

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
Centro de Energia Nuclear na Agricultura

Efeitos ocasionados pela ingestão de microplásticos no lambari rosa (*Astyanax altiparanae*)

Aluna: Ana Laura Athayde Lourenço

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo

Colaboradora: Doutoranda Glaucia Peregrina Olivatto

Piracicaba - SP
Dezembro de 2021

ANA LAURA ATHAYDE LOURENÇO

Efeitos ocasionados pela ingestão de microplásticos no lambari rosa (*Astyanax altiparanae*)

Monografia apresentada como requisito básico para a conclusão do curso de Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo
Colaboradora: Glaucia Peregrina Olivatto

Piracicaba - SP
Dezembro de 2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os que me ajudaram ao longo desta caminhada e a todo o curso de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo, corpo docente e discente, ao qual fico lisonjeada por ter feito parte.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, que fez com que meus objetivos fossem alcançados durante todos os meus anos de estudos.

Aos meus pais e irmão, que sempre acreditaram em mim e estiveram ao meu lado me apoiando ao longo de toda a minha trajetória. Sem vocês nada disso teria sido possível.

Ao meu namorado por toda paciência, compreensão, carinho e amor. Obrigada por ser meu melhor amigo e porto seguro.

Ao professor Valdemar, por ter sido meu orientador e ter desempenhado tal função com dedicação e amizade.

A Glauca, por todo o aprendizado, apoio e companheirismo ao longo deste percurso.

Aos meus colegas do Laboratório de Ecotoxicologia, pela convivência e troca de experiências que me fizeram crescer não só como profissional, mas também como pessoa.

A todos os meus amigos do curso de graduação de Ciências Biológicas por compartilharem comigo tantos momentos de descobertas e aprendizado. Juntos, conseguimos avançar e ultrapassar todos os obstáculos.

Por último, quero agradecer também à Universidade de São Paulo, ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela oportunidade e incentivo de percorrer o caminho da pesquisa científica.

EPÍGRAFE

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução e Justificativa	3
2. Objetivo	7
3. Material e Métodos	7
3.1 Delineamento experimental e preparo das amostras de microplásticos	7
3.2 Análise da exposição dos peixes à dieta com microplásticos	9
3.3 Retenção dos microplásticos no trato gastrointestinal e fezes	9
3.4 Forma de análise dos resultados	11
4. Resultados e Discussão	11
4.1 Parâmetros ecotoxicológicos	11
4.2 Acumulação e excreção dos microplásticos ingeridos	17
5. Considerações finais	20
6. Conclusões	21
7. Referências	21

RESUMO

Efeitos ocasionados pela ingestão de microplásticos no lambari rosa (*Astyanax altiparanae*)

Microplásticos, partículas plásticas menores que 5 mm, são facilmente encontrados em ecossistemas aquáticos e podem ser ingeridos por uma grande variedade de organismos, como os peixes. O lambari rosa (*Astyanax altiparanae*) é um peixe micrófago, ou seja, que se alimenta de seres e partículas microscópicas, se tornando suscetível à ingestão de microplásticos no meio ambiente. Além disso, o lambari rosa possui grande importância econômica e alimentícia, sendo utilizado como isca para pesca, na aquariofilia, como predador de larvas e no consumo humano. Dessa forma, o presente estudo visou avaliar os possíveis efeitos ecotoxicológicos ocasionados no lambari rosa (n = 450) pela ingestão de microplásticos dos polímeros polietileno (PE) e polietileno tereftalato (PET), uma vez que microplásticos do polímero PE são os mais relatados em amostras de água superficiais e as fibras têxteis do polímero PET correspondem a um dos principais aportes de microplásticos na coluna d'água. Os parâmetros observados para avaliar a toxicidade foram: mortalidade, peso, alterações no comprimento/biometria e malformações. Por fim, foi monitorada a digestão e excreção dos microplásticos ingeridos, sendo que a detecção dos microplásticos coletados do trato gastrointestinal e das fezes foi realizada por meio de técnicas microscópicas e de coloração. Ao final do experimento, observou-se que a exposição dietética, especialmente do polímero PET, foi responsável por ocasionar efeitos ecotoxicológicos no lambari rosa, como mortalidade e alterações na biometria. Ainda, a acumulação de microplásticos de ambos os polímeros no trato gastrointestinal do lambari rosa também foi evidenciada. Portanto, este estudo deve ser combinado com pesquisas e tentativas de mitigação ambiental, visto que fica claro o potencial nocivo que os microplásticos apresentam para o ambiente, e, especialmente, para os animais aquáticos que podem ingeri-los.

Palavras-chave: ecotoxicológico, bioacumulação, água doce.

ABSTRACT

Effects caused by the ingestion of microplastics in the lambari rosa (*Astyanax altiparanae*)

Microplastics, plastic particles smaller than 5mm, are easily found in aquatic ecosystems and can be ingested by a wide variety of organisms, such as fish. The lambari rosa (*Astyanax altiparanae*) is a microphagous fish that feeds on microscopic beings and particles, becoming susceptible to the ingestion of microplastics in the environment. In addition, the lambari rosa has great economic and culinary importance, being used as bait for fishing, in aquariums, as a predator of larvae and in human consumption. Thus, the present study aimed to evaluate the possible ecotoxicological effects caused by the ingestion of microplastics from polymers such as polyethylene (PE) and polyethylene terephthalate (PET) in the lambari rosa (n = 450), once PE polymeric microplastics are the most reported in surface water samples and textile fibers of the PET polymer corresponds to one of the main contributions of microplastics to the water column. The observed parameters to assess toxicity were: mortality, weight, length/biometrics changes and malformations. Finally, digestion and excretion of the ingested microplastics were monitored, and the detection of microplastics collected from the gastrointestinal tract and feces were done using microscopic and dyeing techniques. At the end of the experiment, it was observed that dietary exposure, especially to the PET polymer, was responsible for causing ecotoxicological effects on lambari rosa, such as mortality and changes in biometry. Furthermore, the accumulation of microplastics of both polymers in the gastrointestinal tract of lambari rosa was also evidenced. Therefore, this study should be combined with research and attempts at environmental mitigation, since it is clear the harmful potential that microplastics have for the environment, and especially for aquatic animals that can ingest them.

Keywords: ecotoxicological, bioaccumulation, fresh water.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Na última década, partículas de polímero sintético com tamanho inferior a 5 mm, denominadas microplásticos (Figura 1), têm se tornado alvo de grande preocupação ambiental global, devido ao aporte crescente e frequente dessas partículas provenientes de materiais amplamente utilizados pela sociedade atual (Olivatto *et al.*, 2018). No ambiente aquático, as principais classes de microplásticos relatadas são fragmentos, grânulos (microbeads) e fibras (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012). Fragmentos de microplásticos são originados a partir da fragmentação de resíduos plásticos descartados inadequadamente no ambiente, como consequência da exposição das ações das intempéries, sendo estes microplásticos classificados como microplásticos secundários (Kershaw e Rochman, 2015). Grânulos também são comumente empregados na formulação de cosméticos para efeitos abrasivos na higienização da pele, tais partículas de tamanho reduzido atingem o ambiente aquático através do lançamento de esgoto doméstico (Dauvergne, 2018). Fibras provenientes de materiais têxteis são liberadas durante o procedimento da lavagem de tais tecidos sintéticos e também contribuem com o aporte de microplásticos para o ambiente aquático através do lançamento de efluentes domésticos contendo esse material (Pirc *et al.*, 2016).

