



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO TOCANTINS**  
**CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA – EMVZ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE**  
**PÚBLICA NOS TRÓPICOS**

**ERICSSON RUBENS RODRIGUES FERREIRA**

**EFEITOS COMBINADOS DE MICROPLÁSTICOS E GLIFOSATO NAS**  
**BRÂNQUIAS DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*).**

Araguaína – TO

2022

ERICSSON RUBENS RODRIGUES FERREIRA

**EFEITOS COMBINADOS DE MICROPLÁSTICOS E GLIFOSATO NAS  
BRÂNQUIAS DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Norte do Tocantins, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

**Orientador:** Prof. Dr. Wagner dos Santos Mariano

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Gustavo Paulino

Araguaína – TO

2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

F383e    Ferreira, Ericsson Rubens Rodrigues Ferreira.  
          EFEITOS COMBINADOS DE MICROPLÁSTICOS E GLIFOSATO NAS  
          BRÂNQUIAS DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*).. / Ericsson Rubens  
          Rodrigues Ferreira Ferreira. – Araguaína, TO, 2022.  
          46 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins  
– Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado)  
em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2022.

Orientador: Wagner Dos Santos Mariano

Coorientador: Marcelo Gustavo Paulino

1. Histopatologia. 2. Ecotoxicidade. 3. Morfologia. 4. Teleósteo. I. Título

**CDD 636.089**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

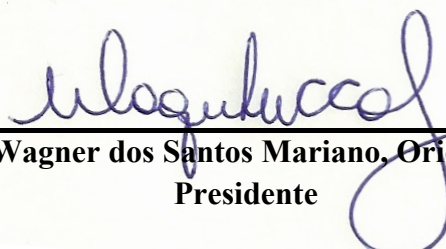
ERICSSON RUBENS RODRIGUES FERREIRA

**EFEITOS COMBINADOS DE MICROPLÁSTICOS E GLIFOSATO NAS  
BRÂNQUIAS DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Norte do Tocantins. Foi avaliada obtenção do título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos e aprovada em sua forma final pelo orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 15 de Agosto de 2022

Banca Examinadora



---

**Prof. Dr. Wagner dos Santos Mariano, Orientador, UFT  
Presidente**



---

**Profa. Dra. Katyane de Sousa Almeida, UFT  
Membro interno**



---

**Profa, Dra. Domenica Palomaris Mariano de Souza, UFT  
Membro externo**

Araguaína – TO

2022

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pai, por tornar possível todos os meus sonhos e demais metas em minha trajetória, me possibilitando realizar mais esse sonho.

Sou imensamente grato aos meus familiares por todo suporte prestado principalmente no período pandêmico, onde não pude contar com a ajuda de amigos e demais colegas de laboratório e de curso.

Agradeço a minha melhor amiga e parceira, Milene Santana Paixão, que me deu todo suporte emocional e me serviu de âncora, me mantendo motivado e concentrado durante momentos difíceis ao longo do mestrado, se mostrando alguém extremamente compreensível e importante nesse processo.

O meu muito obrigado ao Prof. Dr. Marcelo Gustavo Paulino (Co-Orientador) e ao Prof. Dr. Wagner dos Santos Mariano (Orientador) pelo suporte prestado durante o decorrer de todo o curso, ajudando em todas as análises, estudos, custeios e demais empecilhos ocorridos durante essa pós-graduação.

Agradeço o Prof. Dr. Sandro Estevan Moron por ter cedido seu laboratório na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – EMVZ e doado os peixes utilizados nesse estudo, onde foi feita boa parte das análises presentes no presente trabalho, que só foram possíveis graças as técnicas do laboratório Liana Bezerra D. L. e Gilzelle Maria L. S. que foram cruciais no processo dessas análises importantes.

Gratidão a Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR por ter tornado possível efetuar análises importantíssimas para o presente estudo, prestando todo suporte junto ao Prof. Dr. Marcelo G. P., tendo em vista que tais análises tão importantes somente seriam possíveis graças à parceria com a UFSCAR.

Gratidão a Universidade Federal do Norte do Tocantins – UFNT onde foram feitas as demais análises, e foram aclimatados e expostos os peixes do presente estudo.

Agradeço especialmente a minha falecida mãe, que sempre acreditou no meu potencial e esperou o melhor de mim. E que mesmo estando longe e, infelizmente, não estar aqui hoje, sempre se fez presente durante os momentos mais importantes de minha vida. Me motivando e me fazendo acreditar em si mesmo, pondo um extra no comum e fazendo de momentos simples, lembranças memoráveis e únicas.

E agradeço cordialmente aos professores componentes da banca examinadora: Prof. Dr. Wagner dos Santos Mariano, Profa. Dra. Domênica Palomares e Profa. Dra. Katyane de Sousa Almeida. Por terem aceitado ao convite e poderem contribuir notadamente com o presente trabalho, elevando ainda mais sua relevância.

## RESUMO

Os microplásticos estão se tornando os contaminantes mais comuns em todos os ambientes aquáticos, ocasionando efeitos ecotoxicológicos e por vezes deletérios em organismos aquáticos. Do mesmo modo, o herbicida glifosato vem sendo amplamente utilizado no combate às ervas daninhas que crescem em torno das produções agrícolas. É sabido que ambos os contaminantes podem estar disponíveis no ambiente aquático e podem se associar causando efeitos combinados. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos subletais da associação de micropartículas plásticas de polietileno e glifosato, em brânquias de tilápia (*Oreochromis niloticus*), utilizando diferentes biomarcadores de toxicidade. O bioensaio de toxicidade foi realizado de modo agudo (96 h), no qual os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos (n=10), sendo um controle (GC), um com 5 mg L<sup>-1</sup> de microplástico de polietileno (GMP); outro com 5 mg L<sup>-1</sup> de glifosato (GG) e um com ambos contaminantes associados (GA), nas mesmas concentrações dos grupos isolados. Após exposição, foi coletado amostra de sangue, via punção caudal, para biomarcadores fisiológicos e, em seguida, os animais foram eutanasiados, para remoção das brânquias. Sub-amostras de brânquias foram utilizadas para os biomarcadores histopatológicos, enzimáticos e osmorregulatórios. Houve um aumento da hemoglobina corpuscular média no GA em relação ao controle e ao GPM, evidenciando um estresse fisiológico que indica hiperemia. Em GMP houve trombocitose, sugerindo um processo inflamatório. Tais processos podem estar relacionados às alterações histopatológicas encontradas em brânquias, das quais demonstram alterações circulatórias no GG, hipertrofia e proliferação de células ricas em mitocôndrias (CRMs) no GG e GA, além de rupturas epiteliais em todos os grupos expostos. Tais achados fisiopatológicos não comprometeram o funcionamento do órgão, entretanto, os biomarcadores osmorregulatórios demonstraram que houve um desequilíbrio osmo-iônico, no qual foi ajustado pelo animal com a proliferação de CRMs ao final de 96 h de exposição. As concentrações subletais deste estudo, facilmente presentes no ambiente aquático, não são letais aos peixes, entretanto, indicam indução de estresse e necessidade de ajustes fisiológicos para que os organismos estejam em homeostasia. As brânquias de *O. niloticus* são sensíveis às alterações ambientais e respondem, de modo integrado, aos efeitos combinados de múltiplos xenobióticos no ecossistema.

**Palavras chave:** Histopatologia; Ecotoxicidade; Morfofisiologia; Teleosteo.

## ABSTRACT

Microplastics are becoming the most common contaminants in all aquatic environments, causing ecotoxicological and sometimes deleterious effects on aquatic organisms. Likewise, the herbicide glyphosate has been widely used to combat weeds that grow around agricultural production. It is known that both contaminants can be available in the aquatic environment and can associate causing combined effects. The aim of this work was to evaluate the sublethal effects of the association of plastic microparticles of polyethylene and glyphosate on tilapia (*Oreochromis niloticus*) gills, using different toxicity biomarkers. The bioassay was performed acutely (96 h), in which the animals were randomly divided into aquariums, with a control (CG) and the others containing 5 mg L<sup>-1</sup> of polyethylene microplastic (MPG); 5 mg L<sup>-1</sup> of glyphosate (GG) and one with both associated contaminants (AG), at the same concentrations as the isolated groups. After exposure, a blood sample was collected via caudal puncture, for physiological biomarkers and then the animals were euthanized to remove the gills. Gill samples were used for histopathological, enzymatic and osmoregulatory biomarkers. There was an increase in mean corpuscular hemoglobin in AG compared to control and MPG, evidencing a physiological stress that indicates hyperchromia. In MPG there was thrombocytosis, suggesting an inflammatory process. Such processes may be related to the histopathological alterations found in gills, which demonstrate circulatory alterations in the GG, hypertrophy and proliferation of mitochondria-rich cells (MRCs) in the GG and AG, in addition to epithelial ruptures in all exposed groups. Such pathophysiological findings did not compromise the functioning of the organ, however, the osmoregulatory biomarkers showed that there was an osmo-ionic imbalance, which was adjusted by the animal with the proliferation of MRCs at the end of 96 h of exposure. The sublethal concentrations of this study, easily present in the aquatic environment, are not lethal to fish, however, they indicate stress induction and the need for physiological adjustments so that the organisms are in homeostasis. The gills of *O. niloticus* are sensitive to environmental changes and respond, in an integrated way, to the combined effects of multiple xenobiotics in the ecosystem.

**Keywords:** Histopathology; Ecotoxicity; Morphophysiology; Teleost.

## LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Microplásticos comuns em ambientes aquáticos. ....13
- Figura 2.** Estrutura do glifosato. ....14
- Figura 3.** A espécie *Oreochromis niloticus*, a tilápia-do-Nilo. Barra de escala = 1 cm. ....16
- Figura 4.** Estrutura branquial de teleósteos. ....17
- Figura 5.** Morfologia celular das lamelas e filamento de teleósteos. CPi = células pilares; Ci = células indiferenciadas; CPV = células pavimentosas; CC = células-cloreto; SVC = seio venoso central; F= filamento; L = lamela. Barra de escala: 20 µm. ....18
- Figura 6.** Histopatologia branquial de *Oreochromis niloticus* exposto a microplástico, glifosato e associação de ambos. (A) Representação do epitélio branquial normal; (B) Alterações circulatórias; setas indicam hiperemia nas lamelas. (C) Aumento de número e hipertrofia de células ricas em mitocôndrias (setas). (D) as setas indicam rupturas do epitélio lamelar. Coloração: Azul de toluidina. Barra de escala = 20 µm. Objetiva de 40x. ....29
- Figura 7.** Índice de comprometimento morfofuncional das brânquias ( $I_{org}$ ) de *Oreochromis niloticus* após exposição aguda de 96 horas a microesferas de polietileno, glifosato, e associação de ambos. Média ± erro-padrão ( $P<0,05$ ). GC=Grupo controle; GMP=Grupo microplástico; GG=Grupo glifosato e GA=Grupo microplástico + glifosato. Dados apresentados em média ± erro padrão ( $P<0,005$ ). ....30
- Figura 8.** Atividade da  $Na^+/K^+$ -ATPase (A) e  $H^+$ -ATPase (B) branquial, e Anidrase carbônica (C) de *Oreochromis niloticus* exposto a microplástico, glifosato e associação de ambos. GC=Grupo controle; GMP=Grupo microplástico; GG=Grupo glifosato e GA=Grupo microplástico + glifosato. Dados apresentados em média ± erro padrão ( $P<0,005$ ). ....31
- Figura 9.** Densidade de células ricas em mitocôndrias branquiais em *Oreochromis niloticus* após exposição aguda de 96 horas a microesferas de polietileno, glifosato, e associação de ambos. (A) Grupo controle; (B) Grupo microplástico; (C) Grupo glifosato e (D) Grupo microplástico + glifosato. Coloração: Azul de toluidina. Barra de escala = 20 µm. Objetiva de 40x. ....32
- Figura 10.** Determinação da densidade de células ricas em mitocôndrias branquiais nas lamelas (A) e nos filamentos (B) em *Oreochromis niloticus* após exposição aguda de 96 horas a microesferas de polietileno, glifosato, e associação de ambos. GC=Grupo controle; GMP=Grupo microplástico; GG=Grupo glifosato e GA=Grupo microplástico + glifosato. Dados apresentados em média ± erro padrão ( $P<0,005$ ). (\*) significa diferença estatística entre os grupos tratados e controle. (#) significa diferença entre o GMP e GA. ....33



## LISTAS DE TABELAS

- Tabela 1.** Parâmetros hematológicos de *Oreochromis niloticus* após exposição aguda de 96 horas a microesferas de polietileno, glifosato, e associação de ambos. Média ± erro-padrão (P<0,05). (\*) significa diferença entre o grupo tratado e controle. (#) Significa diferença entre o grupo isolado GMP e combinado. ....27
- Tabela 2.** Frequência de micronúcleo e alterações nucleares eritrocitárias de *Oreochromis niloticus* após exposição aguda de 96 horas a microesferas de polietileno, glifosato, e associação de ambos. Média ± erro-padrão (P<0,05). ....28
- Tabela 3** – Frequência de alterações histopatológicas individual ( $I_{alt}$ ) identificadas no tecido branquial *Oreochromis niloticus* após exposição aguda de 96 horas a microesferas de polietileno, glifosato, e associação de ambos. Média ± erro-padrão (P<0,05). (\*) significa diferença entre o grupo tratado e controle. ....28
- Tabela 4.** Concentração de íons plasmáticos ( $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Cl^-$ ) e osmolalidade de *Oreochromis niloticus* após exposição aguda de 96 horas a microesferas de polietileno, glifosato, e associação de ambos. Média ± erro-padrão (P<0,05). ....30

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	11
1.1 Contaminação dos ecossistemas aquáticos	11
1.1.1 Microplásticos	12
1.1.2 Glifosato	14
1.2 O uso de peixes como bioindicadores do ambiente	15
1.2.1 Brânquias como bioindicadoras da saúde animal e ambiental	16
<b>2. Justificativa</b>	20
<b>3. Objetivos</b>	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
<b>4. Materiais e Métodos</b>	22
4.1. Animais	22
4.2 Contaminantes	22
4.3 Delineamento experimental	22
4.4 Parâmetros hematológicos	23
4.5 Teste do micronúcleo e aberrações nucleares eritrocitárias	23
4.6 Histopatologia de brânquias	24
4.7 Determinação da osmolaridade total e concentrações iônicas plasmáticas	24
4.8 Proteína total	24
4.9 Atividade da Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase e H <sup>+</sup> -ATPase branquial	25
4.10 Atividade da anidrase carbônica branquial	25
4.11 Determinação da densidade de células ricas em mitocôndrias em brânquias	26
4.12 Análise estatística	26
<b>5. Resultados</b>	27
<b>6. Discussão</b>	34
<b>7. Conclusão</b>	38
<b>Referências</b>	39

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Contaminação dos ecossistemas aquáticos

A contaminação ambiental é um problema inerente vivenciado e comprovado em vários países, desde os mais industrializados até os países em desenvolvimento (PERES et al., 2001). Tal problema é mais notório no ecossistema aquático por se tratar de um ambiente consideravelmente suscetível à poluição, sendo muitas vezes destino final do despejo de diversos resíduos e poluentes, decorrentes da atividade antrópica (DERRAIK et al., 2002). A contaminação aquática ocorre principalmente pelo processo e uso/descarte de agentes tóxicos e processos como escoamento artificial, lixiviação ou deriva pelo ar (AKERBLUM, 2004).

