reação da glicose desidrogenase com a coenzima, resultando na conversão da glicose contida na amostra em gluconolactona. Tal reação gera uma corrente elétrica medida por um leitor digital (Accu-Chek Advantage Roche Diagnosis®) que é interpretada como glicemia.

#### **2.3.2.4. Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)**

Para a avaliação do possível efeito neurotóxico, avaliamos a atividade da AChE no sobrenadante resultante do processamento do cérebro dos animais (n=10/grupo), utilizando substrato de acetilcolina iodado e 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), com base no método espectrofotométrico de Ellman (1961). Resumidamente, 50 µL de cada amostra, 100 µL de solução de substrato de acetilcolina iodada (98%) e 100 µL de solução de DTNB (130 µg/mL) foram adicionados em sequência a cada poço de uma microplaca de ELISA. A absorbância das amostras (405 nm) foi lida 30 segundos após a homogeneização dos reagentes e 3 min após a primeira leitura, realizada em leitor de microplaca ELISA.

#### **2.3.2.5. Estresse oxidativo**

Para avaliação da possível indução de estresse oxidativo pelos tratamentos, elencamos diferentes biomarcadores, os quais são descritos a seguir:

- a) **Avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)** – tais substâncias são amplamente adotadas para avaliação do estresse oxidativo (Draper et al., 1984) e, no presente estudo, suas concentrações foram determinadas conforme Carvalho et al. (2019), com algumas adaptações. Em síntese, 100 µL do sobrenadante das amostras foram misturados com 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) (28% p/v em 0,25 N HCl), 50 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA, 1% em ácido acético 0,25 N) e 25 µL de butilhidroxitolueno (BHT, 5 mM). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho de água a 95° C, por 15 min e, posteriormente, foram centrifugadas a 13.000 rpm, em temperatura ambiente, por 10 min. Os sobrenadantes oriundos das amostras foram transferidos para microplaca ELISA (em triplicata) e lidos a 492 nm.
- b) **Avaliação da produção de óxido nítrico** – nesta avaliação utilizamos como base a reação colorimétrica de Griess (Grisham et al., 1996), para a detecção de nitrito resultante da oxidação de óxido nítrico, baseado em Ajjuri & O'Donnell (2013). Para isso, 30 µL do sobrenadante de cada amostra foram pipetados (em triplicata) em poços de microplaca ELISA preenchidos com 150 µL de reagente de Griess [sulfanilamida a 2,3%, N-(1-naftil)etilenodiamina a 0,12% e ácido ortofosfórico (0,5 mol/L) em água purificada via osmose reversa]. Em seguida, as amostras foram incubada em temperatura ambiente por

5 min e lidas a 492 nm. A curva padrão foi preparada utilizando diferentes soluções de nitrito de sódio (50, 100, 200, 300, 400 e 500  $\mu\text{mol/L}$ ) e a equação da reta ( $y = 0,0014 \times + 0,0275$ ;  $r^2 = 0,99$ ) foi usada para calcular as concentrações de nitrito nas amostras.

- c) **Peróxido de hidrogênio** - para avaliação da produção deste parâmetro nos baseamos no método proposto por Graf & Penniston (1980) [utilizando kit comercial (Kit Elabscience, Cat.: E-BC-K 102-S. Lote: 731RIHZ1ES. Exp: 2020-06-16)], o qual leva em consideração a oxidação do iodeto na presença de amolibdato de amônio, bem como na fotometria do complexo azul-amido-iodo resultante.

#### 2.3.2.6. Parâmetros relacionados à atividade antioxidante

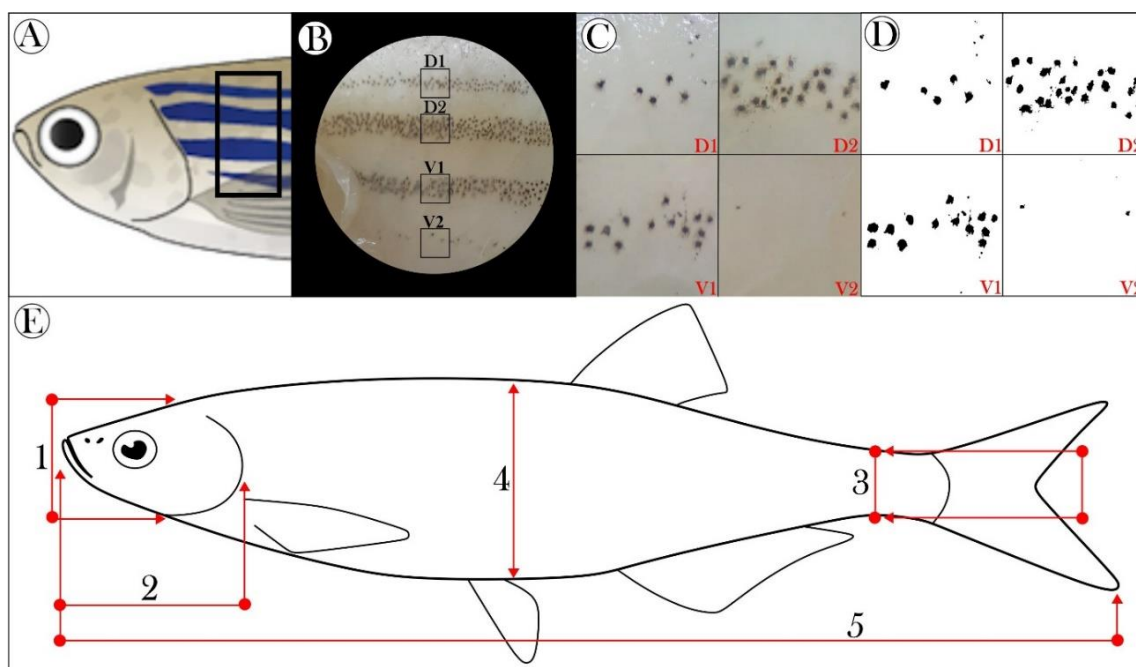
Para avaliação da possível inibição ou estimulação da atividade antioxidante pelos tratamentos, os biomarcadores descritos a seguir foram avaliados.

- a) **Glutationa total** - o teor de glutaciona total (reduzida GSH + oxidada GSSG) foi mensurado com base no método descrito por Griffith (1980), com adaptações. Em resumo, 5  $\mu\text{L}$  do sobrenadante das amostras foram pipetados em poços de uma microplaca de ELISA e, posteriormente, foram adicionados 75  $\mu\text{L}$  da mistura de trabalho (tampão de fosfato 95  $\mu\text{M}$ , EDTA 0,95 mM, NADPH 48  $\mu\text{M}$ , DTNB 0,031 mg/mL, 0,115 unidades/mL de glutaciona redutase e 0,24% de ácido sulfossalicílico). Em seguida, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, 25  $\mu\text{L}$  de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (0,16 mg/mL) foram adicionados aos poços e a absorbância foi medida a 405 nm, logo após o início da reação. Foram realizadas cinco leituras em intervalos de 1 min. Além disso, a absorbância de diluições seriadas de uma solução de glutaciona reduzida padrão em diferentes concentrações (0,25, 0,5, 1, 2 e 4 nmol/10  $\mu\text{L}$ ) foi determinada para determinação da curva de calibração. A seguir, foi traçado um gráfico com base nos pontos da curva padrão, que corresponderam ao delta da absorbância. A equação linear ( $y = 0,0423 \times = 0,0037$ ;  $R^2 = 0,9741$ ) foi determinada após a análise de regressão linear e utilizada para determinar as concentrações de glutaciona total das amostras.
- b) **Tióis totais** - as concentrações de tióis totais foram determinadas com base nos procedimentos descritos por Santos et al. (2015), tendo sido as leituras das amostras realizadas 405 nm.
- c) **Superóxido dismutase (SOD)** - a atividade total desta enzima foi avaliada de acordo com o método descrito por Dieterich et al. (2000). Uma unidade de atividade SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a taxa de autooxidação do pirogalol em 50%, a qual foi determinada a 630 nm.

### 2.3.3. Análise de pigmentação e parâmetros biométricos

Pressupondo que a exposição aos BioMPs de PLA também era capaz de provocar alterações na pigmentação externa e, conseqüentemente, provocar diferenças na coloração natural dos animais, avaliamos o percentual de pigmentação em áreas específicas dos *D. rerio*. Para isso, 10 indivíduos de cada grupo foram selecionados aleatoriamente e após a eutanásia foram fixados em formalina. A análise do percentual pigmentado foi realizada com base no método utilizado por Guillot et al. (2016), que levou em consideração os pigmentos produzidos pelos melanóforos. Ressalta-se que em tal método, a fixação em formol remove os pigmentos dos xantóforos e iridóforos, deixando apenas aqueles produzidos e armazenados na pele dos animais pelos melanóforos. Após a fixação, os animais foram fotografados em microscópio estereoscópio (SZT LED, BEL, China) e o percentual de pigmentação (por  $\text{mm}^2$ ) foi analisado acima da nadadeira peitoral esquerda, nas seguintes faixas laterais presentes nos *D. rerio*: dorsal superior (D1), dorsal inferior (D2), ventral superior (V1) e ventral inferior (V2), conforme esquematizado na Figura 4A-C. Os registros fotográficos foram dimensionados a ( $1 \text{ mm}^2$ ) no software CorelDRAW Graphics Suite 2019 e o percentual de pigmentação presente foi calculado por meio do software ImageJ.

Para avaliação da biometria dos animais, 15 indivíduos de cada grupo foram selecionados aleatoriamente. Após a aferição da biomassa corpórea, os animais foram fotografados para determinação (por meio do software ImageJ) da altura e comprimento de cabeça, altura do pedúnculo caudal e do dorso, além do comprimento total, conforme Takács et al. (2016) (Figura 4D).



**Figura 4.** (A-D) Esquemas representativos das áreas externas dos *D. rerio* utilizadas para determinação dos efeitos dos tratamentos sobre a pigmentação dos animais. (A) Faixa vertical indicando a porção corporal analisada; (B) Pigmentos presentes na pele dos animais observadas

em microscópio estereoscópico; (C) Delimitação de 1 mm<sup>2</sup> da área escolhida para análise do percentual pigmentado; (D) Imagem processada pelo ImageJ. Em destaque os pigmentos presentes em cada 1 mm<sup>2</sup>; (B-D) D1: faixa dorsal superior, D2: faixa dorsal inferior, V1: faixa ventral superior e V2: faixa ventral inferior e (E) Medidas biométricas aferidas nos animais (1: altura de cabeça, 2: comprimento de cabeça, 3: altura do pedúnculo caudal, 4: altura do dorso e 5: comprimento total).

#### 2.3.4 Acumulação dos biomicroplásticos de PLA

O possível acúmulo dos BioMPs de PLA foi estimado pela quantificação do ácido láctico no sobrenadante resultante do processamento do cérebro, fígado, brânquias e carcaça (corpo dos animais após a dissecação, excluindo os órgãos mencionados anteriormente). Tal avaliação foi baseada no método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956) e mais recente também realizada por Oliveira et al. (2020). Tal método promove a degradação do PLA através da hidrólise não enzimática (em meio fortemente ácido) em monômeros de ácido láctico e posterior formação de complexos com fenol, tornando a solução amarelo-alaranjada (coloração estável). Dessa forma, foram adicionados em um microtubo previamente esterilizado 100 µL do sobrenadante da amostra, 100 µL de solução de p-phenylphenol (pPPP) (5%) e 500 µL de ácido sulfúrico PA, os quais foram misturados em vortex mixer, elevando a temperatura das soluções à 80-90°C. Em seguida, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 15 min e a absorbância das amostras foram registradas a 630 nm em leitor de ELISA (em duplicata).

Paralelamente, uma curva padrão foi gerada utilizando uma diluição seriada da suspensão de ácido láctico (0, 0,02, 0,04, 0,09, 0,18, 0,35, 0,70, 1,41 e 2,8 mg/mL), as quais foram tratadas da mesma forma que as amostras biológicas. Cada ensaio foi executado em triplicata para confirmar a precisão da curva padrão. A concentração de ácido láctico de fonte endógena presente nos *D. rerio* do grupo controle foi detectada e subtraída daqueles animais que foram expostos aos BioMPs de PLA. A análise de regressão linear ( $y = 0,6099x + 0,0565$ ;  $r^2 = 0,99555$ ) foi aplicada para calcular as concentrações de ácido láctico nas amostras.

