

UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE DE
ECOSSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS

GREICILENE REGINA PEDRO

Avaliação do acúmulo de microplásticos em peixes
(*Centropomus undecimalis*) expostos
em laboratório por meio de digestão alcalina e
Espectroscopia de Infravermelho com Transformada
Fourier em Reflectância Total Atenuada – ATR - FTIR

SANTOS

2021

GREICILENE REGINA PEDRO

**Avaliação do acúmulo de microplásticos em peixes
(*Centropomus undecimalis*) expostos
em laboratório por meio de digestão alcalina e
Espectroscopia de Infravermelho com Transformada
Fourier em Reflectância Total Atenuada – ATR - FTIR**

Dissertação apresentada à
Universidade Santa Cecília como parte
dos requisitos para obtenção de título
de mestre no Programa de Pós-
Graduação em Sustentabilidade de
Ecossistemas Costeiros e Marinhos,
sob a orientação do Prof. Dr. Camilo
Dias Seabra Pereira.

SANTOS

2021

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, por qualquer que seja o processo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos.

571.95 Pedro, Greicilene Regina
P413a Avaliação do acúmulo de microplásticos em peixes (Centropomus undecimalis) expostos em laboratório por meio de digestão alcalina e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada Fourier em Reflectância Total Atenuada - ATR - FTIR. Greicilene Regina Pedro. - 2021

68 p.

Orientador: Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, Santos, SP, 2021.

1. Bioacumulação. 2. Microplásticos. 3. Peixes. 4. Digestão alcalina. 5. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada Fourier em Reflectância Total Atenuada - ATR - FTIR. I. Pereira, Camilo Dias Seabra, orient. II. Avaliação do acúmulo de microplásticos em peixes (Centropomus undecimalis) expostos a microplástico em laboratório por meio de digestão alcalina e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada Fourier em Reflectância Total Atenuada - ATR - FTIR.

Elaborada pelo SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas - Unisanta

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP #2017/12193-9) no âmbito do projeto de pesquisa do doutorando Caio Rodrigues Nobre.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira, pela condução segura, paciente e gentil dos estudos e atividades necessários para a realização deste trabalho.

Ao doutorando Caio Rodrigues Nobre, por todo o apoio no desenvolvimento dos trabalhos em laboratório e análises estatísticas dos dados de ATR - FTIR, bem como pela maneira generosa com que compartilhou conhecimentos e dados relacionados à sua pesquisa.

À Profa. Dra. Grazyelle Sebrenski da Silva, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Amazonas (DM-ICB-UFAM) e à mestrandia Maria Tereza Souza, pela parceria que viabilizou parte fundamental do trabalho, tanto para a definição de protocolo de digestão das amostras e realização do experimento quanto para a análise ATR - FTIR.

Ao Laboratório de Síntese e Caracterização de Nanomateriais (LSCN), localizado no Instituto Federal do Amazonas (IFAM), Campus Distrito Industrial, em especial ao Igor A. Pinto, pela análise via ATR - FTIR.

À Profa. Dra. Helen Sadauskas Henrique, que viabilizou a cooperação interinstitucional que tornou possível a realização de parte importante do presente estudo.

Ao Professor Dr. Ronaldo José Torres, do Departamento de Ciências do Mar da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP Campus Baixada Santista, pelo apoio e orientação para as análises dos dados de ATR – FTIR.

À equipe do Laboratório de Ecotoxicologia da Unisanta, em especial aos Professores Doutores Aldo Ramos Santos, Augusto César e Fábio Hermes Pusceddu, pelas valiosas sugestões que certamente aperfeiçoaram o trabalho.

Ao Laboratório de Química da Unisanta, em especial aos colaboradores Kátia e Alex, pela cooperação disponibilizando equipamentos e materiais para a realização da digestão das amostras. Kátia forneceu, ainda, importantes orientações sobre aspectos químicos envolvidos na digestão das amostras.

À Profa. Dra. Ursulla Pereira Souza, coordenadora do Mestrado em

Ecologia/PPG Ecomar e às colaboradoras Sandra Helena Aparecida de Araujo e Imaculada Scorza, da Secretaria de Pós-Graduação *stricto sensu* da Unisanta, por toda atenção e orientações a mim dispensadas ao longo do curso. A partir delas agradeço aos professores e professoras bem como às demais colaboradoras e colaboradores da Unisanta que proporcionaram inúmeras ocasiões de aprendizado durante todo o período de realização do curso.

RESUMO

A contaminação dos oceanos por plásticos em geral, especialmente microplásticos, é uma questão ambiental global emergente e diversos estudos têm sido realizados para a avaliação de fontes, destino e efeitos destes microplásticos no ambiente e na saúde humana. Estas são informações importantes para embasar a construção de políticas públicas e outras ações visando a redução e a gestão dos resíduos plásticos nos oceanos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a bioacumulação de microplásticos em diferentes tecidos de peixes *Centropomus undecimalis* expostos ao polímero de polietileno de baixa densidade em laboratório, via água, durante 3 e 7 dias. Amostras de brânquias, trato gastrointestinal e músculos foram digeridas em solução alcalina de 10 M NaOH e analisadas por meio de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada Fourier em Reflectância Total Atenuada (ATR - FTIR) para detecção de microplásticos. Os resultados obtidos por meio da análise de ATR - FTIR demonstraram a bioacumulação de microplástico nos diferentes órgãos analisados, inclusive em músculos dorsais de organismos expostos por 3 dias. Novos estudos devem ser realizados a fim de determinar o melhor método de digestão para peixes estuarinos, considerando a viabilidade financeira e o tempo necessário para a digestão das amostras, garantindo a redução do material biológico em níveis adequados para a detecção das eventuais partículas de microplásticos presentes bem como visando ampliar a compreensão sobre a bioacumulação de microplásticos – e substâncias associadas – em diferentes organismos e tecidos biológicos e suas implicações, inclusive como um fator de risco para a saúde humana.

Palavras-chave: Bioacumulação. Microplásticos. Peixes. Digestão alcalina. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada Fourier em Reflectância Total Atenuada – ATR - FTIR.

ABSTRACT

Evaluation of microplastic accumulation in fish (*Centropomus undecimalis*) exposed to microplastic in the laboratory by means of alkaline digestion and Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Attenuated Total Reflectance – ATR - FTIR

Contamination of the oceans by microplastics is an emerging global environmental issue and several studies have been carried out to assess the sources, fate and effects of microplastics on the environment and human health, with the objective of supporting the construction of public policies. Actions aimed reducing and managing plastic waste in the oceans. The present study aimed to evaluate the bioaccumulation of microplastics in different tissues of *Centropomus undecimalis* fish exposed in the laboratory, via water, for 3 and 7 days. Samples of gills, digestive system and muscles were digested in 10 M NaOH alkaline solution and analyzed by Infrared Spectroscopy with Fourier Transform in Attenuated Total Reflectance (ATR - FTIR) for detection of microplastics. The results obtained through the analysis of ATR - FTIR demonstrated the bioaccumulation of microplastic in the different organs and tissues analyzed, including in the dorsal muscles of organisms exposed for 3 days. New studies must be carried out in order to determine the best digestion method for estuarine fish, considering the financial feasibility and the time required for the digestion of the samples, ensuring the reduction of biological material to adequate levels for the detection of any microplastic particles present. as well as aiming to broaden the understanding of the bioaccumulation of microplastics – and associated substances – in different biological organisms and tissues and its implications, including as a risk factor for human health.

Keywords: Bioaccumulation. Microplastics. Fishes. Alkaline digestion. Attenuated Total Reflectance – Infrared Transformed by Fourier – ATR - FTIR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Desenho esquemático das principais fases do estudo (exposição, extração e detecção de microplásticos nos organismos - teste)	26
Figura 2.	Aspectos do tanque para aclimação dos organismos - teste ...	27
Figura 3.	Microplásticos utilizados no experimento. A. detalhe das micropartículas e B. imagem via microscopia óptica	27
Figura 4.	Desenho experimental do ensaio de exposição e os 2 tratamentos para os 2 períodos amostrais (Grupos Controle para 3 e 7 dias – CT3 e CT7 e expostos ao microplástico por 3 e 7 dias – MPT3 e MPT7)	28
Figura 5.	Organismos - teste. A. durante exposição e B. após exposição aos microplásticos	29
Figura 6.	Dissecção dos organismos - teste. A. Detalhe e B. Amostra com músculos dorsais, trato gastrointestinal e brânquias (sentido horário)	30
Figura 7.	Secagem das amostras. A. amostras na estufa (40°C). B. Amostras secas	30
Figura 8.	Pesagem das amostras e início da digestão. A. Raspagem dos tecidos pós secagem. B e C. Pesagem e acondicionamento em separado de trato gastrointestinal, músculos e brânquias. D e E. Preparo das amostras para digestão com a adição de NaOH 10 M. F. Digestão das amostras em estufa a 60°C	31
Figura 9.	Amostras pós digestão. A. Amostras de brânquias e trato gastrointestinal. B. Amostras de músculos	32
Figura 10.	Filtragem das amostras digeridas. A. Sistema de filtragem. B. Amostra em processo de filtragem (detalhe)	32
Figura 11.	Amostras digeridas (trato gastrointestinal e brânquias) pós filtragem. A. antes e B. depois da secagem	33
Figura 12.	Acondicionamento das amostras (em “envelopes” de papel alumínio) para posterior análise ATR - FTIR	33
Figura 13.	Microplásticos observados em organismos - teste expostos a MP. A. trato gastrointestinal. B. brânquias	36
Figura 14.	Peso seco (g) das amostras de trato gastrointestinal dos organismos - teste expostos ou não ao microplástico, por 3 e 7 dias	37
Figura 15.	Peso seco (g) das amostras de brânquias dos organismos - teste expostos ou não ao microplástico, por 3 e 7 dias	37
Figura 16.	Peso seco (g) das amostras de músculos dorsais dos organismos - teste expostos ou não ao microplástico, por 3 e 7 dias	38
Figura 17.	Quantidade (ml) média de 10 M NaOH utilizada para digestão das amostras de trato gastrointestinal, brânquias e músculos dorsais dos organismos-teste dos grupos controle e expostos ao microplástico	39
Figura 18.	Espectros padrão do polímero polietileno (com destaque para o padrão obtido na rede mundial de computadores – PE)	44
Figura 19.	Espectros das amostras de “branco” (n=4) e do polietileno (PE).	45

Figura 20.	Espectros de amostras de músculos (M), brânquias (B) e trato gastrointestinal (TD) de organismos dos grupos de controle, não expostos ao microplástico, 3 (CT 3) e 7 (CT 7) dias e do polímero polietileno (PE)	47
Figura 21.	Espectros das amostras de brânquias de organismos do grupo controle (CT 3) e expostos ao microplástico (MPT 3), por 3 dias e o espectro padrão do polímero (PE)	49
Figura 22.	Espectros das amostras de músculos de organismos do grupo controle (CT 7) e expostos ao microplástico (MPT 7), por 7 dias e o espectro padrão do polímero (PE)	51
Figura 23.	Espectros das amostras do trato gastrointestinal de organismos expostos ao microplástico, por 7 dias (MPT 7) e do padrão do polímero (PE)	53
Figura 24.	Presença de microplástico nas amostras de Brânquias dos indivíduos do grupo de controle e expostos a microplástico, por 3 e 7 dias (Média, \pm erro padrão e $p \leq 0,05$). Não houve diferença significativa entre o tratamento testado e o controle em ambos os períodos de exposição (3 e 7 dias)	57
Figura 25.	Presença de microplástico nas amostras do trato gastrointestinal (Sist. Digestivo) dos indivíduos do grupo de controle e expostos a microplástico, por 3 e 7 dias (Média, \pm erro padrão e $p \leq 0,05$). Houve diferença significativa entre o tratamento testado e o controle para o período de 7 dias de exposição ao MP	58
Figura 26.	Presença de microplástico nas amostras de músculos dorsais (Músculo) dos indivíduos do grupo de controle e expostos a microplástico, por 3 e 7 dias (Média, \pm erro padrão e $p \leq 0,05$). Não houve diferença significativa entre o tratamento testado e o controle em ambos os períodos de exposição (3 e 7 dias)	58
Figura 27.	Presença de microplástico nas amostras de Brânquias, trato gastrointestinal (trato digestivo) e Músculos dorsais (Músculos) dos indivíduos do grupo de controle e expostos a microplástico (MP), por 3 dias, com destaque para o resultado em músculos de um dos indivíduos expostos ao MP	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Dados biométricos (Média \pm Desvio padrão) dos indivíduos submetidos aos diferentes tratamentos (Grupos Controle e expostos a microplástico), por 3 e 7 dias.....	29
Tabela 2.	Quantidade de solução alcalina (ml) utilizada para a digestão das amostras de trato gastrointestinal (TGI), Brânquias e Músculos dorsais (Músculo) dos indivíduos submetidos aos diferentes tratamentos (Grupos Controle e expostos a microplástico), por 3 e 7 dias	38
Tabela 3.	Presença de microplástico nas amostras de trato gastrointestinal (TGI), Brânquias e Músculos dorsais dos indivíduos do grupo de controle e expostos a microplástico (MP), por 3 dias	56
Tabela 4.	Presença de microplástico nas amostras de trato gastrointestinal (TGI), Brânquias e Músculos dorsais dos indivíduos do grupo de controle e expostos a microplástico (MP), por 7 dias	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATR - FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada Fourier em reflectância total atenuada
DMSO	Dimetilsulfóxido
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
GEF	<i>Global Environment Facility</i>
GESAMP	<i>Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection</i>
LANAM	Laboratório Nacional de Aquicultura Marinha
MP	Microplástico
MSFD	<i>Marine Strategy Framework Directive</i>
ONU	Organização Mundial das Nações Unidas
PBT	<i>Persistent, Bioaccumulative and Toxic</i>
PE	Polietileno
PEBD	Polietileno de baixa densidade
PET	Polietileno tereftalato
POP	Poluentes orgânicos persistentes
PP	Polipropileno
PVC	Policloreto de vinila
Py - GC/MS	Cromatografia gasosa de pirólise com espectrometria de massas
SEM - EDS	Espectroscopia de raios X por dispersão em energia
TWARP	<i>Transboundary Water Assessment Programme</i>
UNEP	<i>United Nations Environment Programme</i>
UV	Ultra-violeta (raios)
WQC	<i>Water quality criteria</i>
WWF	<i>World Wide Fund for Nature</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	PLÁSTICOS – FONTES, DESTINO E CARACTERIZAÇÃO	13
2.2	MICROPLÁSTICOS	15
2.2.1	Presença e efeitos em organismos e ecossistemas	17
2.2.2	Substâncias associadas aos microplásticos	19
2.2.3	Microplásticos e contaminantes associados na alimentação e saúde humanas	22
2.3	MÉTODOS DE AMOSTRAGEM E ANÁLISE DE MICROPLÁSTICOS	22
2.3.1	Extração e detecção de microplásticos em organismos	24
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	ORGANISMOS - TESTE	26
4.2	MICROPLÁSTICOS	27
4.3	EXPOSIÇÃO DOS ORGANISMOS AO MICROPLÁSTICO	27
4.4	EXTRAÇÃO E DETECÇÃO DE MICROPLÁSTICOS	29
4.4.1	Extração dos microplásticos – Digestão alcalina e filtragem	30
4.4.2	Detecção de microplásticos por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada Fourier em Refletância Total Atenuada – ATR - FTIR (<i>Attenuated Total Reflectance – Infrared Transformed by Fourier</i>)	34
4.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	35
5	RESULTADOS e DISCUSSÃO	35
5.1	DIGESTÃO	37
5.2	ATR - FTIR	42
5.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	57
6	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICES	71

1 INTRODUÇÃO

A contaminação dos oceanos por resíduos sólidos – e plásticos em especial – é uma questão ambiental global emergente como indicado pelo *United Nation Environment Programme* (UNEP), programa ligado à Organização Mundial das Nações Unidas (ONU) (UNEP, 2011).

Estimativas sobre os custos relacionados aos prejuízos causados por resíduos plásticos para o ecossistema marinho chegam a valores de US\$ 13 bilhões/ano, aproximadamente (ONU, 2014).

Criados na primeira década do século XX, a utilização dos plásticos tem aumentado sensivelmente desde o final da Segunda Grande Guerra Mundial (1945) quando estes polímeros começaram a ser empregados em larga escala na produção de itens das mais diferentes áreas. Mais recentemente, na década de 1970, ocorreu novo incremento ao seu uso, tanto pela ampliação das possibilidades para sua utilização em diferentes setores como também pelo crescimento da população mundial neste mesmo período (OLIVATTO *et al.*, 2018).

Em 1950 a produção estimada de plásticos era de 2 milhões de toneladas enquanto, em 2016, o volume produzido já chegava aos 396 milhões de toneladas. Calcula-se que 8,9 bilhões de toneladas de plásticos foram fabricados desde meados do século XX e que, deste total, 6,3 bilhões de toneladas foram descartadas – via incineração, reciclagem, aterros ou diretamente na natureza – sendo que cerca de 2,6 bilhões de toneladas ainda estão em uso (GEYER; JAMBECK; LAW, 2017).

Quanto ao Brasil, levantamento da *World Wide Fund for Nature* (WWF) (2019), baseado em dados do Banco Mundial, indica que o país foi o quarto maior gerador de resíduos plásticos, em 2016, com cerca de 11,3 milhões de toneladas. O estudo aponta que, do total de resíduos plásticos gerados, 91% foi coletado por serviço de limpeza urbana, mas apenas 1,28% deste volume foi encaminhado para reciclagem, número bem abaixo da média mundial, que é de 9%. Ressalta ainda que, além dos problemas relacionados à disposição incorreta, existem outras questões importantes como a relativa dificuldade em reciclar alguns tipos de plásticos – a exemplo dos plásticos termorrígidos, que respondem por 20% do volume total – e a presença de algum tipo de contaminação associada ao material.

Estes resíduos plásticos podem entrar diretamente nos ecossistemas marinhos ou por meio de outros corpos d'água e da própria atmosfera (UNEP, 2019).

Os resíduos plásticos são encontrados nos mares tanto próximos às suas fontes, com destaque para os grandes centros urbanos, quanto em regiões remotas – como regiões polares e abissais marinhas – devido à ação das correntes marinhas que os transportam por todo o planeta com a tendência de se acumular nas zonas de convergência oceânicas (COLE *et al.*, 2011; UNEP, 2019).

A contaminação do ambiente marinho por resíduos plásticos apresenta, portanto, aspecto transnacional, considerando a conexão entre as águas oceânicas, exigindo a construção de estratégias integradas para a pesquisa e gestão sobre o tema (JONES, 2019). Neste sentido o Grupo Conjunto de Especialistas em Aspectos Científicos da Proteção do Meio Ambiente Marinho (GESAMP - *Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection*), órgão consultivo da ONU, criado em 1969 e responsável por identificar questões emergentes relacionadas ao estado do ambiente marinho, estabeleceu grupo de trabalho, em 2012, para avaliação global de fontes, destino e efeitos de microplásticos - partículas plásticas com até 5 mm em sua maior extensão - no ambiente, com o objetivo de embasar a construção de políticas públicas e outras ações para redução e gestão dos resíduos plásticos nos oceanos.

Dentre as principais questões elencadas por este grupo de trabalho está o destino a longo prazo dos microplásticos, incluindo estimativa de distribuição no leito oceânico e na coluna d'água além da captação de partículas e de seus contaminantes pela biota e seus impactos físicos e biológicos na população humana e de aspectos sociais, incluindo educação e conscientização pública (GESAMP, 2019; UNEP, 2019; LUSHER; HOLLMAN; MENDOZA-HILL, 2017).

Ensaio ecotoxicológicos fazem parte deste esforço de avaliação, pois possuem características importantes como a possibilidade de apontar a biodisponibilidade das substâncias estudadas assim como detectar o efeito tóxico resultante das interações entre as diferentes substâncias presentes em determinada amostra (BERTOLETTI, 2008), contribuindo para uma adequada avaliação de risco destas substâncias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLÁSTICOS – FONTES, DESTINO E CARACTERIZAÇÃO

Em 2015, 36% do plástico produzido era utilizado para a fabricação de embalagens, 16% para itens utilizados na construção e 14% para a indústria têxtil (JONES, 2019).

Cerca de 80% do plástico encontrado nos oceanos é proveniente de fontes terrestres e o restante tem origem em atividades humanas realizadas no ambiente marinho (COLE *et al.*, 2011).

As fontes terrestres são oriundas de atividades diversas, relacionadas ao turismo costeiro, agricultura, indústria e aos centros urbanos. Já as fontes no mar incluem navios mercantes e de turismo – por meio do descarte incorreto de lixo e contêineres perdidos –, barcos de recreio, pesca e aquacultura, por meio de redes de pesca e outros petrechos perdidos ou descartados incorretamente, plataformas *offshore* de óleo e gás, dentre outras (COLE *et al.* 2011; UNEP, 2019).

No Brasil, parte importante do lixo que chega ao mar é gerada em áreas ocupadas irregularmente, onde não há serviço de coleta de resíduos, demonstrando a ligação intrínseca do problema à ocupação territorial e às questões socioeconômicas (JONES, 2019).

Os plásticos são formados por grandes cadeias de polímeros originários principalmente de materiais fósseis como petróleo, gás e carvão e podem ser agrupados de diversas formas, de acordo com seu tamanho, origem e composição (COLE *et al.*, 2011).

Quanto à sua composição, existe quase uma centena de diferentes tipos de plástico (JONES, 2019) e, no Brasil, a norma ABNT NBR 13230 (2008) para embalagens e acondicionamento, que adotou critérios internacionais, separa os plásticos em 7 grandes grupos: (i) tereftalato de polietileno (PET), (ii) polietileno de alta densidade (PEAD), (iii) policloreto de vinila (PVC), (iv) polietileno de baixa densidade (PEBD), (v) polipropileno (PP), (vi) poliestireno (PS) e um sétimo grupo formado por plásticos compostos por diferentes materiais.