Um dos problemas ambientais e preocupações da qualidade da água mais relatados é o crescimento do uso indiscriminado de pesticidas para atender a demanda da produção de alimentos (BONOMO et al., 2021). Os pesticidas são divididos em diferentes classes, dentre as quais é sabido que os herbicidas e inseticidas são os mais utilizados, uma vez que, herbicidas são efetivos e uma poderosa ferramenta econômica no gerenciamento da produtividade agrícola (TANG et al., 2018). Entretanto, estes compostos geralmente são associados a causar e potencializar efeitos adversos em organismos aquáticos e na saúde humana (KNISS, 2017).

Adicionados a isso, muito tem se falado sobre “contaminantes emergentes”, no qual são direcionados aos produtos tóxicos que não são removidos ou totalmente eliminados pelos processos de tratamento de água que abastecem o consumo humano. Tanto os herbicidas, fármacos, produtos de higiene pessoal, entre outros, estão incluídos neste conceito, no entanto, frente a identificação de muitos compostos emergentes que desencadeiam riscos ao ambiente e à saúde humana, os polímeros plásticos sintéticos levantam uma preocupação na razão produção/descarte massivo. Esses compostos são altamente persistentes na natureza, uma vez que possui degradação lenta e acumulação rápida (BARNES et al. 2009; THOMPSON et al. 2009; SEDLAK, 2017).

Devido ao seu descarte inadequado, os materiais plásticos têm se tornado onipresente em todos os ecossistemas do planeta e se mostrado um grande problema, no que se refere a contaminação do ambiente aquático atualmente (ANDRADY; NEAL, 2009; ANDRADY, 2011; HAMMER et al., 2012; PlasticsEurope, 2015). No meio aquático, os plásticos absorvem a radiação ultravioleta (UV) da luz solar com reações fotolíticas, foto-oxidativas e termo-oxidativas que resultam na quebra de ligações químicas e na subsequente formação de novos grupos funcionais (SHAH et al., 2008; ANDRADY, 2011). Estes plásticos degradados sob

condições ambientais são fragmentados em partículas de dimensões menores, com dimensões inferiores a 5 mm, são comumente designadas por microplásticos (MP) (ARTHUR et al., 2009; ANDRADY, 2011).

Diversos estudos têm demonstrado que os MP podem causar efeitos diretos quando ingeridos, como por exemplo, a transferência de partículas para níveis superiores da cadeia trófica (WRIGHT et al., 2013). A ingestão de MP pode, ainda, expor os organismos aquáticos a outros aditivos químicos, podendo levar a efeitos sinérgicos adversos (KOELMANS et al., 2014; NA et al., 2021), como por exemplo, a capacidade de MP de polietileno adsorver agrotóxicos prolongando significativamente as meias-vidas de degradação desses pesticidas na água (WANG et al., 2020). Estudos demonstraram que MP juntamente com outros contaminantes podem ser ingeridos e acumulados em organismos aquáticos (WATTS et al., 2014; COLE; GALLOWAY, 2015) e invertebrados terrestres (WARDROP et al., 2016; HODSON et al., 2017; NELMS et al., 2017).

A maioria destes estudos tem focados em efeitos dos MP como vetor de poluentes orgânicos persistentes (BAKIR et al., 2014; MATO et al., 2001; NA et al., 2021). Entretanto, os efeitos combinados de poluentes na saúde, desenvolvimento e crescimentos de organismos aquáticos não são amplamente relatados e, dessa forma, não podem ser ignorados.

### 1.1.1 Microplásticos

Os MP (Figura 1) são um contaminante amplamente estudado e comprovadamente danoso para muitos seres vivos, e tem sido alvo de muitos estudos ecotoxicológicos acerca dos seus efeitos na biota aquática (COLLINGNON et al., 2012; THIEL et al., 2018). Devido sua grande capacidade de persistência e dispersão no ambiente aquático, os MP apresentam grande ameaça a biodiversidade aquática, uma vez que podem ser ingeridos por invertebrados da base da teia trófica marinha e conseqüentemente ser transferidos para níveis tróficos superiores (SETÄLÄ, et al, 2014).

A ingestão de MP pode gerar efeitos diretos e subletais, como, por exemplo, a redução da eficiência reprodutiva, o comprometimento da capacidade de alimentação, lacerações, ulcerações, danos intestinais (LAIST, 1997; DERRAIK, 2002; MOORE, 2008; GREGORY, 2009; LEI, 2017) e a possível exposição a poluentes adsorvidos na superfície de partículas plásticas (TANAKA et al., 2013; CHUA et al., 2014; LAVERS et al., 2014; LAVERS; BOND, 2016).

**Figura 1.** Microplásticos comuns em ambientes aquáticos.



Fonte: LIM (2021)

Os microplásticos podem influenciar potencialmente a toxicidade de outros contaminantes no ambiente aquático. Outra possibilidade é que poluentes com alta afinidade pela superfície dos MP possam se acumular nessas partículas e se dispersar por longas distâncias (TEUTEN et al., 2009). A exposição combinada de pireno e microplásticos, por exemplo, reduz significativamente a atividade da isocitrato desidrogenase, sugerindo uma interação toxicológica da mistura nos mecanismos que levam à inibição enzimática (OLIVEIRA et al, 2013). Portanto, os microplásticos podem ter um efeito negativo direto, mas também podem modificar potencialmente a toxicidade e a biodisponibilidade dos poluentes, os quais indicam que os microplásticos têm potencial para alterar a toxicidade de herbicidas como o glifosato (ZOCCHI; SOMMARUGA, 2019).

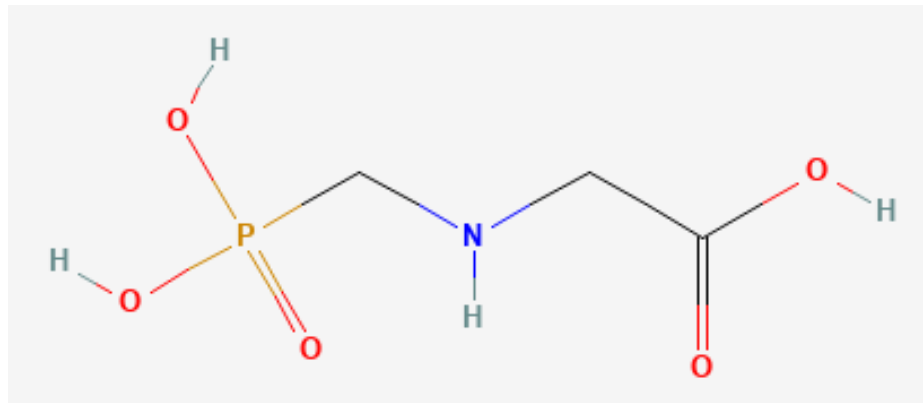
Estudos demonstraram que a presença de microplásticos pode prolongar significativamente as meias-vidas de degradação de pesticidas na água, causando efeitos adversos em brânquias de peixes (WANG et al., 2020; KARBALAEI et al., 2021). A interação com metais pesados causa efeitos combinados mais severos do que os contaminantes sozinhos (RODA et al., 2020), além de causar maior toxicidade e de aumentar sua bioconcentração na biota (NA et al., 2021).

Os efeitos combinados do MP com glifosato demonstraram toxicidade para *Daphnia magna* (ZOCCHI; SOMMARUGA, 2019), entretanto, os efeitos para vertebrados como os peixes, permanecem não relatados.

### 1.1.2 Glifosato

O glifosato (N-(fosfonometil)glicina) (Figura 2), pesticida da classe dos herbicidas, trata-se de um produto não-seletivo, sistêmico e pós-emergente o qual apresenta elevada eficiência na eliminação de ervas daninhas (GONÇALVES et al., 2019). É um herbicida que possui uma meia-vida de 7 a 142 dias na água e 76 a 240 no solo, possui elevada solubilidade em água (10.000–15.700 mg L<sup>-1</sup> a 25°C), facilitando sua dissolução e dispersão em um ambiente aquático (ANNETT et al., 2014; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2022). Importante ressaltar que, com a implementação dos transgênicos, resistentes a herbicidas, o glifosato tornou-se produto imprescindível à agricultura, tendo seu consumo aumentado significativamente (CUNHA, 2005). Além disso, na região da Amazônia Legal, por exemplo, o herbicida vem sendo utilizado no combate às ervas daninhas que crescem em torno dos tanques de piscicultura (PORTO, 2005).

**Figura 2.** Estrutura do glifosato



**Fonte:** National Center for Biotechnology Information (2022).

O mecanismo de ação do glifosato em plantas é bastante singular, pelo fato de ser o único herbicida capaz de inibir especificamente a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfatossintase (EPSPs), a qual é responsável por catalisar a condensação do ácido chiquímico e do fosfato piruvato, evitando assim, a síntese de três aminoácidos essenciais – triptofano, fenilalanina e tirosina (JAWORSKI, 1972; ZABLOTOWICZ; REDDY, 2004). Essa enzima não existe na maioria dos animais, como os peixes, sendo assim, é considerada de baixa toxicidade para esses animais (FAO/WHO, 1986). Entretanto, estudos já demonstraram efeitos potencialmente negativos dessa categoria de herbicida em peixes, como alterações hepáticas, cerebrais e musculares, devido as alterações na atividade da acetilcolinesterase (MODESTO;

MARTINEZ, 2010), alterações histopatológicas branquiais e em fígado (BRAZ-MOTA et al., 2015), e estresse oxidativo (TEIXEIRA et al., 2018).

É sabido que, a presença de glifosato com surfactantes pode causar toxicidade em organismos aquáticos (RAMÍREZ et al., 2009; RONDÓN-BARRAGÁN et al., 2012). Além deste tipo de interação, a exposição combinada de glifosato com antibióticos, pode promover o crescimento de cianobactérias tóxicas e induzindo uma toxicidade indireta (XU et al., 2021). A interação de glifosato e MP podem estar ligados às diferentes propriedades de sorção de formulações químicas à base de glifosato (ZOCCHI; SOMMARUGA, 2019).

## 1.2 O uso de peixes como bioindicadores do ambiente

Os peixes são excelentes bioindicadores do ecossistema aquático por serem organismos pertencentes ao topo da cadeia trófica desses ambientes e possuírem intrínseca relação com os demais organismos. Esses organismos são sensíveis às alterações nesse ambiente indicando respostas de efeitos agudos e crônicos, acumulativos e persistentes no nível de cadeia; refletindo na qualidade da água e na saúde dos próprios indivíduos (LINS et al., 2010; PAULINO, 2011; LIMA et al., 2018).

O uso de peixes em estudos ecotoxicológicos não se restringe apenas na avaliação do número e abundância de espécies nos ecossistemas, mas permite uma análise mais detalhada da condição de saúde de cada espécie, utilizando biomarcadores (PAULINO, 2011). Os peixes respondem as mudanças nos mais diversos níveis estruturais, desde fatores celulares, morfofisiológicos, bioquímicos, genéticos até variações nos padrões comportamentais (LINS et al., 2010; LIMA et al., 2018).

A tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758) (Figura 3), é originária da África e do Oriente Médio, atualmente é considerada um dos peixes mais produzidos e comercializados internacionalmente, e sua ampla distribuição geográfica pelo mundo deve-se principalmente a seus diversos habitats ecológicos (McANDREW et al., 2016; FAO, 2019). São encontradas naturalmente em uma extensa variedade de ecossistemas tropicais e subtropicais, trata-se de uma espécie com elevada taxa de crescimento em diversos métodos de produção, tem hábito alimentar onívoro, mas com boa conversão alimentar, capacidade de reprodução em cativeiro e é de grande interesse para o mercado consumidor (RODRIGUES et al., 2015).