#### 2.4. Análises estatísticas

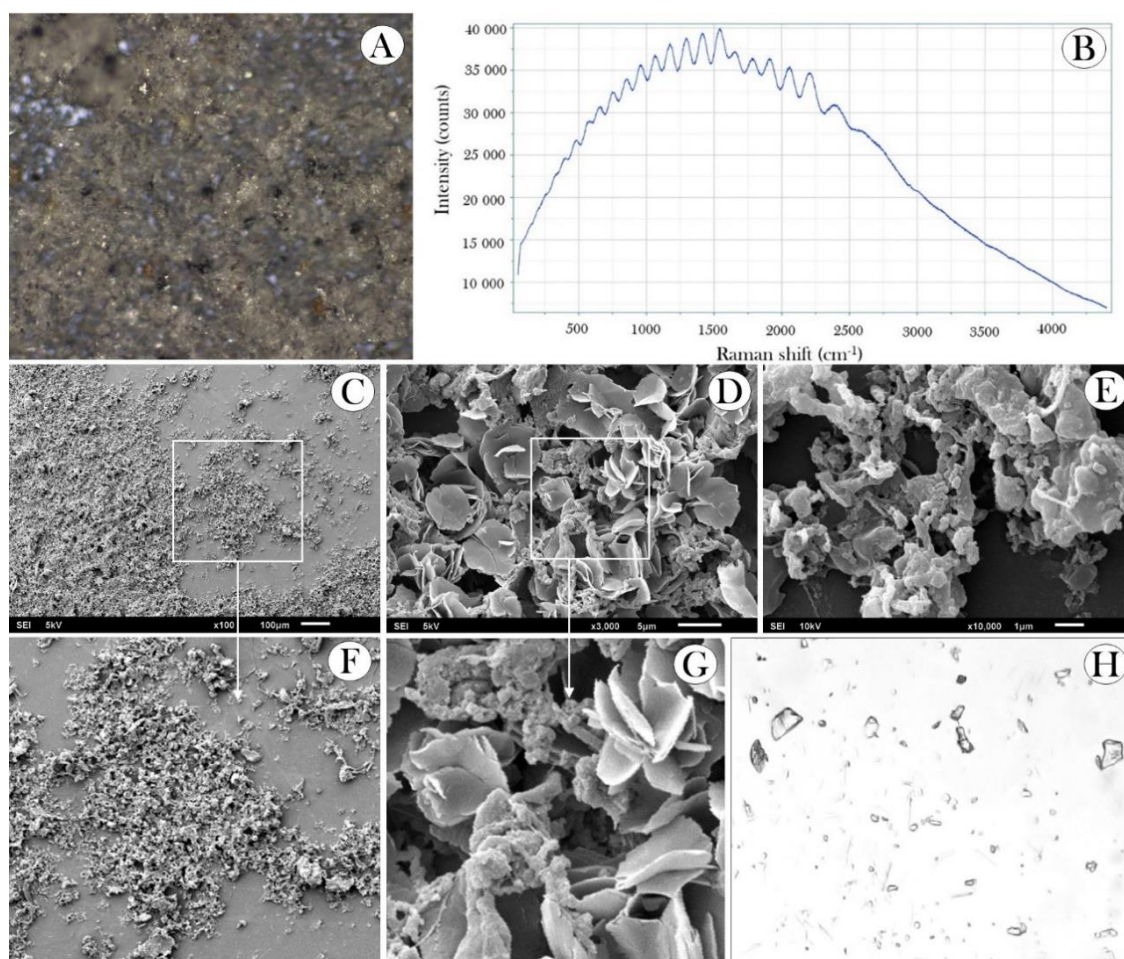
Inicialmente, todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e ao teste de Bartlett's, para avaliação da homocestaticidade. Feito isso, os dados paramétricos foram submetidos à one-way ANOVA (com pós-teste de Tukey) e o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as médias dos dados não-paramétricos, utilizando-se como pós-teste o teste de Dunn's (ambos a 5% de probabilidade). Os dados referentes à quantificação dos BioMPs de PLA foram comparados de forma pareada. Nesses casos, os dados paramétricos foram submetidos ao teste t de Student e os não-paramétricos ao teste de Mann-Whitney, ambos a 5% de probabilidade. Todas as análises

estatísticas e elaboração dos gráficos foram conduzidas no software GraphPad Prism (versão 7.0).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Caracterização e quantificação dos biomicroplásticos

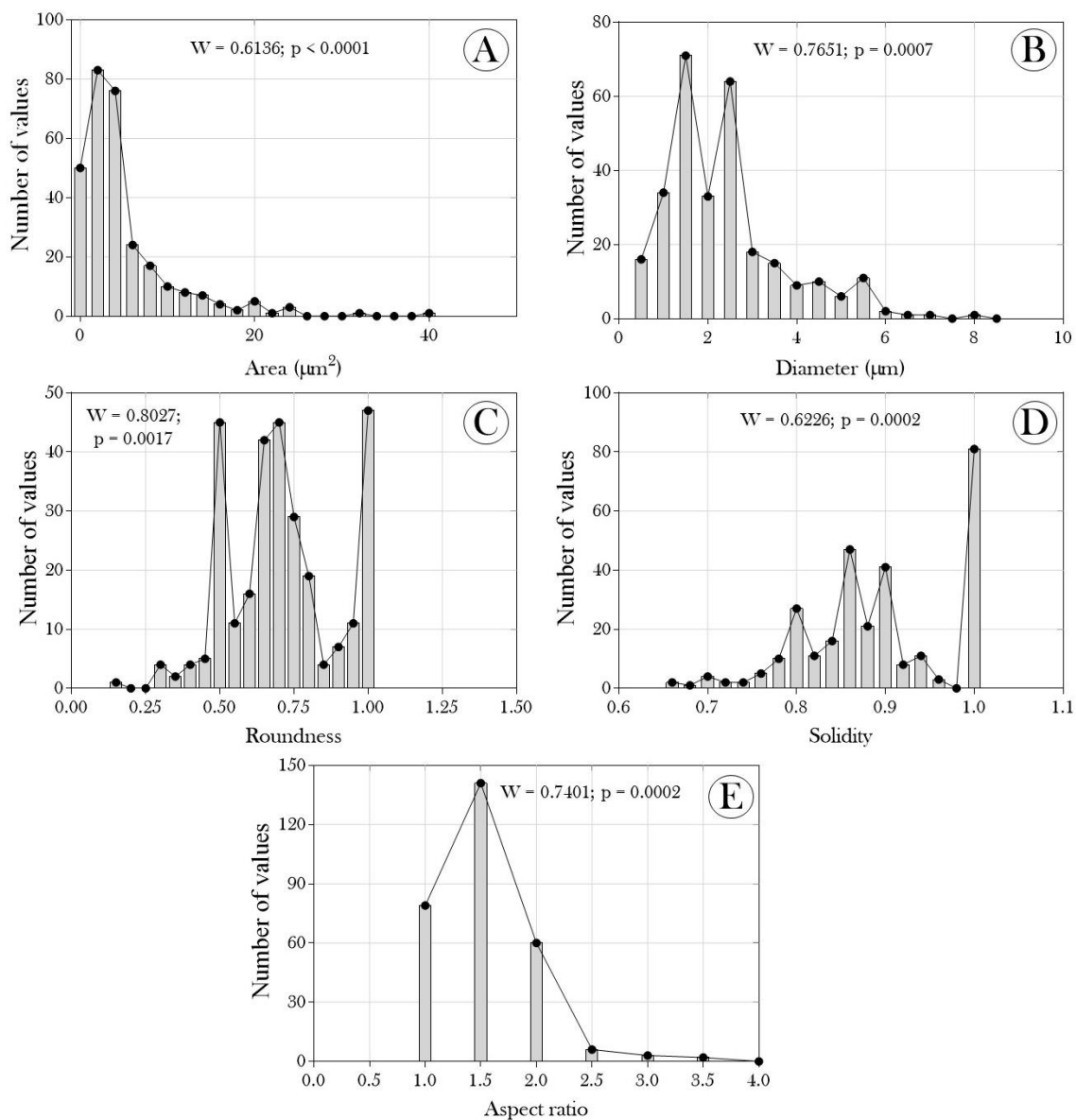
Inicialmente, a análise espectroscópica permitiu a obtenção de um espectro de Raman correspondente a um ponto da superfície analisada, onde houve a deposição do filme de PLA (Figura 5A). No espectro é possível observar a presença de vários picos de intensidade característicos do PLA (Figura 5B) que podem ser atribuídos à diversas interações moleculares, tais como,  $\text{CH}_3$  vibrações atribuídas ao alongamento assimétrico e simétrico,  $\text{CH}$  alongamento /  $\text{C}=\text{O}$  alongamento,  $\text{CH}_3$  vibração de deformação simétrica,  $\text{CH}_3$  vibração de balanço,  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  alongamento,  $\text{C}-\text{CH}_3$  alongamento,  $\text{C}-\text{COO}$  vibração,  $\text{C}=\text{O}$  alongamento,  $\text{C}-\text{CO}$  estados vibracionais e / ou  $\text{C}-\text{O}-\text{C} + \text{C}-\text{CH}_3$  vibração. Além disso, confirmamos a variedade morfológica e de tamanho das partículas de PLA por meio das análises morfométricas realizadas via fotoeletromicrografias obtidas na análise de microscopia eletrônica de varredura (Figura 5C-G, respectivamente) e de microscopia óptica (Figura 5H), processadas pelo software Image J.



**Figura 5.** (A) Imagem do ponto da superfície analisada pela espectrometria de Raman, onde houve a deposição do filme de PLA; (B) Espectro de Raman; (C-G) eletromicrografias representativas

obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em diferentes ampliações e (H) fotomicrografias representativas dos BioMPs de PLA analisados via microscopia óptica, em diferentes ampliações.

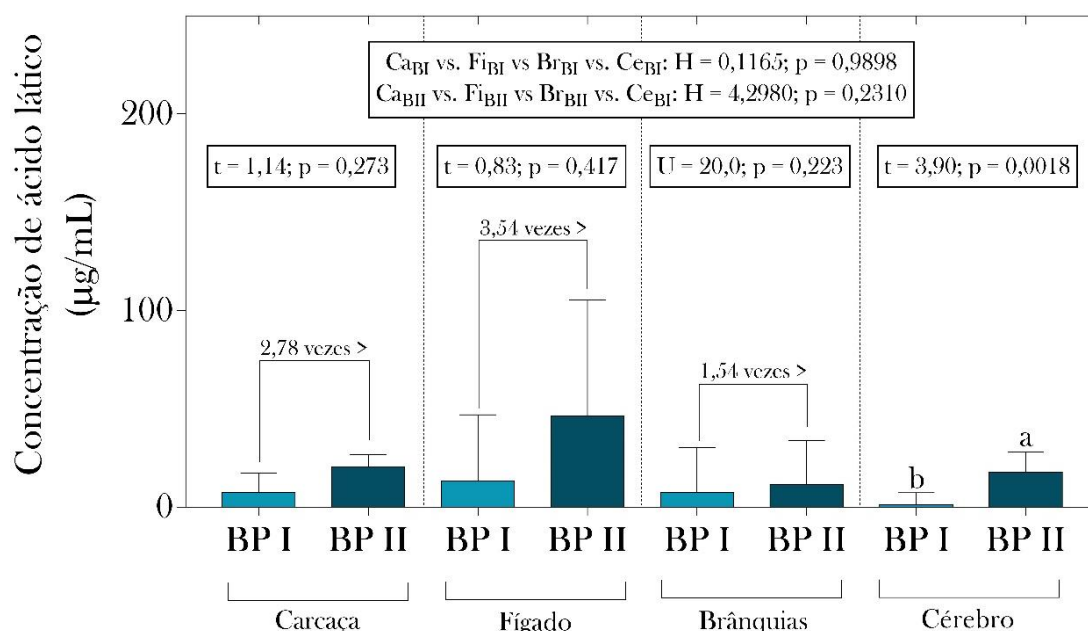
Os histogramas de frequência das medidas morfométricas indicam que em média as partículas de PLA apresentaram área e diâmetro de  $4,92 \pm 0,31 \mu\text{m}^2$  e  $2,34 \pm 0,07 \mu\text{m}$ , respectivamente (Figura 6A-B), ambos apresentando uma distribuição assimétrica negativa. Em relação às variáveis de forma, a média dos valores obtidos para *aspect ratio* foi de  $1,52 \pm 0,02$ , cuja distribuição também foi assimétrica. Já os valores obtidos para as variáveis *roundness* e *solidity*, as médias foram de  $0,70 \pm 0,01$  e  $0,89 \pm 0,004$ , respectivamente, ambas apresentando uma distribuição multimodal, o que ratifica a heterogeneidade das partículas de PLA utilizadas em nosso estudo (Figura 6).





**Figura 6.** Histogramas de frequência relativos aos parâmetros de forma e tamanho dos BioMPs de PLA utilizados em nosso estudo (n = 290 partículas). (A) Area; (B) Diameter; (C) Rondness (D) Solidity e (E) Aspect ratio das partículas.

Em relação a quantificação de ácido láctico nos animais, observamos maior concentração de ácido láctico nos animais dos grupos BP I e BP II (sem efeito concentração-resposta). Embora as concentrações de ácido láctico na carcaça, fígado e brânquias dos animais tenha sido estatisticamente equitativa entre os grupos BP I e BP II; no cérebro, a concentração de ácido láctico foi superior nos animais do grupo BP II (Figura 7).