Desta grande diversidade de plásticos, apenas alguns tipos são produzidos em grande escala, com destaque para o polipropileno – PP, tipo de plástico com maior produção a nível mundial. Já o polietileno de baixa densidade – PEBD, tipo com maior volume descartado (GEYER; JAMBECK; LAW, 2017), é apontado por Harrison, Ojeda e Romero-González (2012) por seu papel dominante entre os detritos plásticos em ambiente marinho.

Algumas substâncias são utilizadas para conferir aos plásticos propriedades

como durabilidade, flexibilidade e resistência aos raios solares ultra-violetas (UV), dentre outras. Esses aditivos são utilizados como plastificantes, antioxidantes, retardadores de chama, estabilizadores de UV, lubrificantes e corantes (LUSHER; HOLLMAN; MENDOZA-HILL, 2017).

Porém, essas características são também parte da causa principal dos problemas relacionados aos resíduos plásticos (COLE *et al.*, 2011) já que aditivos utilizados para regular os mecanismos que resultam na fragmentação e degradação dos plásticos, podem causar uma série de efeitos negativos em organismos vivos (ANDRADY, 2011).

Outra característica importante é a densidade específica dos diferentes tipos de plásticos, que resulta na distribuição das diferentes partículas ao longo da coluna d'água, a partir da superfície até o substrato no fundo do mar (LUSHER; HOLLMAN; MENDOZA-HILL, 2017; UNEP, 2019; ALIMÍ; FADARE; OKOFFO, 2021).

Porém, mesmo plásticos de baixa densidade acabam afundando quando sua superfície é tomada por "biofilme" de microrganismos (COLE *et al.*, 2011; UNEP, 2019).

Quanto ao tamanho, basicamente os plásticos podem ser divididos em dois grandes grupos, sendo que o tamanho limite para esta divisão é de 5mm em sua maior dimensão (UNEP, 2019).

2.2 MICROPLÁSTICOS

O termo microplástico foi introduzido em meados da década de 2000, mais precisamente em 2004, porém sua presença nos oceanos é relatada desde os anos 1970, como indicado por Cole *et al.* (2011).

A definição do tamanho das partículas plásticas consideradas como microplástico levou em conta o tamanho abaixo do qual ocorre a ingestão dessas partículas por muitas espécies da biota (LUSHER; HOLLMAN; MENDOZA-HILL, 2017).

Ambos os estudos citados, que trazem extensa revisão sobre pesquisas relacionadas ao tema, consideram como microplásticos as partículas plásticas com até 5 mm em sua maior extensão.

Os microplásticos podem ser divididos em duas grandes categorias, de acordo com sua origem: primários e secundários (LUSHER; HOLLMAN; MENDOZA-HILL,

2017; UNEP, 2019).

Os primários, a exemplo de *pellets* e microesferas, são produzidos em pequenas dimensões e são utilizados na composição de produtos diversos, como os de cuidados pessoais, a exemplo de cremes dentais e cosméticos, além de outros produtos com características abrasivas. Já os *pellets*, resinas poliméricas definidas como partículas esféricas e cilíndricas com alguns milímetros de diâmetro, têm diversas aplicações industriais, inclusive como componentes de tintas, sprays, abrasivos e estruturas para jateamento (COLE *et al.*, 2011; UNEP, 2019).

Estes plásticos primários estão presentes, também, em fibras têxteis sintéticas, utilizadas na fabricação de itens de vestuário e tapetes, por exemplo.

Já os microplásticos secundários são resultado da desintegração e fragmentação de resíduos plásticos maiores, a exemplo de pneus, roupas e tapetes sintéticos, sacolas e garrafas plásticas, redes de pesca e outros resíduos de materiais plásticos, sendo que essa decomposição varia de acordo com fatores ambientais, especialmente temperatura e incidência de raios UV - ultravioleta (COLE *et al.*, 2011; FREE *et al.*, 2014; UNEP, 2019; JULIENNE; DELORME; LAGARDE, 2019).

Microplásticos têm sido encontrados nos ambientes terrestres, marinhos e no ar (DRIS *et al.*, 2016; AMATO-LOURENÇO *et al.*, 2020). Estão presentes também na água potável – tanto a oriunda das redes de distribuição (KOSUTH *et al.*, 2017), como a do tipo engarrafada (EERKES-MEDRANO; LESLIE; QUINN, 2019), e em diversos itens alimentícios, a exemplo do sal marinho (IÑIGUEZ; CONESA; FULLANA, 2017).

De Orte, Clowez e Caldeira (2019) citam que cerca de 90% do microplástico encontrado nos ecossistemas costeiros são provenientes de microfibras, em grande parte oriundas da lavagem de roupas sintéticas. Browne *et al.* (2011) apontaram que cerca de 1.900 partículas de microplásticos podem ser descartadas durante a lavagem de uma única peça de fibra sintética. Considerando-se que, atualmente, cerca de 60% dos itens de vestuário são produzidos com fibras de plástico, em especial *nylon*, acrílico e poliéster, é possível ter a dimensão do papel potencial deste item específico para a contaminação dos oceanos.

Schwabl *et al.* (2019) detectaram a presença de microplásticos nas fezes de voluntários de diferentes países e, na Itália, estudo detectou sua presença em placentas humanas (RAGUSA *et al.*, 2021).

Inúmeros estudos indicam, também, a presença de microplásticos em efluentes de esgotos e é possível projetar a magnitude dos seus impactos relativos no ambiente

marinho, destino final natural de águas oriundas de corpos d'água terrestres e de efluentes sanitários, tratados ou não (COLE *et al.*, 2011).

A UNEP (2019) indica que, nas últimas quatro décadas, a presença de microplásticos nas águas superficiais oceânicas aumentou significativamente, o que reforça a necessidade do desenvolvimento de pesquisas sobre seus efeitos químicos e físicos no oceano, inclusive como meio de transporte de inúmeras substâncias químicas ao longo de toda a cadeia alimentar.

2.2.1 Presença e efeitos em organismos e ecossistemas

Diversos estudos demonstraram a presença de microplásticos em distintos ambientes aquáticos e associados, enterrados a profundidades de até 2 metros na areia da praia na Baía de Santos (TURRA *et al.*, 2014) e em água doce, desde igarapés em Manaus, Amazonas (SOUZA, 2020), até rios na China (ZHANG *et al.*, 2021).

Os microplásticos também já foram detectados em diversos seres vivos, inclusive marinhos como copépodes da espécie *Temora longicornis*, coletados na porção oeste do Canal da Mancha, Europa (COLE *et al.*, 2014), e mexilhões *Perna perna* (SANTANA, 2015), indicando o seu potencial de alterar ecossistemas e afetar o crescimento, reprodução, desenvolvimento e até mesmo a sobrevivência de diferentes organismos.

Apesar dos microplásticos terem sido encontrados em organismos dos diferentes níveis da cadeia alimentar, eventuais processos de bioacumulação (assimilação e acumulação nos tecidos) ou biomagnificação (acumulação progressiva ao longo dos diferentes níveis tróficos) ainda precisam ser melhor esclarecidos. Também não parece haver uma concentração maior nos organismos de topo de cadeia, em comparação com aqueles nos níveis tróficos de base, ao contrário do que ocorre com outros poluentes (COLE *et al.*, 2011; ANDRADY, 2011).

Estudo desenvolvido em laboratório, com anêmonas-do-mar, demonstrou a ingestão de microplásticos, tanto por meio da alimentação, com camarões contaminados, quanto diretamente do ambiente (DE ORTE; CLOWEZ; CALDEIRA, 2019).

Outro fator importante a ser considerado nos atuais estudos diz respeito ao efeito sinérgico da presença de microplásticos em ambientes onde organismos já se

encontram sob forte estresse por outros fatores, inclusive aqueles causados pelas mudanças climáticas em curso (DE ORTE; CLOWEZ; CALDEIRA, 2019). Uma das consequências para os organismos submetidos a essas condições de estresse é a maior demora para excretar estes microplásticos (JONES, 2019).

Os efeitos físicos de plásticos para os organismos, relacionados tanto ao emaranhamento quanto à sua ingestão, estão bem demonstrados em diversos estudos. Roman *et al.* (2020), por exemplo, estudaram albatrozes das praias na Austrália e Nova Zelândia e concluíram que a ingestão de plástico pode causar de 3,4 a 17,5% das mortes próximas a costa, por meio da obstrução gastrointestinal.

Todavia, para os microplásticos estes efeitos são mais difíceis de serem comprovados. Nobre *et al.* (2015), em ensaio desenvolvido em laboratório, demonstraram que *pellets* virgens (sem uso prévio) tiveram efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento de embriões de ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus*, aumentando o percentual de desenvolvimento embrionário anômalo.

Lusher, Hollman e Mendoza-Hill (2017) afirmam que há significativas lacunas de conhecimento sobre a presença e eventuais efeitos de microplásticos (em especial partículas com menos de 150 μm , capazes de penetrar na corrente sanguínea e atingir órgãos como fígado, rins e cérebro) em ambientes e organismos aquáticos, inclusive em espécies de interesse comercial para o consumo humano. Os mesmos autores afirmam que, em 2017, efeitos adversos da ingestão de microplásticos em organismos aquáticos foram observados apenas em estudos realizados em condições de laboratório, com uma exposição à substância em concentrações muito maiores do que aquelas encontradas no ambiente natural. E que não havia, até aquele momento da revisão, evidências de efeitos negativos causados pela ingestão de microplásticos em organismos aquáticos.

Alguns estudos indicam que os microplásticos podem ser ingeridos por organismos marinhos filtradores, a exemplo de ostras e mexilhões, e induzir a obstrução das paredes intestinais destes indivíduos, bem como causar uma reação no interior dos tecidos. Essas partículas também atuam como um estressor adicional, como no caso do sistema filtrador do interior bucal de baleias *Eubalena glacialis* (UNEP, 2019).

Pontes (2019) analisou os efeitos de microplásticos em caranguejos de água doce da espécie *Dilocarcinus pagei*, capturados em Itacoatiara - Amazonas, e concluiu que a ingestão de microplásticos pode causar efeitos negativos no crescimento de

juvenis, ganho de peso e sobrevivência de adultos da espécie.

Estudo analisando a presença de microplásticos em água doce e peixes selvagens, de água doce, detectou a presença predominante de microplásticos maiores (acima de 0,3mm), do tipo flocos e fibras, em especial compostos por PP, PE e PET (ZHANG *et al.*, 2021).

Barboza *et al.* (2020) identificaram a presença de microplásticos em diferentes tecidos (trato gastrointestinal, músculo dorsal e brânquias) de exemplares de três espécies de peixes, *Dicentrarchus labrax*, *Trachurus trachurus* e *Scomber colias*, capturados em águas do nordeste do Oceano Atlântico Norte (costa noroeste de Portugal) e normalmente destinados ao consumo humano.

Essas partículas plásticas também podem ser captadas por meio da ingestão de presas previamente contaminadas (LUSHER; MCHUGH; THOMPSON, 2013; DE SÁ; LUÍS; GUILHERMINO, 2015; ORY *et al.*, 2018a, b) ou, ainda, através das redes usadas para sua captura (LUSHER; MCHUGH; THOMPSON, 2013).

2.2.2 Substâncias associadas aos microplásticos

Os efeitos químicos causados por microplásticos ingeridos são oriundos de substâncias dos próprios plásticos (aditivos) bem como de outras aderidas a estas partículas plásticas ao longo de sua permanência no ambiente marinho.

O perfil ecotoxicológico destes compostos é bem conhecido, ao contrário da escala com que estes aditivos podem ser transferidos das partículas plásticas para os organismos ou dos impactos causados a estes organismos, considerando as quantidades ingeridas (COLE *et al.*, 2011; UNEP, 2019).

Duas dessas substâncias, utilizadas como componentes na fabricação de plásticos, são o bisfenol A, que é um componente dos policarbonatos utilizados em produtos de vida longa, como eletrônicos e materiais de construção e o ftalato, utilizado para conferir flexibilidade ao PVC. Estes componentes são disruptores endócrinos e podem alterar o funcionamento do sistema hormonal dos indivíduos (COLE *et al.*, 2011).

Estudo desenvolvido em águas potáveis, superficiais e subterrâneas, além de águas residuárias brutas e tratadas do Estado de São Paulo demonstrou que as concentrações de substâncias de interesse emergente nos corpos d'água integrantes da pesquisa estavam no mesmo nível dos esgotos não tratados, indicando que os

tratamentos de esgotos utilizados até o momento não contemplam técnicas eficazes para a remoção deste tipo de contaminante (MONTAGNER *et al.*, 2019). Dentre os 58 compostos-alvo (9 hormônios, 14 produtos farmacêuticos e de higiene pessoal, 8 compostos industriais, 17 pesticidas e 10 drogas ilícitas), os seguintes contaminantes foram destacados como de preocupação prioritária, considerando a frequência de detecção e o número de amostras positivas acima do WQC (*water quality criteria*): cafeína, estrona, 17 β estradiol, 17 α etinil-estradiol, bisfenol A, atrazina, carbendazim, fipronil, malation e imidaclopride. Já a avaliação de risco preliminar para proteção da vida aquática foi identificada para cafeína, paracetamol, diclofenaco, 17 β estradiol, 17 α etinil-estradiol, estriol, estrona, testosterona, triclosan, 4-n-nonilfenol, bisfenol A, atrazina, azoxistrobina, carbendazim, fipronil, imidacloprine, malation e tebuconazol. Porém, considerando os critérios da água potável disponíveis na literatura (apenas para 22 dos compostos), não eram esperados efeitos adversos à saúde humana nas concentrações encontradas pelos autores, exceto para o 17 β estradiol.

O 17 α etinil-estradiol é um composto estrogênico sintético utilizado em pílulas anticoncepcionais. Em 2001, a Comissão Europeia incluiu a substância numa lista de 12 substâncias consideradas prioritárias para avaliação de seu potencial como disruptores endócrinos. Seus metabólitos conjugados são excretados pelas fezes e urina e a introdução de estrógenos no ambiente aquático se dá principalmente por meio dos efluentes de estações de tratamento de águas residuais (OROPESA JIMÉNEZ, 2008).

O triclosan, 2,4,4 - tricloro - 2 - hidroxidifenil éter, é um antimicrobiano sintético de amplo espectro utilizado em inúmeros produtos, a exemplo de sabonetes, detergentes, pasta de dentes e desodorantes. Inúmeros estudos têm demonstrado sua presença em águas residuais domésticas e na superfície marinha, em diferentes locais, além de apontar a preocupação relativa a seus efeitos ecológicos potenciais (DRURY *et al.*, 2013).

Nas águas marinhas existe uma série de substâncias consideradas poluentes, orgânicos e inorgânicos, oriundas de produtos como combustíveis, pesticidas, fármacos, hormônios, produtos de higiene pessoal e outras drogas, denominadas como contaminantes emergentes (GESAMP, 2018). Os microplásticos são reconhecidamente vetores de transporte de substâncias persistentes, bioacumuláveis e tóxicas, como também de patógenos (ALIMI; FADARE; OKOFFO, 2021; GESAMP, 2020).

Os *pellets*, por exemplo, são considerados bons veículos para rastrear esses poluentes em ambientes marinhos, para determinar suas concentrações espaciais e para a compreensão de como eles entram na cadeia alimentar (UNEP, 2019). A *Global Environment Facility* (GEF) e o *Transboundary Water Assessment Programme* (TWARP) avaliam o uso de *pellets* como indicador da presença de poluentes orgânicos persistentes – POPs em águas costeiras, sua distribuição e concentrações, com a produção de séries históricas e mapas de distribuição do lixo flutuante.

Os POPs e compostos persistentes, bioacumuláveis e tóxicos – PBTs, da sigla em inglês *persistent, bioaccumulative and toxic substances*, são abundantes no ambiente e sua capacidade de acumulação nos organismos é conhecida (COLE *et al.*, 2011; ALIMÍ; FADARE; OKOFFO, 2021).

Todavia, a compreensão dos processos de sorção, acumulação, dessorção, liberação e transporte destes produtos químicos associados a microplásticos é um processo complexo, dada a interação conjunta com partículas orgânicas – a exemplo de plâncton, microrganismos e sedimentos – presentes no ambiente marinho (HARTMANN *et al.*, 2017).

Estas substâncias químicas podem aderir aos microplásticos devido à alta razão entre área superficial e volume dos mesmos, o que confere a estas partículas um alto potencial tanto para lixiviação quanto para captação dessas substâncias (VELZEBOER; KWADIJK; KOELMANS, 2014).

A taxa e direção de transferência dos PBTs dependem do ambiente químico no intestino dos organismos, assim como do nível de presença destes compostos no tecido (UNEP, 2019).

Metais tóxicos e algumas espécies de microrganismos, a exemplo de bactérias do gênero *Vibrio*, também estão presentes em ambientes marinhos e têm potencial para associação com os microplásticos (LUSHER; HOLLMAN; MENDOZA-HILL, 2017). A *International Whaling Commission* conduziu investigação sobre a interação de resíduos marinhos e cetáceos. Os microplásticos foram reconhecidos como tendo potenciais impactos em baleias, inclusive pela sua ingestão associada a poluentes químicos e microrganismos (UNEP, 2019).

Harrison, Ojeda e Romero-González (2012) ressaltaram, também, o papel dos microplásticos como veículos de poluentes orgânicos e outros aditivos contaminantes através da cadeia alimentar, com enfoque para a sua presença em sedimentos costeiros.

Estudo avaliando os efeitos da interação entre os microplásticos e o triclosan em ostras da espécie *Crassostrea brasiliiana* demonstrou os efeitos combinados de microplásticos associados com triclosan na fisiologia e bioquímica desses organismos, assim como na estabilidade de suas membranas lisossômicas (NOBRE *et al.*, 2020).

Dessa forma, microplásticos possuem um potencial de contaminação adicional aos organismos o que potencializa a preocupação acerca de sua presença ao longo da cadeia alimentar.

2.2.3 Microplásticos e contaminantes associados na alimentação e saúde humanas

Considerando a presença de inúmeras espécies de organismos marinhos na alimentação humana, a contaminação destes indivíduos por microplásticos, e substâncias de interesse emergente associadas, tem merecido atenção de inúmeros pesquisadores que têm desenvolvido estudos buscando compreender os efeitos da presença destes microplásticos e de eventuais substâncias associadas na saúde humana.

O GESAMP (2020) apresentou os primeiros passos sobre a questão ambiental e riscos à saúde humana associados ao lixo plástico e microplástico no meio marinho, abordando o atual estado-da-arte sobre a compreensão dos riscos e vias de exposição e apontando iniciativas existentes ou planejadas relacionadas ao assunto. O documento indica que a ingestão de partículas de microplástico pela biota pode acarretar potenciais efeitos para a segurança e saúde de ecossistemas e seres humanos. No entanto, ressalta que, embora haja a transferência ao longo da cadeia alimentar como demonstrado por Farrell e Nelson (2013), não há evidências de bioacumulação e biomagnificação de partículas, até o momento (SANTANA; MOREIRA; TURRA, 2017).

Como indicado anteriormente, os peixes são um dos grupos que certamente ingerem microplásticos, e contaminantes associados a estes, e, por consequência, poderão servir de veículo para a ingestão destas partículas por seres humanos.

2.3 MÉTODOS DE AMOSTRAGEM E ANÁLISE DE MICROPLÁSTICOS

Até o momento atual os procedimentos relativos aos métodos de amostragem e análise de microplásticos, em diferentes tipos de amostras, carecem de maior padronização (COLE *et al.*, 2014; BARCELO, 2020). O GESAMP (2020) também ressalta a importância e necessidade de aperfeiçoar os métodos de medição de microplásticos (nanoplásticos, inclusive) com o objetivo de padronizá-los e harmonizá-los, estabelecendo um acordo regulatório internacional.

Lusher, Hollman e Mendoza-Hill (2017) enfatizam a importância dos experimentos de exposição em laboratório para o estudo dos microplásticos. Porém, ressaltam que muitas vezes as condições de exposição (número de partículas / massa / concentração) excedem o observado no campo e que, por isso, os resultados obtidos nesses experimentos devem ser tratados com cuidado. Esses autores destacam, ainda, aspectos que podem influenciar decisivamente os resultados: duração da exposição, que é frequentemente aguda; tamanho das amostras, frequentemente pequenas e compostas de indivíduos de um mesmo tamanho ou história de vida e formato dos microplásticos utilizados (geralmente de forma esférica), enquanto que a maioria dos microplásticos encontrados no meio ambiente são constituídos por fibras e fragmentos. Desta forma indicam a necessidade de criar cenários de exposição que possam reproduzir melhor as condições ambientais.

Os mesmos autores citam revisão realizada pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA), em 2016, sobre os métodos analíticos para detecção de microplásticos em alimentos, que incluem as seguintes etapas: extração e degradação de matéria biogênica; detecção e quantificação visual (enumeração); confirmação e/ou caracterização da identidade plástica das partículas. Segundo os autores, a entidade ressalta que deverão ser observados fatores cruciais, a exemplo de precauções para evitar a contaminação de amostras com microplásticos de ar, roupas, equipamentos e/ou reagentes usados na análise, e confirmação de que as partículas detectadas são de fato microplásticos.

Barletta, Costa e Dantas (2020) apresentaram protocolos padrões, desenvolvidos para amostragem, extração, contagem e classificação de microplásticos e outros poluentes ingeridos por peixes e enfatizaram a importância estratégica da padronização de desenhos amostrais e análises laboratoriais para a comparação entre resultados obtidos em diferentes experimentos.