A espécie *Oreochromis niloticus* é uma espécie bastante econômica e ecologicamente importante para os ecossistemas aquáticos dulcícolas (BIGINAGWA et al., 2016). Alguns

trabalhos de biomonitoramento ambiental tem utilizado a tilápia-do-Nilo como bioindicadora da qualidade do ecossistema e em estudos em laboratório, nos quais se demonstram um importante bioindicador de toxicidade (GADAGBUI et al., 1996; ALMEIDA et al., 2002; FIGUEIREDO-FERNADES et al., 2006). Alguns estudos têm utilizado *O. niloticus* em estudos com MP, envolvendo toxicidade via ingestão (BIGINAGWA et al., 2016), acumulação e alterações teciduais (DING et al., 2020; ZHANG et al., 2022).

**Figura 3.** A espécie *Oreochromis niloticus*, a tilápia-do-Nilo. Barra de escala = 1 cm.



Fonte: Autor

Partindo desse princípio, as brânquias que exercem papel fundamental para a sobrevivência e adaptação de peixes, sendo principal sítio de trocas gasosas e responsável pela regulação osmo-iônica e homeostase, tem demonstrado ser um ótimo bioindicador da qualidade da água e amplamente utilizado em estudos ecotoxicológicos da saúde desses animais (MACHADO, 1999; EVANS et al., 2005).

### 1.2.1 Brânquias como bioindicadoras da saúde animal e ambiental

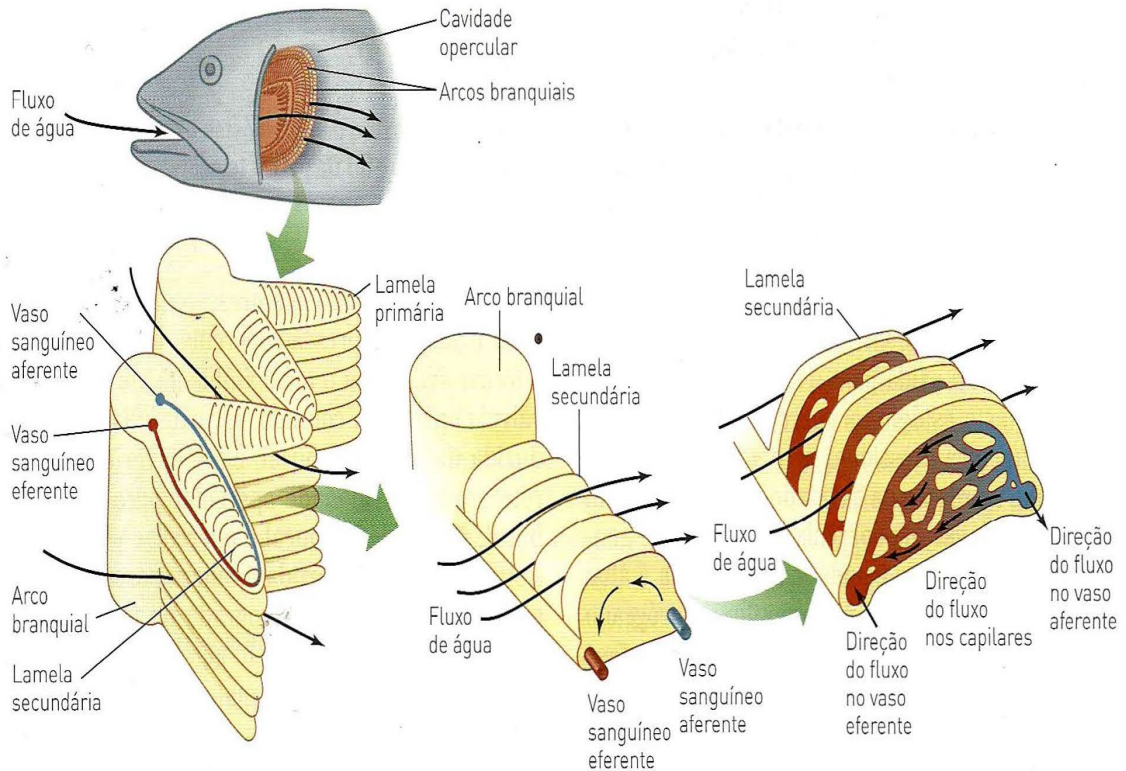
A brânquia dos peixes é um órgão sofisticado e delicado, responsável por desempenhar múltiplas funções fisiológicas, tais como osmorregulação, regulação ácido-base e excreção de nitrogênio, além de realizar as trocas gasosas. A interrupção de qualquer uma dessas funções pode ser fatal ao organismo (SU et al. 2019).

Morfologicamente, as brânquias dos peixes são formadas por quatro arcos branquiais dispostos lateralmente na cavidade orofaríngea. Em cada arco, existem filamentos branquiais dotados de lamelas transversais responsáveis pelas trocas gasosas (Figura 4). A circulação



branquial consiste em um circuito arterial-venoso que consiste em um fluxo de modo contracorrente com o fluxo da água entre elas (EVANS et al., 2005).

**Figura 4.** Estrutura branquial de teleósteos.



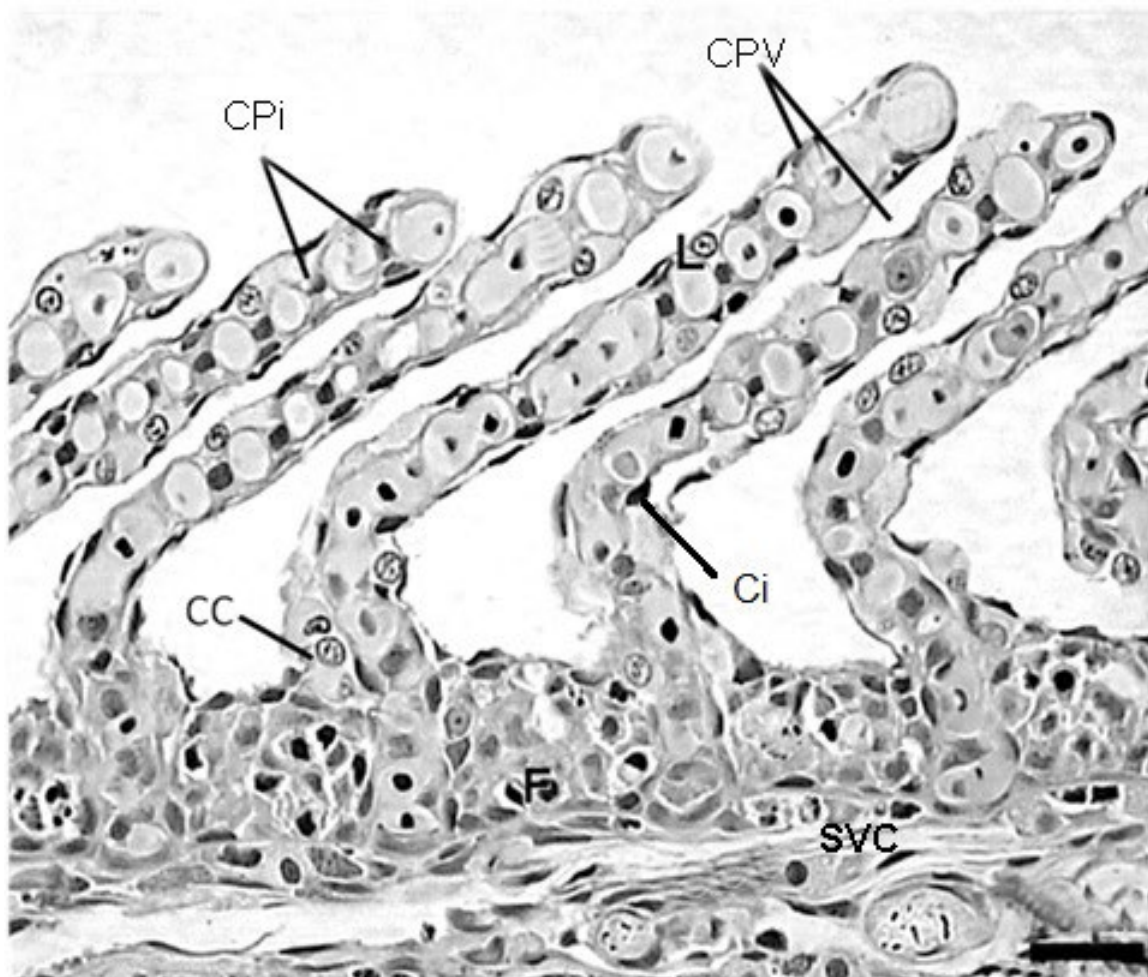
Fonte: MOYES; SCHULTE (2010)

O epitélio das brânquias é a área de interação entre fluido extracelular e ambiente, isto é, possui uma vasta área de contato com o meio externo, favorecendo as trocas gasosas e confirmando-se como um órgão bioindicador extremamente eficiente à saúde animal e ambiental por estar em contato diretamente com o ambiente externo e desempenhar funções vitais para o organismo (EVANS et al., 2005; LINS et al., 2010; PAULINO, 2011).

As células que constituem o epitélio do filamento e lamelas são denominadas células indiferenciadas, células neuroepiteliais, células ricas em mitocôndrias (CRMs), células mucosas e células pavimentosas (MORON et al., 2009) (Figura 5). As células pavimentosas recobrem o epitélio branquial, formando uma fina camada nas lamelas, que são estruturadas pelas células pilares, as quais são responsáveis pela formação de espaços por onde o sangue flui entre a lamela nas trocas gasosas. As células mucosas são localizadas nas bordas do filamento e produzem mucosubstâncias que protegem o epitélio de substâncias abrasivas, poluentes e patógenos (MORON et al., 2009). As CRMs estão presentes na base do epitélio do filamento e

são as principais células de absorção ativa dos íons sódio, cloreto e cálcio em peixes de água doce. Sua presença nas lamelas consiste de algumas condições ambientais do ecossistema (EVANS et al., 2005).

**Figura 5.** Morfologia celular das lamelas e filamento de teleósteos. CPi = células pilares; Ci = células indiferenciadas; CPV = células pavimentosas; CC = células-cloreto; SVC = seio venoso central; F= filamento; L = lamela. Barra de escala: 20 µm.



Fonte: Paulino, M.G. (2011)

Um biomarcador pode ser uma alteração bioquímica, fisiológica ou morfológica em resposta ao contato de um organismo com um agente estressor ou o efeito do mesmo (MELANCON, 1995; PAULINO, 2011). Esses biomarcadores são excelentes ferramentas para monitorar a saúde dos ecossistemas aquáticos e vêm sendo utilizados em estudos ecotoxicológicos e monitoramento ambiental de diversos. Apresentam boa sensibilidade frente aos contaminantes auxiliando rapidamente na identificação dos mecanismos básicos da relação causal entre o estressor e seus efeitos (BAINY, 1993; ADAMS, 2002).

A utilização de biomarcadores bioquímicos em avaliações de risco ecológico de ecossistemas aquáticos e na determinação dos efeitos causados por xenobióticos é bastante

ampla, conferindo algumas vantagens, pois comumente são os primeiros a serem detectados. São muito sensíveis, apresentam alta especificidade, são de baixo custo e fornecem informações do efeito metabólico causado pelos xenobióticos, como os pesticidas (AMORIN, 2003; PAULINO, 2011). Sua utilização tem se difundido devido ao seu potencial como sistemas rápidos de alerta precoce para efeitos prejudiciais ao organismo e em níveis mais elevados (WU et al. 2014; UÇAR et al. 2020).

Alterações morfológicas no tecido branquial podem afetar direta ou indiretamente funções essenciais ao organismo, como trocas gasosas e o equilíbrio osmo-iônico, e representar estratégias adaptativas e/ou compensatórias frente as demais mudanças na qualidade da água (LAURENT; PERRY, 1991; PAULINO, 2011), tendo em vista a exposição de grandes áreas desse tecido ao ambiente e todos os demais contaminantes nele presente, as brânquias são um excelente biomarcador da saúde de peixes frente à exposição a contaminantes (MACHADO, 1999).

## 2. JUSTIFICATIVA

A preocupação recente acerca dessas partículas na biota aquática e a constatação desse problema ambiental, geram questionamentos sobre as consequências disso para os seres desse habitat. Diante disso, diariamente surgem novas perguntas no que refere aos possíveis efeitos que esse contaminante causa nos diferentes níveis tróficos, e como essas partículas microscópicas podem interagir ou adentrar no organismo desses seres.

Considerando o predito e o fato de que ainda os efeitos toxicológicos dos MP em organismos de água doce são escassos, inicialmente foram abordados neste estudo a toxicidade de MP e a escassez de trabalhos que trazem dados sobre sua toxicidade em associação a outros contaminantes. Dessa forma, sabido que em todos os ambientes aquáticos são encontrando MP, associado ao risco dos agrotóxicos lixiviados, o estudo focou em elucidar o comprometimento morfofuncional em brânquias dos peixes e alterações que afetam a saúde dos animais e potencialmente seus consumidores.