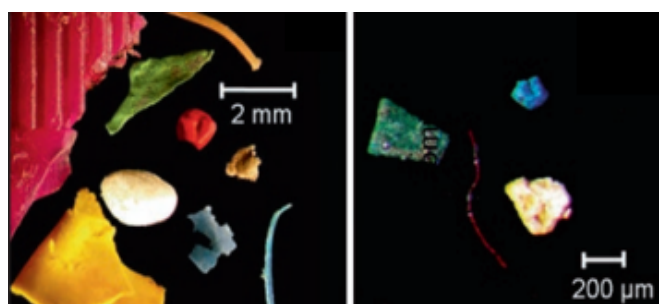


Figura 1: Microplásticos, partículas plásticas com tamanho inferior a 5 mm (Bergmann, Gutow e Klages, 2015).

O plástico do polímero polietileno (PE) é considerado como um dos principais polímeros produzidos a nível global, uma vez que esse polímero está presente na confecção de objetos plásticos nos mais variados setores e também é o polímero predominantemente relatado nas amostras de microplásticos do tipo fragmentos e microbeads coletadas em águas superficiais (Li, Busquets e Campos, 2020).

Na indústria têxtil, são utilizadas tanto fibras naturais, como o algodão e a lã, quanto fibras sintéticas, como o poliéster (polietileno tereftalato (PET)), náilon (poliamida (PA)), elastano (85% poliuretano (PU)), acrílico (poliacrilonitrila (PAN)) e a poliolefina

(polipropileno (PP)) (Dris *et al.*, 2017). As fibras sintéticas são responsáveis por aproximadamente 60% do consumo mundial de fibras, sendo utilizadas para complementar as fibras naturais na indústria têxtil há mais de 50 anos e, com isso, esses tecidos são amplamente utilizados em diversos produtos, como roupas e tapetes (Cesa *et al.*, 2017).

Browne *et al.* (2011) foram os primeiros pesquisadores a identificarem o processo de lavagem (ciclos a 40°C e 600 rotações por minuto) como uma fonte poluidora de fibras microplásticas, sendo que, segundo eles, uma única peça de roupa feita de poliéster pode liberar cerca de 1.900 microfibras por lavagem. Outro estudo de Napper e colaboradores (2016) analisou a liberação de fibras plásticas de tecidos feitos a partir de poliéster, acrílico e uma mistura de poliéster e algodão (Napper *et al.*, 2016). Tais tecidos foram lavados em diferentes condições de temperatura e com diferentes concentrações de detergentes. Os resultados encontrados mostraram que cerca de 700.000 fibras podem ser liberadas a partir de uma lavagem de cerca de 6kg de roupas feitas a partir de tecido sintético. Dessa forma, devido ao tamanho reduzido dessas fibras, uma quantidade considerável delas não é retida pelo tratamento de esgoto, atingindo então ambientes aquáticos (Water Environment Federation, 2003).

Nesse contexto, esses tipos de microplásticos já foram encontrados em diversos habitats, incluindo praias (Nel e Froneman, 2015), sedimentos (Frias *et al.*, 2016), águas superficiais (Lusher *et al.*, 2015) e até áreas remotas, como geleiras polares (Obbard *et al.*, 2014), o que demonstra a onipresença dessas partículas nos diferentes compartimentos ambientais (Olivatto *et al.*, 2019). Estudos também mostraram que essas microfibras podem ser inaladas por humanos, impactando negativamente na funcionalidade dos pulmões (Dris *et al.*; 2017).

A ingestão de microplásticos já foi registrada em diversas espécies, como peixes (Cartes *et al.*, 2016), camarões (Devriese *et al.*, 2015) e mexilhões (Li *et al.*, 2015). As micropartículas plásticas possuem tamanho similar ao plâncton, podendo ser facilmente ingeridas por uma ampla gama de organismos. Essa ingestão pode apresentar riscos físicos para pequenos animais, como os peixes. Além da obstrução do trato digestivo, dependendo do tamanho da partícula ingerida e do tamanho do animal, também pode haver uma falsa sensação de saciedade, o que pode levar a desnutrição do animal, bem como a alterações hormonais que irão afetar a sua taxa de reprodução e de crescimento (Van Franeker e Law, 2015). A ingestão de microplásticos já foi reportada em mais de 150 espécies de peixes, tanto de água doce quanto salgada (Jabeen *et al.*, 2017).

Em um estudo realizado por Jemec *et al.* (2016), foi analisada a ingestão de microfibras têxteis do polímero PET (em torno de 300 μm) pelo microcrustáceo *Daphnia magna*, sendo que houve um significativo aumento na mortalidade dos microcrustáceos expostos as microfibras após 48h. Em outro estudo, Murray e Cowie (2011) observaram a presença de fibras plásticas no conteúdo estomacal de pequenos peixes que eram consumidos pela população local, colocando em risco a segurança alimentar e a saúde humana. Outro estudo realizado por Ory *et al.* (2017) comparou microplásticos e organismos planctônicos de águas superficiais que são consumidos por animais marinhos, como os peixes. Para isso, cavalinhas (*Decapterus muroadsi*) foram coletadas para testar a hipótese de que peixes acabam ingerindo acidentalmente microplásticos que se assemelham a sua presa natural. Os resultados mostraram que cerca de 80% dos peixes ingeriram microplásticos, principalmente partículas de polietileno que se assemelhavam em cor e tamanho às espécies azuis de copépodes consumidas por esse peixe. Dessa forma, peixes que possuem hábito alimentar planctívoro estão extremamente expostos a ingerirem microplásticos flutuantes de forma acidental, ao confundirem tais partículas com suas habituais presas.

Após a ingestão, os microplásticos podem permanecer no trato digestivo, ser excretados ou absorvidos do trato digestivo (Triebkorn *et al.*, 2019). Em um estudo realizado por Grigorakis *et al.* (2017), peixes dourados foram alimentados com microfibras plásticas obtidas a partir do processo de lavagem em máquina. Após cerca de 6 dias, uma pequena quantidade de micropartículas plásticas havia ficado retida no trato gastrointestinal desses peixes, sendo que o tempo de excreção correspondente a 50% e 90% dessas partículas foi de 10 e 33.4h, respectivamente. No entanto, a transferência trófica de microesferas fluorescentes do polímero poliestireno (PS) (10 μm) do zooplâncton para o camarão *Mysis relicta* foi observado por Setälä *et al.* (2014). *M. relicta*, que tinha sido mantido junto com o zooplâncton (copépodes e larvas de poliqueta) pré-exposto por 12h a microplásticos, continha microesferas de PS em seu estômago. A transferência trófica de microplásticos de mexilhões (*Mytilus edulis*) para caranguejos da costa (*Carcinus maenas*) também foi mostrada para microesferas fluorescentes de PS com 0,5 μm e 8-10 μm de diâmetro (Setälä *et al.*, 2014). Logo, a literatura atual acerca desse tema é inconclusiva e são poucas as evidências experimentais sobre essa problemática, especialmente quando se trata de animais de água doce, sendo, portanto, necessária a avaliação em outras espécies.