Primpke *et al.* (2020) destacam que a análise de microplásticos em amostras ambientais é um campo emergente de pesquisa, sendo realizada por meio de

métodos variados e instrumentos baseados em espectroscopia ou métodos termoanalíticos. Destacam ainda que as tendências de composição dos polímeros derivados podem variar, de acordo com os limites de detecção do respectivo método e instrumental utilizado. Finalmente, os autores indicam a necessidade de harmonização de resultados intermetodológicos.

2.3.1 Extração e detecção de microplásticos em organismos

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para detectar microplásticos ingeridos por diferentes organismos. Lusher, Hollman e Mendoza-Hill (2017), em extensa revisão sobre o assunto, indicam que os métodos de extração incluem dissecação, depuração, homogeneização e digestão de tecidos, com produtos químicos ou enzimas e que esses tecidos geralmente são dissecados e avaliados visualmente ao microscópio. Os autores ressaltam que os estudos se concentraram principalmente no trato digestivo (estômago e intestino) dos organismos observados ou, quando a pesquisa se refere aos riscos do consumo humano, em tecidos comestíveis, como músculos da cauda de camarão (DEVRIESE *et al.*, 2015).

Lusher, Hollman e Mendoza-Hill (2017) relatam que os plásticos podem ser submetidos a análises por meio de diferentes técnicas, como as vibracionais não destrutivas, a exemplo da Espectrometria de Infravermelho com Transformada Fourier (FTIR) em transmitância ou reflectância, micro FTIR e Reflectância Total Atenuada (ATR) e Espectrometria Raman; e técnicas destrutivas, como Pirólise-Cromatografia Gasosa combinada com Espectroscopia de Massa (Py – GC/MS), Cromatografia de Permeação em Gel de Alta Temperatura (HT - GPC) com IR detecção, Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (SEM - EDS) e termoextração, dessorção juntamente com GC / MS e varredura automatizada acoplada à microespectrometria. As espectroscopias Raman e FTIR são as técnicas preferidas, pois não são destrutivas e podem ser utilizadas, inclusive, como técnicas complementares. Essas duas técnicas apresentam também uma probabilidade menor de contaminação cruzada entre amostras orgânicas (TORRES, 2007).

Peixes do gênero *Centropomus* vem sendo empregados em estudos de monitoramento ambiental, sendo utilizados como modelo biológico para avaliações histológicas, genéticas, citológicas, hematológicas e bioenergéticas (KIRSCHBAUM *et al.*, 2009; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2008; BRENTANO; MARTINS; PAZ, 2010;

CANTANHÊDE *et al.*, 2014, 2016).

O desenvolvimento de estudos laboratoriais visando avaliar a bioacumulação de microplásticos em peixes por meio da utilização de digestão alcalina e detecção por ATR - FTIR pode ampliar a compreensão dos processos de bioacumulação em diferentes tecidos biológicos e suas implicações, inclusive como um fator de risco para a saúde humana, bem como contribuir para a padronização da metodologia utilizada nesses estudos.

3 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar a bioacumulação de microplásticos por meio de digestão alcalina do material biológico, com a utilização de 10 M NaOH e detecção por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada Fourier em Reflectância Total Atenuada – ATR - FTIR empregando peixes da espécie *Centropomus undecimalis* expostos de forma aguda a partículas microplásticas, em condições laboratoriais.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do estudo foram:

(i) avaliar a bioacumulação de microplásticos nas brânquias, trato gastrointestinal e músculos dorsais dos organismos expostos ao polímero de polietileno de baixa densidade por 3 e 7 dias;

(ii) utilizar método de digestão alcalina (10M NaOH) de amostras para tecidos de peixes marinhos/estuarinos,

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo deriva do projeto “Avaliação do risco ambiental da interação de microplástico, fármaco e antimicrobiano: uma abordagem ecotoxicológica” (Processo FAPESP – 2017/12193-9), que conta com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP (CEUA n.

8111041217), bem como aprovação do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO (Processo n. 60314-1).

Para a realização das análises da presença de microplásticos nos organismos - teste o estudo foi dividido em 3 fases: 1 – exposição; 2 – extração e 3 – detecção, conforme apresentado na Figura 1.

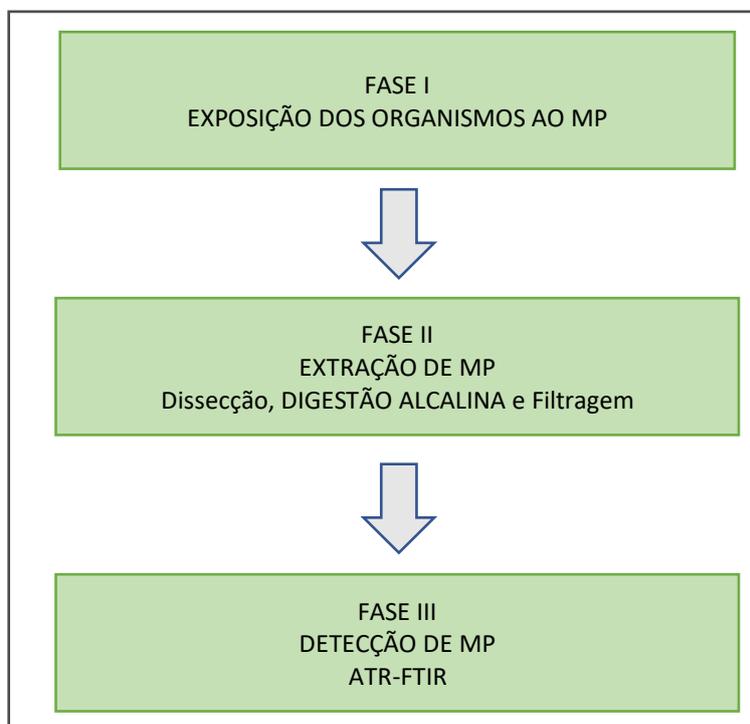


Figura 1. Desenho esquemático das principais fases do estudo (exposição, extração e detecção de microplásticos – MP – nos organismos - teste).

Fonte: Elaborado pela autora.

4.1 ORGANISMOS – TESTE

Peixes do gênero *Centropomus* vem sendo empregados em estudos de monitoramento ambiental, sendo utilizados como modelo biológico para avaliações histológicas, genéticas, citológicas, hematológicas e bioenergéticas (KIRSCHBAUM *et al.*, 2009; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2008; BRENTANO; MARTINS; PAZ, 2010; CANTANHÊDE *et al.*, 2014, 2016).

Indivíduos juvenis de *Centropomus undecimalis*, com aproximadamente 15 cm, foram adquiridos do Laboratório Nacional de Aquicultura Marinha (LANAM) da Universidade Estadual Paulista – *campus* Registro, sendo transportados em tanque com aeração até o laboratório de ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília, onde foram aclimatados por 15 dias em tanque marinho de 500L com condições controladas de aeração, sistema de filtração e controle de parâmetros físico-químicos (Figura 2).

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração formulada para peixes carnívoros, com 40% de proteína e 4 mm de espessura, fornecida pelo LANAM.

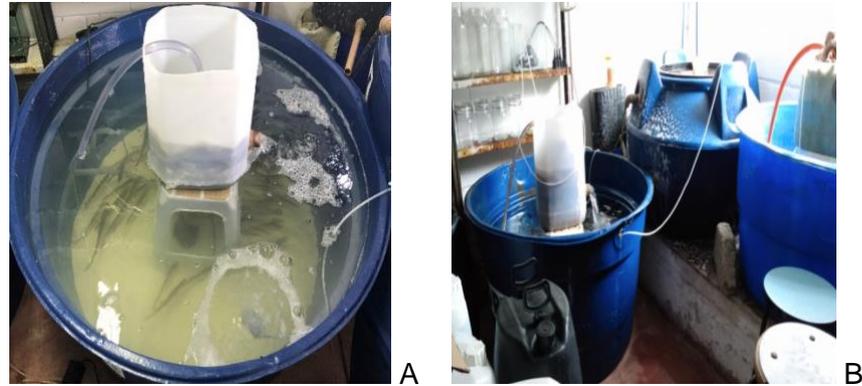


Figura 2. Aspectos do tanque para aclimação dos organismos - teste. Fonte: Caio R. Nobre (A). Elaborado pela autora (B).

4.2 MICROPLÁSTICOS

Para a realização do experimento foram utilizadas partículas de polietileno de baixa densidade, de tamanho variável (entre 150 e 250 μm), cedidas pela empresa Braskem (Figura 3).

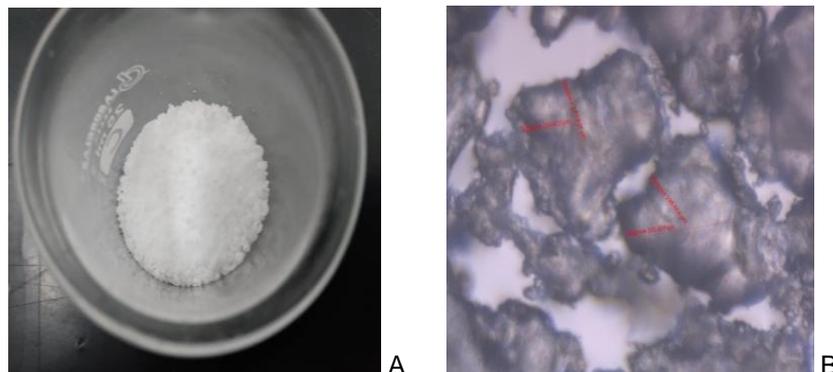


Figura 3. Microplásticos utilizados no experimento. A. detalhe das micropartículas e B. imagem via microscopia óptica (aumento 40x). Fonte: Elaborado pela autora (A) e Leticia F. da Silva (B).

4.3 EXPOSIÇÃO DOS ORGANISMOS AO MICROPLÁSTICO

Após o período de aclimação os organismos foram subdivididos de acordo com os diferentes tratamentos e períodos amostrais (Grupos Controle, por 3 e 7 dias

e expostos ao microplástico, por 3 e 7 dias), sendo alimentados diariamente com a mesma ração, fornecida pelo LANAM, para que a falta de alimento não interferisse durante o período de ensaio (Figura 4) por meio de eventuais efeitos causados por desnutrição.

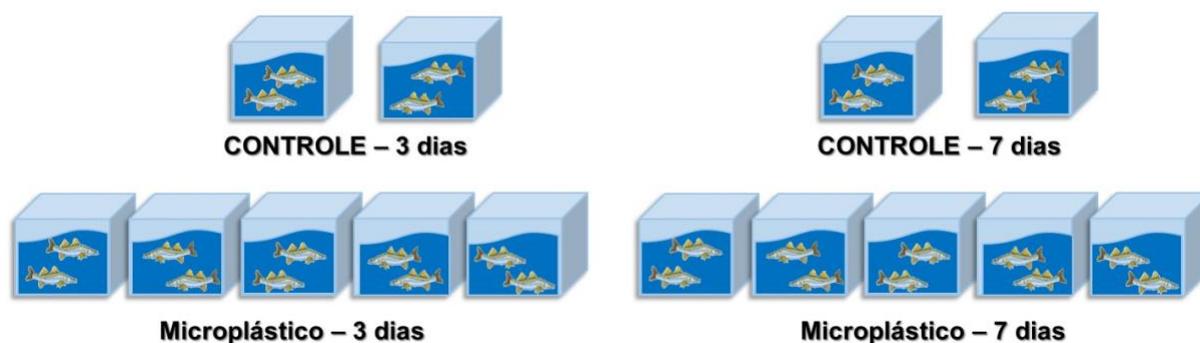


Figura 4. Desenho experimental do ensaio de exposição e os 2 tratamentos para os 2 períodos amostrais (Grupos Controle para 3 e 7 dias – CT3 e CT7 e expostos ao microplástico por 3 e 7 dias – MPT3 e MPT7).

Fonte: Adaptado de Caio R. Nobre.

Durante essa fase de exposição os organismos foram dispostos aos pares em aquários de 50L, com aeração e água marinha de salinidade 30 ppt (Figura 5 A). Foram utilizados 40L de água marinha e 0,5 ml/L de dimetilsulfóxido – DMSO para os grupos controle e, para os grupos expostos ao microplástico, foram adicionados 250 mg de MP/L, durante o período de 3 e 7 dias. Vale destacar que o DMSO foi utilizado como um controle no âmbito do experimento para avaliação do risco ambiental da interação de microplástico, fármaco e antimicrobiano envolvendo substâncias com baixa solubilidade.

Durante a exposição não foi realizada substituição da água marinha pois ensaio preliminar demonstrou que os organismos suportariam ambos os períodos de exposição sem a necessidade de substituição da água. Tampouco foram adicionadas quantidades suplementares de microplásticos uma vez que a dosagem inicial já pode ser considerada alta.

Após a exposição os organismos (Grupos Controle por 3 dias - CT3, n = 3; Controle por 7 dias - CT7, n = 2; grupos expostos ao microplástico por 3 dias - MP T3, n = 10 e expostos ao microplástico por 7 dias - MP T7, n = 9) foram anestesiados em uma solução de *Benzocaína* (ethyl-p-aminobenzoato) 0,1% diluída em água marinha, por 10 minutos. Os organismos foram mantidos sob refrigeração (-20°C) para

posteriormente ser realizada a dissecação (Figura 5 B).

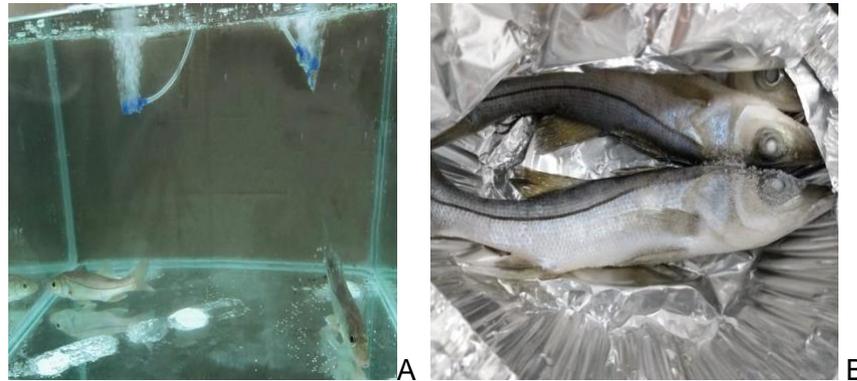


Figura 5. Organismos - teste A. durante exposição e B. após exposição aos microplásticos.
Fonte: Caio R. Nobre (A) e elaborado pela autora (B).

Os dados biométricos dos organismos - teste podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Dados biométricos (Média \pm Desvio padrão) dos indivíduos submetidos aos diferentes tratamentos (Grupos Controle e expostos a microplástico), por 3 e 7 dias.

	3 Dias		7 Dias	
	Comprimento (cm)	Peso (g)	Comprimento (cm)	Peso (g)
Controle	16,12 \pm 1,68	40,23 \pm 9,27	15,73 \pm 1,46	34,04 \pm 7,45
Microplástico	16,96 \pm 1,09	44,68 \pm 6,03	15,68 \pm 0,10	33,89 \pm 3,70

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 EXTRAÇÃO E DETECÇÃO DE MICROPLÁSTICOS

Para a extração/digestão e detecção de microplásticos nos organismos expostos aos diferentes tratamentos foi utilizado o protocolo proposto por Cole *et al.* (2014), com pequenas adaptações descritas oportunamente. Este protocolo se mostrou eficaz na digestão de tecidos e posterior detecção de microplásticos em peixes de água doce da espécie *Colossoma macropomum*.

Preliminarmente os organismos oriundos dos diferentes tratamentos, expostos ou não aos microplásticos, por 3 ou 7 dias (Grupos Controle T3, n = 3; Controle T7, n = 2; MP T3, n = 10 e MP T7, n = 9), mantidos sob refrigeração (-20°C), foram descongelados e dissecados para a separação das brânquias, do trato gastrointestinal e músculos dorsais (Figura 6), perfazendo um total de 72 amostras.

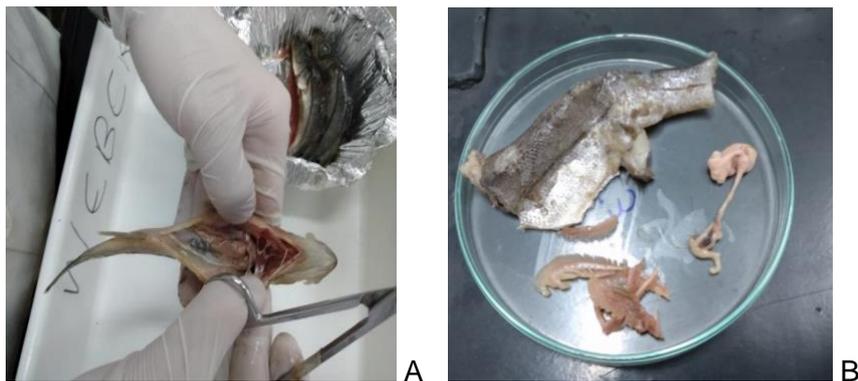


Figura 6. Dissecção dos organismos - teste. A. Detalhe e B. Amostras de músculos dorsais, trato gastrointestinal e brânquias (sentido horário).
Fonte: Elaborado pela autora.

Na sequência as amostras (n = 72) foram submetidas a secagem em estufa (FANEM modelos 315 SE) a 40°C por aproximadamente 18 horas (Figura 7) e posteriormente pesadas (em balança DIGIMED modelo KN 5000C).

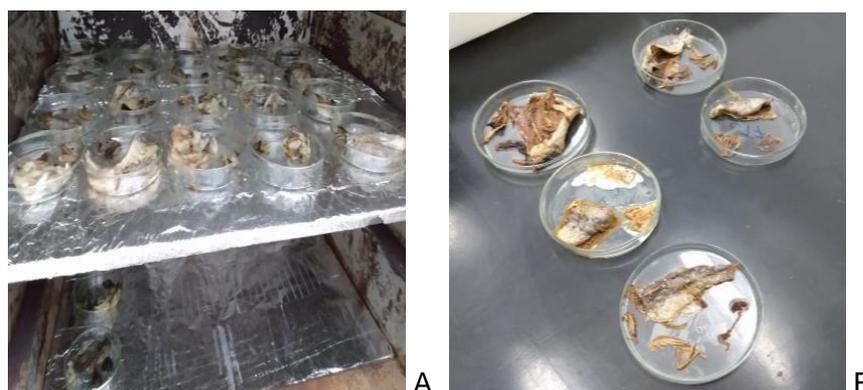


Figura 7. Secagem das amostras. A. amostras na estufa (40°C). B. Amostras secas.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.1 Extração dos microplásticos – Digestão alcalina e filtragem

Para a extração dos microplásticos foi adotado o protocolo de Cole *et al.* (2014), que verificaram uma eficácia na digestão otimizada de 91,3%, adicionando 10 M de NaOH aos órgãos e tecidos secos, com agitação por cerca de 40s, para facilitar a remoção de todo o material biológico.

Brânquias, trato gastrointestinal e os músculos dorsais dos organismos dos diferentes tratamentos e períodos amostrais foram digeridos sob a ação de 40 ml de 10 M NaOH por 0,2g de tecido seco, mantidos durante 24 h a 60°C em estufa (FANEM modelos 315 SE e Orion 515) em frascos de vidro com tampas de vidro (Figura 8). A utilização de papel alumínio para a vedação dos frascos de vidro não é recomendada,

pois no processo de digestão e aquecimento em estufa, o NaOH evapora e o papel alumínio, em decorrência do contato com a solução, reage e acaba por contaminar a amostra (COLE *et al.*, 2014).

Os recipientes e respectivas tampas, de vidro, utilizados para a digestão, foram previamente lavados com detergente específico (EXTRAN) e enxaguados com água comum (5x) e água destilada (3x) a fim de reduzir a possibilidade de contaminação prévia. Quatro outros desses recipientes foram utilizados como “brancos”, contendo apenas a solução de 10 M NaOH, com o objetivo de identificar eventuais contaminações (COLE *et al.*, 2014).



Figura 8. Pesagem das amostras e início da digestão. A. Raspagem dos tecidos pós secagem. B e C. Pesagem e acondicionamento em separado de trato gastrointestinal, músculos e brânquias. D e E. Preparo das amostras para digestão com a adição de 10 M NaOH. F. Digestão das amostras em estufa a 60°C.

Fonte: Elaborado pela autora.

Após 24 h de digestão em estufa as amostras foram organizadas para o processo de filtração (Figura 9).

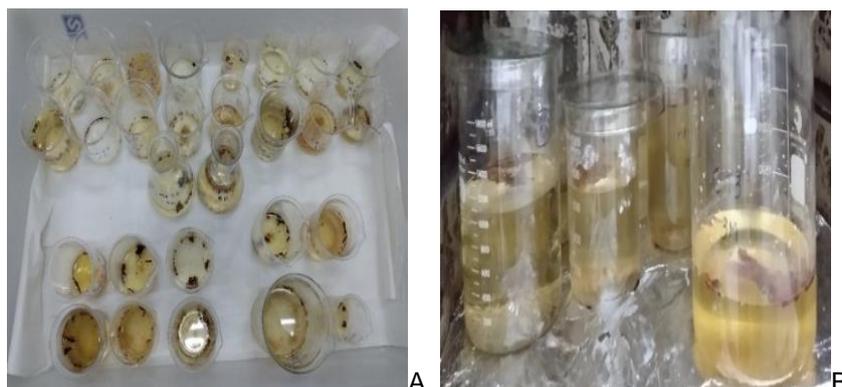


Figura 9. Amostras pós digestão. A. Amostras de brânquias e trato gastrointestinal. B. Amostras de músculos.

Fonte: Elaborado pela autora.

As amostras pós-digestão foram filtradas por uma malha de aço inoxidável com porosidade de 30 μ m cortada em pequenos filtros de 5-6 cm para facilitar o manuseio no processo de filtração realizado com a utilização de bomba a vácuo (PRISMATEC) (Figura 10). Esses pequenos filtros foram previamente pesados em balança analítica (DHAUS) e, após a filtragem, pesados novamente, agora contendo as amostras retidas.