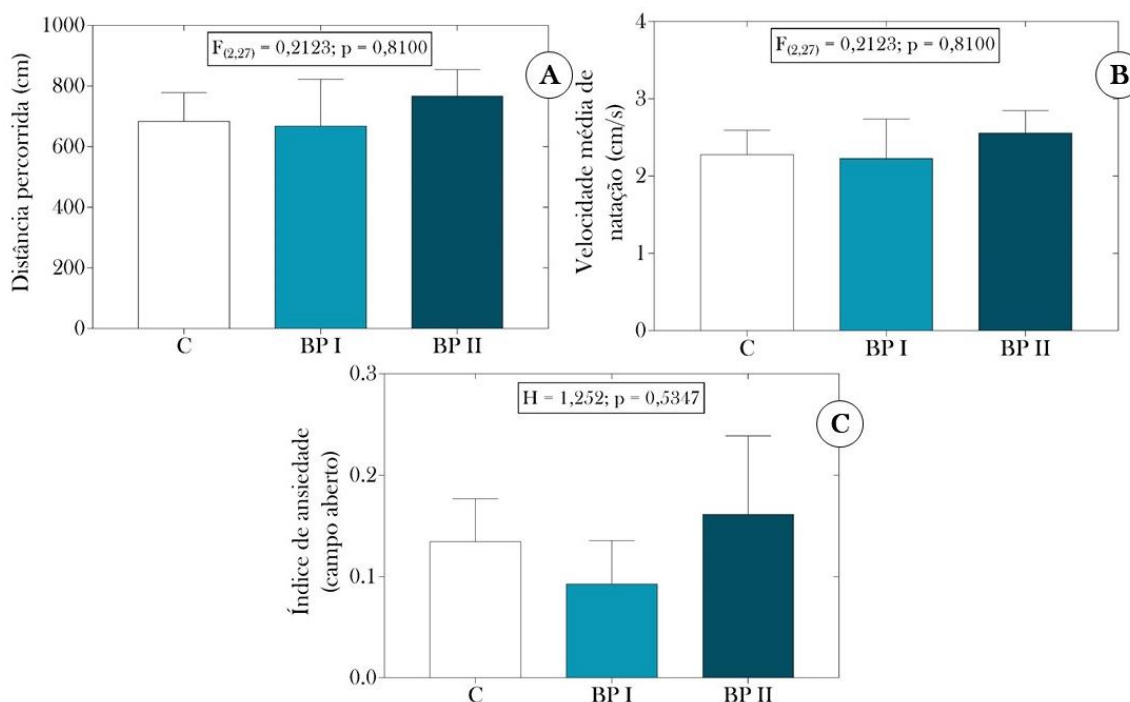


**Figura 7.** Concentração de ácido láctico na carcaça, fígado, brânquias e cérebro de adultos de *D. rerio* expostos aos BioMPs de PLA (BP I: 2,5 mg/L e BP II: 5 mg/L). As barras indicam a média + o desvio padrão dos dados, os quais foram submetidos ao teste de t Student (se paramétricos) ou ao teste de Mann-Whitney (se não-paramétricos), ambos a 5% de probabilidade. Letras minúsculas distintas posicionadas acima das barras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. Os sumários estatísticos são apresentados na parte superior dos gráficos.

### 3.2. Biomarcadores comportamentais

Em relação aos testes realizados, o teste do campo aberto foi o primeiro, tendo os animais sido avaliados individualmente. Conforme podemos observar na Figura 8A-B, a ausência de diferenças entre os grupos quanto aos parâmetros “distância percorrida” e “velocidade média de natação” evidencia que os tratamentos não provocaram efeitos sobre o desempenho locomotor (hipoatividade ou hiperatividade) dos animais. Além disso, o índice de ansiedade gerado a partir dos cruzamentos entre as zonas central e periférica do aparato não diferiu entre os grupos

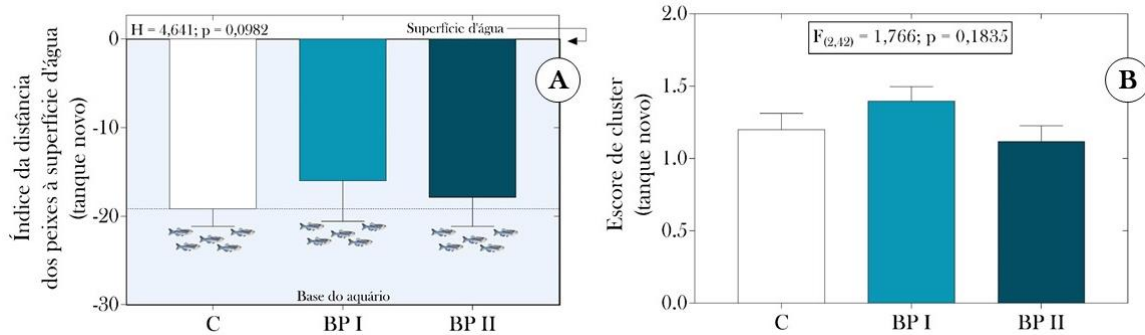
experimentais, o que sugere ausência de efeitos ansiogênicos ou ansiolíticos dos BioMPs de PLA (Figura 8C).



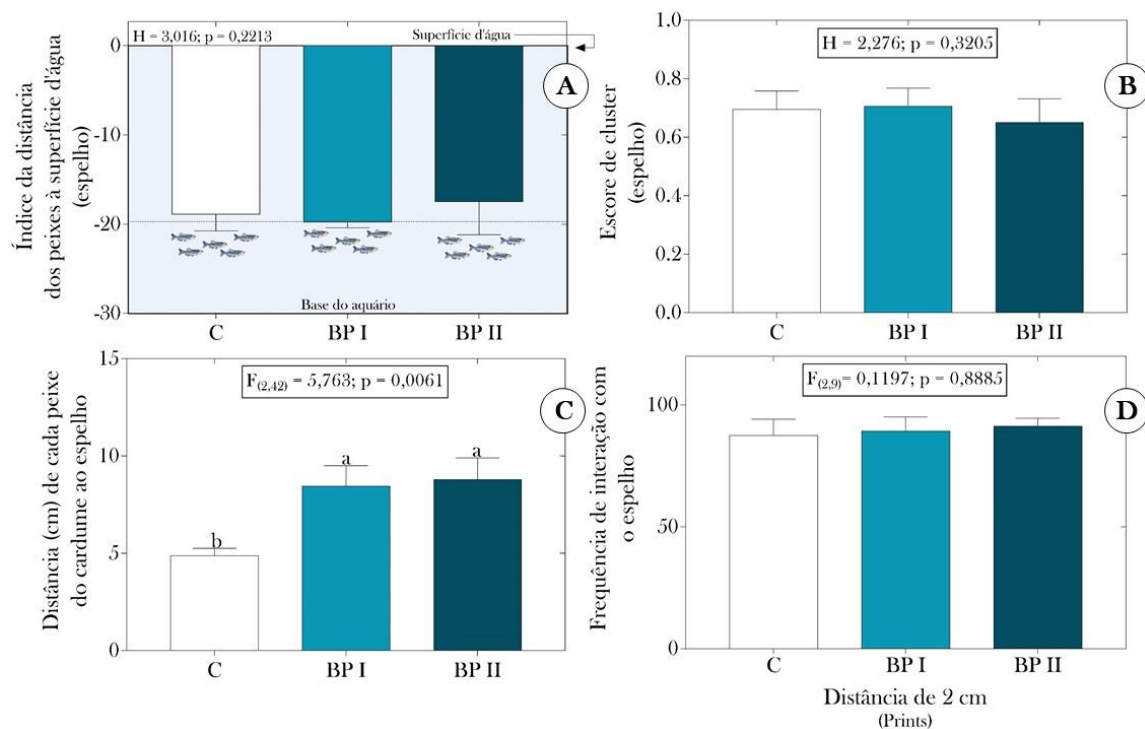
**Figura 8.** (A) Distância percorrida, (B) velocidade média de natação e (C) índice de ansiedade avaliados no teste do campo aberto, ao qual adultos de *D. rerio* foram submetidos (previamente expostos ou não aos BioMPs de PLA). As barras indicam a média + desvio padrão dos dados, os quais foram submetidos à one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (se paramétricos) ou ao teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's (se não-paramétricos), ambos a 5% de probabilidade. Os sumários estatísticos são apresentados na parte superior dos gráficos. A ausência de letras minúsculas posicionadas acima das barras indica similaridade estatística entre os grupos. C: grupo controle; BP I e BP II: grupos nos quais os animais foram expostos aos BioMPs de PLA nas concentrações de 2,5 mg/L e 5 mg/L, respectivamente.

Em relação aos comportamentos dos cardumes, não observamos no teste do tanque novo diferenças entre os grupos quanto ao índice da altura média do cardume até a superfície e à coesão dos cardumes, inferida pelos ECs (Figura 9A-B). Resultados semelhantes (i.e.: ausência de diferenças entre os grupos) foram observados no teste de interação social coespecífica (através de um espelho), quando os parâmetros “distância até a superfície” e “coesão dos cardumes” foram avaliados (Figura 10A-B). Entretanto, os dados referentes à interação dos animais inferida pela distância entre os indivíduos e o espelho, apontam que o grupo controle posicionou-se mais próximo do espelho, em comparação com os grupos expostos aos BioMPs de PLA (sem efeito concentração-resposta) (Figura 10C). Por outro lado, não evidenciamos diferenças entre os grupos em relação à frequência de interação com o espelho, registrada apenas quando pelo menos um

animal do cardume encontrava posicionado na zona de interação mais próxima com o espelho (i.e.: 2 cm) (Figura 10D).

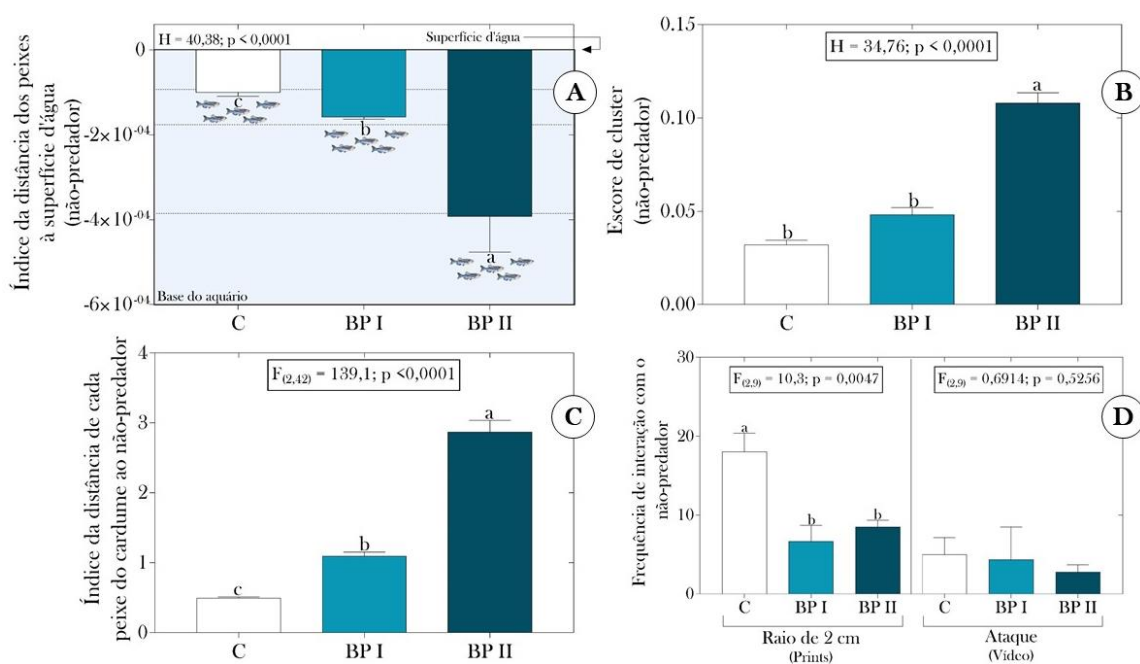


**Figura 9.** (A) Índice da distância dos peixes até a superfície d' água e (B) escores de cluster (obtidos no teste do tanque novo) de cardumes de adultos de *D. rerio* compostos por indivíduos expostos ou não aos BioMPs de PLA. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados, os quais foram submetidos à one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (se paramétricos) ou ao teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's (se não-paramétricos), ambos a 5% de probabilidade. Os sumários estatísticos são apresentados na parte superior dos gráficos. A ausência de letras minúsculas posicionadas abaixo (em "A") ou acima (em "B") das barras indicam similaridade estatística entre os grupos experimentais. C: grupo controle; BP I e BP II: grupos nos quais os animais foram expostos aos BioMPs de PLA nas concentrações de 2,5 mg/L e 5 mg/L, respectivamente.