Os lambaris são peixes que pertencem à família Characidae (ordem Characiformes), sendo o gênero *Astyanax* o mais numeroso (Nelson, 2006). O lambari rosa (Figura 2) é uma espécie que está sendo amplamente utilizada como modelo experimental na área da biologia, ecotoxicologia e fisiologia reprodutiva (Gomes, 2013). Indivíduos desta espécie possuem pequeno porte (10 a 15 cm de comprimento) e massa corpórea de até 60 g (Porto-Foresti, 2010). Em laboratório, possuem características importantes, tais como facilidade de manejo, aceitação de alimentação artificial, prolificidade e crescimento rápido (Porto-Foresti, 2010). A espécie possui dimorfismo sexual durante o período reprodutivo, no qual os machos apresentam aspereza da nadadeira anal. O ciclo de vida do lambari rosa é rápido: entre dez e onze semanas de cultivo alguns indivíduos já estarão aptos para a reprodução (principalmente machos). Após a 20ª semana, a maior parte dos indivíduos já estará apta para se reproduzir, incluindo as fêmeas.



Figura 2: Lambari rosa (Acervo pessoal).

O lambari rosa é um peixe de água doce comumente encontrado em rios, lagos e represas ao longo de toda a América do Sul. Possui uma boa aceitação na alimentação humana, principalmente no consumo in natura, como tira-gosto. É utilizado como isca viva na pesca profissional ou de lazer, uma vez que é um peixe que atrai carnívoros, como o tucunaré, a corvina e o dourado. Também é utilizado como peixe ornamental na aquarofilia. Ainda, é um excelente predador de larvas de mosquitos vetores, podendo ser utilizado no combate às doenças transmitidas por mosquitos que têm sua fase larval na água, como a febre amarela e a dengue (Garutti, 2003). Possui hábito alimentar onívoro, sendo generalista e se alimentando tanto de matéria vegetal quanto animal. No entanto, é um peixe micrófago, ou seja, que se alimenta de seres e partículas microscópicas, estando suscetível a ingestão de microplásticos no meio ambiente, seja ela acidental ou intencional (Bastian *et al.*, 2021).

Desse modo, os microplásticos do polímero PE, provenientes da fragmentação de objetos plásticos e das microbeads de produtos de higiene pessoal, assim como as fibras microplásticas, provenientes do tecido poliéster, obtido a partir do polímero PET, são

partículas em potencial na exposição dietética de peixes, como o lambari rosa, espécie de peixe pouco investigada pela comunidade científica (Malafaia, 2022), apesar de possuir grande importância econômica e de ser utilizada nas atividades pesqueiras, colocando em risco a vida dessa espécie aquática e também a saúde humana que faz uso desse pescado. Nesse contexto, visto que existem poucas pesquisas que focam no potencial ecotoxicológico e acumulativo que os microplásticos exercem nesses organismos e que não existe uma uniformidade nas pesquisas já realizadas, a importância desse estudo fica, portanto, evidente para nortear órgãos competentes nas tomadas de decisões no gerenciamento e uso de microplásticos, bem como nas medidas de proteção à ecologia dos ecossistemas aquáticos e à saúde humana.

2. OBJETIVO

Avaliar os possíveis efeitos toxicológicos causados no lambari rosa pela ingestão de microplásticos dos polímeros PE e PET em diferentes concentrações, comparando as taxas de peso, crescimento/biometria, malformações e mortalidade dos indivíduos, além de monitorar a excreção dessas partículas pelo trato gastrointestinal do lambari rosa, com o intuito de elucidar a lacuna sobre a bioacumulação de microplásticos por essa espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental e preparo das amostras de microplásticos

Pellets do polímero PE e PET fornecidas pelo Departamento de Engenharia de Produção da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) – Campus Sorocaba e pelo Instituto de Química de São Carlos (IQSC), Universidade de São Paulo, respectivamente, foram triturados em moinho criogênico, atingindo a escala microscópica de 100 µm- 350 µm (Figura 3). Após a trituração, foram misturados com a ração extrusada tetraMin® e água para formação de uma pasta que foi extrusada novamente e utilizada na dieta do lambari rosa (Garutti, 2003).

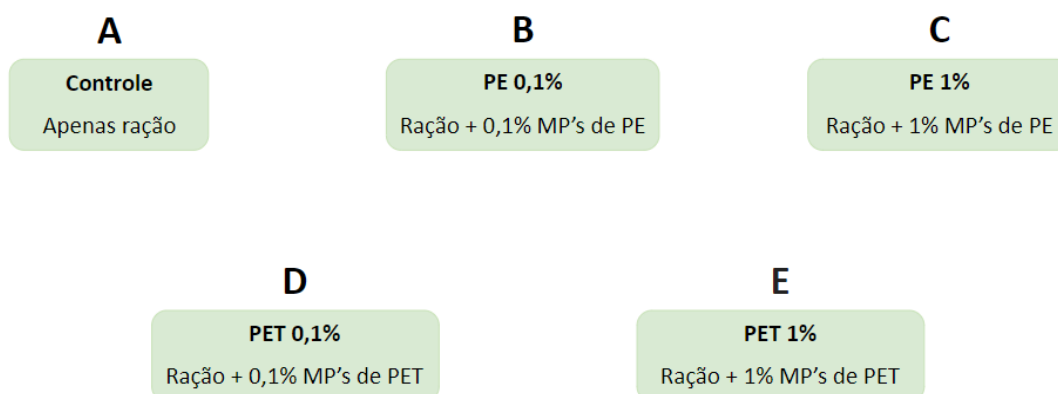


Figura 3: Microplásticos triturados em moinho criogênico para atingir a escala de tamanho de 100 a 350 μm (Acervo pessoal).

Os alevinos de lambari rosa ($n = 450$) foram comprados do Pesqueiro Pompéia (Av. Pompéia, 3430 - Pompéia, Piracicaba - SP, 13425-620) e passaram por um processo de aclimatização. Após o processo de aclimatização, foram transferidos para aquários de vidro transparente com capacidade para 70L, com sistema de água corrente e saída do tipo monge (para evitar a saída dos lambaris). Também foi colocada uma cobertura de tela a fim de evitar o escape dos peixes, uma vez que os lambaris saltam para fora do aquário (Garutti, 2003).

O experimento teve duração de 90 dias, sendo que foram realizados cinco tratamentos experimentais (Esquema 1).

Tratamentos Experimentais



Esquema 1: Esquematização dos 5 tratamentos realizados. Tratamento A (controle), no qual os lambaris rosa foram alimentados somente com ração extrusada tetraMin®; Tratamento B, no qual os lambaris rosa foram alimentados com ração extrusada tetraMin® e 0,1% de microplásticos do polímero PE, Tratamento C, no qual os lambaris rosa foram alimentados com ração extrusada tetraMin® e 1% de microplásticos do polímero PE, Tratamento D, no qual os lambaris rosa foram alimentados com ração extrusada tetraMin® e 0,1% de microplásticos do polímero PET e Tratamento E, no qual os lambaris rosa foram alimentados com ração

extrusada tetraMin® e 1% de microplásticos do polímero PET.

3.2 Análise da exposição dos peixes à dieta com microplásticos

Os parâmetros observados ao longo dos 90 dias de experimento, decorrentes da exposição dos peixes à dieta com microplásticos, foram: mortalidade, peso, alterações no comprimento/biometria e malformações. A mortalidade foi verificada diariamente e os lambaris mortos foram removidos imediatamente dos aquários para evitar a degradação. A taxa de mortalidade foi determinada de acordo com o número total de indivíduos mortos no final do experimento em relação ao número total de indivíduos no início do experimento e em relação ao tratamento controle. O peso corporal dos indivíduos de cada tratamento foi quantificado, com o auxílio de uma balança analítica, no início e final do experimento. Após os 90 dias de experimento, 5 indivíduos de cada aquário foram anestesiados com benzocaína (0,1mg/L) e examinados individualmente sob estereomicroscópio com ampliação para registrar e observar possíveis anormalidades morfológicas e lesões. Por fim, todos os indivíduos foram medidos do ponto terminal da boca até a parte traseira do opérculo caudal a fim de verificar se houve alguma alteração no comprimento e/ou biometria dos indivíduos que ingeriram microplásticos (Figura 4). As razões entre o comprimento da cabeça e o comprimento total do corpo também foram calculadas (Pannetier *et al.*, 2020).