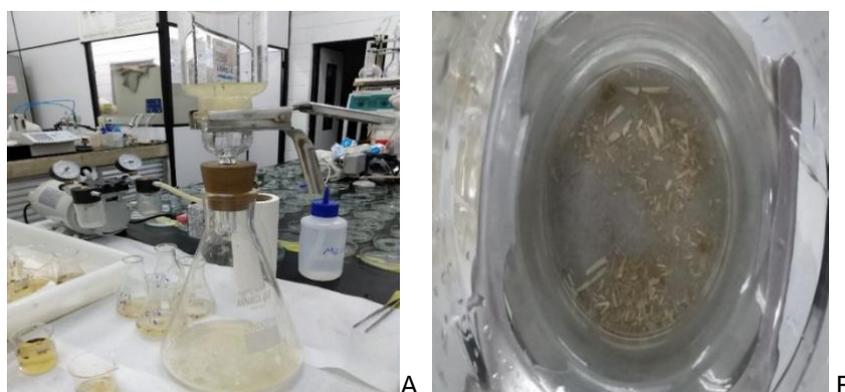


Figura 10. Filtragem das amostras digeridas. A. Sistema de filtragem. B. Amostra em processo de filtragem (detalhe).

Fonte: Elaborado pela autora.

Para parte das amostras dos músculos dorsais e de brânquias foram realizadas adaptações ao protocolo inicial visando otimizar o processo de filtragem após o processo de digestão devido à presença de quantidade importante de material biológico e de solução alcalina. Para tanto foram utilizados, na filtragem, filtros de fibra de vidro (Merck Millipore Ltd.), também recomendados para filtrações dessa natureza (BESSA *et al.*, 2019), de maneira

isolada ou em conjunto com o filtro de aço inoxidável. As amostras permaneceram na solução de 10 M NaOH, em temperatura ambiente, até o momento da filtração.

Ao final do processo de filtração, os filtros contendo as amostras foram lavados com cerca de 100ml de água Milli-Q e, na sequência, permaneceram por cerca de 1 hora secando em estufa (60 °C) com nova pesagem em seguida (Figura 11).

Vale ressaltar que a temperatura de fusão do PEBD, polímero das partículas utilizadas no presente estudo, varia entre 110 a 115 °C (COUTINHO; MELLO; DE SANTA MARIA, 2003).

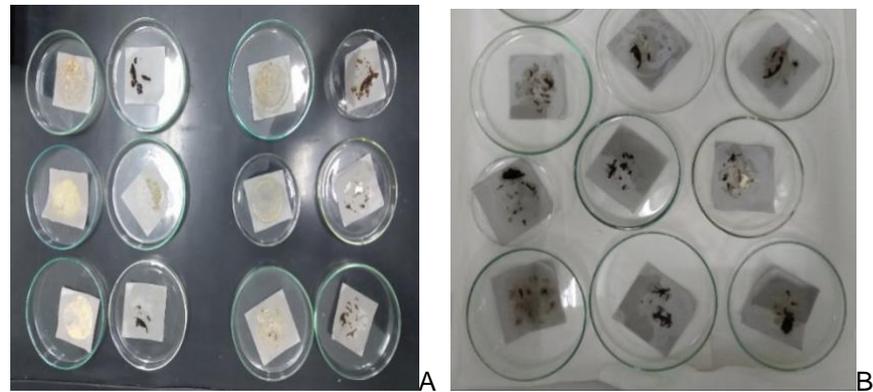


Figura 11. Amostras digeridas (trato gastrointestinal e brânquias) pós filtração. A. antes da secagem e B. depois da secagem.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os filtros secos com o material retido foram armazenados em “envelopes” de papel alumínio (Figura 12), para posteriores observações em estereomicroscópio (ZEISS) e subsequente qualificação em ATR - FTIR.

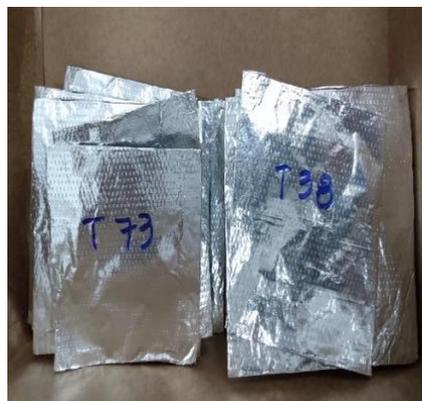


Figura 12. Acondicionamento das amostras (em “envelopes” de papel alumínio) para posterior análise ATR - FTIR.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os filtros de malha de aço e / ou de fibra de vidro utilizados apresentavam porosidade menor do que o microplástico do experimento. O “branco” também foi filtrado e submetido às etapas de preparação para análise ATR - FTIR, tendo permanecido em estufa por até 8 horas.

4.4.2 Detecção de microplásticos por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada Fourier em Reflectância Total Atenuada – ATR - FTIR (*Attenuated Total Reflectance – Infrared Transformed by Fourier*)

As amostras filtradas – resultado da digestão e filtragem das brânquias, do trato gastrointestinal e músculos dorsais dos organismos expostos aos diferentes tratamentos – foram submetidas à detecção do polímero por meio da Espectroscopia de Infravermelho com Transformada Fourier em Reflectância Total Atenuada (ATR - FTIR).

Os espectros foram obtidos por meio de um espectroscópio no infravermelho médio (Agilent) Modelo Cary 630 FTIR de absorção, na faixa espectral de 4.000-650 cm^{-1} , com resolução de 8 cm^{-1} , disponibilizado pelo Laboratório de Síntese e Caracterização de Nanomateriais (LSCN), localizado no Instituto Federal do Amazonas (IFAM), Campus Distrito Industrial, Manaus, Amazonas. Os dados padrão foram obtidos das bibliotecas *Agilent (Polymer Handheld ATR Library, Elastomer Oring and Seal Handheld ATR Library)* e *ATR Demo Library*.

O diamante cristal do ATR foi limpo com solução 70% de álcool isopropílico e uma leitura de fundo foi realizada antes da leitura de cada amostra. As amostras foram comprimidas pelo diamante para garantir uma boa superfície de contato entre elas e o ATR cristal.

As bandas de absorção, identificadas usando a altura dos picos nas amostras com similaridade de no mínimo 80%, também foram comparadas com as bandas de cada polímero reportado na literatura. Ao interpretar a saída de FTIR, somente as leituras com níveis de confiança maiores que 50% (LUSHER; MCHUGH; THOMPSON, 2013) foram aceitas. Apenas esses dados foram incluídos para a análise do teste de FTIR para confirmar a presença de microplástico encontrado durante a observação das amostras de brânquias, do trato gastrointestinal e dos músculos dorsais dos organismos dos diferentes tratamentos e períodos amostrais.

A técnica visa confirmar, portanto, a presença dos polímeros constituintes das

partículas plásticas utilizadas no experimento de exposição, em conjunto com um banco de dados de referência (COLE *et al.*, 2014).

Ao final, os espectros das amostras foram gerados a partir do pacote *Simple Baseline* no *software* de espectroscopia ótica *Spectragryph* (MENGES, 2020), a partir dos dados da ATR-FTIR.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados a fim de identificar os tratamentos (organismos expostos ao microplástico) que apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle (organismos não expostos ao microplástico), para amostras do trato gastrointestinal, brânquias e músculos dos indivíduos, em ambos os períodos amostrais, 3 e 7 dias.

Os dados obtidos tiveram os *outliers* removidos por meio de teste de *Grubbs*. Em seguida foram analisados quanto à normalidade e homocedasticidade através dos métodos de *Shapiro-Wilk* e teste de *Bartlett*, respectivamente. Na sequência foi realizada uma análise de variância (*Two - way ANOVA*) com teste *a posteriori* de *Bonferroni*, a fim de identificar se os tratamentos apresentaram diferença estatística significativa com o controle e em relação ao tempo de exposição por meio do programa Prism v.7a. Todas as análises empregaram a significância de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Preliminarmente, foi possível observar visualmente a presença de microplásticos em parte dos indivíduos expostos ao microplástico, tanto no trato gastrointestinal quanto em brânquias (Figura 13).

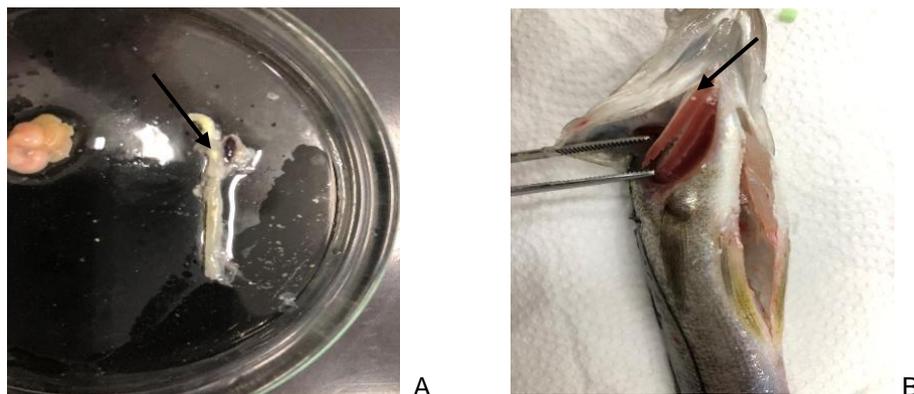


Figura 13. Microplásticos observados em organismos - teste expostos a MP. A. trato gastrointestinal. B. brânquias.

Fonte: Caio F. Nobre.

Barboza *et al.* (2020) salientam que os microplásticos podem ser captados por peixes diretamente da água do mar, de forma passiva (através da passagem da água pelas brânquias, por exemplo) e ativamente, quando ingeridos no lugar ou junto com os itens comuns de sua alimentação. A presença de microplástico nas brânquias e no trato gastrointestinal dos organismos-teste expostos ao microplástico pode ser explicada, portanto, por estes mecanismos de contato e ingestão das partículas.

O hábito alimentar da espécie utilizada como organismo-teste, *Centropomus undecimalis*, a partir da ingestão indiscriminada de elementos presentes nas águas, pode potencializar a ingestão de contaminantes, a exemplo de microplásticos. Tonini, Braga e Nova (2007) enfatizam que os peixes carnívoros, como os robalos, em sua maioria são classificados como predadores visuais, pois usam a visão como principal sentido para localização de presas. Estes indivíduos possuem uma forma característica de ingestão de alimento e, quando a presa está próxima à boca, o peixe levanta a cabeça, abaixa a mandíbula e abre os opérculos, aumentando a capacidade da cavidade bucal. Este aumento repentino da cavidade bucal provoca uma rápida entrada de água, promovendo a sucção da presa (BALDISSEROTTO, 2020) e permitindo que o peixe ingira acidentalmente outros componentes, além da presa (RICKLEFS, 1998).

O método utilizado para exposição de peixes estuarinos a microplástico em laboratório se mostrou eficiente uma vez que as condições experimentais garantiram a sobrevivência dos organismos e a exposição (com a observação de partículas plásticas visualizadas diretamente e por meio da análise dos resultados de ATR - FTIR) em diferentes tempos de exposição (3 e 7 dias).

5.1 DIGESTÃO

A quantidade de material biológico (em peso seco) presente nas amostras variou, em ordem crescente, entre menos de 0,1g até 6,0g para trato gastrointestinal, brânquias e músculos dorsais (Figuras 14, 15 e 16 e Tabela do Apêndice A).

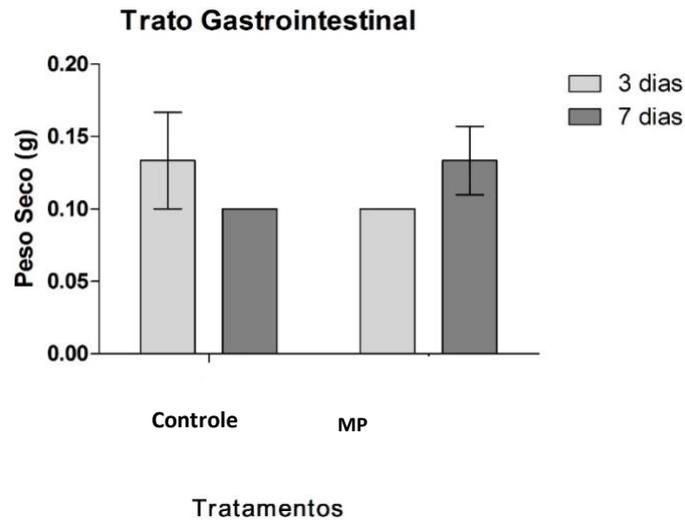


Figura 14. Peso seco (g) das amostras de trato gastrointestinal dos organismos - teste expostos ou não ao microplástico, por 3 e 7 dias.
Fonte: Elaborado pela autora.

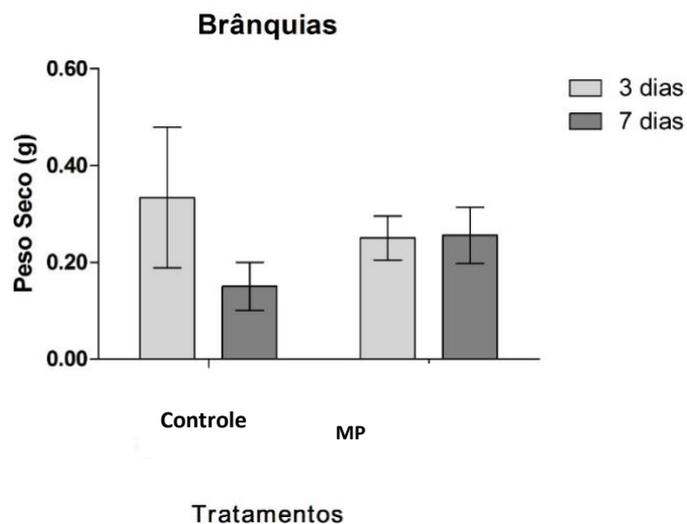


Figura 15. Peso seco (g) das amostras de brânquias dos organismos - teste expostos ou não ao microplástico, por 3 e 7 dias.
Fonte: Elaborado pela autora.

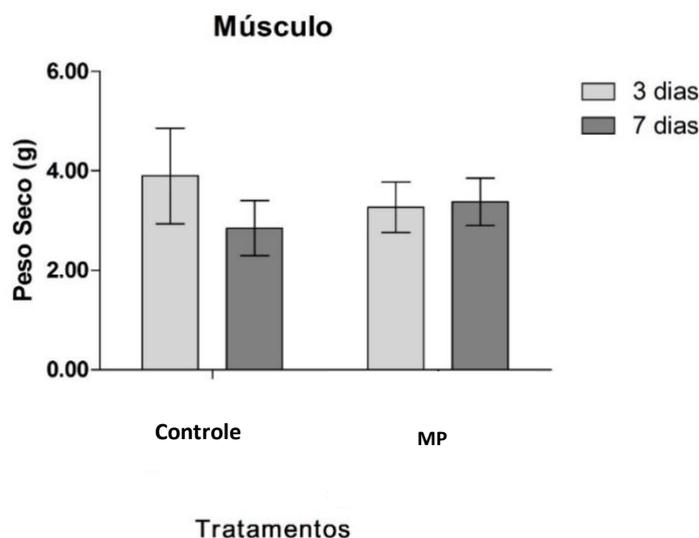


Figura 16. Peso seco (g) das amostras de músculos dorsais dos organismos - teste expostos ou não ao microplástico, por 3 e 7 dias.

Fonte: Elaborado pela autora.

A quantidade de material biológico das amostras acarretou a utilização de quantidade variável da solução de 10 M NaOH, de 40ml até 1,2L, para a sua digestão (Tabela 2) já que o protocolo utilizado indica a utilização de 40ml da solução alcalina a cada 0,2g de peso seco da amostra.

Tabela 2. Quantidade de solução alcalina (ml) utilizada para a digestão das amostras de trato gastrointestinal (TGI), Brânquias e Músculos dorsais (Músculo) dos indivíduos submetidos aos diferentes tratamentos (Grupos Controle e expostos a microplástico), por 3 e 7 dias.

	Volume de Solução de NaOH 10M (ml)		
	Média	Mínimo	Máximo
TGI	40.83	40.00	60.00
Brânquias	58.33	40.00	120.00
Músculo	670.83	160.00	1200.00

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao final do processo foi possível observar a digestão parcial do material biológico, com a presença de material recalcitrante, em especial nas amostras de brânquias e músculos dorsais.

O resultado pode ser explicado pela composição desses tecidos e órgãos, mais densos em comparação com o material do trato gastrointestinal, tanto em amostras de brânquias (Figura 10B), com a presença de ossos, cartilagens e tecido mucoso (LIMA, *et al.*, 2009), quanto em amostras de músculos dorsais, cuja pele com

tecido fibroso foi mantida ao final do processo de digestão (Figura 9B). No caso dos músculos dorsais as amostras também eram comparativamente mais volumosas que as demais (Figuras 14 a 16).

Porém, o protocolo de digestão alcalina otimizado com 10M NaOH a 60°C proposto por Cole *et al.* (2014), em estudo para detecção de microplástico em zooplâncton marinho, se mostrou suficiente para a obtenção das amostras finais submetidas à análise de ATR - FTIR bem como para detecção de microplástico, como demonstram os resultados de ATR - FTIR apresentados a seguir.

No entanto, vale ressaltar que não foi avaliada no presente estudo uma eventual degradação do polímero, mesmo que parcial, durante o processo de digestão como indicado por Pfeiffer e Fischer (2020) que apontaram para a possibilidade de alto percentual de degradação de PET com a utilização de altas concentrações de NaOH e temperaturas.

O tempo necessário para a filtragem do material, após a digestão, também foi consideravelmente variável, sendo maior para as amostras de músculos dorsais e brânquias. A maior quantidade de solução de 10M NaOH utilizada no processo de digestão (Figura 17) bem como a presença de importante material recalcitrante dessas amostras podem explicar essa variação.

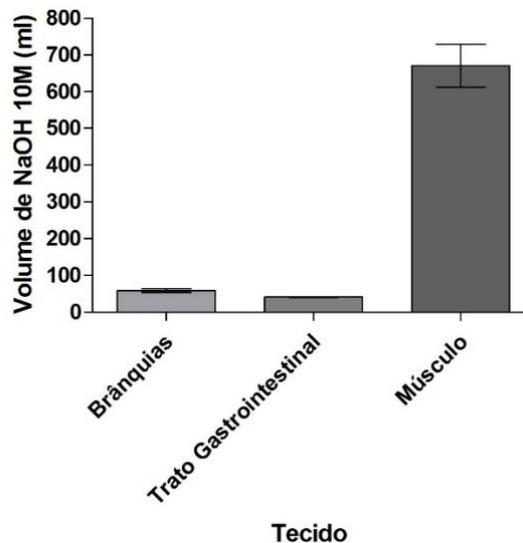


Figura 17. Quantidade (ml) média de 10 M NaOH utilizada para digestão das amostras de trato gastrointestinal, brânquias e músculos dorsais dos organismos-teste dos grupos controle e expostos ao microplástico.

Fonte: Elaborado pela autora.

Desta forma, o protocolo utilizado pode ser considerado como alternativa para a digestão de tecidos e órgãos de peixes estuarinos, devendo ser avaliado em

comparação com outros protocolos utilizados, considerando os custos envolvidos, período de tempo para realização dos experimentos e a possibilidade de detecção do polímero.

Barcelo (2020) destaca que os métodos para esta análise requerem que se garanta ao máximo possível a redução da presença de partículas naturais e a preservação da integridade das partículas de polímeros sintéticos alvo.

Cole *et al.* (2014) discorrem sobre as dificuldades de isolar microplásticos oriundos de ambientes marinhos produtivos e ressaltam a necessidade de desenvolvimento de protocolos para a detecção e separação dessas partículas plásticas na presença de material biológico em quantidades significativas.

Lusher, Hollman e Mendoza-Hill (2017) indicam que os métodos de extração de microplásticos incluem a digestão de tecidos com produtos químicos ou enzimas. Os autores destacam que microplásticos presentes em tecidos dissecados podem ser isolados usando soluções salinas, flutuação de densidade, inspeção visual ou digestão e que a enumeração de microplásticos presentes na biota ou tecidos excisados pode ser um desafio, por conta do material biológico presente (biofilmes microbianos, algas e detritos), que podem mascarar a presença das partículas de plástico. Por isso, ressaltam que, para isolar microplásticos, a matéria orgânica deve ser digerida, restando os materiais recalcitrantes.

Os protocolos de digestão citados pelos autores incluem ácidos (a exemplo de ácido nítrico, ácido fórmico e ácido clorídrico), álcalis (como o hidróxido de potássio), agentes oxidantes (peróxido de hidrogênio, por exemplo) e enzimas (Proteinase K) (LUSHER *et al.*, 2017b). Ressaltam ainda que, até o momento do estudo, o uso de hidróxido de potássio (KOH) parecia ser a estratégia mais adequada (DEHAUT *et al.*, 2016; KÜHN *et al.*, 2016; LUSHER *et al.*, 2017b).

Lusher *et al.* (2017b) indicam como protocolos otimizados para digerir tecidos de peixes para isolar microplásticos a utilização de tratamento com KOH (10%) associado à exposição por 14-21 dias (FOEKEMA *et al.*, 2013; LUSHER *et al.*, 2017b) e tratamento com KOH (10%) em temperatura de 60°C por 12 horas (ROCHMAN *et al.*, 2015).

Zhang *et al.* (2021), em estudo sobre MP em peixes de água doce selvagens (em trato gastrointestinal e brânquias), utilizaram 200 ml de H₂O₂ 30% a 65°C por 24-72 horas para a digestão do material.