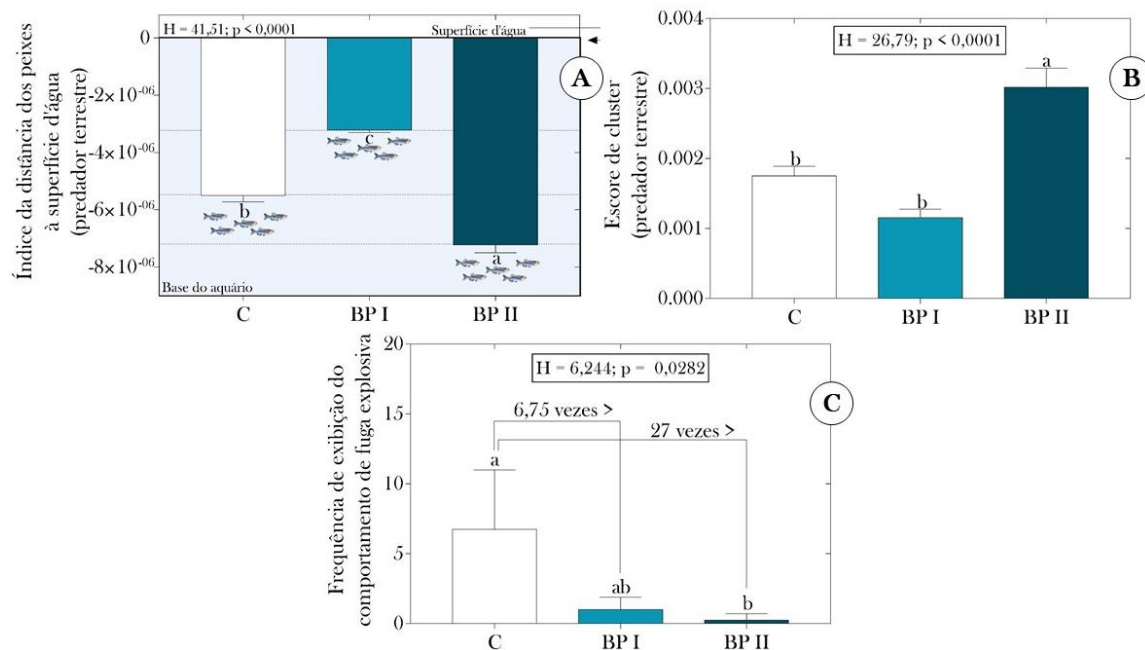
**Figura 10.** (A) Índice da distância dos peixes até a superfície d' água; (B) escore de *cluster*; (C) distância de cada peixe do cardume até o espelho e (D) frequência de interação com o espelho (avaliados no teste interação coespecífica) de cardumes de adultos de *D. rerio* expostos ou não aos BioMPs de PLA. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados, os quais foram submetidos à one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (se paramétricos) ou ao teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's (se não-paramétricos), ambos a 5% de probabilidade. Letras minúsculas diferentes posicionadas abaixo (em "A") ou acima (em "B-D") das barras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. Os sumários estatísticos são apresentados na parte superior dos gráficos. Já a ausência de letras indica similaridade estatística entre os grupos. C: grupo controle; BP I e BP II: grupos nos quais os animais foram expostos aos BioMPs de PLA nas concentrações de 2,5 mg/L e 5 mg/L, respectivamente.

Em relação ao teste de interação social com um indivíduo não-predador, observamos que os tratamentos influenciaram a exibição comportamental dos animais neste teste. Conforme observado na Figura 11A, os animais do grupo controle permaneceram mais próximo da lâmina d' água, em relação aos demais grupos. Por outro lado, quando os cardumes foram confrontados com o *P. reticulata*, apenas os cardumes do grupo BP II aumentaram sua coesão (inferida pelos ECs) (Figura 11B). Já em relação ao índice da distância de cada peixe do cardume ao não-predador, observamos um efeito concentração-resposta, o qual aumentou de forma proporcional ao incremento das concentrações de BioMPs de PLA (Figura 11C), o que sugere que o grupo controle permaneceu mais próximo ao heteroespecífico. Adicionalmente, o registro da frequência de interações entre os *D. rerio* e o *P. reticulata* sugere maior interação dos animais do grupo controle, embora o número de ataques desferidos contra o peixe intruso não tenha diferido entre os grupos (Figura 11D).



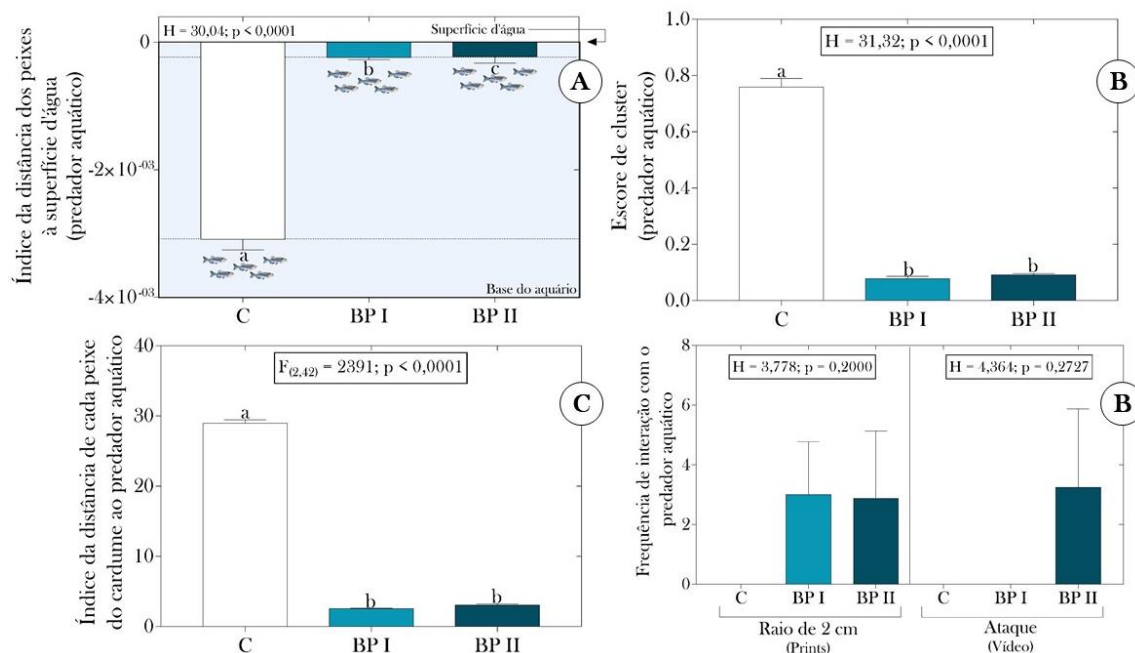
**Figura 11.** (A) Índice da distância dos peixes até a superfície d' água; (B) escore de *cluster*; (C) distância de cada *D. rerio* do cardume até o peixe intruso e (D) frequência de interação dos peixes testes ao não-predador no teste de interação social no qual os cardumes foram confrontados com um *P. reticulata*. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados, os quais foram submetidos à one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (se paramétricos) ou ao teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's (se não-paramétricos), ambos a 5% de probabilidade. Letras minúsculas diferentes posicionadas abaixo (em "A") ou acima (em "B-D") das barras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. Os sumários estatísticos são apresentados na parte superior dos gráficos. Já a ausência de letras indica similaridade estatística entre os grupos. C: grupo controle; BP I e BP II: grupos nos quais os animais foram expostos aos BioMPs de PLA nas concentrações de 2,5 mg/L e 5 mg/L, respectivamente.

Na sequência do teste de interação social com o não-predador (*P. reticulata*) foi realizado o teste de resposta social a um potencial predador terrestre, simulado por um camundongo (*M. musculus*). Os resultados referentes à distância dos peixes até a superfície d'água revelam, curiosamente, que cada grupo respondeu ao estímulo oferecido de uma forma peculiar, sendo os cardumes compostos pelos animais do grupo controle aqueles que permaneceram mais tempo na zona mediana, os do grupo BP I mais próximos à superfície do aquário e os cardumes compostos por *D. rerio* expostos à maior concentração de BioMPs de PLA foram aqueles que permaneceram predominantemente na zona inferior do aquário (Figura 12A). Entretanto, os ECs apontam que a coesão dos cardumes do grupo BP II foi superior, em relação aos demais grupos (Figura 12B), conforme também foi observado quando os cardumes foram confrontados com o não-predador (Figura 11B). Por outro lado, observamos que os cardumes formados pelos animais do grupo controle exibiram com maior frequência o comportamento de fuga explosiva (vide vídeo em "Material Suplementar"), sendo tal frequência 6,75 e 27 vezes maior do que aquela registrada nos cardumes dos grupos BP I e II, respectivamente (Figura 12C).



**Figura 12.** (A) Índice da distância dos peixes até a superfície d' água; (B) escore de *cluster* e (C) frequência de exibição do comportamento de fuga explosivas de cardumes compostos por adultos de *D. rerio* expostos ou não aos BioMPs de PLA, quando submetidos ao teste de interação social com um potencial predador terrestre. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados, os quais foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's (se não-paramétricos), a 5% de probabilidade. Os sumários estatísticos são apresentados na parte superior dos gráficos. As letras minúsculas diferentes posicionadas abaixo (em "A") ou acima (em "B-C") das barras indicam diferenças significativas entre os grupos. C: grupo controle; BP I e BP II: grupos nos quais os animais foram expostos aos BioMPs de PLA nas concentrações de 2,5 mg/L e 5 mg/L, respectivamente.

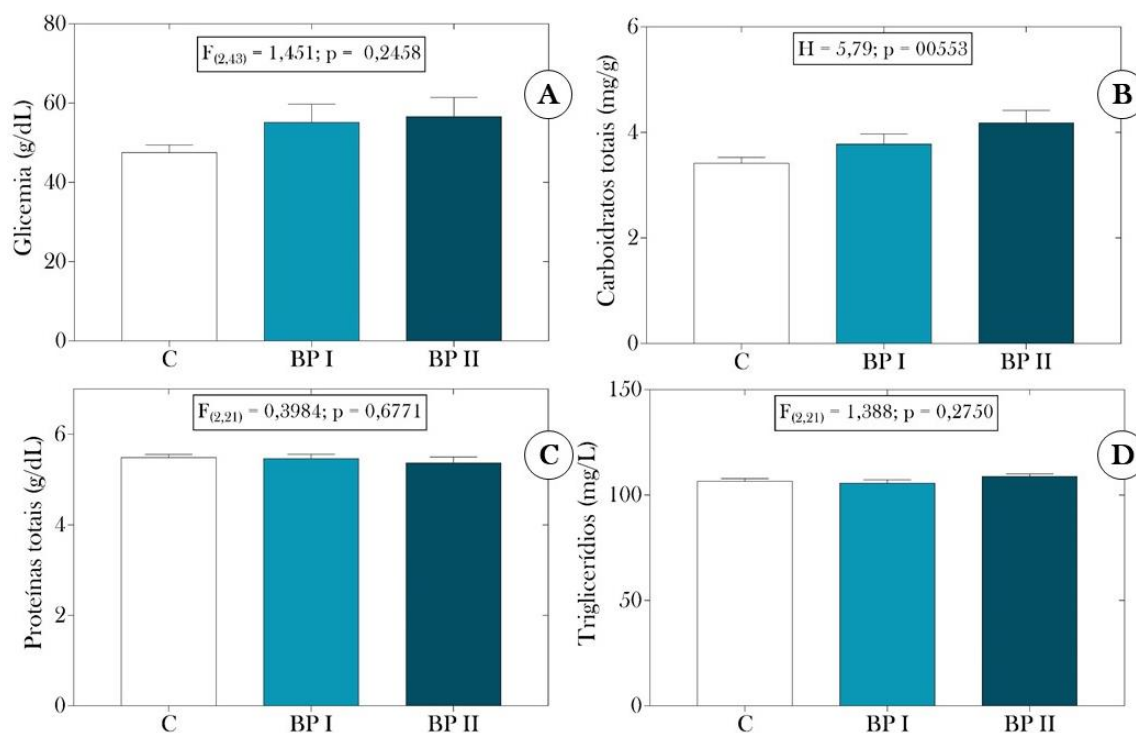
Quanto ao teste de interação social com um potencial predador aquático (representado por um indivíduo de *O. niloticus*), nossos dados também revelam influência dos BioMPs de PLA na exibição comportamental dos cardumes avaliados. Enquanto os cardumes do grupo controle permaneceram mais tempo na zona mais basal do aquário, os cardumes dos *D. rerio* expostos à ambas as concentrações dos bioplásticos foram mais frequentes na zona superficial do aquário (Figura 13A). Por outro lado, observamos que os cardumes dos grupos expostos aos BioMPs de PLA se dispersaram na presença do predador, em oposição aos do grupo controle, para os quais um maior EC foi obtido (Figura 13B). Além disso, os dados referentes à interação entre as presas (*D. rerio*) e seu potencial predador (*O. niloticus*) [inferida pela distância entre eles (Figura 13C) e pela frequência de interações (Figura 13D)] demonstram maior interação dos animais expostos aos BioMPs de PLA com a tilápia (Figura 13C), sendo os cardumes do grupo BP II os únicos a desferirem ataques contra o estímulo predatório (Figura 13D).



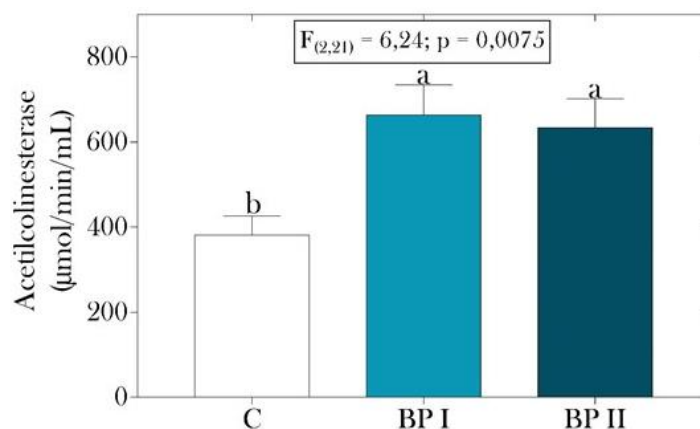
**Figura 13.** (A) Índice da distância dos peixes até a superfície d' água; (B) escore de *cluster*; (C) distância de cada peixe do cardume até a *O. niloticus* e (D) frequência de interação dos peixes testes com o estímulo predatório (no teste de interação social com potencial predador). As barras indicam a média + desvio padrão dos dados, os quais foram submetidos à one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (se paramétricos) ou ao teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's (se não-paramétricos), ambos a 5% de probabilidade. Os sumários estatísticos são apresentados na parte superior dos gráficos. Letras minúsculas diferentes posicionadas abaixo (em "A") ou acima (em "B-D") das barras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. Já a ausência de letras indica similaridade estatística entre os grupos. C: grupo controle; B I e B II: grupos nos quais os animais foram expostos aos BioMPs de PLA nas concentrações de 2,5 mg/L e 5 mg/L, respectivamente.