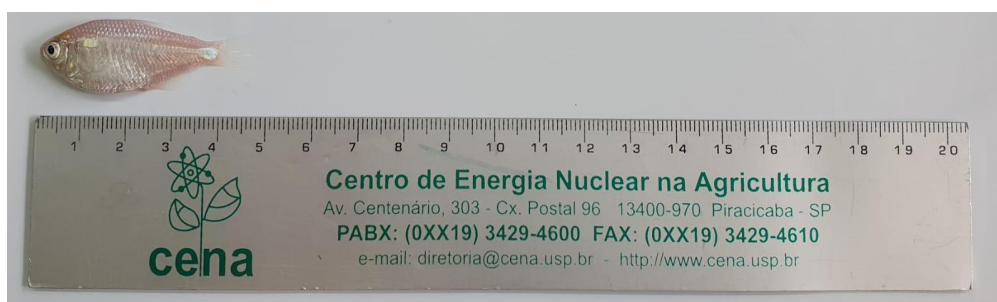


Figura 4: Avaliação e coleta das medidas biométricas do lambari rosa (Acervo pessoal).

3.3 Retenção dos microplásticos no trato gastrointestinal e fezes

A fim de avaliar o processo de digestão dos microplásticos ingeridos pelo lambari rosa, 5 peixes foram retirados de aquários aleatórios nos tempos $T = 2h$, $T = 24h$ e $T = 48h$ após a alimentação (Jovanović *et al.*, 2018). Tais indivíduos foram eutanasiados com uma

overdose de benzocaína (10x a dose ideal de 0,1mg/L). O trato gastrointestinal de cada indivíduo foi removido e armazenado a -80°C. Para analisar a excreção das micropartículas plásticas pelo lambari rosa, foi feita a coleta das fezes com o auxílio de um coletor.

Para remover a matéria orgânica presente nos tratos gastrointestinais e nas fezes, foi utilizada a técnica de digestão do material biológico (adaptada da metodologia utilizada por Dhimmer (2017)). A técnica envolve a dissolução química de tecidos moles e matéria orgânica utilizando hidróxido de potássio PA (KOH 10%). Após a adição de 50ml de KOH 10%, as amostras foram colocadas em estufa a 60°C por 48 horas, a fim de otimizar o tempo de realização do processo. As amostras digeridas foram então filtradas com bomba a vácuo em filtro Whatmann de aproximadamente 1µm e foram colocadas em estufa a 32°C por 24 horas para secagem dos filtros (Luz, 2018). Os filtros contendo microplásticos, após serem secos em estufa, foram armazenados em placas de Petri a fim de evitar perdas.

Para identificar os microplásticos dos resíduos retidos após o tratamento com o hidróxido de potássio, foi utilizado o corante vermelho do Nilo (Figura 5), que adsorve na superfície plástica (da Costa Araújo, 2020). Dessa forma, foi preparada uma solução de vermelho do Nilo (Sigma-Aldrich) em acetona a 1 mg/ml. Foi utilizado 5 µL dessa solução para cada amostra de trato gastrointestinal e fezes obtida, sendo que cada amostra ficou em contato com o corante em agitador orbital (100 rpm) por 30 minutos.

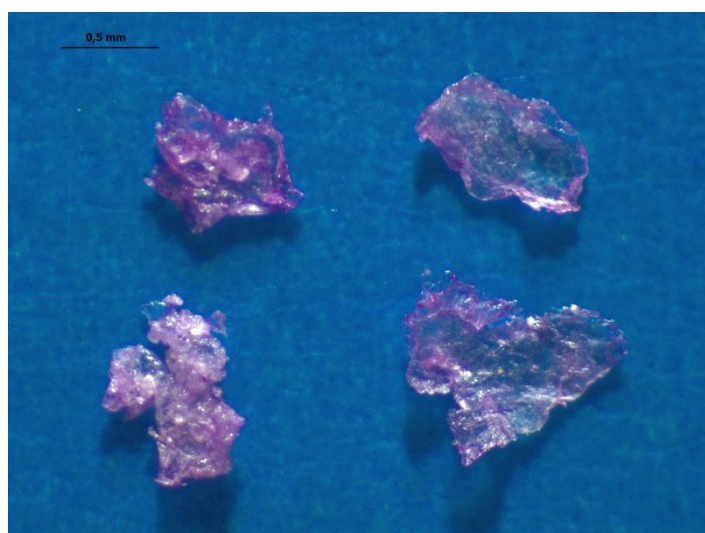


Figura 5: Microplásticos após as etapas de digestão da matéria orgânica e coloração com o corante vermelho do Nilo (Acervo pessoal).

A observação e quantificação das partículas microplásticas de cada amostra foi realizada com auxílio de microscópio. Os microplásticos de cada amostra foram então separados e pesados.

3.4. Forma de análise dos resultados

Os resultados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos de mortalidade, peso, biometria e malformação foram apresentados na forma de média (\pm erro padrão da média) e porcentagem, com um nível de significância de 0.05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros ecotoxicológicos

4.1.1 Mortalidade

A mortalidade foi verificada durante 90 dias e a taxa de mortalidade (TM) foi calculada, para cada tratamento, seguindo a seguinte equação (1):

$$TM = \frac{\text{número total de indivíduos mortos no final do experimento}}{\text{número total de indivíduos no início do experimento}} \times 100 \quad (1)$$

Estão demonstradas abaixo a quantidade de indivíduos mortos por mês (Gráfico 1) e a taxa de mortalidade (TM) por tratamento (Gráfico 2).

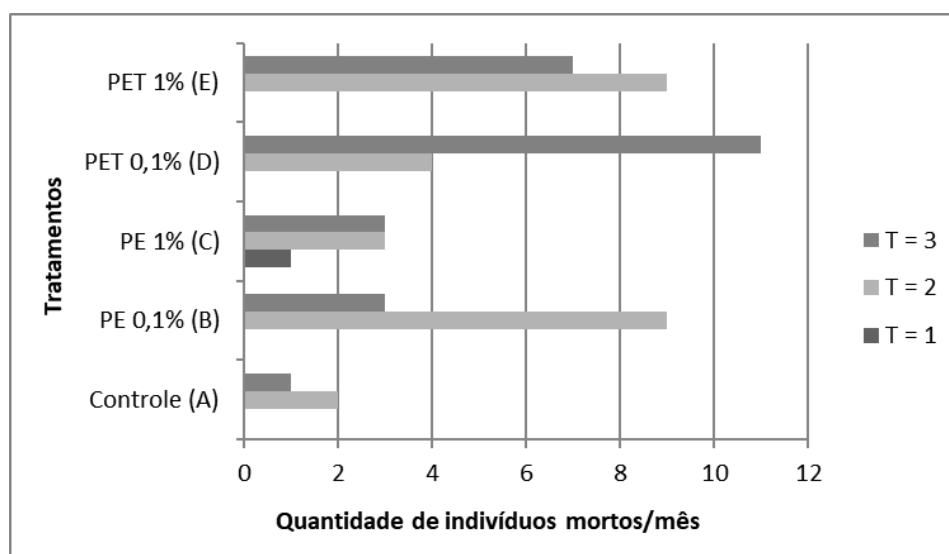


Gráfico 1: Quantidade de indivíduos mortos por mês por tratamento. T=1, T=2 e T=3 correspondem ao primeiro, segundo e terceiro mês de experimento, respectivamente.