Cole *et al.* (2014) relatam que, em experimento para detecção de microplásticos

em zooplâncton marinho, utilizando diferentes metodologias para digestão das amostras, o protocolo de digestão alcalina otimizado, com 10M NaOH a 60°C, apresentou eficácia de digestão de 91,3%. Ressaltam ainda que, com a utilização desse protocolo, ocorreu fusão de fragmentos de polietileno presente nas amostras, porém garantindo a sua observação. O estudo demonstrou também que o tratamento com proteinase-K apresentou os melhores resultados (com 97% das amostras digeridas).

Em estudos para a detecção de partículas plásticas em mexilhões, Cole *et al.* (2014) citam a utilização de ácido nítrico para a digestão dos tecidos, ressaltando, porém, que o método é destrutivo para alguns tipos de polímeros, sensíveis ao pH ácido.

Lusher, Hollman e Mendoza-Hill (2017) ressaltam que os agentes químicos podem ser filtrados com o objetivo de reter quaisquer materiais recalcitrantes (a exemplo de tecido não digerido, resíduo inorgânico e microplásticos). Os autores informam que as partículas de microplásticos em filtros podem ser visualizadas diretamente, transferidas para lâminas ou extraídas e que a separação por densidade também pode ser usada, embora essa técnica seja mais comum em amostras de sedimentos e água.

Ressaltam também que a técnica de separação por densidade, recomendada pela *Marine Strategy Framework Directive* (MSFD), também pode ser utilizada após a digestão e que soluções salinas como o cloreto de sódio (NaCl aq) permitem a separação de partículas onde há grandes quantidades de material (a exemplo de areia, além de quitina e ossos) que não foi dissolvido anteriormente. Finalmente, destacam que o NaCl é recomendado por seu baixo custo e segurança, mas ressaltam que seu uso pode levar a uma subestimação de partículas mais densas (densidades maiores que $1,2 \text{ g cm}^{-3}$).

Bessa *et al.* (2019) ressaltam que o H_2O_2 15% é recomendado para a digestão de diferentes tecidos, porém consumindo tempo relativamente grande no processo. Já o método enzimático, apontado como extremamente eficiente (COLE *et al.*, 2014) para a digestão, apresenta custos comparativamente maiores, sendo mais apropriado, portanto, para amostras pequenas (BESSA *et al.*, 2019).

O KOH 10%, também recomendado para a separação de microplástico (LUSHER *et al.*, 2017b), deve ter sua utilização avaliada levando-se em consideração as restrições para sua aplicação no caso de amostras de tecidos adiposos (BESSA *et*

al., 2019).

Bessa *et al.* (2019) também apontam que os protocolos citados garantem que os polímeros não serão degradados – parcial ou totalmente – durante o processo de digestão, ao contrário daqueles que utilizam HCl e H₂O₂ 30%. Todavia, há estudos recentes que utilizaram o H₂O₂ 30% a 65°C, por 24-72 horas, para a digestão de peixes de água doce avaliados quanto à presença de microplástico (ZHANG *et al.*, 2021).

5.2 ATR - FTIR

As amostras finais (obtidas após o processo de digestão, filtração e secagem) foram submetidas à Espectroscopia no Infravermelho com reflectância total atenuada – ATR - FTIR, após uma observação microscópica preliminar.

A espectroscopia de infravermelho é considerada o método mais confiável para identificar a composição de microplásticos (CINCINELLI *et al.*, 2017) e a técnica, baseada no princípio de absorção da radiação do infravermelho, fornece evidências dos grupos funcionais e da estrutura do composto em análise.

Souza (2020) identificou a presença de micro e nanoplásticos encontrados em ambiente de água doce, a partir da observação de diferentes picos de espectros obtidos pela análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada Fourier - FTIR.

Na Espectroscopia no Infravermelho com reflectância total atenuada, um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal de ATR) para um meio menos denso (amostra) ocorrendo uma reflexão em sua superfície interna. Ao final, a intensidade da radiação de penetração apresenta uma atenuação, expressa em uma banda no espectro, sendo aplicada para a análise de amostras em estado sólido, a exemplo de pastas, adesivos ou pó (RODRIGUES e GALZERANI, 2012; OLIVATTO *et al.*, 2018).

Os espectros resultantes da análise ATR - FTIR das amostras dos diferentes tratamentos (organismos expostos ou não ao microplástico, para amostras do trato gastrointestinal, brânquias e músculos dos indivíduos, em ambos os períodos amostrais, 3 e 7 dias), bem como dos “brancos” (amostras contendo apenas a solução de 10M NaOH), foram comparados com o espectro padrão de polietileno obtido em banco de dados da rede mundial de computadores (Figura 18).

Já a Figura 19 apresenta os espectros obtidos para os “brancos” em comparação com os espectros padrão do polietileno.

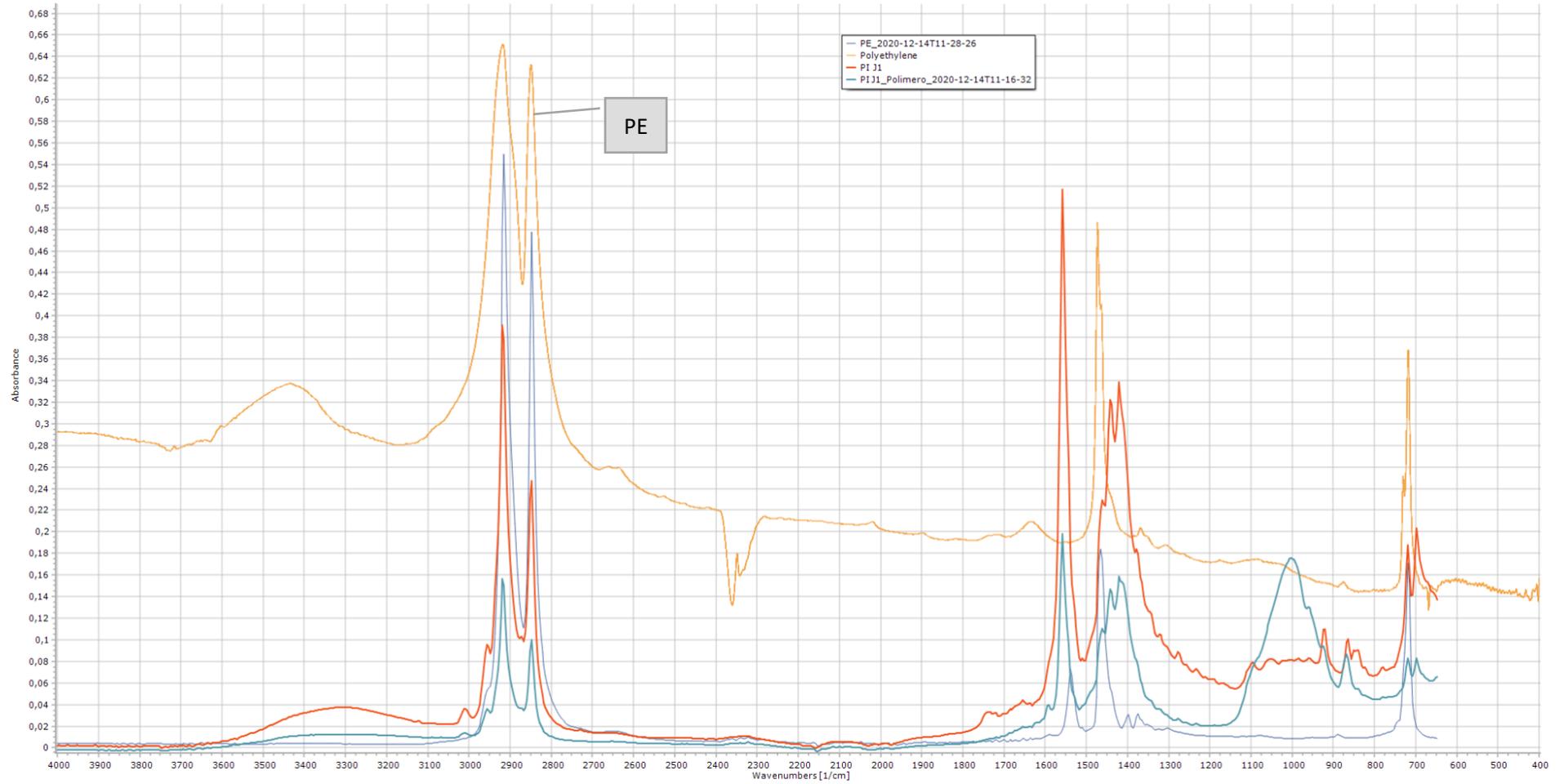


Figura 18. Espectros padrão do polímero polietileno (com destaque para o padrão obtido na rede mundial de computadores – PE).
Fonte: Elaborado por Ronaldo José T

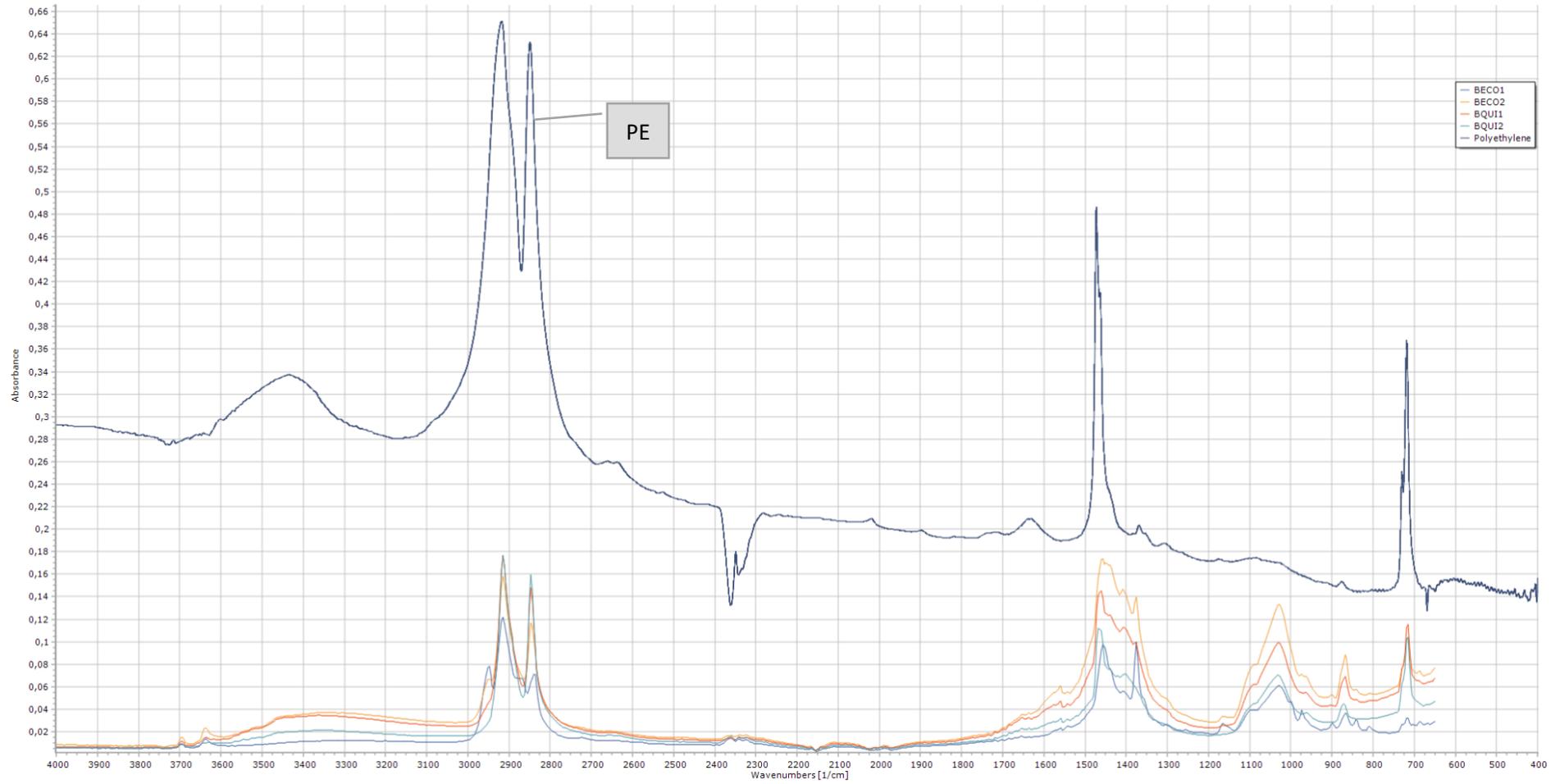


Figura 19. Espectros das amostras de “branco” (n=4) e do polietileno (PE).

Fonte: Elaborado por Ronaldo José Torres.

Os resultados apontam para a presença de polietileno nessas amostras contendo apenas a solução alcalina (NaOH 10M), sendo possível observar os picos característicos do polímero, porém em intensidades menores do que aqueles presentes nos espectros padrão do polietileno.

Um dos fatores que determina a intensidade dos picos dos espectros é a concentração do polímero presente nas amostras. Em amostras puras a intensidade encontrada estará em seu máximo. Já em amostras com diferentes substâncias essa intensidade dos picos será diferente, em virtude da presença de diferentes moléculas e concentrações diversas do mesmo componente.

O polietileno observado nas amostras de “brancos” pode ser originário de diferentes fontes, a exemplo do frasco utilizado para comercialização do NaOH e do recipiente utilizado para o preparo da solução usada para a digestão das amostras, dentre outras possíveis fontes de contaminação. A questão da contaminação por microplásticos foi abordada em revisão sobre os métodos analíticos para detecção de microplásticos em alimentos, realizada em 2016 pela EFSA, que ressalta a possibilidade de contaminação de amostras com microplásticos de ar, roupas, equipamentos e/ou reagentes usados na análise (LUSHER, HOLLMAN e MENDOZA-HILL, 2017).

A Figura 20 apresenta os espectros obtidos para as amostras de brânquias, trato gastrointestinal e músculos dorsais dos grupos controle, não expostos ao microplástico, por 3 e 7 dias, em comparação com o espectro padrão do polietileno.

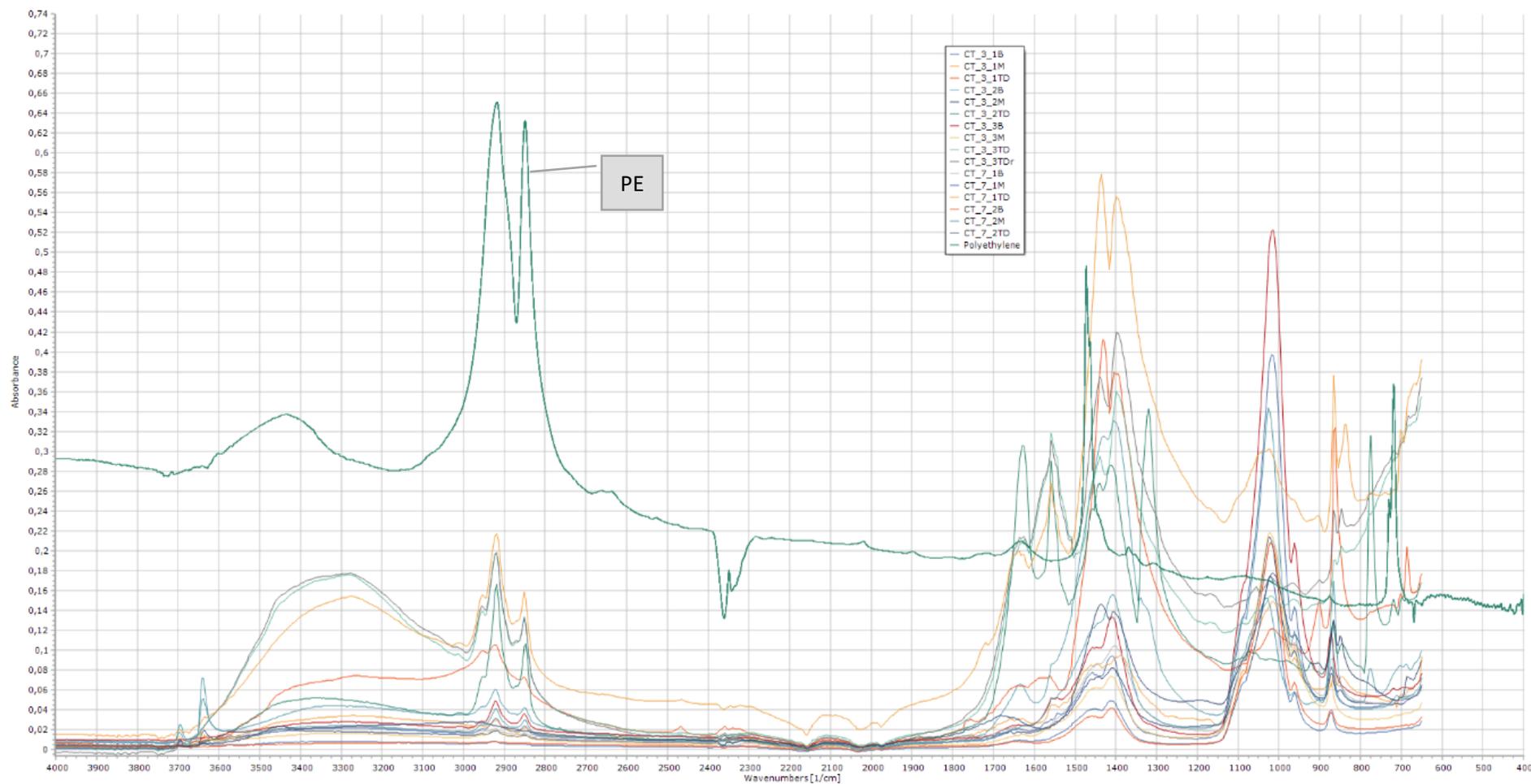


Figura 20. Espectros de amostras de músculos (M), brânquias (B) e trato gastrointestinal (TD) de organismos dos grupos de controle, não expostos ao microplástico, 3 (CT 3) e 7 (CT 7) dias e do polímero polietileno (PE).

Fonte: Elaborado por Ronaldo José Torres.

Os resultados das análises ATR - FTIR para os organismos dos grupos controle demonstram que foram observados os sinais característicos do espectro do polietileno para as amostras de brânquias, trato gastrointestinal e músculos dorsais, porém em intensidades menores em comparação ao espectro padrão do polímero.

Como já discutido no caso dos “brancos” a presença do polímero pode ter diferentes origens. Além daquelas destacadas para a solução utilizada na digestão do material biológico vale ressaltar, por exemplo, que os peixes utilizados como organismos-teste foram capturados, no LANAM, com a utilização de redes de polietileno, uma outra possível fonte de contaminação prévia.

A seguir são apresentados os espectros obtidos para as amostras de brânquias, trato gastrointestinal e músculos dorsais dos organismos expostos ao microplástico, por 3 e 7 dias.

A Figura 21 apresenta comparação entre os espectros das amostras de brânquias de organismos do grupo controle e expostos a microplástico por 3 dias e do padrão para o polietileno.

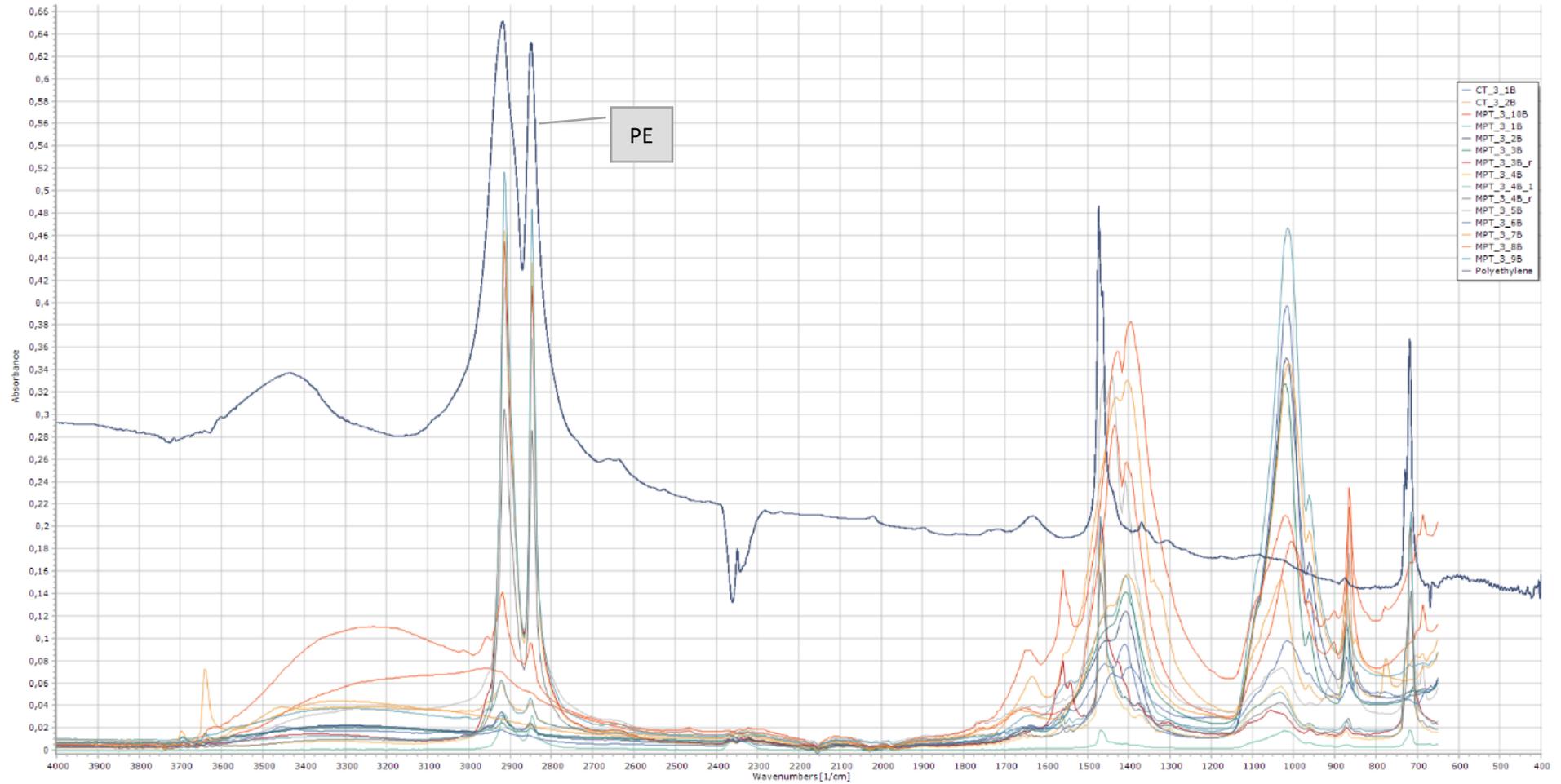


Figura 21. Espectros das amostras de brânquias de organismos do grupo controle (CT 3) e expostos ao microplástico (MPT 3), por 3 dias e o espectro padrão do polímero (PE).