A presença de múltiplos compostos no meio ambiente aquático pode comprometer a função osmorregulatória e saúde dos peixes, levando a alterações nos órgãos como brânquias e à mortalidade. Entretanto, ainda é escasso informações que relatem os efeitos combinados de MP e glifosato em águas doce. Muitos estudos utilizam os princípios ativos brutos, entretanto, produtos formulados comerciais são ainda menos estudados. Ainda, este estudo corroborou em elucidar ao máximo os impactos dos MP e herbicida que são encontrados em águas no Brasil e seus efeitos sobre a biota.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos de concentrações subletais de microplásticos de polietileno e glifosato, isolados e associados, em brânquias de tilápia (*Oreochromis niloticus*) utilizando diferentes biomarcadores de toxicidade.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Avaliar o comprometimento morfofuncional nas brânquias de *Oreochromis niloticus* expostos à MP, Glifosato e combinados, através de análises fisiológicas e histopatológicas.
2. Avaliar os efeitos na osmorregulação e no equilíbrio iônico de *Oreochromis niloticus* expostos a concentrações subletais de microplásticos, do glifosato e da associação dos dois contaminantes por 96 horas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Juvenis de tilápia (*Oreochromis niloticus*, n= 40;  $15,75 \pm 0,3$  cm;  $68,39 \pm 3,2$  g) foram adquiridos no Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais situado no campus da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMVZ), da Universidade Federal do Tocantins, em Araguaína e, em seguida, transportados até o Laboratório de Morfofisiologia Animal Comparada – LaMAC, campus CIMBA, onde os animais foram aclimatados por um período de 30 dias em tanques com capacidade de 500 litros com aeração artificial constante, temperatura  $\pm 25$  °C, pH 6,5, fotoperíodo natural e alimentação com ração balanceada (40% proteína) uma vez ao dia.

### 4.2 Contaminantes

O herbicida utilizado neste estudo foi a formulação comercial do ROUNDUP WG®, o qual tem como princípio ativo o glifosato (Sal de Amônio de Glifosato 792,5 g/kg -720 g/kg equivalente ácido), registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob o nº 2094.

O microplástico utilizado foram microesferas de polietileno (100% polietileno), menores que 1 mm, utilizadas na fabricação de produtos de higiene pessoal, adquiridos comercialmente.

### 4.3 Delineamento Experimental

No Laboratório de Morfofisiologia Animal Comparada (LaMAC) os peixes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=10), sendo um livre dos contaminantes (GC-controle), um grupo exposto ao microplástico (GMP;  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ), outro grupo exposto ao glifosato (GG;  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ), e um grupo exposto a associação de ambos (GA; microplástico  $5 \text{ mg L}^{-1}$  e herbicida  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ). As concentrações individuais e combinadas basearam-se em concentrações frequentemente encontradas em ecossistemas aquáticos e consideradas não letais para *O. niloticus*.

Os animais foram expostos em aquários de 150 L de modo agudo, por 96 horas. Em seguida, os animais foram anestesiados (benzocaína  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ) para coleta de amostras de sangue (0,5 mL), obtidas via punção caudal com seringas heparinizadas para obtenção de plasma

sanguíneo para análise hematológica, genotóxica e da osmolalidade e concentração iônica plasmática. Após biometria, ocorreu a eutanásia por secção medular para obtenção das brânquias. Sub-amostras deste tecido foram congeladas imediatamente (-80°C) para análises dos biomarcadores bioquímicos e fisiológicos e, outras sub-amostras, foram fixadas em solução de Glutaraldeído 2,5% (GTA 2,5%; em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,3) para análises de biomarcadores morfológicos.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética animal local CEUA-UFT, nº 23.101.002.470/2020-17.

#### **4.4 Parâmetros hematológicos**

Ainda no LaMAC microcapilares com sangue foram confeccionados segundo a metodologia de Goldenfarb et al. (1971) para a determinação do hematócrito (Hct). Após centrifugação (12000 g, 3 min), a porcentagem de eritrócitos foi obtida através de um cartão padrão de leitura para Hct. O número de eritrócitos (RBC) foi determinado em solução de formol citrato e analisados em câmara de Neubauer utilizando microscópio óptico (em aumento de 400x) e expresso em  $10^6$  células  $\text{mm}^3$ . A hemoglobina (Hb;  $\text{g dL}^{-1}$ ) foi determinada segundo Collier (1994) com diluição de sangue em solução de Drabkin. A densidade foi mensurada a 540 nm em espectrofotômetro. Os índices hematimétricos (volume corpuscular médio – VCM; hemoglobina corpuscular média – HCM e concentração de hemoglobina corpuscular média – CHCM) foram determinados a partir das variáveis hematológicas.

Extensões sanguíneas foram confeccionadas, secas em temperatura ambiente, fixadas e coradas utilizando um kit Panótico Rápido (Lio Serum, Laborclin). As análises de contagem diferencial de leucócitos, número total de leucócitos e trombócitos foram calculados a partir do número total de eritrócitos (3000 células sanguíneas), segundo a metodologia proposta por Tavares-Dias et al. (2002).

#### **4.5 Teste do Micronúcleo e Aberrações Nucleares Eritrocitárias**

O teste de micronúcleo (MN) e ocorrências de alterações nucleares eritrocitárias (ANEs) foi feito de acordo com proposto por Hoofman e Haat (1982) e Carrasco et al. (1990) com modificações (CAVALCANTI et al., 2008). Extensões sanguíneas foram fixadas em metanol 100% e coradas com Giemsa (5%). As análises foram feitas no LaMAC (UFNT) em microscópio óptico, com magnificação em 1000x, com contagem realizada em 3000 eritrócitos.

#### 4.6 Histopatologia de brânquias

As amostras de brânquias fixadas foram utilizadas para análises histopatológicas baseada na metodologia de Paulino et al. (2020). As amostras foram desidratadas em series crescentes em etanol e embebidas em resina histológica (Leica®). Secções dos tecidos foram preparadas em 3 µm e corados com azul de toluidina. Cinco secções foram analisadas utilizando 5 campos aleatórios na amostra, totalizando 25 campos.

A classificação do índice de alteração individual de lesão ( $I_{alt}$ ) foi baseada em um escore numérico ( $Sc$ ) que relaciona a frequência de aparição da alteração, e um fator de importância ( $Fi$ ), o qual indica severidade da lesão no órgão ( $I_{alt} = Sc \times Fi$ ). O índice que indica o comprometimento do órgão ( $I_{org}$ ) foi baseado na somatória dos  $I_{alt}$  e expresso como média do grupo ( $I_{org} = \Sigma I_{alt}$ ).

#### 4.7 Determinação da osmolalidade total e concentrações iônicas plasmática

A osmolalidade plasmática total foi realizada na Universidade Federal de São Carlos em um microsmômetro (µOSMETTE PRECISION SYSTEM) que tem como base o ponto de congelamento, e expressada em mOsmol Kg<sup>-1</sup>.

As concentrações dos íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> foram determinadas em fotômetro de chama (DIGMED DM-61) (UFSCAR). A concentração de íons Cl<sup>-</sup> foi determinada utilizando um kit comercial (LABTEST®) com absorvância de 490 nm, em uma leitora de microplaca. As concentrações de íons plasmáticos foram expressas em mEq L<sup>-1</sup>.

#### 4.8 Proteína total

O teor da proteína total (mg proteína<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>), do fígado, músculo e plasma, para as todas as análises bioquímicas foi determinado segundo o método de Bradford utilizando coomassie brilliant blue G-250 (BRADFORD, 1976) na UFSCAR, adaptado para leitura em microplaca (Dynex Technologies Ltd., MRXTC, UK), conforme descrito por Kruger (1994) e utilizando a albumina bovina (1 mg mL<sup>-1</sup>) como padrão. A absorvância das amostras foi medida a 595 nm.



#### 4.9 Atividade da Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-ATPase (NKA) e H<sup>+</sup>-ATPase (HA) branquial

A determinação da atividade da NKA ( $\mu\text{mol ATP mg proteína}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) e da HA ( $\text{U mg h}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$ ) em brânquias foram realizadas na UFSCAR, seguindo método de Gibbs e Somero (1989), com adaptações de Kultz e Somero (1995) e Gonzáles et al. (2005). Os filamentos branquiais foram homogeneizados individualmente em tampão SEID 0,5% (Sacarose – 150mM; Imidazol – 50mM; EDTA – 10mM; desoxicolato de sódio 1%) e centrifugados a 3200 RPM por 7 minutos a 4°C. Os ensaios são baseados na desfosforilação do ATP para a oxidação do NADH, sendo a atividade da NKA determinada na fração sensível a ouabaína, enquanto a fração sensível a N-Etilmaleimida (NEM) foi utilizada para avaliar a atividade da HA, sendo assim a atividade foi determinada pela taxa total em relação à taxa específica de inibidor específico à enzima (ouabaína para NKA e NEM para HA).

De forma sucinta, cada poço da microplaca continha 5  $\mu\text{l}$  de amostra homogeneizada de brânquia e 200  $\mu\text{l}$  de tampão de reação (30mM – imidazol; 45mM – NaCl; 15mM – KCl; 3mM –  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,4 – KCN; 1mM – ATP; 0,2mM – NADH; 3 U/mL – PK; 2 U/mL – LDH; 0,1mM – Frutose; 2mM – PEP) sozinho ou com 2 mM de ouabaína ou 10 mM de NEM. As leituras foram realizadas a 340 nm, em triplicata, a cada 1 min durante 10 min em leitor de microplaca SpectraMax M5 (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA). A concentração de proteína do homogeneizado foi determinada usando reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e albumina proveniente de soro bovino (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) como padrão, com medições feitas em 595 nm.

#### 4.10 Atividade da anidrase carbônica branquial

Amostras dos filamentos branquiais foram homogeneizadas em tampão (Manitol – 225mM; Sacarose – 75mM; Trifosfato – 10mM; pH – 7,4) e centrifugadas a 10.000g a 4°C. A atividade branquial da AC foi realizada na UFSCAR, e determinada segundo protocolo descrito por Vitale et al. (1999). A atividade da anidrase carbônica foi determinada pela adição de 7,5 mL de meio de reação em 0,05 mL de homogeneizado de tecido e 1 mL de água destilada saturada com CO<sub>2</sub> a 2,5°C. A variação de pH foi medida no decorrer de 20 segundos utilizando um medidor de pH (3510 Jenway, UK). A atividade enzimática foi determinada pela razão entre os declives de regressões lineares das reações não-catalisadas e catalisadas, sendo expressa em U mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### **4.11 Determinação da densidade de células ricas em mitocôndrias em brânquias**

Amostras de brânquias foram fixadas em Glutaraldeído (GTA) 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH7,4. Em seguida, foram desidratadas em bateria crescente de etanol (50-100%) na EMVZ e incluídas em historesina Leica® na UFSCAR. Secções histológicas de 3 µm foram realizadas e posteriormente coradas com azul de toluidina. A determinação da CRMs foi realizada seguindo método de Costa et al. (2017). Brevemente, no LaMAC (UFNT) foi utilizado 5 secções por animal em 5 lamelas consecutivas e respectiva regiões interlamelares, por secção, totalizando 125 lamelas. Toda análise foi realizada utilizando método cego ao observador.

#### **4.12 Análise estatística**

Os resultados estão apresentados como média ± erro-padrão da média. Após submetidos ao teste de normalidade (D'Agostino & Pearson), as diferenças entre os animais expostos em relação aos animais controle foram detectadas por análise de variância (ANOVA) one-way, seguida pelo pós-teste de Bonferroni, utilizando software GraphPad Prism 5.0.

Diferenças estatisticamente significantes foram consideradas quando  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

## 5. RESULTADOS

Nenhum animal morreu durante os experimentos. Os resultados dos parâmetros hematológicos (Tabela 1), demonstram que houve aumento de 28 % do HCM no grupo expostos aos contaminantes associados e aumento de 42 % no grupo GA em relação ao grupo GMP. Nos parâmetros leucocitários foi observado um aumento no número total de trombócitos no grupo GMP.

**Tabela 1.** Parâmetros hematológicos de *Oreochromis niloticus* após exposição aguda de 96 horas a microesferas de polietileno, glifosato, e associação de ambos. Média  $\pm$  erro-padrão ( $P < 0,05$ ). (\*) significa diferença entre o grupo tratado e controle. (#) Significa diferença entre o grupo isolado GMP e combinado

<b>Parâmetros Hematológicos</b>				
	GC	GMP	GG	GA
<b>Parâmetros eritrocitários</b>				
HCT (%)	24,7 $\pm$ 1,9	27,9 $\pm$ 2,1	26,0 $\pm$ 1,9	26,7 $\pm$ 1,5
Hb (g dL <sup>-1</sup> )	7,7 $\pm$ 0,5	7,6 $\pm$ 0,3	6,5 $\pm$ 0,5	8,7 $\pm$ 0,7
RBC (10 <sup>4</sup> células mm <sup>3</sup> )	189,6 $\pm$ 17,9	210,2 $\pm$ 12,2	162,1 $\pm$ 13,6	169,1 $\pm$ 10,2
VCM ( $\mu$ m <sup>3</sup> )	131,6 $\pm$ 9,6	130,8 $\pm$ 9,0	159,6 $\pm$ 11,2	175,3 $\pm$ 15,3
HCM (pg célula <sup>-1</sup> )	42,7 $\pm$ 2,5	38,4 $\pm$ 1,2	38,3 $\pm$ 1,7	54,9 $\pm$ 4,9*#
CHCM (g dL <sup>-1</sup> )	33,2 $\pm$ 1,9	30,0 $\pm$ 1,5	26,1 $\pm$ 1,4	29,1 $\pm$ 3,0
<b>Parâmetros leucocitários</b>				
Leucócitos totais (10 <sup>3</sup> )	4,1 $\pm$ 0,9	3,8 $\pm$ 0,5	2,6 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,3
Trombócitos totais (10 <sup>3</sup> )	0,7 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,2*	1,0 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,2
Linfócitos (%)	56,6 $\pm$ 2,6	51,7 $\pm$ 2,1	56,9 $\pm$ 2,5	61,2 $\pm$ 2,5
Monócitos (%)	4,0 $\pm$ 0,8	8,5 $\pm$ 1,7	7,7 $\pm$ 1,4	4,0 $\pm$ 0,7
Neutrófilos (%)	39,2 $\pm$ 2,4	40,9 $\pm$ 1,4	35,3 $\pm$ 2,1	34,9 $\pm$ 2,2
LG-PAS (%)	0	0,1 $\pm$ 0,07	0,05 $\pm$ 0,05	0,1 $\pm$ 0,06
Eosinófilos (%)	0	0	0	0
Basófilos (%)	0	0	0	0

GC = Grupo controle; GMP = Grupo microplástico; GG = Grupo glifosato; GA = Grupo associado.