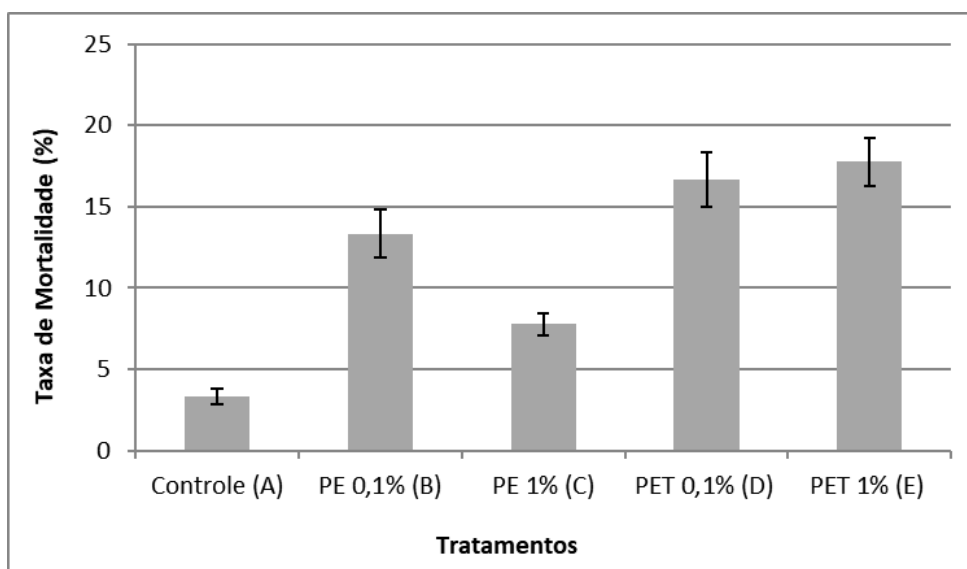


Gráfico 2: Taxa de mortalidade (média + desvio padrão) por tratamento ao final dos 90 dias de experimento.

A partir dos resultados obtidos observa-se que, durante os primeiros 30 dias de experimento, apenas um indivíduo do Tratamento C morreu, enquanto ao longo dos meses seguintes o número de indivíduos mortos nos demais tratamentos (B, D e E) aumentou significativamente, de forma que, após os 90 dias de experimento, o Tratamento E foi o que apresentou a maior taxa de mortalidade dentre todos os tratamentos ($17,77 \pm 1,48$), seguido do Tratamento D ($16,66 \pm 1,85$), Tratamento B ($13,33 \pm 1,5$), Tratamento C ($7,77 \pm 0,66$) e, por fim, Tratamento A ($3,33 \pm 0,5$).

Assim sendo, os indivíduos presentes nos Tratamentos D e E, ou seja, que foram alimentados com microplásticos do polímero PET nas concentrações de 0,1% e 1%, respectivamente, foram os que apresentaram maior taxa de mortalidade após o tempo de 90 dias do experimento. Essa mortalidade pode ser justificada pela interrupção ou redução significativa da alimentação devido a lesões ou obstruções intestinais, que podem levar à morte. Segundo Peda *et al.* (2016), a ingestão de microplásticos pode ocasionar a perfuração do intestino, lesões ulcerativas, ruptura gástrica e até mesmo alterações intestinais, o que evidencia o impacto negativo que tais danos físicos podem ter nas taxas de alimentação e nas funções intestinais dos peixes.

No entanto, ao considerar o polímero PE, o Tratamento B, que continha a menor concentração de microplásticos (0,1%), apresentou maior taxa de mortalidade do que o Tratamento C, que continha a maior concentração (1%) de microplásticos desse polímero. Isso pode ter ocorrido porque, na presença de altas concentrações de microplásticos, os peixes foram capazes de selecionar partículas que continham apenas ração, ingerindo em

menor quantidade partículas de ração que continham microplásticos (Long *et al.*, 2015).

4.1.2. Peso

5 indivíduos de cada aquário foram anestesiados com benzocaína (0,1mg/L) e pesados em balança analítica no início do experimento (T = i) e após 90 dias, no final do experimento (T = f). Os dados obtidos estão descritos no Gráfico 3 e na Tabela 1 abaixo:

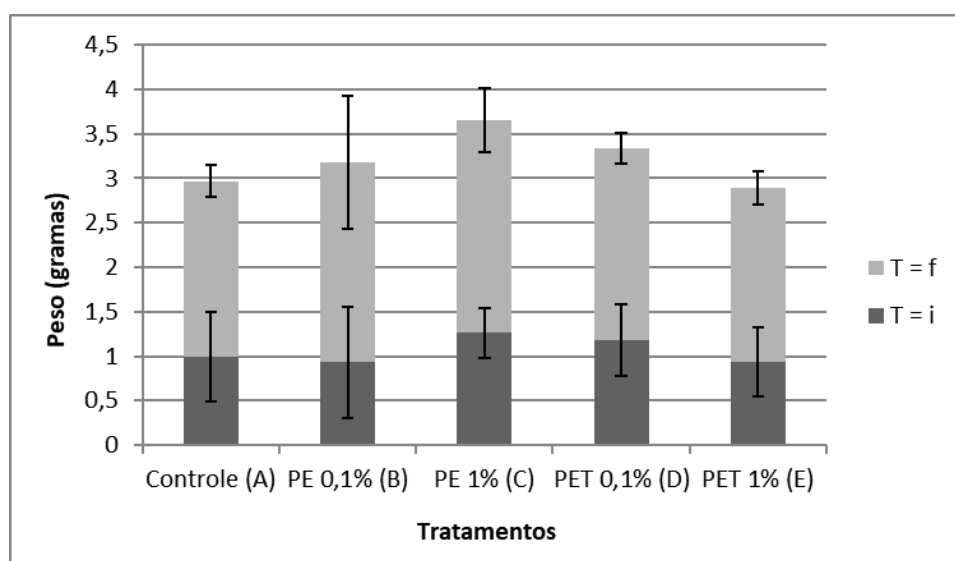


Gráfico 3: Peso em gramas (média + desvio padrão) de indivíduos no início do experimento (T = i) e final do experimento (T = f) por tratamento.

	Controle (A)	PE 0,1% (B)	PE 1% (C)	PET 0,1% (D)	PET 1% (E)
T = i	0,99 ± 0,5	0,93 ± 0,62	1,26 ± 0,27	1,18 ± 0,4	0,94 ± 0,38
T = f	1,98 ± 0,18	2,25 ± 0,74	2,39 ± 0,35	2,16 ± 0,17	1,95 ± 0,19

Tabela 1: Peso em gramas (média + desvio padrão) de indivíduos no início do experimento (T = i) e final do experimento (T = f) por tratamento.

No entanto, observa-se que não houveram grandes variações no peso corporal (g) dos indivíduos ao longo dos 90 dias de experimento, evidenciando que a exposição à dieta contendo microplásticos de ambos os polímeros e em ambas concentrações não afetou este parâmetro toxicológico. Tal resultado se confirma quando os dados são comparados com o Tratamento A (controle).

4.1.3 Malformações

Após 90 dias de experimento, 5 indivíduos de cada aquário foram anestesiados com benzocaína (0,1mg/L) e examinados individualmente sob estereomicroscópio. No entanto, não foram identificadas malformações ou lesões em nenhum indivíduo de nenhum tratamento após a ingestão de microplásticos presentes na dieta. O Tratamento A (controle) também não apresentou nenhuma anormalidade morfológica.