Fonte: Elaborado por Ronaldo José Torres

Os picos característicos do polímero foram identificados, em intensidades variáveis, nas diferentes amostras de brânquias dos organismos expostos a microplástico, por 3 dias. Algumas destas amostras apresentaram, inclusive, picos bastante próximos, em intensidade, ao espectro padrão do polietileno, apontando para uma alta concentração do polímero nestas réplicas.

A Figura 22 apresenta a comparação dos espectros das amostras dos músculos dorsais de organismos do grupo controle e expostos a microplástico, por 7 dias e do padrão para o polietileno.

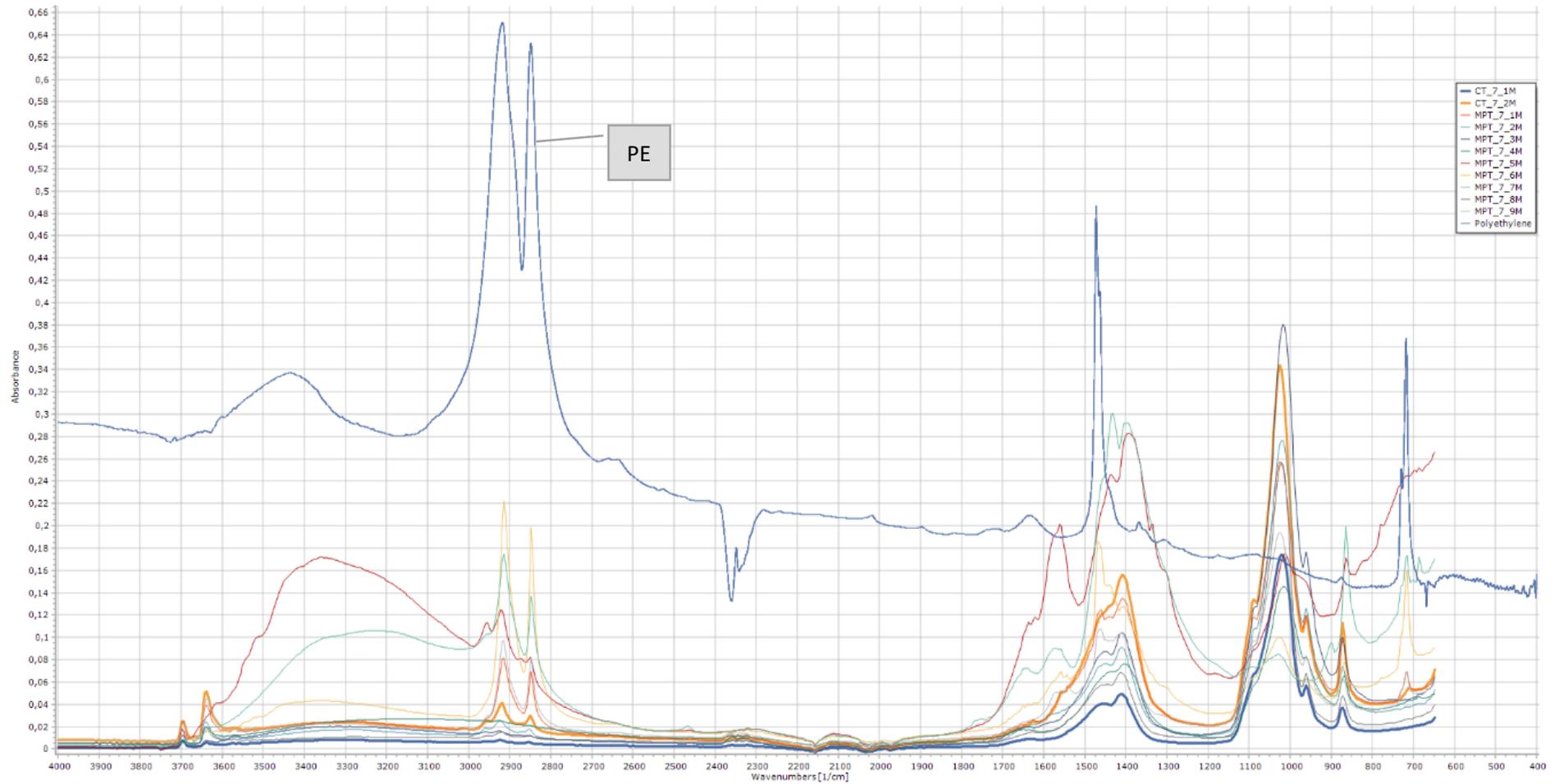


Figura 22. Espectros das amostras de músculos de organismos do grupo controle (CT 7) e expostos ao microplástico (MPT 7), por 7 dias e o espectro padrão do polímero (PE).

Fonte: Elaborado por Ronaldo José Torres.

Os resultados demonstram que, apesar de menos intensos em comparação com aqueles presentes nas amostras de brânquias, os picos característicos do polímero também foram observados nas amostras de músculos, em especial dos organismos expostos ao microplástico.

Os espectros das amostras do trato gastrointestinal de organismos expostos a microplástico, por 7 dias, em comparação com o espectro padrão do polietileno, podem ser observados na Figura 23.

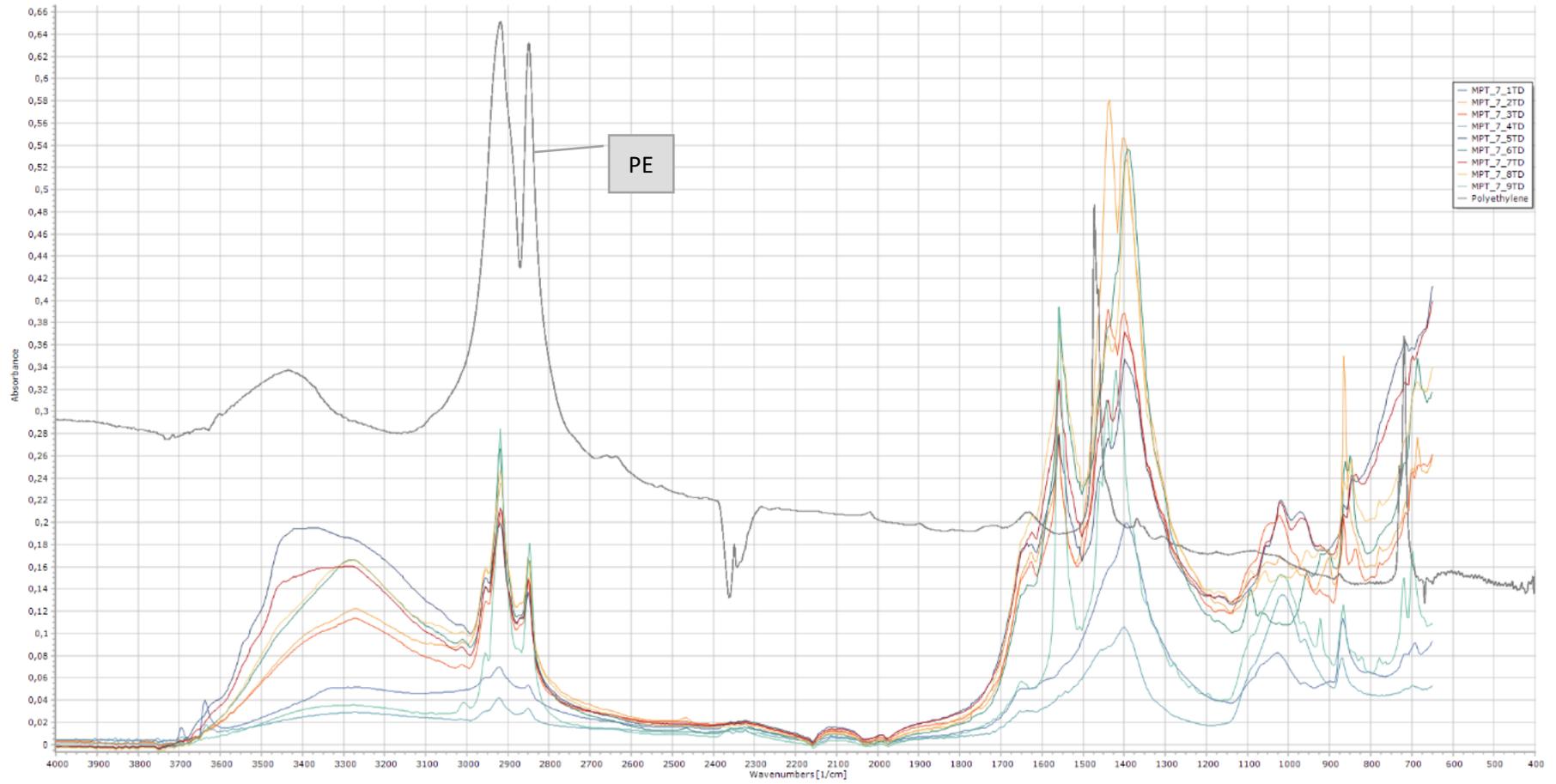


Figura 23. Espectros das amostras do trato gastrointestinal de organismos expostos ao microplástico, por 7 dias (MPT 7) e do padrão do polímero (PE).

Fonte: Elaborado por Ronaldo José Torres.

Novamente foi possível observar nos espectros destas amostras os picos característicos do polietileno, em intensidade variáveis.

É possível observar, portanto, por meio da análise dos resultados de ATR - FTIR obtidos, a presença de polietileno – polímero que compõe o microplástico utilizado no experimento de exposição – em brânquias, trato gastrointestinal e músculos, em ordem decrescente de intensidade, tanto nos organismos - teste expostos a 3 quanto a 7 dias (Figuras 21 a 23 e Apêndices B a D).

Os resultados coincidem com Barboza *et al.* (2020), que identificaram a presença de microplásticos em diferentes tecidos – trato gastrointestinal, músculo dorsal e brânquias – de exemplares de três espécies de peixes – *Dicentrarchus labrax*, *Trachurus trachurus* e *Scomber colias* – capturados em águas do nordeste do Oceano Atlântico Norte (costa noroeste de Portugal).

A técnica ATR – FTIR, aliada à análise preliminar via microscopia, foi capaz de identificar a presença do polietileno e do microplástico nas diferentes amostras. A ATR – FTIR apresenta uma série de vantagens – como sua adequação para a detecção do tipo de partícula utilizada no experimento além de não se tratar de técnica destrutiva – devendo sua utilização ser considerada de acordo com os objetivos e características dos estudos.

Lusher, Hollman e Mendoza-Hill (2017) informam que a espectroscopia Raman é capaz de alcançar uma melhor resolução (até 1 μm) do que a FTIR (10 μm), como demonstrado por Lenz *et al.* (2015), mas ressaltam que a identificação de fibras depende principalmente da técnica FTIR, já que as análises utilizando Raman não se mostraram eficientes até agora para este tipo de microplástico, de acordo com Dris (2017). Cole *et al.* (2014) alertam que a utilização do Raman pode ser prejudicada pela presença de pigmentos de algas no material analisado e, por isso, relatam a utilização da técnica FTIR.

Já a varredura automatizada acoplada à microespectrometria pode fornecer um método robusto para análise de grandes amostras ambientais sem ter que confiar na identificação visual, metodologia dependente do operador e não eficiente para partículas microplásticas menores que 50 μm , conforme Frère *et al.* (2016), podendo ser utilizada em complemento ao Raman (PONTES, 2019).

Primpke *et al.* (2020) compararam os resultados de análises de microplásticos obtidos por meio da cromatografia gasosa de pirólise com espectrometria de massas (Py - GC/MS) e FTIR. Os autores ressaltam que ambas as abordagens geram um

conjunto de dados diferentes, relacionados à massa ou ao número de partículas presentes nas amostras e destacam que o FTIR detecta ampla gama de materiais identificando, inclusive, partículas muito pequenas presentes também em pequeno número.

Souza (2020), por exemplo, identificou a presença de micro e nanoplásticos encontrados em ambiente de água doce, a partir da observação de diferentes picos de espectros obtidos pela análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada Fourier - FTIR.

Harrison, Ojeda e Romero-González (2012), em estudo para detecção de microplásticos em sedimentos com a comparação de dois métodos de Espectrometria de Infravermelho com Transformada Fourier em reflectância (micro FTIR e reflectância total atenuada – ATR - FTIR), demonstraram que ambos os métodos podem ser utilizados de maneira complementar, já que cada um deles permitiu a distinção de certos aspectos dos microplásticos de maneira mais eficiente. Os autores ressaltam, ainda, a possibilidade de que os espectros obtidos sejam influenciados por contaminantes associados às partículas plásticas e/ou materiais orgânicos naturalmente presentes em ecossistemas marinhos.

Na presente análise de ATR - FTIR os sinais de outras substâncias também foram observados nos espectros obtidos. A presença de material orgânico, não totalmente digerido no processo de digestão, ocasionou a geração de sinais característicos. Esta característica dos espectros gerados pelas amostras dos diferentes tratamentos pode dificultar a sobreposição exata com a do padrão de polietileno.

Os picos das amostras nem sempre aparecem estreitos como os do polietileno. Para aperfeiçoar o método de análise das amostras os técnicos responsáveis pela leitura dos resultados de ATR - FTIR indicam ser recomendável realizar a lavagem – com posterior secagem - e limpeza do material a ser submetido à leitura, após análise via microscopia. Jung *et al.* (2018) citam a água como meio apropriado para esta lavagem. Também é indicada a possibilidade de aumentar a faixa de varredura do equipamento para 4.000 a 400 cm^{-1} .

Os sinais de outras substâncias – outros polímeros dentre elas – também foram identificados. No caso de não polímeros, cujos dados foram analisados por meio da biblioteca do fabricante *Agilent*, muitas vezes foram identificadas similaridades menores ou iguais a 80%.

As Tabelas 3 e 4 apresentam os valores relacionados à presença de microplástico (concentração do polímero) observadas nas amostras de trato gastrointestinal, brânquias e músculos dorsais dos indivíduos dos grupos controle e expostos a microplástico, por 3 e 7 dias, respectivamente.

Tabela 3. Presença de microplástico (coincidência com a absorvância do padrão de polietileno, em %) nas amostras de trato gastrointestinal (TGI), Brânquias e Músculos dorsais dos indivíduos do grupo de controle e expostos a microplástico (MP), por 3 dias.

3 dias						
Réplicas	Brânquias		TGI		Músculos	
	Controle	MP	Controle	MP	Controle	MP
1	2.67	5.91	17,65	11,03	6.64	46.97
2	15.06	4.38	22,33	18,52	3.08	4.6
3	3.51	51.06	18,59	15,94	3.65	17.53
4		<u>91.85</u>		30,36		15.29
5		76.52		-		30.74
6		5.64		15,21		-
7		2.46		22,27		9.29
8		19.15		25,79		<u>84.61</u>
9		-		26,7		6.84
10		17.88		28,84		3.11

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 4 - Presença de microplástico (coincidência com a absorvância do padrão de polietileno, em %) nas amostras de trato gastrointestinal (TGI), Brânquias e Músculos dorsais dos indivíduos do grupo de controle e expostos a microplástico (MP), por 7 dias.

7 dias						
Réplicas	Brânquias		TGI		Músculos	
	Controle	MP	Controle	MP	Controle	MP
1	4.14	27.28	16,45	22,53	1.58	20.52
2	0.22	11.78	5,64	25,73	7.15	4.12
3		8.96		25,26		0.62
4		5.31		14,88		8.96
5		49.18		17,37		13.9
6		-		24,38		-
7		-		20,21		31.69
8		38.23		23,51		2.48
9		-		22,53		31.57

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados apontam para a presença de MP em concentrações muito

próximas àquelas do polímero polietileno, em especial para amostras de brânquias e músculos de alguns dos organismos expostos a microplásticos, por 3 dias (com destaque para as brânquias do indivíduo 4 e músculos do indivíduo 8).

5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados das análises estatísticas dos tratamentos de brânquias, trato gastrointestinal e músculos dorsais de organismos expostos a microplástico e do grupo controle para ambos os períodos amostrais podem ser observados nas Figuras 24 a 26.

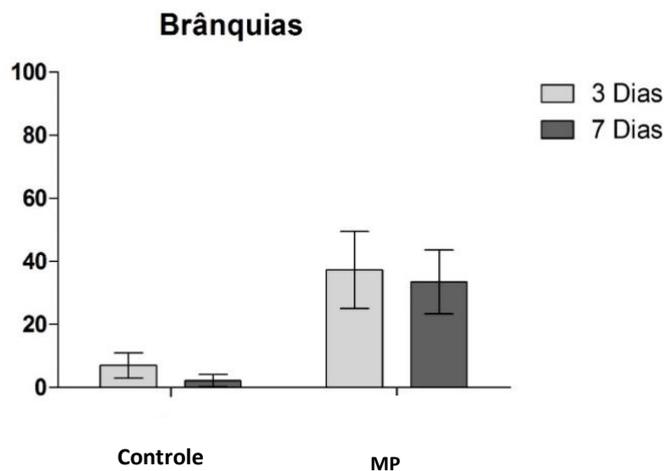


Figura 24. Presença de microplástico (coincidência com a absorção do padrão de polietileno, em %) nas amostras de Brânquias dos indivíduos dos grupos de controle e expostos a microplástico (MP), por 3 e 7 dias (Média, \pm erro padrão e $p \leq 0,05$). Não houve diferença significativa entre o tratamento testado e o controle em ambos os períodos de exposição (3 e 7 dias).

Fonte: Elaborado pela autora.

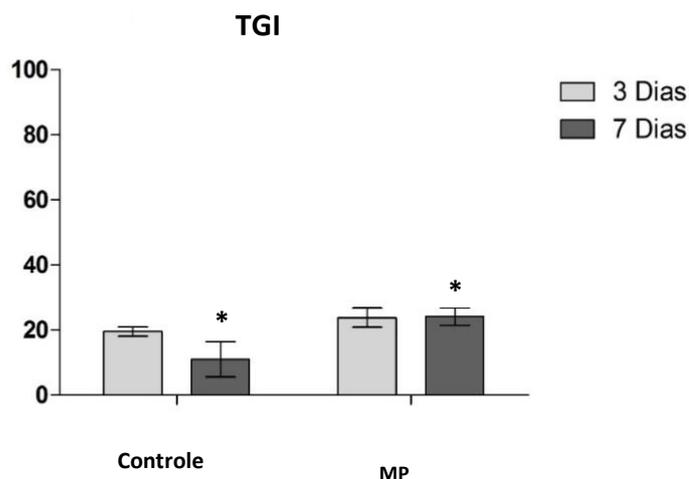


Figura 25. Presença de microplástico (coincidência com a absorbância do padrão de polietileno, em %) nas amostras do trato gastrointestinal (TGI) dos indivíduos do grupo de controle e expostos a microplástico, por 3 e 7 dias (Média, \pm erro padrão e $p \leq 0,05$). Houve diferença significativa entre o tratamento testado e o controle para o período de 7 dias de exposição ao MP. Fonte: Elaborado pela autora.

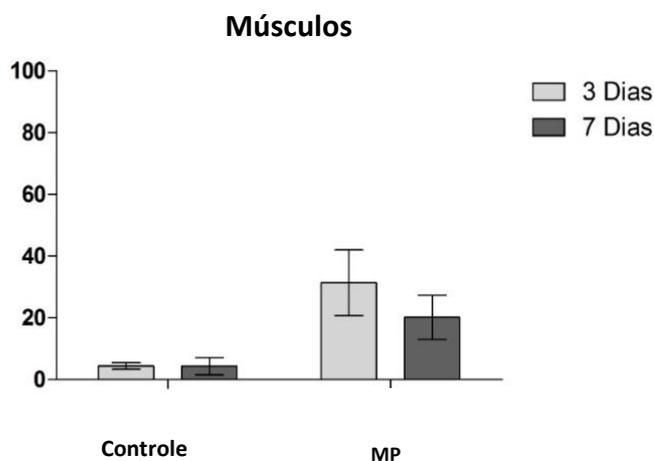


Figura 26. Presença de microplástico (coincidência com a absorbância do padrão de polietileno, em %) nas amostras de músculos dorsais (Músculos) dos indivíduos do grupo de controle e expostos a microplástico, por 3 e 7 dias (Média, \pm erro padrão e $p \leq 0,05$). Não houve diferença significativa entre o tratamento testado e o controle em ambos os períodos de exposição (3 e 7 dias). Fonte: Elaborado pela autora.

Foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos de organismos expostos a microplástico e o grupo controle apenas para o grupo composto por amostras do trato gastrointestinal e exposto por 7 dias (Figura 26).

Esses resultados corroboram aqueles do trabalho de Zhang *et al.* (2021), que em estudo sobre MP em peixes de água doce selvagens reportaram a presença de

uma média de 0,6 itens de MP por indivíduo nas brânquias e no trato gastrointestinal, sendo que a maioria destes itens foi encontrada justamente no trato gastrointestinal dos animais.