Não houve alterações nos biomarcadores genotóxicos (Tabela 2), como também não foram observados presença de MN e as ANEs não demonstraram diferenças na frequência de núcleos alterados em relação ao controle e demais grupos tratados.

**Tabela 2.** Frequência de micronúcleo e alterações nucleares eritrocitárias de *Oreochromis niloticus* após exposição aguda de 96 horas a microesferas de polietileno, glifosato, e associação de ambos. Média  $\pm$  erro-padrão ( $P < 0,05$ ).

<b>Biomarcadores Genotóxicos</b>				
	GC	GMP	GG	GA
Micronúcleo (%)	0	0	0	0
Núcleo lobulado (%)	0,1 $\pm$ 0,04	0,1 $\pm$ 0,06	0,1 $\pm$ 0,07	0,2 $\pm$ 0,03
Núcleo binucleado (%)	0,005 $\pm$ 0,005	0,008 $\pm$ 0,005	0,008 $\pm$ 0,005	0,02 $\pm$ 0,005
Núcleo vacuolado (%)	0,08 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,02
Núcleo indentado (%)	0,4 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,07	0,2 $\pm$ 0,1
Núcleo reniforme (%)	0,06 $\pm$ 0,05	0,07 $\pm$ 0,03	0,03 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,04
Núcleo segmentado (%)	0,01 $\pm$ 0,01	0,004 $\pm$ 0,003	0,02 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,007

GC = Grupo controle; GMP = Grupo microplástico; GG = Grupo glifosato; GA = Grupo associado.

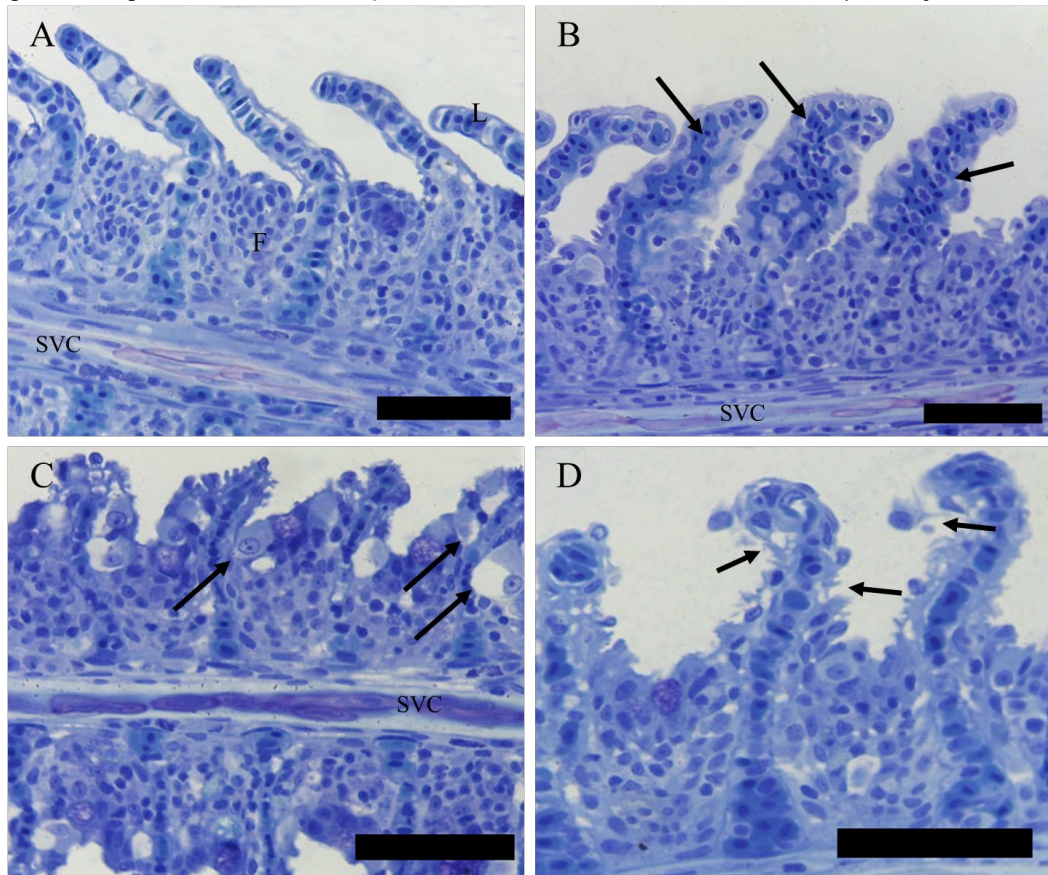
Nas análises histopatológicas foram observadas alterações nas patologias individuais em brânquias de *O. niloticus* (Figura 6). Os valores médios do  $I_{alt}$  estão representados na Tabela 3.

**Tabela 3** – Frequência de alterações histopatológicas individual ( $I_{alt}$ ) identificadas no tecido branquial *Oreochromis niloticus* após exposição aguda de 96 horas a microesferas de polietileno, glifosato, e associação de ambos. Média  $\pm$  erro-padrão ( $P < 0,05$ ). (\*) significa diferença entre o grupo tratado e controle.

<b>Índice de Alteração Individual das Brânquias - <math>I_{alt}</math></b>				
	GC	GMP	GG	GA
Atrofia celular	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Alteração estrutural de células pilares	2,8 $\pm$ 0,6	3,1 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 0,5
Alterações circulatórias	2,5 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,2*	1,5 $\pm$ 0,3
Hipertrofia do epitélio lamelar	1,3 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,2
Descolamento epitelial e edemas	3,5 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,3
Fusão parcial das lamelas	0,8 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,2
Fusão total de lamelas	0,7 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,7	0,5 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,3
Hiperplasia do epitélio	1,0 $\pm$ 0,7	1,3 $\pm$ 0,7	1,0 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,7
Alterações em células ricas mitocôndrias	0,5 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,6	2,0 $\pm$ 0,4*	2,1 $\pm$ 0,4*
Alterações em células mucosas	2,3 $\pm$ 0,4	2,8 $\pm$ 0,6	1,2 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,2
Ruptura do epitélio	0,7 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 0,7*	5,0 $\pm$ 0,9*	3,7 $\pm$ 1,2*

GC = Grupo controle; GMP = Grupo microplástico; GG = Grupo glifosato; GA = Grupo associado.

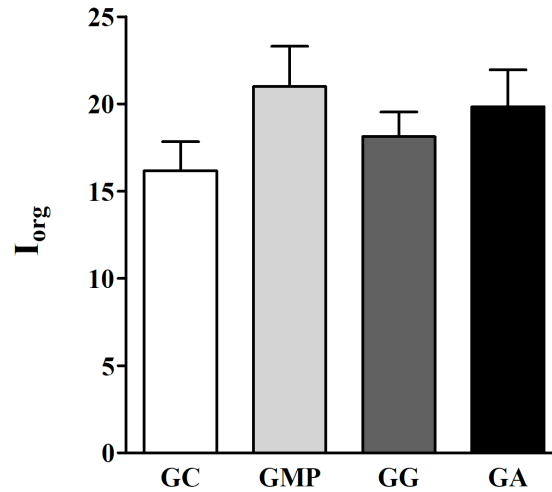
**Figura 6.** Histopatologia branquial de *Oreochromis niloticus* exposto a microplástico, glifosato e associação de ambos. (A) Representação do epitélio branquial normal; (B) Alterações circulatórias; setas indicam hiperemia nas lamelas. (C) Aumento de número e hipertrofia de células ricas em mitocôndrias (setas). (D) as setas indicam rupturas do epitélio lamelar. Coloração: Azul de toluidina. Barra de escala = 20  $\mu$ m. Objetiva de 40x.



Fonte: autor

Houve diminuição de alterações circulatórias no grupo GG, as CRMs aumentaram em GG e GA em relação ao controle e houve aumento de ruptura epitelial em todos os grupos tratados. O comprometimento morfofuncional do órgão, representado pelo  $I_{org}$ , demonstra que não houve alterações que comprometam o bom funcionamento das brânquias frente às exposições (Figura 7).

**Figura 7.** Índice de comprometimento morfofuncional das brânquias ( $I_{org}$ ) de *Oreochromis niloticus* após exposição aguda de 96 horas a microesferas de polietileno, glifosato, e associação de ambos. Média  $\pm$  erro-padrão ( $P < 0,05$ ). GC=Grupo controle; GMP=Grupo microplástico; GG=Grupo glifosato e GA=Grupo microplástico + glifosato. Dados apresentados em média  $\pm$  erro padrão ( $P < 0,005$ ).



Fonte: autor

Não houve alteração na concentração dos íons sódio, potássio e cloreto plasmático nos grupos expostos (Tabela 4).

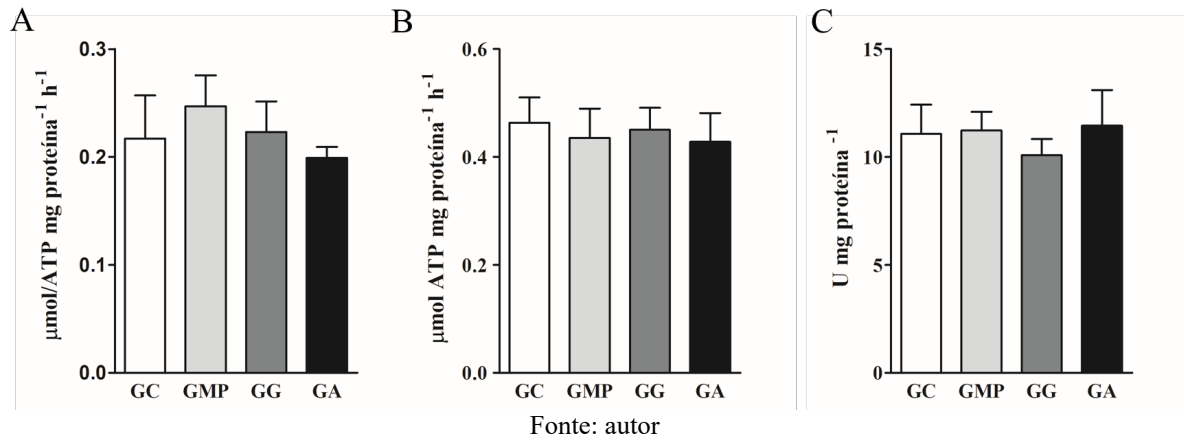
**Tabela 4.** Concentração de íons plasmáticos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) e osmolalidade de *Oreochromis niloticus* após exposição aguda de 96 horas a microesferas de polietileno, glifosato, e associação de ambos. Média  $\pm$  erro-padrão ( $P < 0,05$ ).

<b>Concentração da osmolalidade e íons plasmáticos</b>				
<i>Variáveis</i>	GC	GMP	GG	GA
$\text{Na}^+$ (mEq $\text{L}^{-1}$ )	185,8 $\pm$ 11,5	188,7 $\pm$ 11,6	191,1 $\pm$ 6,0	171,0 $\pm$ 12,1
$\text{K}^+$ (mEq $\text{L}^{-1}$ )	3,58 $\pm$ 0,28	3,72 $\pm$ 0,26	4,21 $\pm$ 0,35	4,04 $\pm$ 0,34
$\text{Cl}^-$ (mEq $\text{L}^{-1}$ )	122,6 $\pm$ 2,6	138,4 $\pm$ 6,7	127,9 $\pm$ 4,3	129,0 $\pm$ 5,2
Osmolalidade (mOsmol $\text{Kg}^{-1}$ )	266,2 $\pm$ 8,6	284,0 $\pm$ 2,9	275,0 $\pm$ 7,1	245,8 $\pm$ 16,1

GC = Grupo controle; GMP = Grupo microplástico; GG = Grupo glifosato; GA = Grupo associado.

As atividades das enzimas NKA (Figura 8A), HA (Figura 8B) e AC (Figura 8C) mantiveram-se inalteradas em todos os grupos tratados.

**Figura 8.** Atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (A) e  $\text{H}^+$ -ATPase (B) branquial, e Anidrase carbônica (C) de *Oreochromis niloticus* exposto a microplástico, glifosato e associação de ambos. GC=Grupo controle; GMP=Grupo microplástico; GG=Grupo glifosato e GA=Grupo microplástico + glifosato. Dados apresentados em média  $\pm$  erro padrão ( $P < 0,005$ ).