### 3.3. Biomarcadores bioquímicos

Buscando compreender como os BioMPs de PLA afetaram o comportamento dos animais, inicialmente avaliamos a influência dos tratamentos sobre as concentrações sanguíneas de glicose e de carboidratos totais, proteínas totais e triglicerídios no cérebro dos animais. Entretanto, não observamos diferenças significativas entre os grupos para nenhum destes biomarcadores (Figura 14), o que sugere que os bioplásticos não induziram déficit nutricional nos animais, tampouco condições fisiológicas caracterizadas por quadro hiper/hipoglicêmico, déficit no metabolismo de carboidratos/proteínas ou de dislipidemias. Por outro lado, nossos resultados demonstram um aumento significativo na atividade da AChE nos grupos expostos aos BioMPs de PLA (sem efeito concentração-resposta), em comparação com o grupo controle (Figura 15).



**Figura 14.** (A) Concentrações sanguíneas de glicose (g/dL) e de (B) carboidratos totais (C) proteínas totais e triglicérides no cérebro de adultos de *D. rerio* expostos ou não aos BioMPs de PLA. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados, os quais foram submetidos à one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (se paramétricos) ou ao teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's (se não-paramétricos), ambos a 5% de probabilidade. Os sumários estatísticos são apresentados na parte superior dos gráficos. A ausência de letras sobre as barras indica similaridade estatística entre os grupos. C: grupo controle; BP I e BP II: grupos nos quais os animais foram expostos aos BioMPs de PLA nas concentrações de 2,5 mg/L e 5 mg/L, respectivamente.

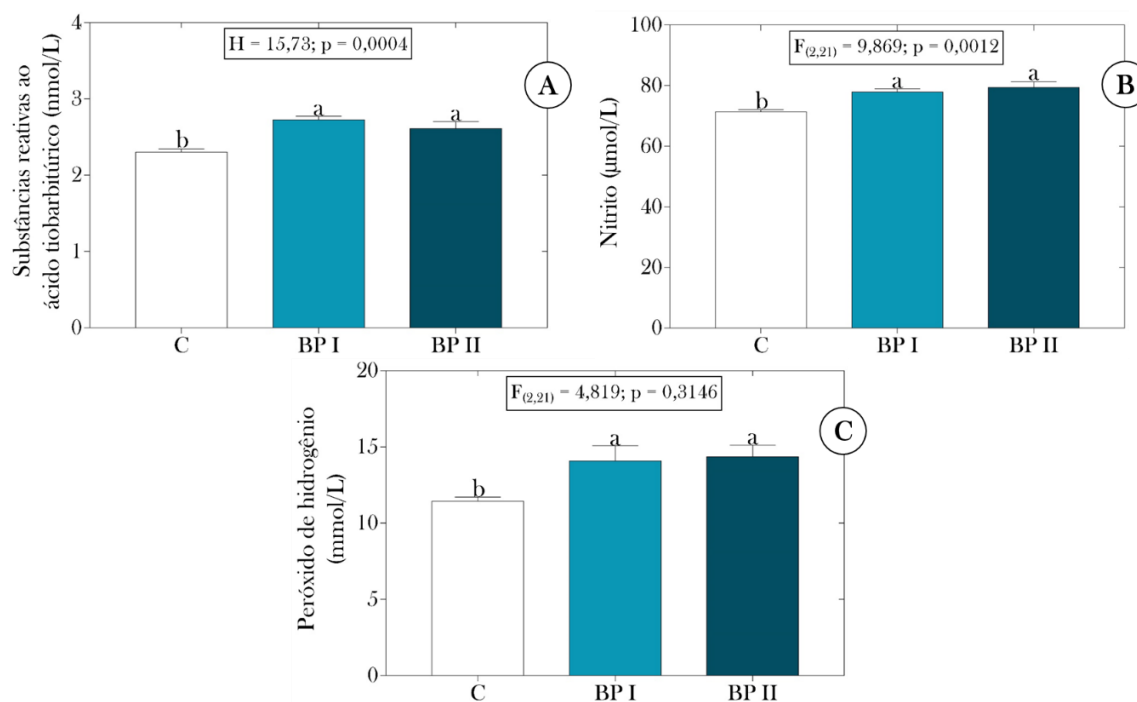


**Figura 15.** Atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro de adultos de *D. rerio* expostos ou não aos BioMPs de PLA. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados, os quais foram submetidos à one-way ANOVA com pós-teste de Tukey, a 5% de probabilidade. O sumário

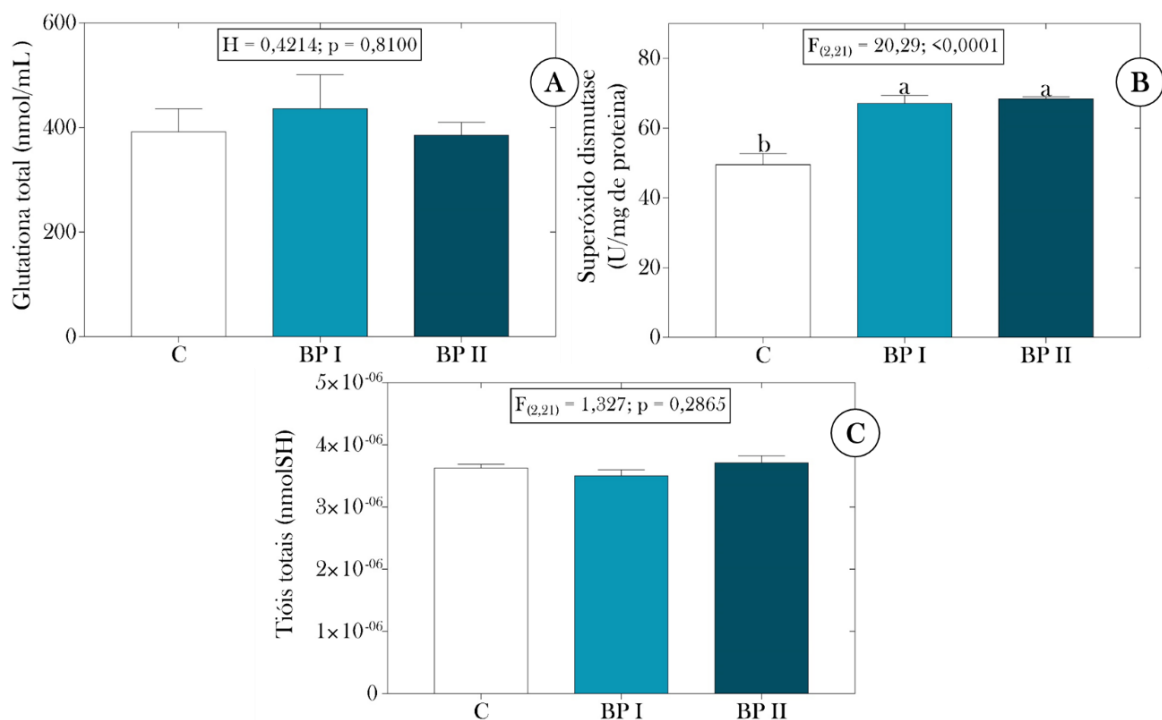


estatístico é apresentado na parte superior do gráfico. Letras minúsculas diferentes posicionadas acima das barras evidenciam diferenças significativas entre os grupos. C: grupo controle; BP I e BP II: grupos nos quais os animais foram expostos aos BioMPs de PLA nas concentrações de 2,5 mg/L e 5 mg/L, respectivamente.

Para avaliar a possível indução de estresse oxidativo pelos BioMPs de PLA avaliamos, no cérebro dos animais, as concentrações de TBARS, a produção de nitrito (medida indireta do óxido nítrico) e a produção de peróxido de hidrogênio. Já a influência dos tratamentos na atividade antioxidante dos animais foi aferida pela dosagem de glutathiona total, superóxido dismutase e tióis totais. Nossos dados indicam aumento significativo de todos os biomarcadores de estresse oxidativo nos animais dos grupos BP I e II (Figura 16A-B) e, apenas a atividade da superóxido dismutase foi aumentada nesses mesmos animais (Figura 17B). Logo, esses dados são sugestivos de desbalanço REDOX induzido pelos BioMPs de PLA.



**Figura 16.** (A) Concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, (B) produção de nitrito e (C) peróxido de hidrogênio no cérebro de adultos de *D. rerio* expostos ou não aos BioMPs de PLA. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados, os quais foram submetidos à one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (se paramétricos) ou ao teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's (se não-paramétricos), ambos a 5% de probabilidade. Os sumários estatísticos são apresentados na parte superior dos gráficos. Letras minúsculas diferentes posicionadas acima das barras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. C: grupo controle; BP I e BP II: grupos nos quais os animais foram expostos aos BioMPs de PLA nas concentrações de 2,5 mg/L e 5 mg/L, respectivamente.



**Figura 17.** (A) Atividade da glutathiona total, (B) súpéroxido dismutase e de (C) tióis totais no cérebro de adultos de *D. rerio* expostos ou não aos BioMPs de PLA. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados, os quais foram submetidos à one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (se paramétricos) ou ao teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's (se não-paramétricos), ambos a 5% de probabilidade. Os sumários estatísticos são apresentados na parte superior dos gráficos. Letras minúsculas diferentes posicionadas acima das barras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. Já a ausência de letras indica similaridade estatística entre os grupos. C: grupo controle; BP I e BP II: grupos nos quais os animais foram expostos aos BioMPs de PLA nas concentrações de 2,5 mg/L e 5 mg/L, respectivamente.

### 3.4. Biometria e pigmentação

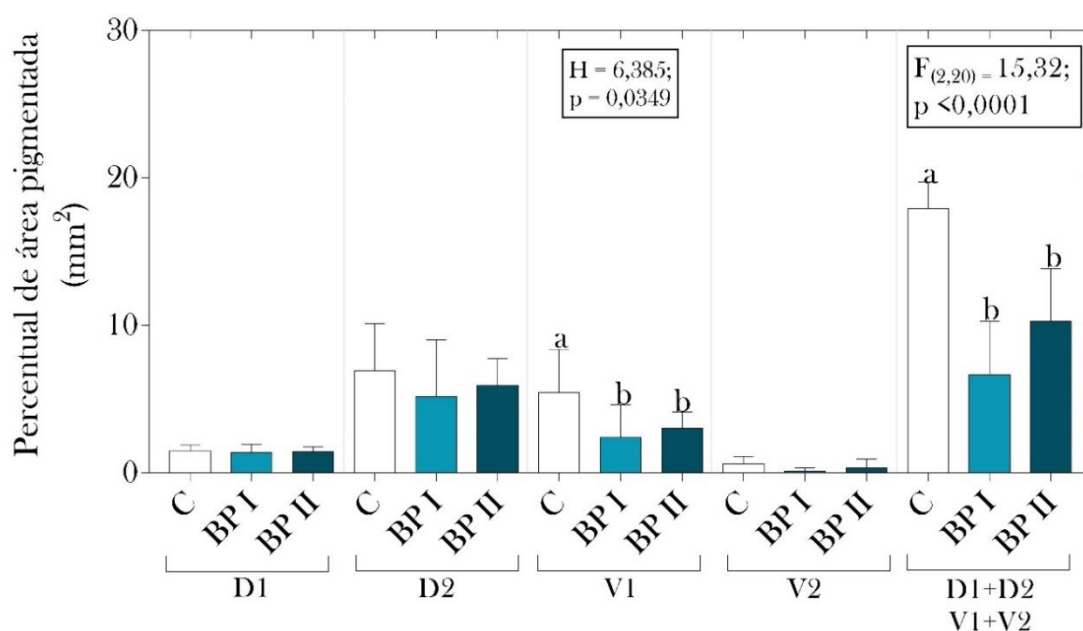
No presente estudo, também avaliamos se a exposição aos BioMPs de PLA foi capaz de induzir alterações em diferentes parâmetros biométrico. Entretanto, não observamos diferenças entre as biomassas dos animais dos distintos grupos experimentais ( $F_{(2,43)} = 0,6903$ ;  $p = 0,5060$  - gráfico não mostrado), tampouco nas medições corpóreas (altura de cabeça, comprimento da cabeça, altura do pedúnculo caudal, altura do dorso e comprimento total) (Tabela 1). Por outro lado, observamos diferenças significativas no percentual de área pigmentada entre os grupos experimentais, sendo os animais não-expostos aqueles que apresentaram maior área pigmentada (D1+D2+V1+V2), quando comparados àqueles expostos aos BioMPs de PLA (Figura 18), o que sugere, portanto, influência dos biopolímeros sobre a pigmentação corpórea dos animais.