Lusher, Hollman e Mendoza-Hill (2017) também apontaram que, de um modo geral, microplásticos foram observados, em pequenas quantidades, apenas no trato gastrointestinal de organismos aquáticos de vida livre.

Os resultados (Figuras 24 a 26) demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (grupos controle e expostos ao microplástico) e os períodos amostrais (3 e 7 dias). Também não há diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tempos.

A presença do polímero foi observada, inclusive, em músculos dorsais de organismos expostos ao microplástico por 3 dias (Figura 27) e apontam para a possibilidade de translocação do microplástico para esses tecidos em peixes expostos por um período de tempo relativamente curto.

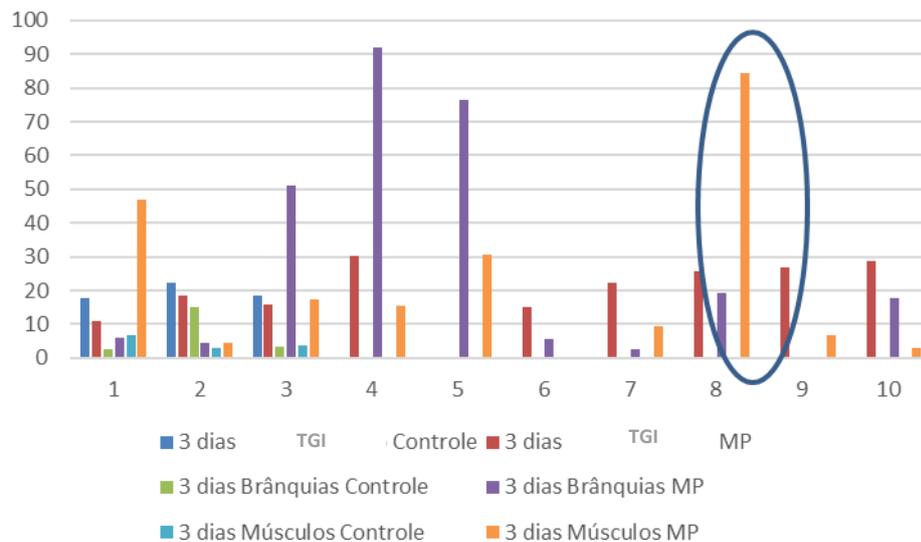


Figura 27. Presença de microplástico (coincidência com a absorvância do padrão de polietileno, em %) nas amostras de Brânquias, trato gastrointestinal (TGI) e músculos dorsais (Músculos) dos indivíduos do grupo de controle e expostos a microplástico (MP), por 3 dias, com destaque para o resultado em músculos de um dos indivíduos expostos ao MP.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados apontam para a importância da realização de estudos visando a compreensão da bioacumulação de microplásticos em diferentes tecidos e órgãos de organismos expostos a microplásticos, bem como dos potenciais efeitos negativos a esses organismos e aos seres humanos, dada a possibilidade de ingestão indireta de

microplásticos a partir do consumo de peixes expostos a ambientes onde a presença dessas partículas é uma realidade.

Barboza *et al.* (2020) ressaltam o potencial dos microplásticos em causar danos diretos aos organismos como efeitos neurotóxicos e danos oxidativos à camada lipídica. Lusher, Hollman e Mendoza-Hill (2017) citam estudos com próteses plásticas, quando foram observadas mudanças na expressão de genes e proteínas, danos ao DNA, células imunológicas comprometidas, proliferação celular e necrose, inflamação em tecidos, osteólise e lacerações de tecido. Os estudos *in vitro* que expuseram células humanas a esses tipos de micro e nanoplásticos encontraram impactos relacionados ao estresse oxidativo, mudanças na expressão de proteínas, danos ao DNA, apoptose celular (morte celular programada) e necrose além de coagulação celular. Todavia, concluem que ainda é necessário um maior número de dados experimentais a fim de avaliar o risco de toxicidade de partículas micro e nanoplásticas após absorção oral em humanos.

De acordo com Lusher, Hollman e Mendoza-Hill (2017), produtos oriundos da pesca e aquicultura representaram cerca de 17% da ingestão de proteína animal na alimentação humana, em 2013. Para o Brasil, citam dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) que estimam em 9,74 kg/*per capita* o consumo de peixes nesse mesmo ano. Os autores ressaltam as vantagens da ingestão desse tipo de alimento para a saúde humana, mas também indicam a preocupação emergente sobre os potenciais impactos causados pela presença de microplásticos em organismos aquáticos consumidos.

Os autores afirmam que, em humanos, os riscos de ingestão de microplásticos são reduzidos por conta da remoção das vísceras da maior parte dos organismos marinhos consumidos, com exceção de peixes de menor tamanho e de muitas espécies de bivalves, que são consumidos por inteiro. Isto porque, segundo os autores, de um modo geral, microplásticos foram observados, em pequenas quantidades, apenas no trato gastrointestinal de organismos aquáticos de vida livre. Também indicam que os microplásticos podem ser eliminados junto com o material fecal e que a translocação para outros tecidos não ocorre ou é muito baixa para as menores partículas de microplásticos (menores que 600 μm).

Em estudo mais recente, Barboza *et al.* (2020) também ressaltam o potencial risco à saúde humana uma vez que detectaram a presença de microplásticos em músculos dorsais, presentes nas partes comumente consumidas (filés), ao contrário

do trato gastrointestinal (vísceras), geralmente removido antes de seu consumo.

Os autores estimaram em 112 a 842 itens microplásticos/ano a ingestão humana dessas partículas, considerando as variações relacionadas à idade e consumo recomendado pela EFSA, em 2016. Os autores ressaltam ainda que, em locais onde o consumo médio de pescado é maior, como no caso de Portugal, esse consumo pode chegar a 3.078 itens microplásticos/ano/pessoa, reforçando a necessidade de novos estudos para a compreensão dos danos relacionados à ingestão de microplásticos por humanos e definição de limites para a ingestão diária dessas partículas.

6 CONCLUSÃO

Os resultados qualitativos obtidos por meio da análise de ATR - FTIR demonstraram a bioacumulação de microplástico nos diferentes tecidos – trato gastrointestinal, brânquias e músculos dorsais – de organismos expostos por 3 e 7 dias, com destaque para a presença do microplástico em músculos de organismos expostos às partículas por apenas três dias, apesar das análises estatísticas não terem mostrado diferenças significativas na maioria dos casos, com exceção dos tratamentos de organismos expostos a microplástico e o grupo controle para o grupo composto por amostras do trato gastrointestinal e exposto por 7 dias.

Todavia, novos estudos devem ser realizados a fim de determinar o melhor método de digestão para peixes estuarinos, considerando a viabilidade financeira e o tempo necessário para a digestão das amostras, garantindo a redução do material biológico em níveis adequados para a detecção das eventuais partículas de microplásticos presentes. Aspectos relacionados à geração de resíduos tóxicos e aplicabilidade em amostras oriundas de diferentes organismos de vida livre expostos a microplásticos de diferentes formatos e associados a diversos contaminantes também devem ser avaliados.

Novos estudos deverão ser desenvolvidos visando ampliar a compreensão sobre a bioacumulação de microplásticos – e substâncias associadas – em diferentes organismos e tecidos biológicos e suas implicações, inclusive como um fator de risco para a saúde humana.

TRABALHO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

ScholarOne Manuscripts

01/09/2021 19:45

ScholarOne Manuscripts™

Camilo Pereira

English (US)

Instructions & Forms

Help



Química Nova

[Home](#)[Author](#)[Author Dashboard](#) / [Submission Confirmation](#)

Submission Confirmation

Thank you for your submission

Submitted to	Química Nova
Manuscript ID	QN-2021-0250
Title	AVALIAÇÃO DO ACÚMULO DE MICROPLÁSTICOS POR MEIO DE DIGESTÃO ALCALINA E ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA FOURIER EM REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA – ATR - FTIR EM PEIXES (<i>Centropomus undecimalis</i>) EXPOSTOS EM LABORATÓRIO
Authors	Pedro, Greicilene Regina Nobre, Caio Rodrigues Souza, Maria Tereza Pinto, Igor Araujo da Silva, Crazyelle Sebenski Pereira, Camilo Dias Seabra Torres, Ronaldo
Date Submitted	01-Sep-2021

(Cópia do comprovante de submissão do artigo científico)

REFERÊNCIAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR 13230**: embalagens e acondicionamento plásticos recicláveis – identificação e simbologia. Rio de Janeiro: ABNT, 2008. 8 p.
- ALIMI, O.S.; FADARE, O.O.; OKOFFO, E.D. Microplastics in African ecosystems: Current knowledge, abundance, associated contaminants, techniques, and research needs. **Science of the Total Environment**, v. 755. 2021.
- AMATO-LOURENÇO, L. F.; GALVÃO, L. S.; WEGER, L. A.; HIEMSTRA, P. S.; VIJVER, M. G.; MAUAD, T. An emerging class of air pollutants: potential effects of microplastics to respiratory human health? **Science of the Total Environment**, v. 749, Dez, 2020.
- ANDRADY, A. L. Microplastics in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 8, p. 1596-1605, Ago, 2011.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2020. 212p. ISBN 9788573911985.
- BARBOZA, L. G. A.; LOPES, C.; OLIVEIRA, P.; BESSA, F.; OTERO, V.; HENRIQUES, B.; RAIMUNDO, J.; CAETANO, M.; VALE, C.; GUILHERMINO, L. Microplastics in wild fish from North East Atlantic Ocean and its potential for causing neurotoxic effects, lipid oxidative damage, and human health risks associated with ingestion exposure. **Science of the Total Environment**, v. 717, Maio, 2020.
- BARCELO, D. Microplastics analysis. **MethodsX**, v. 7, Abr. 2020. Editorial.
- BARLETTA, M.; COSTA, M. F.; DANTAS, D. V. Ecology of microplastics contamination within food webs of estuarine and coastal ecosystems. **MethodsX**, v. 7, 2020.
- BERTOLETTI, E. **Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no estado de São Paulo**. 2.ed. São Paulo: CETESB, 2008. 42p.
- BESSA, F.; FRIAS, J.; REGOLI, F. Harmonized protocol for monitoring microplastics in biota. **JPI-Oceans BASEMAN project**. 2019.
- BRENTANO, D. M.; MARTINS, L.; PAZ, A. V. Avaliação da geração de micronúcleo em juvenis de *Centropomus parallelus* (robalo-peva) expostos a diferentes concentrações salinas. **Revista Técnico Científica do IFSC**, v. 2, n. 1, p. 13-16, 2010.
- BROWNE, M.A.; CRUMP, P.; NIVEN, S.J.; TEUTEN, E.; TONKIN, A.; GALLOWAY, T.; THOMPSON, R. Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 21, p. 9175-9179. 2011.
- CANTANHÊDE, S. M.; MEDEIROS, A. M.; FERREIRA, F. S.; FERREIRA, J. R. C.;

ALVES, L. M. C.; CUTRIM, M. V. J.; SANTOS, D. M. S. Using histopathological biomarker in gills of *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) in assessing the waterquality at Ecological Park Laguna da Jansen, São Luís-MA. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 66, n. 2, p. 593-601, 2014.

CANTANHÊDE, S. M.; DA SILVA CASTRO, G.; PEREIRA, N. J.; DE PINHO CAMPOS, J. S.; DA SILVA, J.; TCHAICKA, L.; CARVALHO-NETA, R. N. F.; TORRES JÚNIOR, J. R. S.; SANTOS, D. M. S. Evaluation of environmental quality of two estuaries in Ilha do Maranhão, Brazil, using histological and genotoxic biomarkers in *Centropomus undecimalis* (Pisces, Centropomidae). *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, p. 21058-21069, 2016.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2020. Disponível em: <<https://www.cetesb.sp.gov.br/praias/emissarios-submarinos/>>. Acesso em: 25 jan. 2020.

CINCINELLI, A.; SCOPETANI, C.; CHELAZZI, D.; LOMBARDINI, E.; MARTELLINI, T.; KATSOYIANNIS, A.; FOSSI, M. C.; CORSOLINI, S. Microplastic in the surface Waters of the Ross Sea (Antarctica): Occurrence, distribution and characterization by FTIR. *Chemosphere*, v. 175, p. 391-400, 2017.

COLE, M.; LINDEQUE, P.; HALSBAND, C.; GALLOWAY, T. S. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine Pollution Bulletin*, v. 62, p. 2588-2597, 2011.

COLE, M.; WEBB, H.; LINDEQUE, P. K.; FILEMAM, E. S.; HALSBAND, C.; GALLOWAY, T. S. Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Scientific Reports*, v. 4, p. 1-8, 2014.

COUTINHO, F.M.B.; MELLO, I.L.; DE SANTA MARIA, L.C. Polietileno: Principais tipos, propriedades e aplicações. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2003.

DEHAUT, A.; CASSONE, A. L.; FRÈRE, L.; HERMABESSIERE, L.; HIMBER, C.; RINNERT, E.; RIVIÈRE, G.; LAMBERT, C.; SOUDANT, P.; HUVET, A.; DUFLOS, G. Microplastics in seafood: benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environmental Pollution*, v. 215, p. 223-233, 2016.

DE ORTE, M.R.; CLOWEZ, S.; CALDEIRA, K. Response of bleached and symbiotic sea anemones to plastic microfiber exposure. *Environmental Pollution*, v. 249, p. 512-517, 2019.

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

DEVRIESE, L. I.; VAN DER MEULEN, M. D.; MAES, T.; BEKAERT, K.; PAUL-PONT, I.; FRÈRE, L.; ROBBENS, J.; VETHAAK, A. D. Microplastic contamination in brown shrimp (*Crangon crangon* Linnaeus 1758) from coastal waters of the Southern North

Sea and Channel area. *Marine Pollution Bulletin*, v. 98, n. 1, p. 179-187, 2015.

DRIS, R.; GASPERI, J.; SAAD, M.; MIRANDE, C.; TASSIN, B. Synthetic fibers in atmospheric fallout: a source of microplastics in the environment? *Marine Pollution Bulletin*, 104, p. 290-293, 2016.

DRIS, R. **First assessment of sources and fate of macro and micro plastics in urban hydrosystems: Case of Paris megacity**. 2017. Dissertação (pós-doutorado - PhD) - Université Paris-Est Creteil, Paris, 2017.

DRURY, B.; SCOTT, J.; ROSI-MARSHALL, E. J.; KELLY, J. J. Triclosan Exposure Increases Triclosan Resistance and Influences Taxonomic Composition of Benthic Bacterial Communities. *Environmental Science and Technology*, v. 47, p. 8923-8930, 2013.

EERKES-MEDRANO, D.; LESLIE, H. A.; QUINN, B. Microplastics in drinking water: a review and assessment. *Current Opinion in Environmental Science Health*, v. 7, p. 69-75, 2019.

FARRELL, P.; NELSON, K. Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environmental Pollution*, v. 177, Junho, p. 1-3, 2013.

FOEKEMA, E. M.; DE GRUIJTER, C.; MERGIA, M. T.; VAN FRANKEKER, J. A.; MURK, A.J.; KOELMANS, A.A. Plastic in North Sea fish. *Environmental Science Technology*, 47, 15, p. 8818-8824, 2013.

FREE, C. M.; JENSEN, O. P.; MASON, S. A.; ERIKSEN, M.; WILLIAMSON, N. J.; BOLDGIV, B. High levels of microplastic pollution in a large remote lake. *Science Direct*. v. 85, n. 1, p. 156-163, 2014.

FRÈRE, L.; PAUL-PONT, I.; MOREAU, J.; SOUDANT, P.; LAMBERT, C.; HUVERT, A., RINNERT, E. A semi-automated Raman micro-spectroscopy method for morphological and chemical characterizations of microplastic litter. *Marine Pollution Bulletin*, v. 113, n. 1-2, p. 461-468, 2016.

GESAMP - Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection. 2015. **Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment**. KERSHAW, P. J. (ed.) IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UM/UNEP/UNDP. Reports and Studies Series. GESAMP. N. 93, 96 p.

GESAMP - Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection. 2016. **Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: part two of a global assessment**. KERSHAW, P. J.; ROCHMAN, C. M. (ed.), IMO/FAO/UNESCO IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP. Reports and Studies Series. GESAMP N. 93, International Maritime Organization, London. 220 p.

GESAMP - Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection. 2018. **Global Trends in Pollution of Coastal Ecosystems**. RUIZ-

FERNÁNDEZ, A. C.; SANCHEZ-CABEZA, J. A. (ed.). IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP/ISA. Rep. Stud. GESAMP. N. 106, 101 p.

GESAMP - Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection. 2019. **Guidelines or the monitoring and assessment of plastic litter and microplastics in the ocean**. KERSHAW, P. J.; TURRA, A.; GALGANI, F. (ed.), IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP/ISA. Rep. Stud. GESAMP N. 99, 130 p.

GESAMP - Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection. 2020. **Proceedings of the GESAMP International Workshop on assessing the risks associated with plastics and microplastics in the marine environment**. KERSHAW, P. J.; CARNEY ALMROTH, B.; VILLARRUBIA-GÓMEZ, P.; KOELMANS, A. A.; GOUIN, T. (ed.), IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP/ISA. Reports to GESAMP N. 103, 68 p.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, 2017.

HARRISON, J. P.; OJEDA, J. J.; ROMERO-GONZÁLEZ, M. E. The applicability of reflectance micro-Fourier-transform infrared spectroscopy for the detection of synthetic microplastics in marine sediments. **Science of the Total Environment**, v. 416, p. 455-463, 2012.

HARTMANN, N.B.; RIST, S.; BODIN, J.; JENSEN, L.H.S.; SCHMIDT, S.N.; MAYER, P.; MEIBOM, A.; BAUN, A. Microplastics as vectors for environmental contaminants: exploring sorption, desorption, and transfer to biota. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 13, p. 455-551, Maio, 2017.

IÑIGUEZ, M. E.; CONESA, J. A.; FULLANA, A. Microplastics in Spanish table salt. **Scientific Reports**. v. 7, 2017.

JONES, F. A ameaça dos microplásticos. **Revista Pesquisa FAPESP - Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo**, n. 281, jul. 2019. Disponível em: [A ameaça dos microplásticos: Revista Pesquisa Fapesp](#). Acesso em: out. 2019.

JULIENNE, F.; DELORME, N.; LAGARDE, F. From macroplastics to microplastics: Role of water in the fragmentation of polyethylene. **Chemosphere**, v. 236, 2019.

JUNG, M. R.; HORGEN, F. D.; ORSKI, S. V.; RODRIGUEZ, C. V.; BEERS, K. L.; BALAZS, G. H.; JONES, T. T.; WORK, T. M.; BRIGNAC, K. C.; ROYER, S. J.; HYRENBACH, K. D.; JENSEN, B. A.; LYNCH, J. M. Validation of ATR FT-IR to identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 12, p. 704–716, 2018.

KIRSCHBAUM, A. A.; SERIANI, R.; PEREIRA, C. D.; ASSUNÇÃO, A.; ABESSA, D. M.; ROTUNDO, M. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. Cytogenotoxicity biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, SP, Brazil. **Genetics and molecular biology**, v. 32, n. 1, p. 151-154, 2009.

KOSUTH, M.; MASON, S.; WATTENBERG, E.; TYREE, C. Synthetic Polymer Contamination of Global Drinking Water. **Technical Report**, 2017.

KÜHN, S.; VAN WERVEN, B.; VAN OYEN, A.; MEIJBOOM, A.; BRAVO REBOLLEDO, E.L.; VAN FRANEKER, J.A. The use of potassium hydroxide (KOH) solution as a suitable approach to isolate plastics ingested by marine organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v.115 (1-2), p. 86–90, 2016.

LENZ, R.; ENDERS, K.; STEDMON, C. A.; MACKENZIE, D. M. A.; NIELSEN, T. G. A critical assessment of visual identification of marine microplastic using Raman spectroscopy for analysis improvement. **Marine Pollution Bulletin**, v. 100, n. 1, p. 82-91, 2015.

LIMA, F.B.; BRACCINI, M.C.; DIAZ, A.O.; PINHEIRO JÚNIOR, C.; GUIMARÃES, A.C.G. Morfologia das brânquias de *Steindachnerina brevipinna* (Eigenmann e Eigenmann, 1889) (Characiformes, Curimatidae). **Biotemas**, v. 22, n. 1, p. 87-92, 2009.

LUSHER, A.L.; MCHUGH, M.; THOMPSON, R.C. Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. **Marine Pollution Bulletin**, v. 67, n. 1-2, p. 94-99, 2013.

LUSHER, A. L.; HOLLMAN, P. C. H.; MENDOZA-HILL, J. J. **Microplastics in fisheries and aquaculture: status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety**. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, Roma, Itália, n. 615, 2017.

LUSHER, A.; WELDEN, N.; SOBRAL, P.; COLE, M. Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. **Analytical Methods**, v. 9, p. 1346-1360, 2017b.

MENGES, F. Spectragryph - optical spectroscopy software, Version 1.2.15, 2020. Disponível em: <http://www.effemm2.de/spectragryph/>. Acesso em: abr. 2021.

MONTAGNER, C. C.; SODRÉ, F. F.; ACAYABA, R. D.; VIDAL, C.; CAMPESTRINI, I.; LOCATELLI, M. A.; PESCARA, I. C.; ALBUQUERQUE, A. F.; UMBUZEIRO, G. A.; JARDIM, W. F. Ten Years-Snapshot of the Occurrence of Emerging Contaminants in Drinking, Surface and Ground Waters and Wastewaters from São Paulo State, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 3, p. 614-632, 2019.

NOBRE, C. R.; SANTANA, M. F. M.; MALUF, A.; CORTEZ, F. S.; CESAR, A.; PEREIRA, C. D. S.; TURRA, A. Assessment of microplastic toxicity to embryonic development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). **Marine Pollution Bulletin**, v. 92, n. 1, p. 99-104, 2015.