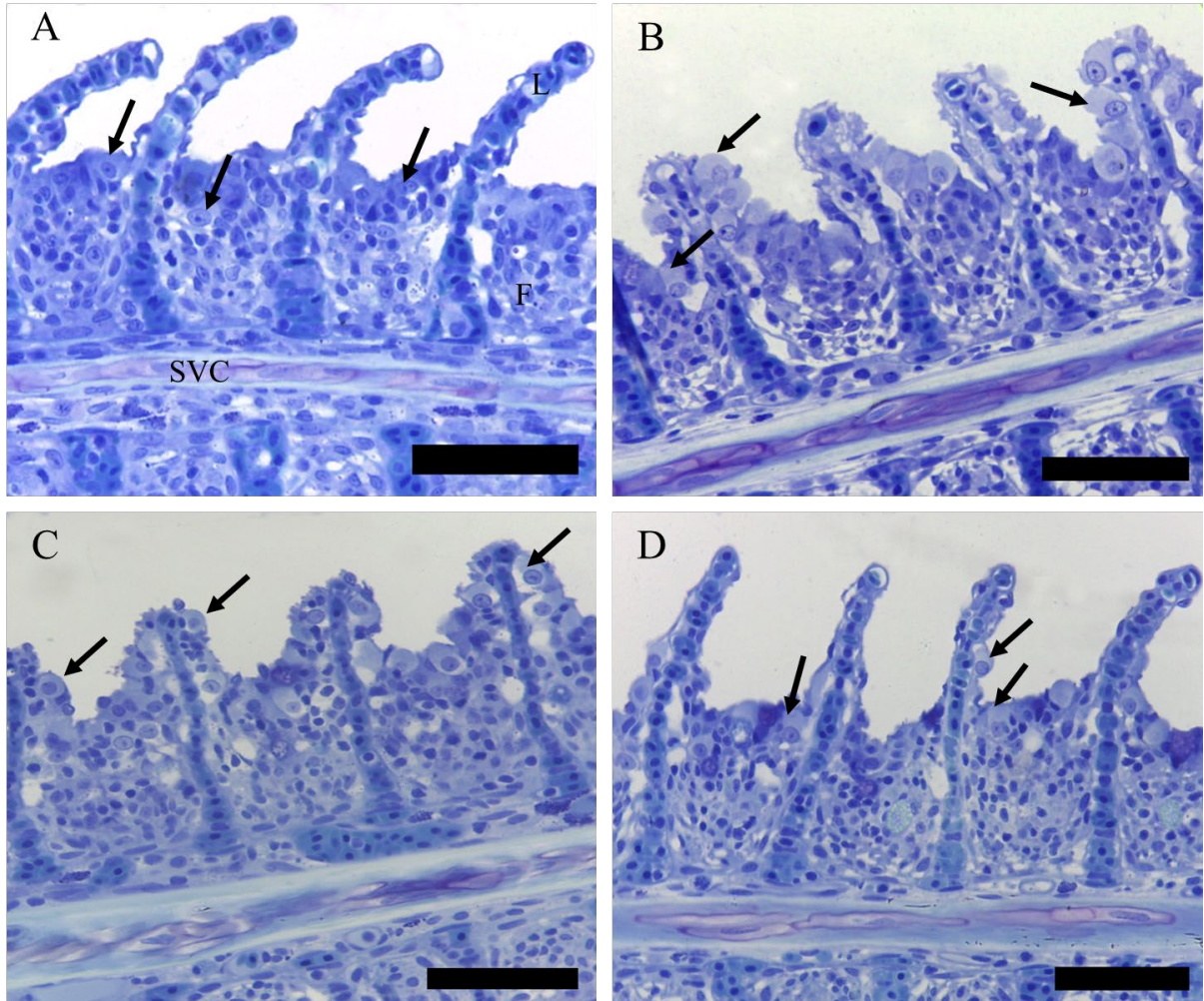


A morfologia dos filamentos branquiais de *O. niloticus* s\u00e3o similares aos demais tele\u00f3steos e a distribui\u00e7\u00e3o e localiza\u00e7\u00e3o das CRMs s\u00e3o primariamente localizadas nas regi\u00f5es interlamelares (Figura 9A). Ap\u00f3s a exposi\u00e7\u00e3o, houve altera\u00e7\u00e3o na densidade de CRMs branquiais, em todos os grupos tratados (Figura 9 B-D).

No grupo GMP houve aumento de 793,0 % de CRM na lamela em rela\u00e7\u00e3o ao controle, enquanto no grupo GG, o aumento foi de 688,4 % na lamela. Entre o GMP e GA, houve uma diminui\u00e7\u00e3o de 72 % (Figura 10A). N\u00e3o houve diferen\u00e7a na densidade de CMRs na regi\u00e3o do filamento (Figura 10B).



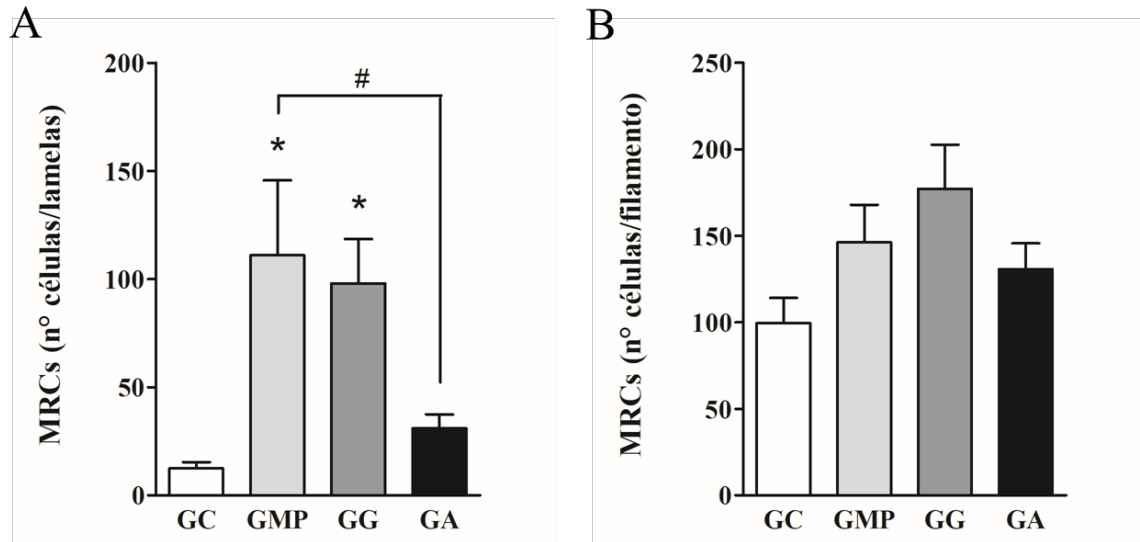
**Figura 9.** Densidade de células ricas em mitocôndrias branquiais em *Oreochromis niloticus* após exposição aguda de 96 horas a microesferas de polietileno, glifosato, e associação de ambos. (A) Grupo controle; (B) Grupo microplástico; (C) Grupo glifosato e (D) Grupo microplástico + glifosato. Coloração: Azul de toluidina. Barra de escala = 20 µm. Objetiva de 40x.



Fonte: Autor



**Figura 10.** Determinação da densidade de células ricas em mitocôndrias branquiais nas lamelas (A) e nos filamentos (B) em *Oreochromis niloticus* após exposição aguda de 96 horas a microesferas de polietileno, glifosato, e associação de ambos. GC=Grupo controle; GMP=Grupo microplástico; GG=Grupo glifosato e GA=Grupo microplástico + glifosato. Dados apresentados em média  $\pm$  erro padrão ( $P < 0,005$ ). (\*) significa diferença estatística entre os grupos tratados e controle. (#) significa diferença entre o GMP e GA.



## 6. DISCUSSÃO

Embora a concentração de MP possa ser muito distinta nos meios aquáticos, é sabido que, em decorrência do alto índice de descarte e consumo, o Brasil ainda não atende a Política Nacional de Resíduos Sólidos (artigo 47 da Lei N° 12.305) (BRASIL, 2010), a qual menciona sobre o descarte adequado de detritos plásticos. Já as contaminações aquáticas de químicos individuais proveniente de agricultura, como herbicidas, são relatadas por diversos autores, que sua presença nos corpos hídricos é em pequenas concentrações (FARGASOVÁ, 1994; WONG, 2000). Mesmo em baixas concentrações, a presença de xenobióticos na água pode afetar os sistemas fisiológicos dos animais e comprometer sua capacidade de desenvolvimento. Os parâmetros hematológicos são biomarcadores sensíveis para exposições ambientais, tanto que, se mantidas as mesmas condições fisiológicas e ambientais, seguem um padrão para a espécie e fornece informações importantes sobre o estado de saúde dos peixes (BOSSART; DIERAUF, 2001).

Após a exposição ao MP, Glifosato e Associados, o eritrograma apontou um estresse fisiológico no GA, que indicou uma hiper Cromia, quando observado o HCM como parâmetros hematimétricos. O aumento do HCM poderia ser induzido pela ação da adrenalina, hormônio do estresse, que favorece uma troca de  $H^+$  por  $Na^+$  e aumento dos íons sódio e cloreto intracelular, que poderia levar um aumento de VCM e conseqüente lise celular (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Pôde ser observado um ligeiro aumento nos valores de VCM no GA, que caracteriza a entrada de água nos eritrócitos. Um aumento do HCM foi previamente registrado por Hamed et al. (2019) para tilápia exposta a MP por 15 dias, nas concentrações de 1, 10 e 100  $mg L^{-1}$ , indicando que as partículas plásticas no ambiente induzem alterações fisiológicas rápidas. De um modo geral, a serie vermelha do sangue pode ser interpretada como uma resposta compensatória para a capacidade de carrear oxigênio e manter a difusão de gases para os tecidos (LI et al., 2011), que é um problema enfrentado aos animais com aumento da demanda metabólica frente a situações de estresse fisiológico.

Ainda na análise eritrocitária, foi observado que não houve presença de MN ou indução de ANEs nas células de *O. niloticus*, em quaisquer grupos de exposição. Apesar do teste de MN ser um dos melhores indicadores de citogenotoxicidade em células vermelhas de peixes (CARMO, 2015), danos no DNA poderia estar ocorrendo, uma vez que os ácidos nucleicos são frágeis e sensíveis às alterações celulares. Roda et al. (2020) expos *Prochilodus lineatus* a microesferas de polietileno (20  $\mu g L^{-1}$ ) e ao cobre (10  $\mu g L^{-1}$ ) isolados e em mistura por 24h e

96h, e da mesma forma, não observaram ANEs, porém, com o ensaio cometa, os autores verificaram dano no DNA em outros tecidos, como o hepático e branquial.

Além disso, a toxicidade de MPs pode alterar o sistema imunológico com impacto na saúde e defesa animal (ESPINOSA et al., 2017). Nos peixes, os leucócitos são produzidos e armazenados no tecido renal, exceto os linfócitos, que sofrem maturação no timo (CARLSON; ZELIKOFF, 2008). Neste estudo, o número total de leucócitos não foi alterado, assim como suas concentrações individuais de células leucocitárias, entretanto, os animais expostos ao MP isolado apresentou um aumento no número de trombócitos totais após a exposição. A contagem de trombócitos são bons biomarcadores de xenobióticos no ambiente pois evidenciam possíveis danos nos processos relacionados a hemostasia dos animais (TAVARES DIAS; MORAES, 2004), assim como danos e processos inflamatórios teciduais.

A função dos trombócitos nos peixes tem similaridade com às plaquetas nos mamíferos, em relação à regulação da coagulação. Além disso, tem evidências que os trombócitos estão relacionados à defesa físicas dos organismos, e por possuírem substâncias envolvidas na atividade fagocitária celulares (SHIOGIRI et al., 2015). As brânquias dos peixes são altamente irrigadas pelo sangue e conseqüentemente uma importante via de entrada de contaminantes para o sistema sanguíneo. Quaisquer alterações neste tecido, é rapidamente refletido ao sistema do organismo via circulação.

Frente à contaminantes, as brânquias podem apresentar alterações morfológicas e conseqüentemente alterar as suas funções, como por exemplo, patologias que influenciam em outras funções metabólicas, bioquímicas e homeostasia fisiológica do organismo (SCHLENK et al., 2008). Especificamente em brânquias, as alterações histopatológicas podem refletir o grau e o tempo de exposição aos contaminantes e suas alterações funcionais (FERNANDES; MAZON, 2003). A análise histopatológica de *O. niloticus*, neste estudo, demonstrou que houve alteração circulatória em GG, no qual foi diminuído o fluxo sanguíneo lamelar, caracterizando um ajuste a uma possível diminuição de entrada de contaminantes pelo epitélio. Alguns estudos demonstram que alterações circulatórias são comuns em peixes expostos ao MP (KARAMI et al., 2016; LU et al., 2018; WANG et al., 2019; HU et al., 2020; YANG et al., 2020; HAMED et al., 2021). Foi evidente em todos os grupos, ruptura epitelial, que induzem perda da homeostasia circulatória, sugerindo a presença de processo inflamatório e indução de proliferação de trombócitos circulantes.

O tecido epitelial apresenta uma certa fragilidade aos contaminantes por estar diretamente expostos ao meio ambiente, e muitas vezes as estruturas são capazes de compensar agressões físicas (HARPER; WOLF, 2009). Apesar destas alterações diminuir a

possibilidade de contaminantes adentrar o sistema sanguíneo via brânquias, elas consequentemente atrapalham as trocas gasosas por induzirem vasodilatação/constricção e proliferação celular acessórias (LAURENT; PERRY, 1991). Além das dificuldades respiratórias, pode haver problemas com os ajustes de trocas iônicas e equilíbrio ácido-base (GOSS et al., 1992). Neste estudo, o que pôde ser observado foi uma hipertrofia de CRM e aumento do número na porção lamelar. A hipertrofia de CRM foi observada nos peixes expostos com presença de GG, sugerindo que o contaminante exige maior gasto metabólico do organismo para a manutenção de osmorregulação. Schmieg et al. (2020), observaram que CRM hipertrofiadas estavam presentes nas brânquias de truta marrom (*Salmo trutta f. fario*) após exposição ao MP.