4.1.4 Alterações no comprimento/biometria

5 indivíduos de cada aquário foram medidos do ponto terminal da boca até a parte traseira do opérculo caudal (Gráfico 4 e Tabela 2) no início do experimento (T = i) e após 90 dias, no final do experimento (T = f). O comprimento da cabeça (Gráfico 5 e Tabela 3) e do corpo (Gráfico 6 e Tabela 4), bem como a razão entre o comprimento da cabeça e o comprimento total do corpo (Gráfico 7) também foram calculados.

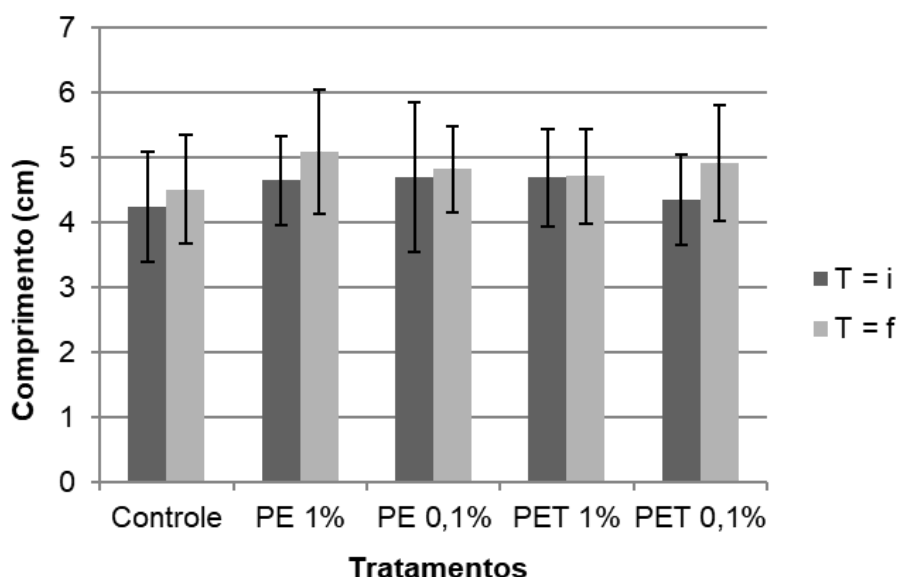


Gráfico 4: Comprimento (cm) medido do ponto terminal da boca até a parte traseira do opérculo caudal (média + desvio padrão) por tratamento no início do experimento (T = i) e no final do experimento (T = f).

	Controle (A)	PE 0,1% (B)	PE 1% (C)	PET 0,1% (D)	PET 1% (E)
T = i	4,24 ± 0,85	4,7 ± 1,15	4,65 ± 0,68	4,36 ± 0,69	4,69 ± 0,74
T = f	4,51 ± 0,83	4,82 ± 0,66	5,09 ± 0,96	4,91 ± 0,89	4,71 ± 0,73

Tabela 2: Comprimento (cm) medido do ponto terminal da boca até a parte traseira do opérculo caudal (média + desvio padrão) por tratamento no início do experimento (T = i) e no final do experimento (T = f).

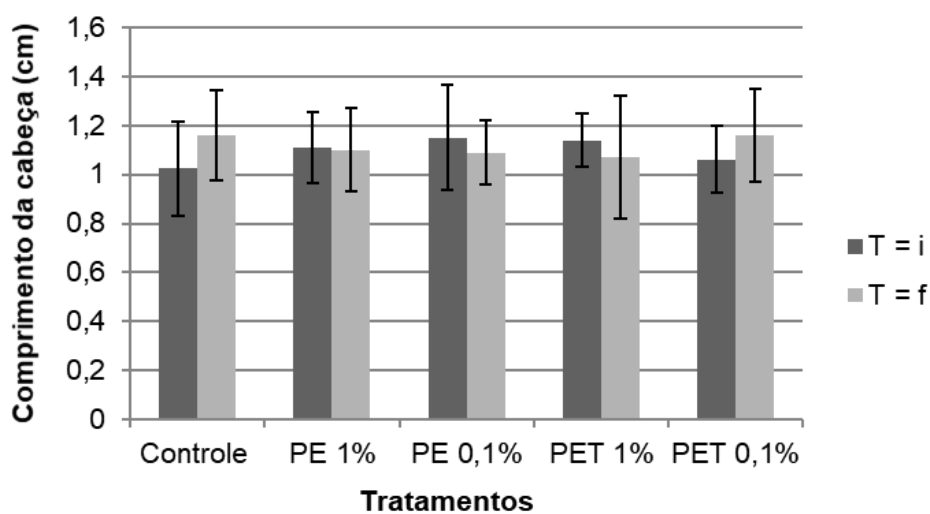


Gráfico 5: Comprimento da cabeça (cm) (média + desvio padrão) por tratamento no início do experimento (T = i) e no final do experimento (T = f).

	Controle (A)	PE 0,1% (B)	PE 1% (C)	PET 0,1% (D)	PET 1% (E)
T = i	1,025 ± 0,19	1,15 ± 0,21	1,11 ± 0,14	1,06 ± 0,13	1,14 ± 0,10
T = f	1,16 ± 0,18	1,09 ± 0,13	1,10 ± 0,17	1,16 ± 0,18	1,07 ± 0,24

Tabela 3: Comprimento da cabeça (cm) (média + desvio padrão) por tratamento no início do experimento (T = i) e no final do experimento (T = f).

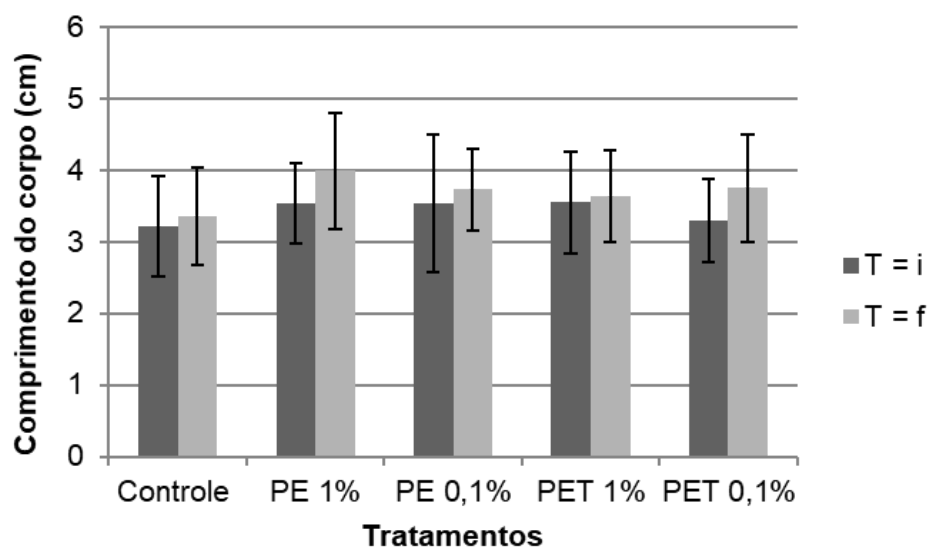


Gráfico 6: Comprimento do corpo (cm) (média + desvio padrão) por tratamento no início do experimento (T = i) e no final do experimento (T = f).