NOBRE, C. R.; MORENO, B. B.; ALVES, A. V.; ROSA, J. L.; FRANCO, H. R.; ABESSA, D. M. S.; MARANHO, L. A.; CHOUERI, R. B.; GUSSO-CHOUERI, P. K.; PEREIRA, C. D. S. Effect of microplastics associated with Triclosan on the oyster *Crassostrea brasiliana*: an integrate biomarker approach. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 79, p. 101-110, 2020.

OLIVATTO, G. P.; CARREIRA, R.; TORNISIELO, V. L.; MONTAGNER, C. C. Microplásticos: contaminantes de preocupação global no antropoceno. **Revista Virtual de Química**, São Paulo, v. 10, n. 6, p. 1968-1989, 2018.

ONU - Organização Mundial das Nações Unidas. 2014. Disponível em: <https://news.un.org/en/story/2014/06/471492-plastic-waste-causes-13-billion-annual-damage-marine-ecosystems-says-un-agency>. Acesso em: nov. 2020.

OROPESA JIMÉNEZ, A. L. Disruptores endócrinos en el medio ambiente: Caso del 17- α - etinil-estradiol. **Observatorio Medioambiental**, v. 11, p. 63-76, 2008.

ORY, N.; CHAGNON, C.; FELIX, F.; FERNÁNDEZ, C.; FERREIRA, J. L.; GALLARDO, C.; ORDÓÑES, O.G.; HENOSTROZA, A.; LAAZ, E.; MISRAJI, R.; MOJICA, H.; HARO, V. M.; MEDINA, L. O.; PRECIADO, M.; SOBRAL, P.; URBINA, M. A.; THIEL, M. Low prevalence of microplastic contamination in planktivorous fish species from the southeast Pacific Ocean. **Marine Pollution Bulletin**, v. 127, p. 211–216, 2018a.

ORY, N. C.; GALLARDO, C.; LENZ, M.; THIEL, M. Capture, swallowing, and egestion of microplastics by a planktivorous juvenile fish. **Environmental Pollution**. v. 240, p. 566–573, 2018b.

PFEIFFER, F.; FISCHER, E. K. Various digestion protocols within microplastic sample processing—evaluating the resistance of different synthetic polymers and the efficiency of biogenic organic matter destruction. **Frontiers in Environmental Science**. v. 8, 2020.

PONTES, N. A. **Efeito dos microplásticos no desenvolvimento do caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei* capturados em Itacoatiara (AM)**. 2019. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara, 2019.

PRIMPKE, S.; FISCHER, M.; LORENZ, C.; GERDTS, G.; SCHOLZ-BÖTTCHER, B. M. Comparison of pyrolysis gas chromatography/mass spectrometry and hyperspectral FTIR imaging spectroscopy for the analysis of microplastics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, p. 8283-8298, 2020.

RAGUSA, A.; SVELATO, A.; SANTACROCE, C.; CATALANO, P.; NOTARSTEFANO, V.; CARNEVALI, O.; PAPA, F.; RONGIOLETTI, M.A.; BAIOTTO, F.; DRAGHI, S.; D'AMORE, E.; RINALDO, D.; MATTA, M.; GIORGINI, E. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. **Environment International**, v. 146, 2021.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SANTOS, A. A.; DE CARLA DIAS, D.; SERIANI, R.; EGAMI, M. I. Hematological and phagocytic response of the fat snook, *Centropomus parallelus*, reared in net cages, before and after inoculation with *Sacharomyces cerevisiae*. **Bioikos**, v. 22(1), p. 29-35, 2008.

RICKLEFS, R. **A economia da natureza**. 3.ed. São Paulo:Guanabara/Koogan, 1998. 470 p.

ROCHMAN, C. M.; TAHIR, A.; WILLIAMS, S. L.; BAXA, D. V.; LAM, R.; MILLER, J. T.; TEH, F. C.; WERORILANGI, S.; TEH, S. J. Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

RODRIGUES, A.G.; GALZERANI, J.C. Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, n. 4, p. 4309-1, 2012.

ROMAN, L.; BUTCHER, R.G.; STEWART, D.; HUNTER, S.; JOLLY, M.; KOWALSKI, P.; HARDESTY, B. D.; LENTING, B. Plastic ingestion is an underestimated cause of death for southern hemisphere albatrosses. **Conservation Letters**, 2020.

SANTANA, M. F. M. **Effects of microplastics contamination on marine biota**. 2015. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de Oceanografia Biológica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SANTANA, M. F. M.; MOREIRA, F. T.; TURRA, A. Trophic transference of microplastics under a low exposure scenario: insights on the likelihood of particle cascading along marine food-webs. **Marine Pollution Bulletin**, v. 121, n. 1-2, p. 154-159, 2017.

SCHWABL, P.; KÖPPEL, S.; KÖNIGSHOFER, P.; BUCSICS, T.; TRAUNER, M.; REIBERGER, T.; LIEBMANN, B. Detection of various microplastics in human stool: a prospective case series. **Annals of Internal Medicine**. v. 171, n. 7, p. 453-457, 2019.

SOUZA, G. R. de. **Avaliação da poluição por microplásticos nas águas do Igarapé do Mindu, no ambiente urbano de Manaus**. 2020. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2020.

TONINI, W. C. T.; BRAGA, L. G. T.; NOVA, D. L. D. V. Diet of juveniles of the snook *Centropomus parallelus* Poey, 1860 in the south of Bahia, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 33, n. 1, p. 85-91. 2007.

TORRES, R. J. **Efeitos da dragagem sobre a qualidade de sedimentos contaminados do canal do porto de Santos: biodisponibilidade e toxicidade de metais e compostos orgânicos persistentes**. 2007. 177 f. Tese (Doutorado em Ciências Exatas e da Terra) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

TURRA, A.; MANZANO, A. B.; DIAS, R. J. S.; MAHIQUES, M. M.; BARBOSA, L.; BALTHAZAR-SILVA, D.; MOREIRA, F. T. Three-dimensional distribution of plastic pellets in sandy beaches: Shifting paradigms. **Scientific Reports**, v. 4, 2014.

UNEP - United Nations Environment Programme. Year Book 2011: Emerging issues

in our global environment. Govere, T.; Bech, S., eds.; Nairobi: UNEP, 2011.

UNEP - United Nations Environment Programme. **Microplastics**. 2019. Disponível em: www.unep.org. Acesso em: 25 nov. 2019.

VELZEBOER, I.; KWADIJK, C. J. A. F.; KOELMANS, A. A. Strong Sorption of PCBs to Nanoplastics, Microplastics, Carbon Nanotubes, and Fullerenes. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 9, p. 4869–4876, 2014.

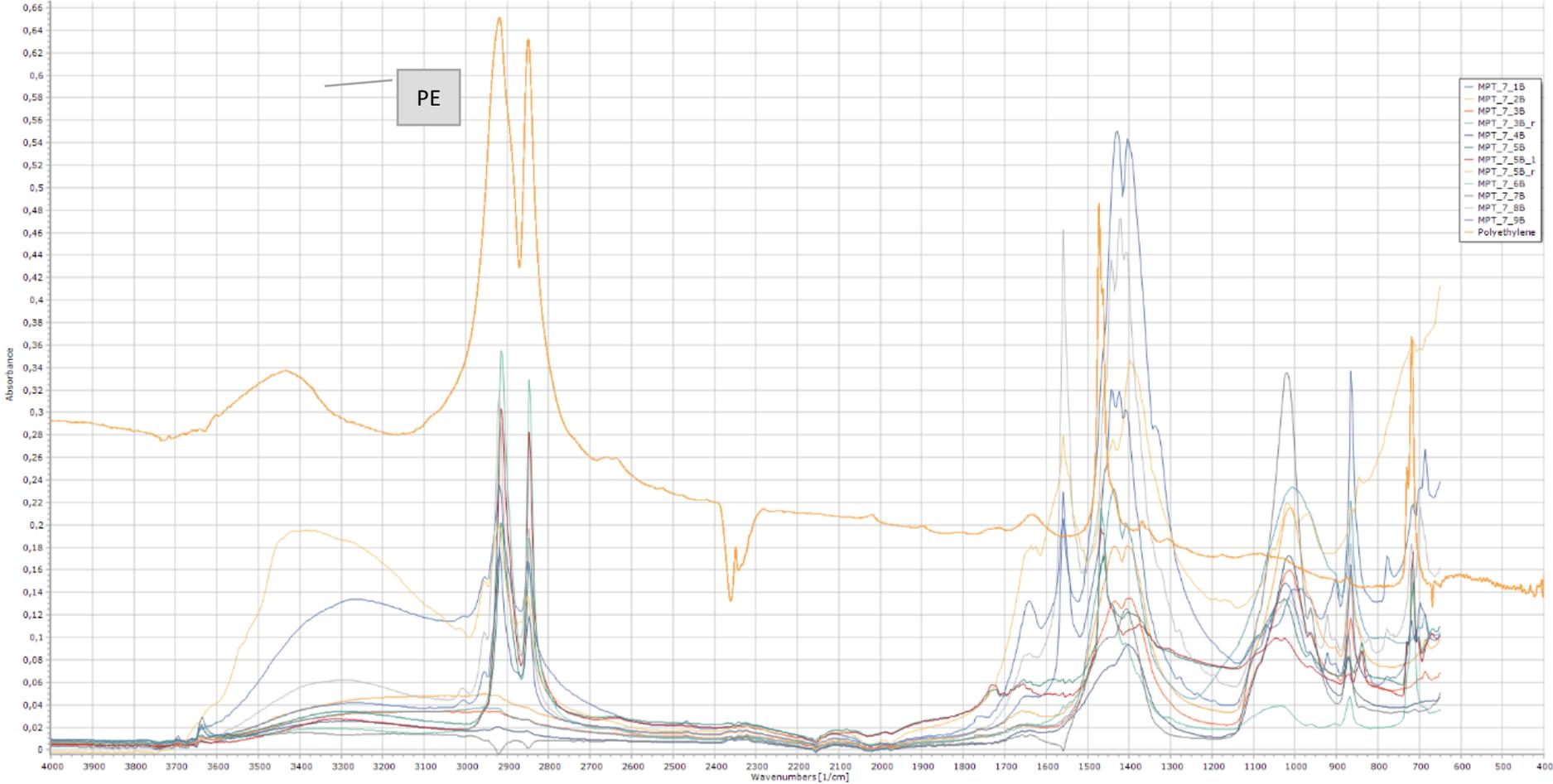
WWF - Fundo Mundial para a Natureza. **Solucionar a poluição plástica: transparência e responsabilização**. 2019. Disponível em: <https://www.wwf.org.br/?70222/Brasil-e-o-4-pais-do-mundo-que-mais-gera-lixo-plastico>. Acesso em: nov. 2020.

ZHANG, L.; XIE, Y.; ZHONG, S.; LIU, J.; QIN, Y.; GAO, P. Microplastics in freshwater and wild fishes from Lijiang River in Guangxi, Southwest China. **Science of the Total Environment**, v. 755. 2021.

APÊNDICE A – Tabela com o peso seco (g) das amostras de trato gastrointestinal (TGI), Brânquias e Músculos dorsais dos indivíduos submetidos aos diferentes tratamentos (Grupos Controle, por 3 e 7 dias – CT3 e CT7 – e expostos a microplástico, por 3 e 7 dias – MP T3 e MP T7) e quantidade da solução de 10 M NaOH (ml)

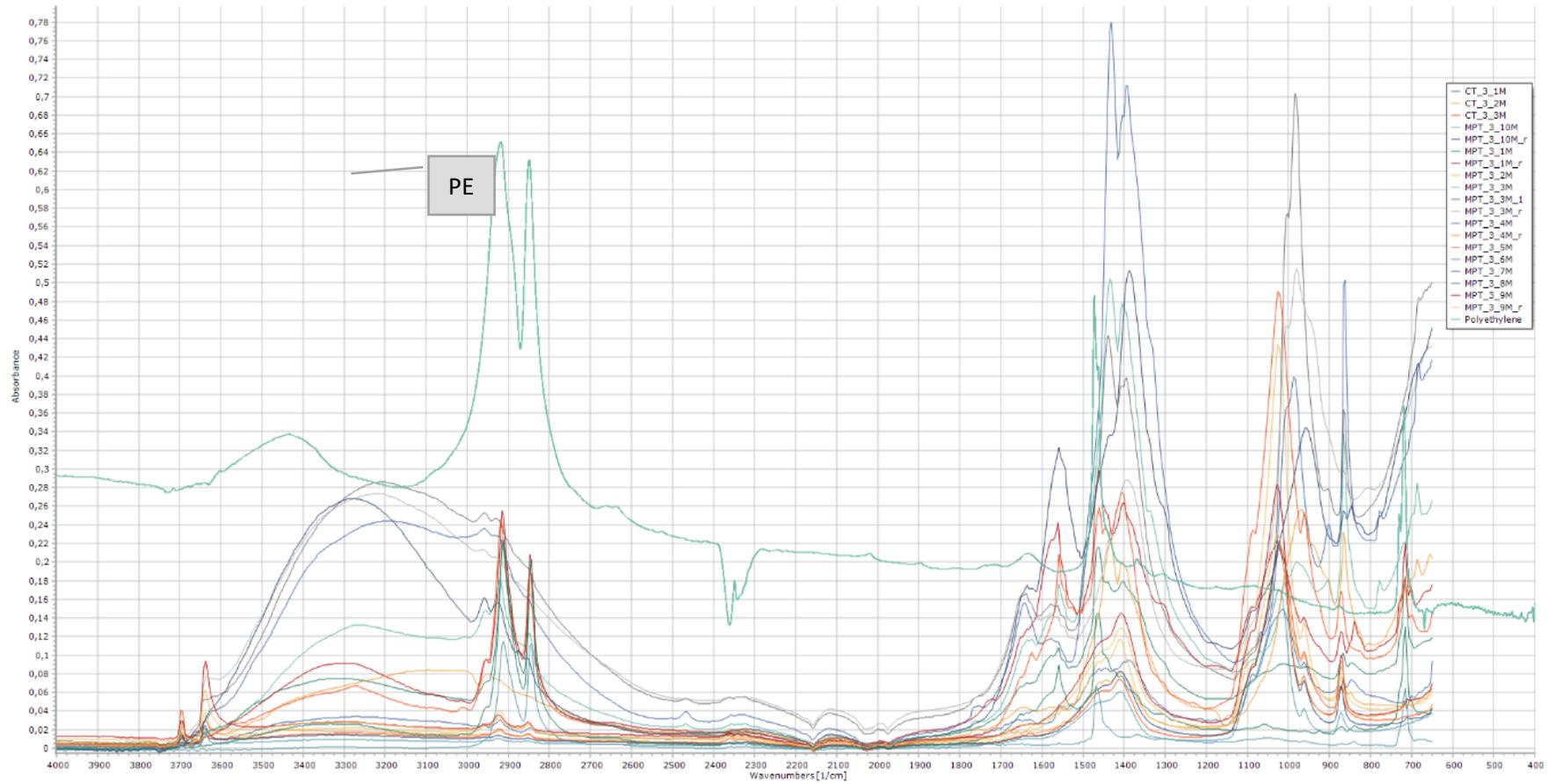
TRATAMENTO- INDIV.	TGI	10 M NaOH	BRÂNQUIAS	10 M NaOH	MÚSCULOS	10 M NaOH
CT3 - 1	0.10	40.00	0.10	40.00	3.20	640.00
CT3 - 2	0.10	40.00	0.60	120.00	2.70	540.00
CT3 - 3	0.20	40.00	0.30	60.00	5.80	1160.00
CT7 - 1	0.10	40.00	0.20	40.00	2.30	460.00
CT7 - 2	0.10	40.00	0.10	40.00	3.40	680.00
MP T3 - 1	0.10	40.00	0.10	40.00	0.80	160.00
MP T3 - 2	0.10	40.00	0.10	40.00	2.70	540.00
MP T3 - 3	0.10	40.00	0.10	40.00	1.80	360.00
MP T3 - 4	0.10	40.00	0.30	60.00	5.30	1060.00
MP T3 - 5	0.10	40.00	0.30	60.00	2.60	520.00
MP T3 - 6	0.10	40.00	0.30	60.00	2.60	520.00
MP T3 - 7	0.10	40.00	0.50	100.00	6.00	1200.00
MP T3 - 8	0.10	40.00	0.10	40.00	2.60	520.00
MP T3 - 9	0.10	40.00	0.30	60.00	4.20	840.00
MP T3 - 10	0.10	40.00	0.40	80.00	4.10	820.00
MP T7 - 1	0.10	40.00	0.40	80.00	3.40	680.00
MP T7 - 2	0.10	40.00	0.20	40.00	1.40	280.00
MP T7 - 3	0.10	40.00	0.20	40.00	2.80	560.00
MP T7 - 4	0.10	40.00	0.10	40.00	3.10	620.00
MP T7 - 5	0.10	40.00	0.10	40.00	1.70	340.00
MP T7 - 6	0.20	40.00	0.40	80.00	3.60	720.00
MP T7 - 7	0.10	40.00	0.20	40.00	5.00	1000.00
MP T7 - 8	0.10	40.00	0.10	40.00	3.50	700.00
MP T7 - 9	0.30	60.00	0.60	120.00	5.90	1180.00

APÊNDICE B – Espectros das amostras de brânquias de organismos do grupo controle (CT 7) e expostos ao microplástico (MPT 7), por 7 dias e o espectro padrão do polímero (PE).



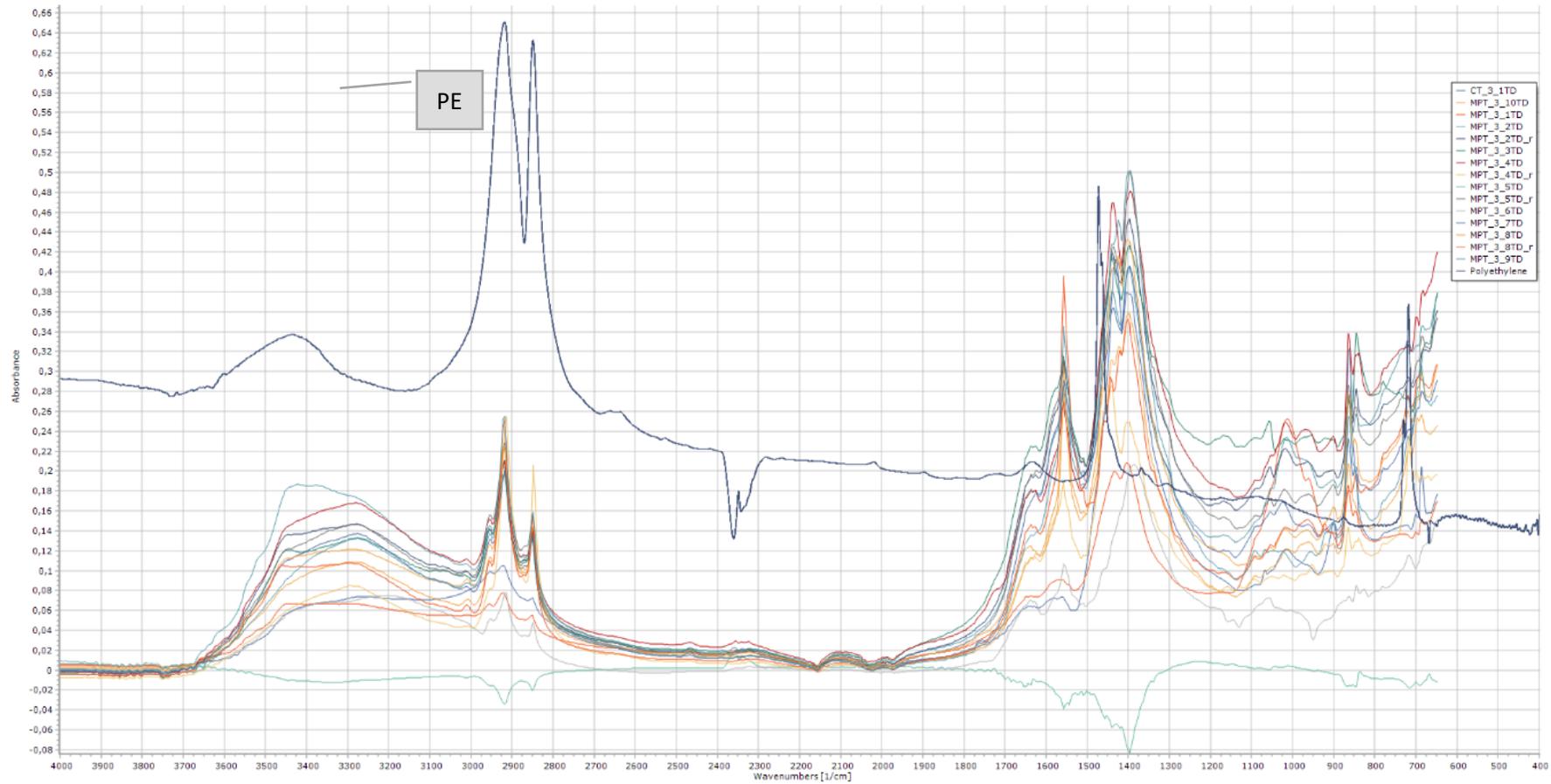
Fonte: Elaborado por Ronaldo José Torres.

APÊNDICE C – Espectros das amostras de músculos de organismos do grupo controle (CT 3) e expostos ao microplástico (MPT 3), por 3 dias e o espectro padrão do polímero (PE).



Fonte: Elaborado por Ronaldo José Torres.

APÊNDICE D – Espectros das amostras de trato gastrointestinal de organismos do grupo controle (CT 3) e expostos ao microplástico (MPT 3), por 3 dias e o espectro padrão do polímero (PE).



Fonte: Elaborado por Ronaldo José Torres.