**Tabela 1.** Parâmetros biométricos corpóreos avaliados em adultos de *D. rerio* expostos ou não aos BioMPs de PLA.

Parâmetros biométricos	Grupos experimentais*			Sumário estatístico**
	C	BP I	BP II	
Altura da cabeça	0,426 ± 0,03	0,428 ± 0,02	0,421 ± 0,02	H = 0,6774; p = 0,7127
Comprimento da cabeça	0,654 ± 0,04	0,660 ± 0,02	0,662 ± 0,06	H = 0,7205; p = 0,6975
Altura do pedúnculo caudal	0,312 ± 0,03	0,310 ± 0,02	0,313 ± 0,02	F <sub>(2,37)</sub> = 0,0287; p = 0,0010
Altura do dorso	0,660 ± 0,06	0,669 ± 0,56	0,659 ± 0,04	H = 0,3462; p = 0,8411
Comprimento total	3,410 ± 0,20	3,423 ± 0,08	3,396 ± 0,23	F <sub>(2,37)</sub> = 0,1095; p = 0,0038

\*Os dados numéricos representam a média ± desvio padrão dos dados.

\*\*Os dados paramétricos foram submetidos à one-way ANOVA e os não-paramétricos ao teste de Kruskal Wallis, ambos a 5% de probabilidade. C: grupo controle; BP I e BP II: grupos nos quais os animais foram expostos aos BioMPs de PLA nas concentrações de 2,5 mg/L e 5 mg/L, respectivamente.



**Figura 18.** Percentual de área pigmentada em diferentes faixas de pigmentação corpórea de adultos de *D. rerio* expostos ou não aos BioMPs de PLA. D1: Faixa dorsal 1; D2: Faixa dorsal 2; V1: Faixa ventral 1 e V2: Faixa ventral 2. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados, os quais foram submetidos à one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (se paramétricos) ou ao teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's (se não-paramétricos), ambos a 5% de probabilidade. Os sumários estatísticos são apresentados na parte superior dos gráficos. Letras minúsculas diferentes

posicionadas acima das barras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. Já a ausência de letras indica similaridade estatística entre os grupos. C: grupo controle; BP I e BP II: grupos nos quais os animais foram expostos aos BioMPs de PLA nas concentrações de 2,5 mg/L e 5 mg/L, respectivamente.

### 3.5. Qualidade físico-química das águas de exposição

Por fim, avaliamos se as alterações observadas nos animais tinham influência de possíveis mudanças na qualidade físico-química das águas de exposição. Conforme pode ser observado na Tabela 2, não observamos diferenças entre os grupos para nenhum dos parâmetros avaliados. Portanto, podemos descartar a hipótese de que os efeitos observados nos *D. rerio* tenham relação direta com alterações nestes parâmetros induzidas pelos poluentes.

**Tabela 2** Parâmetros físico-químicos monitorados ao longo do período experimental.

Parâmetros	Grupos experimentais*			Sumário estatístico**
	C	BP I	BP II	
pH	7,066 ± 0,1351	7,045 ± 0,077	6,968 ± 0,0195	F <sub>(2,45)</sub> = 0,2212; p= 0,8024
Temperatura (°C)	25,61 ± 0,0946	25,49 ± 0,1316	25,53 ± 0,0956	H= 0,4235; p= 0,8092
Salinidade (%)	0,1938 ± 0,0381	0,1563 ± 0,0364	0,1688 ± 0,0463	H= 2,949; p= 0,2289
Oxigênio dissolvido (mg/L)	9,974 ± 0,1021	9,877 ± 0,0817	9,917 ± 0,0979	H= 1,249; p= 0,5355

\*Os dados numéricos representam a média ± desvio padrão dos dados.

\*\*Os dados paramétricos foram submetidos à one-way ANOVA e os não-paramétricos ao teste de Kruskal Wallis, ambos a 5% de probabilidade. C: grupo controle; B I e B II: grupos nos quais os animais foram expostos aos BioMPs de PLA nas concentrações de 2,5 mg/L e 5 mg/L, respectivamente.

## 4. DISCUSSÃO

A identificação, caracterização e compreensão do potencial (eco)toxicológico dos mais diversos poluentes e/ou contaminantes são dependentes intimamente de estudos como o nosso (Grossman et al., 2010; Campos et al., 2019; Mesak et al., 2019). O controle das variáveis em ambiente laboratorial nos proporciona expor e acompanhar os organismos, permitindo-nos avaliar os impactos diretos e indiretos dos mais variáveis xenobióticos. Através do presente estudo, confirmamos nossa hipótese inicial, demonstrando que os BioMPs de PLA induzem efeitos danosos à saúde dos animais avaliados. Dentre os resultados descritos no presente estudo, as alterações comportamentais (Figuras 10, 11, 12 e 13), o efeito neurotóxico (inferido pelo aumento

da AChE - Figura 15) e a indução de estresse oxidativo observada no cérebro dos animais expostos aos BioMPs de PLA (Figura 16) constituem os principais. Além disso, observamos, por meio da quantificação de ácido lático, que os BioMPs de PLA foram absorvidos do meio aquático e translocados para diferentes órgãos dos animais, incluindo o cérebro (Figura 7).

A partir das avaliações comportamentais individuais realizadas, inicialmente, evidenciamos a inabilidade dos BioMPs de PLA em induzirem efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos (Figura 8C), tampouco comprometimento do sistema locomotor dos animais (Figura 8A - B), aferidos no teste do campo aberto. Tais resultados são particularmente importantes, pois nos permite descartar a hipótese de que a resposta comportamental dos cardumes aos diferentes estímulos subsequentes tenha sido influenciada por déficits locomotores ou à comportamentos *anxiety-like* ou *ansiolitic-like* dos indivíduos que os compuseram. Entretanto, resultados diferentes foram relatados recentemente no estudo de Oliveira et al. (2020), no qual os autores identificaram comportamento *anxiety-like* e mudanças locomotoras em larvas de *D. rerio* expostas aos BioMPs de PLA (por 5 dias) nas concentrações de 3 e 9 mg/L. Nesse caso, é possível que a diferença entre nossos resultados e aqueles reportados por Oliveira et al. (2020) seja explicada pela maior sensibilidade das larvas de *D. rerio* aos poluentes, já que uma exposição 6 vezes mais curta (em relação à exposição dos indivíduos adultos - 30 dias) foi suficiente para induzir alterações comportamentais.

Outro diferencial do nosso estudo, refere-se à avaliação do impacto dos poluentes sobre o comportamento dos cardumes de *D. rerio*, o que - contrariamente - tem sido mais comum em estudos descritivos relacionados à biologia espécie (Litvak, 1993; Dlugos & Rabin, 2003; Gerlai, 2014). Conforme discutido por Buske & Gerlai (2011), a formação de cardumes beneficia os indivíduos de diversas formas, incluindo a otimização do forrageio, facilitação de acesso a parceiros para reprodução, além de conferir maior proteção aos indivíduos contra possíveis ameaças predatórias. Nesse sentido, nossos dados evidenciam, pioneiramente, a influência dos BioMPs de MPs sobre o comportamento dos cardumes avaliados, tendo sido fortemente associada às alterações nos diferentes parâmetros bioquímicos aferidos no cérebro dos animais. Inicialmente, observamos que os BioMPs de PLA induziram aumento significativo dos processos de estresse oxidativo (inferidos pelas concentrações de TBARS, nitrito e peróxido de hidrogênio - Figura 16, bem como pelo aumento da atividade antioxidante da SOD - Figura 17), o qual parece ter sido um mecanismo preponderante para a exibição diferenciada dos comportamentos avaliados.

Sobre isso, é importante ressaltar que a escassez de estudos envolvendo a exposição de peixes aos BioMPs de PLA, assim como a outros biopolímeros, dificulta enormemente a comparação dos nossos dados com aqueles previamente publicados. A toxicidade dos biopolímeros de PLA, particularmente, tem sido investigada por meio de delineamentos experimentais muito distintos do adotado em nosso estudo, com foco especialmente em microorganismos e plantas. Esse é o caso, por exemplo, do trabalho de Zimmermann et al. (2019), no qual os autores evidenciaram alta toxicidade basal do PLA em *Aliivibrio fischeri* (bactéria

bioluminescente), avaliada por meio do ensaio Microtox®. Em *Allium cepa*, foi observado que o PLA causou diminuição no índice mitótico, além de ter induzido a formação de diversos tipos de anormalidades cromossômicas (Souza et al., 2013), indicando possível efeito genotóxico desses biopolímeros. Além disso, Zhang et al. (2019) mostraram que partículas de PLA emitidas por impressoras 3D, quando inaladas, induzem morte celular, estresse oxidativo e respostas inflamatórias em camundongos, o que pode levar à diversos distúrbios orgânicos.

Por outro lado, nossos dados são similares àqueles reportados em estudos envolvendo diferentes tipos de MPs convencionais. O aumento dos processos de estresse oxidativo (com consequente desequilíbrio REDOX) já foi associado, por exemplo, à diferentes alterações em peixes expostos aos MPs convencionais [Oliveira et al. (2013) (*Pomatoschistus microps*), Barboza et al. (2018) (em *Dicentrarchus labrax*), Limonta et al. (2019) (em *D. rerio*), Espinosa et al. (2019) (também em *Dicentrarchus labrax*), Qiao et al. (2019) (em *D. rerio*) e Xia et al. (2020) (em *Cyprinus carpio*). Embora os mecanismos de ação dos MPs que explicam esses achados possam ser distintos (dependendo do modelo animal avaliado, tipo de MP, período de exposição, etc.), estes estudos têm sugerido que o aumento do estresse oxidativo esteja relacionado à internalização celular das partículas e à subsequente alteração na integridade das membranas mitocondriais ou, ainda, à supressão das defesas antioxidantes causada pelos MPs (Alomar et al., 2017, Gabriel et al., 2018). Em nosso estudo, o fato da atividade antioxidante da glutatona total e tióis totais (Figura 17) não ter sido proporcional ao aumento do estresse oxidativo já constituiria um indício de efeito negativo dos BioMPs de PLA.

Em relação à atividade da AChE (a qual é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas - Araújo, Santos & Gonsalves, 2016), nossos dados sugerem efeito estimulatório causado pelos BioMPs de PLA (Figura F15). Contrariamente a estudos que relataram a inibição da AChE em peixes expostos aos MPs (Oliveira et al., 2013, Sá, Luís & Guilhermino, 2015, Ferreira et al., 2016); comungamos da hipótese proposta por Gabriel et al. (2020) e Estrela et al. (2021), na qual o aumento da AChE nos animais expostos aos MPs estaria relacionado à possível ruptura de vesículas pré-sinápticas contendo acetilcolina, induzida pela peroxidação lipídica. Nesse caso, a liberação do neurotransmissor nas fendas sinápticas colinérgicas e superestimulação dos receptores pós-sinápticos seriam eventos consequentes da ruptura dessas vesículas.

Particularmente, em nosso estudo, esses dados foram associados ao desequilíbrio RODOX observado nos animais dos grupos BP I e II, bem como às suas respostas aos testes comportamentais aos quais foram submetidos. A menor interação dos peixes expostos aos poluentes com suas imagens refletidas no espelho (Figura 10) e com o heteroespecífico introduzido no aquário [*P. reticula* (não-reprador)] (Figura 11) sugere que os mecanismos que regulam o comportamento social desses animais foram afetados direta ou indiretamente pelos BioMPs de PLA. Nesse caso, é possível que o processamento das imagens refletidas no espelho, pelos animais,

o qual envolve, sabidamente, neurônios no prosencéfalo (Neri, 2012; Stednitz et al. 2018) e do telencéfalo ventral (Shinozuka & Watanabe, 2004), possa ter sido afetado pelo aumento do estresse oxidativo, tendo a AChE um papel importante na mediação das informações neuronais. Além disso, a baixa interação dos animais expostos aos bioplásticos com o *P. Reticulata* (Figura 11C) pode ser interpretada como o reconhecimento do não-predador como uma potencial ameaça, diferentemente do que ocorreu nos animais do grupo controle. Nestes últimos, a maior interação com o peixe intruso pode representar um comportamento exploratório (pré-territorialista) típico de cardumes de *D. rerio*, quando confrontados com indivíduos heteroespecíficos não-predadores (Engeszer et al., 2007).

Alternativamente, não podemos descartar a hipótese de que a alteração na atividade colinérgica (inferida pelo aumento da atividade da AChE) tenha influenciado o comportamento social dos animais expostos aos poluentes. Nesse caso, tal aumento pode ter sido decorrente de um efeito hormético em resposta a uma condição de estresse desencadeada pelas imagens refletidas no espelho e pelo *P. reticulata* (não observada nos animais do grupo controle), conforme também observado por Gambardella et al. (2017), ao estudarem crustáceos planctônicos expostos a MPs de poliestireno. No entanto, é preciso reconhecer que estudos futuros são imprescindíveis para melhor compreensão de como os BioMPs de PLA e os MPs convencionais afetam o comportamento social de peixes. Isso é ainda mais necessário, ao consideramos que nosso *know-how* atual é insuficiente para o completo entendimento sobre a forma e a função dos circuitos subjacentes à maioria dos comportamentos sociais nos *D. rerio*. Somado a isso, devemos considerar a dificuldade de estudarmos os comportamentos sociais, por sua própria natureza, pois o estímulo desencadeador é outro animal, cujo comportamento pode ser muito variado (Engeszer et al., 2007).