Apesar da exposição aos contaminantes não ter afetado a integridade morfofuncional do órgão, na presença dos contaminantes, danos mais severos poderiam ocorrer a médio-longo prazo de exposição. Ao observar os resultados dos biomarcadores osmorregulatórios, foi possível verificar o ajuste da homeostasia osmo-ionica dos peixes. Após 96 h de exposição, as concentrações plasmáticas dos principais íons, osmolaridade total foi mantida, assim como seus agentes regulatórios: enzimas NKA, H<sup>+</sup>ATPase e AC. Entretanto, ocorreu aumento da densidade de CRMs nas lamelas, dando a entender que durante a primeira metade do tempo de exposição, possivelmente houve alterações iônicas e osmorregulatórias, mas o aumento da produção de células cloreto no período de 96 horas pode ter tido papel crucial nos ajustes fisiológicos responsáveis por amenizar os efeitos nocivos dos contaminantes nos íons plasmáticos e nas atividades enzimáticas após o período de exposição.

Em um estudo utilizando caranguejos como modelo experimental (*Carcinus maenas*) expostos a poliestireno, Watts et al. (2016) observaram mudanças transitórias na regulação de íons que retornaram aos níveis normais dentro do período de tempo agudo das exposições (1, 16 e 24 horas). Roda et al. (2020) verificaram que em *P. lineatus* (curimbatá) expostos a MP em associação com metal pesado, as concentrações plasmáticas de K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> permaneceram as mesmas após 96 horas de exposição, porém, menores valores de Na<sup>+</sup> foram observados em todos os grupos tratados após 24 horas e somente no grupo associado após 96 horas, e os níveis de Ca<sup>2+</sup> apresentaram alteração no período de 24 horas enquanto após 96 horas não houve alterações. Diante disso, é possível que no presente estudo, durante o período inicial de exposição, possa ter ocorrido alterações nos íons plasmáticos, mas que ao final das 96 horas o organismo tenha sido capaz de ajustar os níveis osmo-iônicos. Roda et al. (2020) não relataram alterações na NKA, HA e CA nos animais tratados após 96 horas, assim como a exposição.

Dessa forma, como visto no presente estudo houve o aumento da Hemoglobina Corpuscular Média, dentre outras alterações morfológicas, como hipertrofia e aumento da densidade de CRMs nas lamelas. As quais apresentam ligação entre si, visto que através do aumento do número de CRMs na porção lamelar, há o aumento da barreira água-sangue e como consequência possa haver o aumento de cortisol, o que pode vir a ocasionar o aumento do HCM.

## 7. CONCLUSÃO

No presente trabalho, a exposição de *O. niloticus* às concentrações individuais ao MP, glifosato e associação de ambos contaminantes, por 96 horas em brânquias, permitiu as seguintes conclusões:

1. O MP e o glifosato, mesmo em baixas concentrações, podem induzir estresse fisiológico e alteração do funcionamento normal das brânquias de tilápias-do-Nilo como demonstrado após as exposições.
2. Os biomarcadores fisiológicos, bioquímicos e morfológicos empregados na avaliação de toxicidade permitiu verificar indução de toxicidade e a capacidade de ajustes morfofisiológicos pela espécie *O. niloticus*.
3. As análises histopatológicas demonstraram alterações individuais em brânquias induzidas pelos contaminantes, entretanto, são alterações não progressivas com possibilidades de ajustes fisiológicos.
4. Não houve o comprometimento da função branquial associado às patologias individuais em *O. niloticus*.
5. O estresse fisiológico induziu problemas osmorregulatórios nos peixes nas primeiras horas de exposição evidenciando um aumento do número de CRM e hipertrofia celular.
6. Em 96 horas não houve desregulação osmo-iônica, evidenciada pelos biomarcadores bioquímicos e morfológicos.
7. A exposição aguda às concentrações ambientais de contaminantes isolados e combinados, não comprometem a multifunção branquial de *O. niloticus*, entretanto, os ajustes observados podem afetar a saúde do peixe quando em exposições mais prolongadas.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, S.M. **Biological indicators of aquatic ecosystem stress.** Am. Fish. Sc., 3, 104-112, 2002.
- AKERBLOM, N. R201. **Agricultural pesticide toxicity to aquatic organisms e a literature review, vol. 16.** Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, SE, p. 31. 2004.
- ALMEIDA, J. A. et al. **The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination.** Journal Environmental International, v.27, p.673-679, 2002.
- AMORIM, L.C.A. **O Uso dos Biomarcadores na Avaliação da Exposição Ocupacional a Substâncias Químicas.** Rev. Brás. Med. Trab. Belo Horizonte, 1, 124-132, 2003.
- ANDRADY, A.; NEAL, M. **Applications and societal benefits of plastics.** Philosophical Transactions of the Royal Society B,364:1977-1984. 2009.
- ANDRADY, A. **Microplastics in the marine environment.** Marine Pollution Bulletin, 62: 1596-1605. 2011.
- ANNETT, R.; HABIBI, H.R.; HONTELA, A. **Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment.** Journal of Applied Toxicology. 34(5):458-479. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24615870>, 2014.
- ARTHUR, C.; BAKER, J.; BAMFORD, H. (Eds.). **Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Micro-plastic Marine Debris,** Sept 9-11, 2008. NOAA Technical Memorandum NOS-OR&R-30. 2009.
- BAINY, A.C.D. **How to evaluate the safety chemical substances in aquatic environments.** Ciência e Cultura, 45, 10-11, 1993.
- BAKIR, A.; ROWLAND, S.J.; THOMPSON, R.C. **Transport of persistent organic pollutants by microplastics in estuarine conditions.** Estuar. Coast. Shelf Sci. 140, 14–21. 2014.
- BARNES, D.K.A. et al. **Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments.** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2009; 364:1985–1998. doi: 10.1098/rstb.2008.0205. 2009.
- BIGINAGWA, F.J. et al. **First evidence of microplastics in the African Great Lakes: recovery from Lake Victoria Nile perch and Nile tilapia.** J. Gt. Lakes. Res 42, 146–149. 2016.
- BONOMO, M.M. et al. **Multi-biomarkers approach to access the impact of novel metal-insecticide based on flavonoid hesperidin on fish.** Environmental Pollution, Volume 268, Part B, 115758, ISSN 0269-7491, 2021.

BOSSART, G.D.; DIERAUF, L.A. **Clinical pathology**. In: DIERAUF, L.A. Handbook of marine mammal medicine. Boca Raton: CRC Press. p. 383-436. 2001.

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding**. Anal. Biochem., 72, 248-254, 1976.

BRASIL, Lei Nº 12.305 de 02 de agosto de 2010 - **Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS)**. 2010. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2010/lei/112305.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/112305.htm). Acesso em: 28/06/2022.

BRAZ-MOTA, S. et al. **Roundup exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum***. Chemosphere, v. 135, p. 53–60, 2015.

CARLSON, E.; ZELIKOFF, J.T. **The immune system of fish: a target organ of toxicity**. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. The toxicology of fishes. Boca Raton: CRC Press, 2008. p.401-415. 2008.

CARRASCO, K.R., TILBURY, K.L., MYERS, M.S. **Assessment of the micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects**. Can. J. Fish Aquat. Sci. 47, 2123-2136. 1990.

CAVALCANTI, D.G.S.M., MARTINEZ, C.B.R., SOPIA, S.H. **Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus***. Mutation Research 655, p.41–46, 2008.

CARMO, T. L. L. **Efeito da exposição a nanopartículas de dióxido de titânio (NP-TiO<sub>2</sub>) em curimatá (*Prochilodus lineatus*, Teleostei): Aspectos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos** / Talita Laurie Lustosa do Carmo. -- São Carlos: UFSCar, 2015. 127 f. Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

CHUA, E. M. et al. **Assimilation of polybrominated diphenyl ethers from microplastics by the marine amphipod, *Allorchestes compressa***. Environ. Sci. Technol. Lett., 48, 8127–8134. 2014.

COLE, M.; GALLOWAY, T.S. **Ingestion of nanoplastics and microplastics by pacific oyster larvae**. Environ. Sci. Technol. 49 (24), 14625–14632. 2015.

COLLIER, H.B. **The standardization of blood hemoglobin determinations**. Can. Med. Assoc. J., v.50, p.550552, 1994.

COLLIGNON, A. et al. **Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea**. Mar Pollut Bull. 2012 Apr;64(4):861-4. Epub 2012 Feb 9. PMID: 22325448. 2012.

COSTA, O.T.F.D. et al. **Mitochondria-rich cells changes induced by nitrite exposure in tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818)**. An Acad Bras Cienc. 2017 Apr-Jun; 89(2):965-972. Epub 2017 May 15. PMID: 28513781. 2017.

CUNHA, L.F. **Transgênicos: enfim, aprovados**. Globo Rural, n. 234, p. 38-44, 2005.



DERRAIK, J. **The pollution of marine environment by plastic debris: a review.** Marine Pollution Bulletin, 44: 842-852. 2002.

DING, J. et al. **Toxicological effects of nano- and micro-polystyrene plastics on red tilapia: Are larger plastic particles more harmless?** J Hazard Mater. 2020 Sep 5;396:122693. Epub 2020 Apr 18. PMID: 32353735. 2020.

EERKES-MEDRANO, D., THOMPSON, R.C., ALDRIDGE, D.C. **Microplastics in freshwater systems: a review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs.** Water Res. 75, 63–82. 2015.

ESPINOSA, C.; CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A. **Effects of dietary polyvinylchloride microparticles on general health, immune status and expression of several genes related to stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.).** Fish Shellfish Immunol. 68, 251e259. 2017.

EVANS, D.H.; PIERMARINI, P.M.; CHOE, K.P. **The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste.** Physiol Rev 85: 97-177, 2005.

FAO/WHO. **Pesticide residues in food** – 1986. Evaluations. Part I – residues. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations, Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. FAO/WHO, Rome. 1986.

FAO. Food and Agriculture Organization. **Tilapia: Species and geographical distribution in Africa.** 2019.

FARGASOVÁ, A. **Comparative study of plant growth hormone (herbicide) toxicity in various biological subjects.** Ecotoxicol Environ Saf. 1994 Dec;29(3):359-64. doi: 10.1016/0147-6513(94)90008-6. PMID: 7534692. 1994.

FERNANDES, M.N.; MAZON, A.F. **Environmental pollution and fish gill morphology.** In: Val, A.L.; Kapoor, B.G. Fish adaptations. Enfield: Science Publishers, 2003. p. 203-231. 2003.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; ROCHA, E. **Effects of gender and temperature on hepatic EROD activity, liver and gonadal histology in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v.85, p.626-632, 2006.

GADAGBUI, B. K. M.; ADDY, M.; GOKSOYR, A. **Species characteristics of hepatic biotransformation enzymes in two tropical freshwater teleosts, tilapia (*Oreochromis niloticus*) and mudfish (*Clarias anguillaris*),** Comparative Biochemistry Physiology, v.114, p.201-211, 1996.

GIBBS, A.; SOMERO, G.N. **Pressure Adaptation of  $Na^+/K^+$ -ATPase in gills of marine teleosts.** J. Exp. Biol., v. 143, 475-492, 1989.

GOLDENFARB, P. B. et al. **Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination.** American Journal of Clinical Pathology, Birmingham, v. 56, n. 1, p. 50-59, 1971.

- GONÇALVES, B.B. et al. **Ecotoxicology of Glyphosate-Based Herbicides on Aquatic Environment**. In M. Ince, O. K. Ince, & G. Ondrasek (Eds.), *Biochemical Toxicology - Heavy Metals and Nanomaterials*. IntechOpen. 2019.
- GONZÁLES, P.C. et al. **Fratxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins**. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2091–2098. 2005.
- GOSS, G. G. et al. **Mechanisms of ion and acid-base regulation at the gills of freshwater fish**. *Journal of Experimental Zoology*, v. 263, p. 143-159, 1992.
- GREGORY, M. R. **Environmental implications of plastic debris in marine settings—entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions**. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 364, 2013–2025. 2009.
- HAMED, M. et al. **Assessment the effect of exposure to microplastics in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) early juvenile: I. blood biomarkers**. *Chemosphere*. 2019 Aug;228:345-350. Epub 2019 Apr 22. PMID: 31039541. 2019.
- HAMED, M. et al. **Microplastics induced histopathological lesions in some tissues of tilapia (*Oreochromis niloticus*) early juveniles**. *Tissue Cell*. 2021 Aug;71:101512. Epub 2021 Feb 23. PMID: 33647780. 2021.
- HAMMER, J.; KRAAK, M.H.; PARSONS, J.R. **Plastics in the marine environment: the dark side of a modern gift**. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2012;220:1-44. PMID: 22610295. 2012.
- HARPER, C.L.; WOLF, J. **Morphologic effects of the stress response in fish**. *Ilar J.*, v. 50, 387-396, 2009.
- HODSON, M.E. et al. **Plastic bag derived-microplastics as a vector for metal exposure in terrestrial invertebrates**. *Environ. Sci. Technol.* 51 (8), 4714–4721. 2017.
- HOOFMAN, R.N., HAAT, W.K. **Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the Peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulfonate**. *Mutat. Res.*, 147152. 1982.
- HU, L. et al. **Chronic microfiber exposure in adult Japanese medaka (*Oryzias latipes*)**. *PLoS One* 15, e0229962. 2020.
- JAWORSKI, E.G. **Mode of action of N-phosphonomethylglycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 20, p. 1195-1198. 1972.
- KARAMI, A. et al. **Virgin microplastics cause toxicity and modulate the impacts of phenanthrene on biomarker responses in African catfish (*Clarias gariepinus*)**. *Environ. Res.* 151, 58–70. 2016.