	Controle (A)	PE 0,1% (B)	PE 1% (C)	PET 0,1% (D)	PET 1% (E)
T = i	3,21 ± 0,69	3,54 ± 0,95	3,54 ± 0,56	3,3 ± 0,58	3,55 ± 0,71
T = f	3,35 ± 0,68	3,73 ± 0,57	3,99 ± 0,8	3,75 ± 0,74	3,64 ± 0,63

Tabela 4: Comprimento do corpo (cm) (média + desvio padrão) por tratamento no início do experimento (T = i) e no final do experimento (T = f).

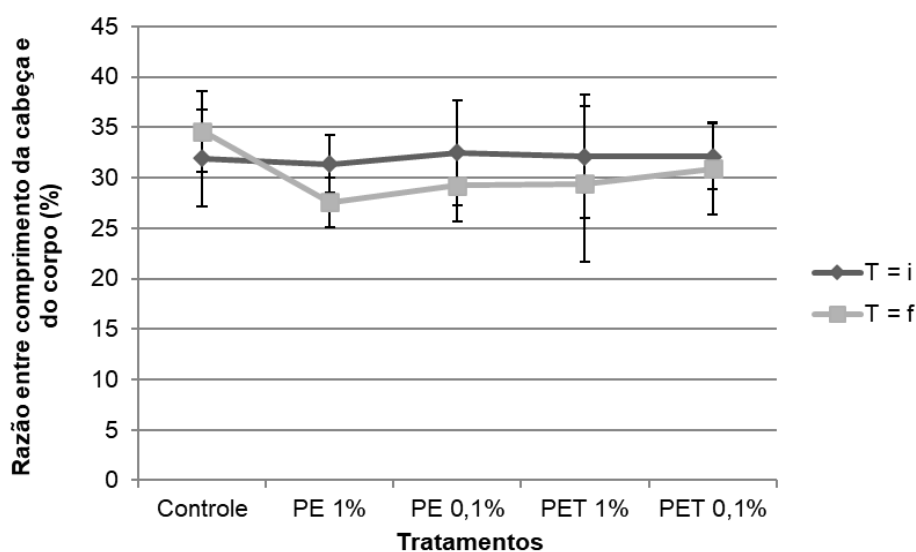


Gráfico 7: Razão entre comprimento da cabeça e comprimento total do corpo (média + desvio padrão) por tratamento no início do experimento (T = i) e no final do experimento (T = f).

A partir dos resultados obtidos, observa-se que os Tratamentos B e E apresentaram as menores medidas de comprimento (cm) quando medidos do ponto terminal da boca até a parte traseira do opérculo caudal. Nota-se também que os Tratamentos B, C e E apresentaram reduções no comprimento da cabeça (cm) após os 90 dias de exposição à dieta contendo microplásticos. Em relação ao comprimento total do corpo (cm), não ocorreram grandes alterações em nenhum dos tratamentos. Por fim, percebe-se que em todos os tratamentos, com exceção do Tratamento A (controle), houve uma redução na razão entre o comprimento da cabeça e o comprimento total do corpo ao final do experimento.

Tendo isso em vista, o comprimento corporal reduzido pode ter ocorrido devido à diminuição da ingestão de alimentos devido à obstrução, perfuração ou ulceração do trato digestivo, ou até mesmo pela indução da sensação de saciedade (Law, 2017; Rochman *et al.*, 2013). Por fim, Pannetier *et al.* (2019) demonstraram que a exposição a dieta contendo microplásticos foi responsável por ocasionar reduções no comprimento da cabeça e na razão entre comprimento da cabeça e comprimento total do corpo em embriões e larvas de peixes, se assemelhando aos resultados observados neste estudo.

4.2 Acumulação e excreção dos microplásticos ingeridos

A quantidade de microplásticos encontrados nas fezes 2h, 24h e 48h após a alimentação, bem como a quantidade de microplásticos encontrados no trato gastrointestinal de cada indivíduo nesses mesmos tempos podem ser observados nas tabelas abaixo. Além disso, a porcentagem de microplásticos ainda presentes no trato gastrointestinal (acumulados) e excretados após 48h da última alimentação também foi calculada. As Tabelas 5, 6, 7 e 8 correspondem aos Tratamentos B, C, D e E, respectivamente.

PE 0,1% (B)				
		1	2	3
Fezes (mg) (n=30)	2h	0,12 ± 0,09	0,08 ± 0,04	0,19 ± 0,06
	24h	0,68 ± 0,11	0,63 ± 0,10	0,66 ± 0,09
	48h	0,62 ± 0,05	0,64 ± 0,07	0,59 ± 0,07
Trato (mg) (n=5)	2h	1,67 ± 0,08	1,69 ± 0,14	1,58 ± 0,1
	24h	0,97 ± 0,12	1,05 ± 0,09	0,91 ± 0,11
	48h	0,33 ± 0,06	0,39 ± 0,08	0,28 ± 0,07
Após 48h:	Não excretado (%)	18,33 ± 0,08	21,66 ± 0,10	15,55 ± 0,09
	Excretado (%)	78,88 ± 0,08	75 ± 0,07	80 ± 0,07
Recuperação (%)	-	97,22	96,66	95,55

Tabela 5: Quantidade de microplásticos encontrados nas fezes (mg) e trato gastrointestinal (mg) 2h, 24h e 48h após a alimentação com 0,1% de microplásticos de PE. Além disso, a porcentagem de microplásticos excretados e não excretados após as 48h também foi calculada. 1, 2 e 3 correspondem às triplicatas do tratamento.

PE 1% (C)				
		1	2	3
Fezes (mg) (n=30)	2h	1,06 ± 0,2	0,91 ± 0,18	1,08 ± 0,23
	24h	9,96 ± 0,44	9,82 ± 0,4	9,86 ± 0,24
	48h	5,31 ± 0,31	5,10 ± 0,26	5,47 ± 0,31
Trato (mg) (n=5)	2h	16,90 ± 0,19	17,02 ± 0,2	16,88 ± 0,41
	24h	6,90 ± 0,22	7,13 ± 0,3	7,0 ± 0,5
	48h	1,57 ± 0,34	2,01 ± 0,42	1,51 ± 0,34
Após 48h:	Não excretado (%)	8,72 ± 0,25	11,16 ± 0,3	8,38 ± 0,41
	Excretado (%)	90,72 ± 0,31	87,94 ± 0,28	91,16 ± 0,26
Recuperação (%)	-	96,44	94,61	97,55

Tabela 6: Quantidade de microplásticos encontrados nas fezes (mg) e trato gastrointestinal (mg) 2h, 24h e 48h após a alimentação com 1% de microplásticos de PE. Além disso, a porcentagem de microplásticos excretados e não excretados após as 48h também foi calculada. 1, 2 e 3 correspondem às triplicatas do tratamento.

PET 0,1% (D)				
		1	2	3
Fezes (mg) (n=30)	2h	0,09 ± 0,05	0,08 ± 0,06	0,11 ± 0,09
	24h	0,68 ± 0,09	0,56 ± 0,08	0,60 ± 0,07
	48h	0,61 ± 0,08	0,6 ± 0,1	0,66 ± 0,05
Trato (mg) (n=5)	2h	1,68 ± 0,12	1,70 ± 0,11	1,66 ± 0,14
	24h	0,99 ± 0,07	1,12 ± 0,06	1,05 ± 0,06
	48h	0,34 ± 0,09	0,47 ± 0,13	0,38 ± 0,07
Após 48h:	Não excretado (%)	18,88 ± 0,09	26,11 ± 0,1	21,11 ± 0,09
	Excretado (%)	76,66 ± 0,07	68,88 ± 0,08	76,11 ± 0,07
Recuperação (%)	-	95,55	97,22	97,22

Tabela 7: Quantidade de microplásticos encontrados nas fezes (mg) e trato gastrointestinal (mg) 2h, 24h e 48h após a alimentação com 0,1% de microplásticos de PET. Além disso, a porcentagem de microplásticos excretados e não excretados após as 48h também foi calculada. 1, 2 e 3 correspondem às triplicatas do tratamento.