Nossos dados também são sugestivos de que a resposta defensiva antipredatória exibida pelos cardumes dos animais expostos aos BioMPs de PLA, também tenha sido influenciada pelo aumento dos processos de estresse oxidativo e pela alteração colinérgica relatada anteriormente. Entretanto, as estratégias de defesa dos cardumes parecem ter sido estímulo-específicas, representando a plasticidade cerebral dos animais para lidarem com as situações de potencial perigo, em um contexto de poluição. Tal plasticidade fica evidente, especialmente quando analisamos as distintas respostas apresentadas pelos animais quando confrontados com um potencial predador terrestre e aquático. Enquanto a redução da coesão dos cardumes foi a estratégia defensiva antipredatória exibida pelos animais do grupo controle quando confrontados com o predador terrestre; a coesão foi observada nos animais expostos à maior concentração dos BioMPs de PLA (sem efeito concentração-dependente, Figura 13). Por outro lado, quando confrontados com um predador aquático (*O. niloticus*) os animais expostos ao poluente permaneceram mais próximos à superfície d'água, apresentaram menor agregação; porém, menor distância entre os cardumes e o potencial predador (Figura 13B), diferentemente dos animais do grupo controle.

Obviamente, é incipiente propormos uma explicação com fundamentos neurológicos mais aprofundados para esses resultados, já que são necessários mais estudos envolvendo avaliações das estruturas e circuitos/substratos neurais afetados pelos poluentes. Além disso, a “eficiência” das diferentes estratégias defensivas apresentadas pelos distintos grupos também é um interessante ponto de partida para pesquisas futuras. No entanto, já foi demonstrado que o reconhecimento do risco de predação pelos *D. rerio* envolve circuitos neurais do eixo hipotálamo-pituitária-interrenal, o qual medeia o sistema de estresse nesses animais (Alsop & Vijayan, 2008; Alderman & Bernier, 2009; Alsop & Vijayan, 2009). Nesse caso, pode-se esperar que alguma modificação, induzida pelos BioMPs de PLA, tenha ocorrido, culminando na percepção diferenciada dos animais aos estímulos oferecidos e, conseqüentemente, na deflagração de respostas antipredatórias distintas entre os grupos experimentais. É possível, por exemplo, que o aumento das reações de estresse oxidativo e da AChE tenham induzido alterações em vias bioquímicas de importância neuromodulatória do estresse nos *D. rerio*, as quais perpassam pela síntese e liberação de diferentes hormônios (e.g.: hormônio liberador de corticotropina, hormônio adrenocorticotrópico e cortisol) interligados numa cascata de eventos neuroendócrinos que medeiam o comportamental dos animais. Assim, o impacto dos tratamentos nos níveis desses hormônios pode, por si só, ter sido preponderante para a deflagração de diferentes respostas antipredatórias, devendo essa hipótese ser testada futuramente.

Por fim, nos chama a atenção a despigmentação epidermal observada nos *D. rerio* expostos aos BioMPs de PLA, quando comparados aos não-expostos (Figura 18), o que constitui um achado pioneiro na literatura. Logo, é incipiente também propormos as bases fisiológicas que explicam os dados obtidos. Contudo, os estudos de McMennamin et al. (2014) e Guillot et al. (2016), ao demonstrarem a relação de dependência entre o processo de melanogênese em *D. rerio* e os hormônios tireoidianos, suscitam a hipótese de que despigmentação observada nos animais que estudamos seja mais uma consequência danosa dos BioMPs de PLA sobre o sistema endócrino dos indivíduos, conforme também sugerido recentemente por Zhao et al. (2020). A interferência negativa do aumento do estresse oxidativo, por exemplo, nas funções tireoidianas já foi demonstrada em diferentes estudos, incluindo *D. rerio* (Ahmad et al., 2016) e outros sistemas modelos (Karbownik et al., 2003; Mancini et al., 2016; Teixeira et al., 2019; Chainy & Sahoo, 2020), o que reforça nossa hipótese.

Alternativamente, é concebível que o microatrito constante entre a pele dos animais e os bioplásticos dispersos na coluna d’água tenha causado microlesões suficientes para induzir a morte dos melanóforos e, conseqüentemente, causado um empalidecimento nos animais. Além disso, é plausível atribuir a causa desse efeito à propriedade reflectante dos bioplásticos estudados, que ao refletirem a radiação luminosa no ambiente subaquático podem interferir negativamente no processo melanogênico, seja ocasionando a morte dos melanóforos ou afetando os processos de diferenciação celular (especialmente pelo aumento da incidência de radiação UV). Estudos prévios



que demonstram que a distribuição de melanóforos melanizados é afetada por diferentes fatores (tais como intensidade luminosa, permitindo que os animais pareçam mais claros ou mais escuros para camuflagem, termorregulação e radiação UV (Thibaudeau & Altig, 2012; Franco-Belussi et al., 2020), reforçam essa presunção. Entretanto, é imperativo que investigações futuras mais detalhadas sejam conduzidas para explorar melhor essa ideia.

## 5. CONCLUSÕES

Em conclusão, nosso estudo confirma a hipótese de que os BioMPs de PLA podem se acumular em adultos de *D. Rerio*, ocasionar alterações bioquímicas preditivas de desequilíbrio REDOX, eliciar respostas comportamentais sociais e antipredatórias diferenciadas (em relação ao grupo controle), bem como despigmentação epidermal avaliada nos animais. Os efeitos dos poluentes sobre as respostas defensivas antipredatórias dos cardumes, em particular, mostraram-se ser dependentes do estímulo predatório ofertado, cujas estratégias defensivas observadas foram distintas entre os grupos experimentais, cuja base neural deve ser melhor investigada em outros estudos. Logo, nosso estudo não apenas identifica pioneiramente alguns impactos dos BioMPs de PLA sobre uma espécie dulcícola, como também sugere que as consequências do acúmulo dos biomateriais podem desencadear alterações/mudanças/adaptações fisiológicas distintas entre os grupos experimentais estudados.

No entanto, não sendo exaustivo, o presente estudo abre perspectivas para a condução de novas investigações para a melhor compreensão dos mecanismos de ação dos BioMPs de PLA sobre a neurofisiologia dos animais estudados e seus impactos em nível de indivíduo e de populações. Questiona-se, por exemplo, se resultados similares seriam observados em exposições mais curtas aos poluentes e/ou em concentrações ainda menores. Os efeitos dos bioplásticos estudados seriam sexo - e idade - dependentes ou similares em outras espécies de peixes dulcícolas? Além disso, as alterações observadas seriam reversíveis em um contexto de cessamento da poluição aquática? Se sim, qual seria o tempo necessário para ocorrer a depuração dos animais? Portanto, somadas aos dados obtidos em nosso estudo, as respostas a essas questões serão muito úteis para que possamos avaliar a magnitude e o real impacto da poluição aquática por BioMPs de PLA (i.e.: sua segurança ecotoxicológica), assim como avaliar o quão essas partículas seriam nocivas à biota aquática e, portanto, potenciais substitutas dos MPs convencionais.

## **6. AGRADECIMENTOS**

Agradecemos ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) (agência brasileira de pesquisa) (proc. N. 426531 / 2018-3) e ao Instituto Federal Goiano pelo apoio financeiro (Proc. N. 23219.001259.2020-70). Agradecemos ainda ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) (Universidade Federal de Goiás / Brasil) pela contribuição no processo de análise dos BioMPs.

## **7. CONFORMIDADE COM AS NORMAS ÉTICAS**

**Conflito de interesses:** Não há conflito de interesses entre os autores.

**Aprovação ética:** Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas éticas de experimentação animal. Esforços meticulosos foram feitos para garantir que os animais sofressem o mínimo possível e para reduzir as fontes externas de estresse, dor e desconforto. O presente estudo não excedeu o número de animais necessários para produzir dados científicos confiáveis. Este artigo não se refere a nenhum estudo com participantes humanos realizado por qualquer um dos autores.

## 8. REFERÊNCIAS

- AHMAD, Farooq et al. Assessment of thyroid endocrine system impairment and oxidative stress mediated by cobalt ferrite (CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles in zebrafish larvae. **Environmental toxicology**, v. 31, n. 12, p. 2068-2080, 2016.
- AJJURI, Rami R.; O'DONNELL, Janis M. Novel whole-tissue quantitative assay of nitric oxide levels in *Drosophila neuroinflammatory* response. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 82, p. e50892, 2013.
- ALDERMAN, Sarah L.; BERNIER, Nicholas J. Ontogeny of the corticotropin-releasing factor system in zebrafish. **General and comparative endocrinology**, v. 164, n. 1, p. 61-69, 2009.
- ALOMAR, C. et al. Microplastic ingestion by *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758 fish and its potential for causing oxidative stress. **Environmental research**, v. 159, p. 135-142, 2017.
- ALSOP, Derek; VIJAYAN, Mathilakath M. Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 294, n. 3, p. R711-R719, 2008.
- ALSOP, Derek; VIJAYAN, Mathilakath. The zebrafish stress axis: molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event. **General and comparative endocrinology**, v. 161, n. 1, p. 62-66, 2009.
- ANBUMANI, Sadasivam; KAKKAR, Poonam. Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 15, p. 14373-14396, 2018.
- ARAÚJO, Cleônia Roberta Melo; SANTOS, VL dos A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase-AChE: uma enzima de interesse farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016.
- ARLETTAZ, Raphael. Feeding behaviour and foraging strategy of free-living mouse-eared bats, *Myotis myotis* and *Myotis blythii*. **Animal behaviour**, v. 51, n. 1, p. 1-11, 1996.
- BARBOZA, Luís Gabriel Antão et al. Microplastics increase mercury bioconcentration in gills and bioaccumulation in the liver, and cause oxidative stress and damage in *Dicentrarchus labrax* juveniles. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.
- BURROWS, Stephen D. et al. Expanding exploration of dynamic microplastic surface characteristics and interactions. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 115993, 2020.
- BUSKE, Christine; GERLAI, Robert. Shoaling develops with age in Zebrafish (*Danio rerio*). **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 6, p. 1409-1415, 2011.
- CAMPOS, Jerônimo Diego de Souza et al. O comportamento do camundongo Swiss webster em biotério de experimentação: observações e reflexões. **R. Soc. bras. Ci. Anim. Lab.**, p. 32-43, 2016.

- CAMPOS, Raphael Pires et al. Analysis of ZnO nanoparticle-induced changes in *Oreochromis niloticus* behavior as toxicity endpoint. **Science of The Total Environment**, v. 682, p. 561-571, 2019.
- CAROLA, Valeria et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioural brain research**, v. 134, n. 1-2, p. 49-57, 2002.
- CARVALHO, Mayara Medeiros de Freitas et al. Effects of acai on oxidative stress, ER stress, and inflammation-related parameters in mice with high fat diet-fed induced NAFLD. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.
- CHAINY, Gagan BN; SAHOO, Dipak Kumar. Hormones and oxidative stress: an overview. **Free Radical Research**, v. 54, n. 1, p. 1-26, 2020.
- CHEN, Ying Jian. Bioplastics and their role in achieving global sustainability. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 1, p. 226-231, 2014.
- CHOU, Ben-Shan; SHIAU, Shi-Yen. Optimal dietary lipid level for growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*. **Aquaculture**, v. 143, n. 2, p. 185-195, 1996.
- COSTA ARAÚJO, Amanda Pereira da; MALAFAIA, Guilherme. Microplastic ingestion induces behavioral disorders in mice: A preliminary study on the trophic transfer effects via tadpoles and fish. **Journal of Hazardous Materials**, v. 401, p. 123263, 2020.
- DAHLGREN, B. T. The effects of three different dietary protein levels on the fecundity in the guppy, *Poecilia reticulata* (Peters). **Journal of Fish Biology**, v. 16, n. 1, p. 83-97, 1980.
- DIETERICH, Sabine et al. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v. 101, n. 1, p. 33-39, 2000.
- DLUGOS, Cynthia A.; RABIN, Richard A. Ethanol effects on three strains of zebrafish: model system for genetic investigations. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 74, n. 2, p. 471-480, 2003.
- DRAPER, H. H. et al. Urinary malondialdehyde as an indicator of lipid peroxidation in the diet and in the tissues. **Lipids**, v. 19, n. 11, p. 836, 1984.
- DUBOIS, Michel et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- ELLMAN, George L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.
- ENGESZER, Raymond E. et al. Timing and plasticity of shoaling behaviour in the zebrafish, *Danio rerio*. **Animal behaviour**, v. 74, n. 5, p. 1269-1275, 2007.
- ESPINOSA, Cristóbal; ESTEBAN, María Ángeles; CUESTA, Alberto. Dietary administration of PVC and PE microplastics produces histological damage, oxidative stress and

- immunoregulation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 95, p. 574-583, 2019.
- ESTRELA, Dieferson da Costa et al. Predictive behaviors for anxiety and depression in female Wistar rats subjected to cafeteria diet and stress. **Physiology & behavior**, v. 151, p. 252-263, 2015.
- ESTRELA, Fernanda Neves et al. Effects of polystyrene nanoplastics on *Ctenopharyngodon idella* (grass carp) after individual and combined exposure with zinc oxide nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, p. 123879, 2021.
- EZGI, B. A. H. D. A review: Investigation of bioplastics J. **Civil Eng. Archi**, v. 9, p. 188-92, 2015.
- 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.
- FENDALL, Lisa S.; SEWELL, Mary A. Contributing to marine pollution by washing your face: microplastics in facial cleansers. **Marine pollution bulletin**, v. 58, n. 8, p. 1225-1228, 2009.
- FOSCHI, Eleonora; BONOLI, Alessandra. The commitment of packaging industry in the framework of the European strategy for plastics in a circular economy. **Administrative Sciences**, v. 9, n. 1, p. 18, 2019.
- GABRIEL, Luís Antão Barboza et al. Microplastics cause neurotoxicity, oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the *European seabass, Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). **Aquatic toxicology**, v. 195, p. 49-57, 2018.
- GABRIEL, Luís Antão Barboza et al. 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**, v. 717, p. 134625, 2020.
- GAMBARDELLA, Chiara et al. Effects of polystyrene microbeads in marine planktonic crustaceans. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 145, p. 250-257, 2017.
- GERLAI, Robert. Social behavior of zebrafish: from synthetic images to biological mechanisms of shoaling. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 234, p. 59-65, 2014.
- GERLAI, Robert; FERNANDES, Yohaán; PEREIRA, Terence. Zebrafish (*Danio rerio*) responds to the animated image of a predator: towards the development of an automated aversive task. **Behavioural brain research**, v. 201, n. 2, p. 318-324, 2009.
- GIRONI, F.; PIEMONTE, V. Bioplastics and petroleum-based plastics: strengths and weaknesses. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 33, n. 21, p. 1949-1959, 2011.
- GRAF, Ernst; PENNISTON, John T. Method for determination of hydrogen peroxide, with its application illustrated by glucose assay. **Clinical Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 658-660, 1980.