- KARBALAEI, S. et al. **Toxicity of polystyrene microplastics on juvenile *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) after individual and combined exposure with chlorpyrifos.** J Hazard Mater. 2021 Feb 5;403:123980. Epub 2020 Sep 15. PMID: 33265019. 2021.
- KNISS, A.R. **Long-term trends in the intensity and relative toxicity of herbicide use.** Nat. Commun. 8. 2017.
- KOELMANS, A. A.; BESSELING, E.; FOEKEMA, E. M. **Leaching of plastic additives to marine organisms.** Environ. Pollut. 187, 49–54. 2014.
- KRUGER, N.J. **The Bradford method for protein quantification.** Methods Mol Biol., 32, 9–15, 1994.
- KULTZ, D.; SOMERO, G.N. **Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*,** J. Exp. Biol., 98, 1883–1894, 1995.
- LAIST, D. W. **Impacts of marine debris entanglement of marine life in marine debris including a comprehensive list of species with entanglement and ingestion records.** In: Coe, J.M., Rogers, D.B. (Eds.), Marine Debris - Sources, Impact and Solutions. Springer-Verlag, New York, pp. 99–139. 1997.
- LAURENT, P.; PERRY, S. F. **Environmental effects on fish gill morphology.** Physiological Zoology, v. 64, n. 1, p. 4-25, 1991.
- LAVERS, J. L.; BOND, A. L.; HUTTON, I. **Plastic ingestion by flesh-footed shearwaters (*Puffinus carneipes*): implications for chick body condition and the accumulation of plastic-derived chemicals.** Environ. Pollut., 187, 124–129. 2014.
- LAVERS, J. L.; BOND, A. L. **Ingested plastic as a route for trace metals in Laysan Albatross (*Phoebastria immutabilis*) and Bonin Petrel (*Pterodroma hypoleuca*) from Midway Atoll.** Mar. Pollut. Bull., 110, 493-500. 2016.
- LEI, L. et al. **Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*.** Sci Total Environ. 2018 Apr 1;619-620:1-8. Epub 2017 Nov 11. PMID: 29136530. 2017.
- LI, Z.H. et al. **Chronic toxicity of verapamil on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on morphological indices, hematological parameters and antioxidant responses.** J Hazard Mater. 2011 Jan 30;185(2-3):870-80. Epub 2010 Oct 20. PMID: 20970250. 2011.
- LIM, X. Z. **Plastics are everywhere — but are they harmful?** Nature | Vol 593 | 6 May 2021.
- LIMA, L. B. D. et al. **Use of biomarkers to evaluate the ecological risk of xenobiotics associated with agriculture.** Environmental Pollution. v. 237, p.611-624, 2018.
- LINNAEUS, C. **Systema naturae per regna tria naturae: secundum classes, orines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis.** Stockholm Sweden, 10<sup>o</sup> Ed., 1758.

- LINS, J.A P. N. et al. **Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático**. Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient. v. 8, n. 4, p. 469-484, Curitiba, 2010.
- LU, K. et al. **Influence of microplastics on the accumulation and chronic toxic effects of cadmium in zebrafish (*Danio rerio*)**. Chemosphere 202. 2018.
- MACHADO, M. R. **Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas**. UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde, Londrina, v. 1, n. 1, p. 63-76, out. 1999.
- MATO, Y. et al. **Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment**. Environ. Sci. Technol. 35 (2), 318–324. 2001.
- MCANDREW, B. J. et al. **Tilapia genomic studies**. Genomics in Aquaculture, p. 105–129, 2016.
- MELANCON, M.J. **Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring**. In: Handbook of ecotoxicology (HOFFMAN, D.; RATTNER, B.A.; BURTON, G.A.; CAIRNS, J.).Ed. Boca raton. Lewis, 1995.
- MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B.R. **Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus***. Chemosphere, v. 78, p. 294–299. 2010.
- MOORE, C. J. **Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing long-term threat**. Environ. Res., 108, 131-139. 2008.
- MORON, S.E.; ANDRADE, C.A.; FERNANDES, M.N. **Response of mucous cells of the gills of traíra (*Hoplias malabaricus*) and jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) (Teleostei: Erythrinidae) to hypo- and hyper-osmotic ion stress**. Neotrop. Ichthiol., 7, 491-498, 2009.
- MOYES, C. D.; SCHULTE, P. M. **Princípios de Fisiologia Animal**. por Artmed; 2º edição (1 janeiro 2010).
- NA, J. et al. **Synergistic effect of microplastic fragments and benzophenone-3 additives on lethal and sublethal *Daphnia magna* toxicity**. J Hazard Mater. 2021 Jan 15;402:123845. Epub 2020 Sep 5. PMID: 33254817. 2021.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 3496, **Glyphosate**. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate>. Accessed May 4, 2022.
- NELMS, S.E. et al. **Marine anthropogenic litter on British beaches: a 10-year nationwide assessment using citizen science data**. Sci. Total Environ. 579, 1399–1409. 2017.
- OLIVEIRA, M. et al. **Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae)**, Ecological Indicators, Volume 34, 2013, Pages 641-647. 2013.

PAULINO, M.G. **Efeito da exposição à atrazina nas brânquias de curimatá, *Prochilodus lineatus* (Teleósteo, Prochilodontidae).** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP. 98p. 2011.

PAULINO, M.G. et al. **Biotransformations, Antioxidant System Responses, and Histopathological Indexes in the Liver of Fish Exposed to Cyanobacterial Extract.** *Environmental Toxicology and Chemistry*—Volume 39, Number 5—pp. 1041–1051, 2020.

PERES, R. M.; SANSEVERINO, M. T. V.; SCHÜLER-FACCINI, L. **Exposição a contaminantes ambientais durante a gestação e seus efeitos sobre a saúde fetal: uma revisão de literatura.** *Revista HCPA*. v. 21, n.3, p. 368-378, 2001.

PHUONG, N.N. et al. **Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments?** *Environ. Pollut.* 211, 111–123. 2016.

PLASTICS EUROPE, 2015. **Plastics – The facts 2015, an analysis of European plastics production, demand and waste data.** Plastics Europe. Brussels. 2015.

PORTO, M.S.A. **Indicadores de estresses em peixes da Amazônia: sensibilidade em face do tipo de estressor.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 38 p. 2005.

RAMÍREZ-DUARTE, W. F.; RONDÓN-BARRAGÁN, I. S.; ESLAVA-MOCHA, P.R. **Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup® herbicide on "cachama blanca" (*Piaractus brachypomus*).** *Pesquisa Veterinária Brasileira* [online]. 2008, v. 28, n. 11, pp. 547-554. 2009.

RODA, J.F.B. et al. **Microplastics and copper effects on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: Is there any interaction?** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2020 Apr;242:110659. Epub 2020 Jan 18. PMID: 31962140. 2020.

RODRIGUES, R.B. et al. **Tecnologia de bioflocos no cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).** *Revista Acta Tecnológica*, v.10, n.2, p. 15, 2015.

RONDÓN-BARRAGÁN, I.S. et al. **El glifosato (Roundup®) y Cosmoflux® 411F inducen estrés oxidativo en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*).** *Orinoquia, Meta*, v. 16, supl. 1, p. 162-176, Dec. 2012.

SÁ, L.C. et al. **Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future?** *Sci Total Environ.* 2018 Dec 15;645:1029-1039. Epub 2018 Jul 20. PMID: 30248828. 2018.

SCHLENK, D. et al. **Biomarkers.** In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D. *The toxicology of fishes.* Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 683-731. 2008.

SCHMIEG, H. et al. **Polystyrene microplastics do not affect juvenile brow trout (*Salmo trutta f. fario*) or modulate effect of the pesticide methiocarb.** 10.21203/rs.2.19551/v2. 2020.

SEDLAK, D. **Three lessons for the microplastics voyage.** *Environ Sci Technol.* 2017; 51:7747–7748. doi: 10.1021/acs.est.7b03340. 2017.

- SETÄLÄ, O., FLEMING-LEHTINEN, V., LEHTINIEMI, M. **Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web.** Environmental Pollution, 185: 77-83. 2014.
- SHAH, A. et al. **Biological degradation of plastics: A comprehensive review.** Biotechnology Advances, 26: 246-265. 2008.
- SHIOGIRI, N. S. **Toxicidade, eficácia e efeitos morfofuncionais do antimicrobiano azitromicina para a tilápia *Oreochromis niloticus*.** -- São Carlos: UFSCar, 2016. 87 p. Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.
- SU, L. et al. **The occurrence of microplastic in specific organs in commercially caught fishes from coast and estuary area of east China.** Journal of Hazardous Materials. 2019.
- TANAKA, K. et al. **Accumulation of plastic-derived chemicals in tissues of seabirds ingesting marine plastics.** Mar. Pollut. Bull., 69, 219–222. 2013.
- TANG, G. et al. **Developing ionic liquid forms of picloram with reduced negative effects on the aquatic environment,** Science of The Total Environment, Volumes 616–617, 2018, Pages 128-134, ISSN 0048-9697. 2018.
- TAVARES-DIAS, M. et al. **Haematological characteristics of Brazilian teleost. VI. Parameters of Jundiá, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae).** Ciência Rural, Santa Maria, 4(32): 693-698, 2002.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos.** Ribeirão Preto: Villimpress, 2004. 144p. 2004.
- TEIXEIRA, J.M.S. et al. **Acute toxicity effects of Roundup Original® on pintado da Amazônia.** Environmental Science and Pollution Research. V.25, p. 25383-25389, 2018.
- TEUTEN, E.L. et al. **Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife.** Philos. Trans. R. Soc., B 364, 2027e2045. 2009.
- THIEL, M. et al. **Impacts of marine plastic pollution from continental coasts to subtropical gyres—fish, seabirds, and other vertebrates in the sea pacific.** Frontiers in Marine Science. Vol.5. 2018.
- THOMPSON, R. C. et al. **Our plastic age.** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2009;364:1973–1976. 2009.
- UÇAR, A. et al. **Determination of Fipronil toxicity by different biomarkers in gill and liver tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2020 Aug;56(7):543-549. Epub 2020 Aug 28. PMID: 32860191. 2020.
- VITALE, A.M. et al. **Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae).** Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 1999 Jan;122(1):121-9. PMID: 10190036. 1999.

- WANG, J. et al. **Polystyrene microplastics cause tissue damages, sex-specific reproductive disruption and transgenerational effects in marine medaka (*Oryzias melastigma*)**. Environ. Pollut. 254, 113024. 2019.
- WANG, F. et al. **The influence of polyethylene microplastics on pesticide residue and degradation in the aquatic environment**. J Hazard Mater. 2020 Jul 15;394:122517. Epub 2020 Mar 11. PMID: 32199204. 2020.
- WARDROP, P. et al. **Chemical pollutants sorbed to ingested microbeads from personal care products accumulate in fish**. Environ. Sci. Technol. 50 (7), 4037–4044. 2016.
- WATTS, A.J. et al. **Uptake and retention of microplastics by the shore crab *Carcinus maenas***. Environ. Sci. Technol. 48 (15), 8823–8. 2014.
- WATTS, A.J. et al. **Effect of microplastic on the gills of the shore crab *Carcinus maenas***. Environ Sci Technol. 2016 May 17;50(10):5364-9. Epub 2016 Apr 28. PMID: 27070459. 2016.
- WONG, P. K. **Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614**. Chemosphere. 2000 Jul;41(1-2):177-82. PMID: 10819198. 2000.
- WRIGHT, S.; THOMPSON, R.; GALLOWAY, T. **The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review**. Environmental Pollution, 178:483-492. 2013.
- WU, H. et al. **Acute toxicity and sublethal effects of fipronil on detoxification enzymes in juvenile zebrafish (*Danio rerio*)**. Pestic Biochem Physiol 115:9–14. 2014.
- XU, S. et al. **Proteomic mechanisms for the combined stimulatory effects of glyphosate and antibiotic contaminants on *Microcystis aeruginosa***. Chemosphere. 2021 Mar;267:129244. Epub 2020 Dec 7. PMID: 33321278. 2021.
- YANG, H. et al. **Toxicity comparison of nano-sized and micron-sized microplastics to Goldfish *Carassius auratus* Larvae**. J. Hazard. Mater. 388, 122058. 2020.
- ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. **Impact of glyphosate and *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis; with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview**. Journal of Environmental Quality, v. 33, p. 825-831. 2004.
- ZHANG, Z. et al. **The contamination of microplastics in China's aquatic environment: Occurrence, detection and implications for ecological risk**. Environ Pollut. 2022 Mar 1;296:118737. Epub 2021 Dec 23. PMID: 34954308. 2022.
- ZOCCHI, M.; SOMMARUGA, R. **Microplastics modify the toxicity of glyphosate on *Daphnia magna***, Science of The Total Environment, Volume 697. 2019.