- GREEN, Dannielle Senga et al. Effects of conventional and biodegradable microplastics on a marine ecosystem engineer (*Arenicola marina*) and sediment nutrient cycling. **Environmental Pollution**, v. 208, p. 426-434, 2016.
- GRIFFITH, Owen W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Analytical biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 207-212, 1980.
- GRISHAM, Matthew B.; JOHNSON, Glenda G.; LANCASTER JR, Jack R. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1996. p. 237-246.
- 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.
- GRÜNSPAN, Lauren D. et al. Teratogenic and anticonvulsant effects of zinc and copper valproate complexes in zebrafish. **Epilepsy research**, v. 139, p. 171-179, 2018.
- GUILLOT, Raul et al. Thyroid hormones regulate zebrafish melanogenesis in a gender-specific manner. **PloS one**, v. 11, n. 11, p. e0166152, 2016.
- GUIMARÃES, Abraão Tiago Batista et al. Toxicity of polystyrene nanoplastics in *Ctenopharyngodon idella* juveniles: A genotoxic, mutagenic and cytotoxic perspective. **Science of The Total Environment**, v. 752, p. 141937, 2020.
- KALIA, Vandana; PUNDIR, Chandra S. Determination of serum triglycerides using lipase, glycerol kinase, glycerol-3-phosphate oxidase and peroxidase co-immobilized onto alkylamine glass beads. 2004.
- KARBOWNIK, Malgorzata; LEWINSKI, Andrzej. The role of oxidative stress in physiological and pathological processes in the thyroid gland; possible involvement in pineal-thyroid interactions. **Neuro endocrinology letters**, v. 24, n. 5, p. 293, 2003.
- KLEIN, Sascha et al. Analysis, occurrence, and degradation of microplastics in the aqueous environment. In: **Freshwater microplastics**. Springer, Cham, 2018. p. 51-67.
- KOELMANS, Albert A.; BESSELING, Ellen; SHIM, Won J. Nanoplastics in the aquatic environment. Critical review. In: **Marine anthropogenic litter**. Springer, Cham, 2015. p. 325-340.
- KOHDA, Masanori et al. If a fish can pass the mark test, what are the implications for consciousness and self-awareness testing in animals?. **PLoS biology**, v. 17, n. 2, p. e3000021, 2019.
- KOR, Kamalodin; MEHDINIA, Ali. Neustonic microplastic pollution in the Persian Gulf. **Marine pollution bulletin**, v. 150, p. 110665, 2020.
- LAWRENCE, Christian et al. The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquaculture**, v. 368, p. 103-108, 2012.
- LIMONTA, Giacomo et al. Microplastics induce transcriptional changes, immune response and behavioral alterations in adult zebrafish. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

- LITVAK, Matthew K. Response of shoaling fish to the threat of aerial predation. **Environmental Biology of Fishes**, v. 36, n. 2, p. 183-192, 1993.
- LOURO, Patrícia; WIDMER, Walter Martin. Plastic Pellets on Campeche Beach (Santa Catarina Island, Brazil): A Seasonality and Composition Study. **Environment and Ecology Research**, v. 5, n. 4, p. 302-311, 2017.
- LOWRY, Oliver H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MALAFIA, 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.
- MANCINI, Antonio et al. Thyroid hormones, oxidative stress, and inflammation. **Mediators of inflammation**, v. 2016, 2016.
- MCMENAMIN, Sarah K. et al. Thyroid hormone-dependent adult pigment cell lineage and pattern in zebrafish. **Science**, v. 345, n. 6202, p. 1358-1361, 2014.
- MESAK, Carlos et al. Do Amazon turtles exposed to environmental concentrations of the antineoplastic drug cyclophosphamide present mutagenic damages? If so, would such damages be reversible?. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 6, p. 6234-6243, 2019.
- MUTHUSAMY, M. Selvamurugan; PRAMASIVAM, Sivakumar. Bioplastics–An Eco-friendly Alternative to Petrochemical Plastics. **Current World Environment**, v. 14, n. 1, p. 49, 2019.
- NAQASH, Nafiah et al. Interaction of freshwater microplastics with biota and heavy metals: a review. **Environmental Chemistry Letters**, p. 1-12, 2020.
- NAVEENA, Byreddy; SHARMA, Ankita. Review on Properties of Bio plastics for Packaging Applications and its Advantages. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 9, n. 5, p. 1428-1432, 2020.
- NERI, Peter. Feature binding in zebrafish. **Animal Behaviour**, v. 84, n. 2, p. 485-493, 2012.
- NIELSEN, Tobias D. et al. Politics and the plastic crisis: A review throughout the plastic life cycle. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Energy and Environment**, v. 9, n. 1, p. e360, 2020.
- OLIVEIRA, João Pedro Justiniano de et al. Behavioral and Biochemical Consequences of *Danio rerio* Larvae Exposure to Polylactic Acid Bioplastic. **Journal of Hazardous Materials**, p. 124152, 2020.
- OLIVEIRA, M. et al. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). **Ecological Indicators**, v. 34, p. 641-647, 2013.
- 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.

- PHAM, Mimi et al. Assessing social behavior phenotypes in adult zebrafish: Shoaling, social preference, and mirror biting tests. In: **Zebrafish protocols for neurobehavioral research**. Humana Press, Totowa, NJ, 2012. p. 231-246.
- POLMAN, Emma MN et al. Comparison of the aerobic biodegradation of biopolymers and the corresponding bioplastics: A review. **Science of The Total Environment**, p. 141953, 2020.
- PRATA, Joana Correia et al. Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. **Science of the Total Environment**, v. 702, p. 134455, 2020.
- PRINZ, Natalie; KOREZ, Špela. Understanding how microplastics affect marine biota on the cellular level is important for assessing ecosystem function: a review. In: **YOUMARES 9- The Oceans: Our Research, Our Future**. Springer, Cham, 2020. p. 101-120.
- PRITCHARD, Victoria L. et al. Shoal choice in zebrafish, *Danio rerio*: the influence of shoal size and activity. **Animal Behaviour**, v. 62, n. 6, p. 1085-1088, 2001.
- QIAO, Ruxia et al. Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish. **Science of the Total Environment**, v. 662, p. 246-253, 2019.
- QUINTÃO, Thales Chagas 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.
- QUINTÃO, Thales Chagas et al. Precopulatory sexual behavior of male mice is changed by the exposure to tannery effluent. **Chemosphere**, v. 195, p. 312-324, 2018.
- ROSEMBERG, Denis B. et al. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e19397, 2011.
- ROWE, Kevin C.; ACHMADI, Anang S.; ESSELSTYN, Jacob A. Convergent evolution of aquatic foraging in a new genus and species (Rodentia: Muridae) from Sulawesi Island, Indonesia. **Zootaxa**, v. 3815, n. 4, p. 541-564, 2014.
- RUDEEKIT, Yositar et al. Compostability and Ecotoxicity of Poly (lactic acid) and Starch Blends. In: **Advanced Materials Research**. Trans Tech Publications Ltd, 2012. p. 323-326.
- SANTOS, Juliana Célia F. et al. Choline and cystine deficient diets in animal models with hepatocellular injury: evaluation of oxidative stress and expression of RAGE, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ . **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2015, 2015.
- SHINOZUKA, Kazutaka; WATANABE, Shigeru. Effects of telencephalic ablation on shoaling behavior in goldfish. **Physiology & behavior**, v. 81, n. 1, p. 141-148, 2004.
- SHRUTI, V. C.; KUTRALAM-MUNIASAMY, Gurusamy. Bioplastics: Missing link in the era of Microplastics. **Science of The Total Environment**, v. 697, p. 134139, 2019.
- SOUZA, Patrícia Moraes Sinohara et al. PLA and organoclays nanocomposites: degradation process and evaluation of ecotoxicity using *Allium cepa* as test organism. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 4, p. 1052-1063, 2013.



- STEDNITZ, Sarah J. et al. Forebrain control of behaviorally driven social orienting in zebrafish. **Current Biology**, v. 28, n. 15, p. 2445-2451. e3, 2018.
- STEWART, Adam et al. Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 135-143, 2012.
- TAKÁCS, Péter et al. Repeatability, reproducibility, separative power and subjectivity of different fish morphometric analysis methods. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0157890, 2016.
- TANG, Shuai et al. Pb (II) uptake onto nylon microplastics: Interaction mechanism and adsorption performance. **Journal of Hazardous Materials**, v. 386, p. 121960, 2020.
- TEIXEIRA, Rayane Brinck et al. An early stage in T4-induced hyperthyroidism is related to systemic oxidative stress but does not influence the pentose cycle in erythrocytes and systemic inflammatory status. **Archives of endocrinology and metabolism**, v. 63, n. 3, p. 228-234, 2019.
- TRIGUEIRO, Nicholas Silvestre de Souza et al. Zebrafish as an Emerging Model System in the Global South: Two Decades of Research in Brazil. **Zebrafish**, 2020.
- TYLER, Betty et al. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 163-175, 2016.
- UMANAILO, M. Chairul Basrun et al. Discourse on the Consumerist Community Consumption. **The Journal of Social Sciences Research**, v. 5, n. 4, p. 846-851, 2019.
- VASILAKIS Mp. A comparison between the effects of polylactic acid and polystyrene microplastics on *Daphnia magna* [Internet] [Dissertation]. 2017. Available from: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:su:diva-145370>.
- WALKER, S.; ROTHMAN, R. Life cycle assessment of bio-based and fossil-based plastic: A review. **Journal of Cleaner Production**, p. 121158, 2020.
- WEBBER, Hannah M.; HAINES, Terry A. Mercury effects on predator avoidance behavior of a forage fish, golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 22, n. 7, p. 1556-1561, 2003.
- WEI, Ren et al. Possibilities and limitations of biotechnological plastic degradation and recycling. **Nature Catalysis**, p. 1-5, 2020.
- XIA, Xiaohua et al. Polyvinyl chloride microplastics induce growth inhibition and oxidative stress in *Cyprinus carpio* var. larvae. **Science of The Total Environment**, p. 136479, 2020.
- XU, Baile et al. Microplastics in the soil environment: Occurrence, risks, interactions and fate—A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 21, p. 2175-2222, 2020.
- ZHANG, Qian et al. Chemical composition and toxicity of particles emitted from a consumer-level 3D printer using various materials. **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 20, p. 12054-12061, 2019.

- ZHAO, Hua-Jin et al. Microplastics enhance the developmental toxicity of synthetic phenolic antioxidants by disturbing the thyroid function and metabolism in developing zebrafish. **Environment International**, v. 140, p. 105750, 2020.
- ZIMMERMANN, Lisa et al. Benchmarking the in vitro toxicity and chemical composition of plastic consumer products. **Environmental science & technology**, v. 53, n. 19, p. 11467-11477, 2019.
- SÁ, Luís Carlos de; LUÍS, Luís G.; GUILHERMINO, Lúcia. Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions. **Environmental Pollution**, v. 196, p. 359-362, 2015.
- FERREIRA, Pedro et al. Effects of multi-stressors on juveniles of the marine fish *Pomatoschistus microps*: gold nanoparticles, microplastics and temperature. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 89-103, 2016.
- THIBAudeau, Giselle; ALTIG, Ronald. Coloration of anuran tadpoles (Amphibia): development, dynamics, function, and hypotheses. **ISRN Zoology**, v. 2012, 2012.
- FRANCO-BELUSSI, Lilian et al. Idiosyncratic liver pigment alterations of five frog species in response to contrasting land use patterns in the Brazilian Cerrado. **PeerJ**, v. 8, p. e9751, 2020.