PET 1% (E)				
		1	2	3
Fezes (mg) (n=30)	2h	1,03 ± 0,12	0,92 ± 0,22	0,98 ± 0,21
	24h	9,60 ± 0,11	9,80 ± 0,17	9,70 ± 0,13
	48h	4,10 ± 0,19	3,40 ± 0,15	3,80 ± 0,14
Trato (mg) (n=5)	2h	16,87 ± 0,17	17,04 ± 0,19	16,96 ± 0,14
	24h	7,24 ± 0,21	7,19 ± 0,12	7,25 ± 0,16
	48h	3,10 ± 0,3	3,60 ± 0,2	3,20 ± 0,18
Após 48h:	Não excretado (%)	17,22 ± 0,14	20 ± 0,17	17,77 ± 0,16
	Excretado (%)	81,83 ± 0,22	78,44 ± 0,18	80,44 ± 0,16
Recuperação (%)	-	97,22	96,44	97,44

Tabela 8: Quantidade de microplásticos encontrados nas fezes (mg) e trato gastrointestinal (mg) 2h, 24h e 48h após a alimentação com 1% de microplásticos de PET. Além disso, a porcentagem de microplásticos excretados e não excretados após as 48h também foi calculada. 1, 2 e 3 correspondem às triplicatas do tratamento.

Para o polímero PE, observa-se que no Tratamento B, no qual os lambaris foram

expostos dieteticamente a concentração de 0,1%, as taxas de acumulação e excreção após 48h da última alimentação variaram em torno de 15-21% e 75-80%, respectivamente. Por sua vez, no Tratamento C, no qual os lambaris foram expostos a uma maior concentração, de 1%, esses valores variaram em torno de 8-11% e 87-91%, respectivamente. Para o polímero PET, por sua vez, observa-se que no Tratamento D, no qual os lambaris foram expostos dieteticamente a concentração de 0,1%, as taxas de acumulação e excreção após 48h da última alimentação variaram em torno de 18-26% e 68-76%, respectivamente. Por sua vez, no Tratamento E, no qual os lambaris foram expostos a uma maior concentração, de 1%, esses valores variaram em torno de 17-20% e 78-81%, respectivamente.

Nota-se, portanto, que os Tratamentos C e E, que continham a maior concentração de microplásticos, ou seja, os tratamentos nos quais os lambaris foram alimentados com 1% de microplásticos de polímeros de PE e PET, respectivamente, apresentaram as maiores taxas de excreção e, conseqüentemente, as menores taxas de acumulação dos microplásticos ingeridos após o período de 48h. Tal resultado pode ser justificado pelo fato da concentração de microplásticos ser mais elevada nesses tratamentos, o que provavelmente implicou em uma excreção mais rápida dos microplásticos através das fezes, sendo que resultados semelhantes também foram observados por Ogonowski *et al.* (2016).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar deste experimento estudar o potencial toxicológico de somente dois polímeros (PE e PET), é muito provável que os efeitos nocivos observados neste estudo e em diversos outros também se apliquem aos demais tipos plásticos encontrados em amostras ambientais. Além disso, quando exposto no ambiente, o material plástico se torna susceptível à colonização de comunidades bacterianas em sua superfície (bioincrustação), tornando-se assim vetor de microrganismos que podem ser patogênicos. Ainda, estudos recentes apontam que é possível que ocorra a transferência de contaminantes, como os poluentes orgânicos persistentes (POP's), da superfície microplástica para o animal (Rainieri *et al.*, 2018). Portanto, a presença de microplásticos potencializa seus riscos de exposição para a biota e aumenta a preocupação em relação à disponibilidade dessas micropartículas nos ambientes aquáticos, especialmente aqueles de água doce.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a exposição dietética, especialmente do polímero PET, foi responsável por ocasionar efeitos toxicológicos no lambari rosa, como mortalidade e alterações na biometria. A acumulação de microplásticos no trato gastrointestinal do lambari rosa também foi evidenciada para ambos os polímeros no intervalo de tempo avaliado, tendo em vista que nenhum dos tipos de plástico foi 100% excretado no período de 48 horas após a alimentação. Portanto, este estudo deve ser combinado com pesquisas e tentativas de mitigação ambiental, visto que fica claro o potencial nocivo que os microplásticos apresentam para o ambiente, e, especialmente, para os animais aquáticos que podem ingeri-los.

7. REFERÊNCIAS

Bastian, Rodrigo, et al. "Daily variation feeding of *Astyanax lacustris* (Lütken 1875) in a subtropical river." *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 43 (2021): e54516-e54516.

Bergmann, Melanie, Lars Gutow, and Michael Klages. *Marine anthropogenic litter*. Springer Nature, 2015.

Browne, Mark Anthony, et al. "Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks." *Environmental science & technology* 45.21 (2011): 9175-9179.

Cartes, Joan E., et al. "Contributions of allochthonous inputs of food to the diets of benthopelagic fish over the northwest Mediterranean slope (to 2300 m)." *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 109 (2016): 123-136.

Cesa, Flavia Salvador, Alexander Turra, and Julia Baruque-Ramos. "Synthetic fibers as microplastics in the marine environment: a review from textile perspective with a focus on domestic washings." *Science of the total environment* 598 (2017): 1116-1129.

da Costa Araújo, Amanda Pereira, and Guilherme Malafaia. "Can short exposure to polyethylene microplastics change tadpoles' behavior? A study conducted with neotropical

tadpole species belonging to order anura (*Physalaemus cuvieri*)." *Journal of hazardous materials* 391 (2020): 122214.

Dauvergne, Peter. "The power of environmental norms: marine plastic pollution and the politics of microbeads." *Environmental Politics* 27.4 (2018): 579-597.

Devriese, Lisa I., et al. "Microplastic contamination in brown shrimp (*Crangon crangon*, Linnaeus 1758) from coastal waters of the Southern North Sea and Channel area." *Marine pollution bulletin* 98.1-2 (2015): 179-187.

Dhimmer, Viren Rasical. *Microplastics in gastrointestinal tracts of *Trachurus trachurus* and *Scomber colias* from the Portuguese Coastal waters*. Diss. 2017.

Dris, Rachid, et al. "A first overview of textile fibers, including microplastics, in indoor and outdoor environments." *Environmental pollution* 221 (2017): 453-458.

Frias, J. P. G. L., et al. "Microplastics in coastal sediments from Southern Portuguese shelf waters." *Marine environmental research* 114 (2016): 24-30.

Garutti, Valdener. *Piscicultura ecológica*. Unesp, 2003.

Gomes, C. C., F. G. Costa, and M. I. Borella. "Distribution of GnRH in the brain of the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* ()." *Micron* 52 (2013): 33-38.

Grigorakis, Stefan, Sherri A. Mason, and Ken G. Drouillard. "Determination of the gut retention of plastic microbeads and microfibers in goldfish (*Carassius auratus*)." *Chemosphere* 169 (2017): 233-238.

Hidalgo-Ruz, Valeria, et al. "Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification." *Environmental science & technology* 46.6 (2012): 3060-3075.

Jabeen, Khalida, et al. "Microplastics and mesoplastics in fish from coastal and fresh

waters of China." *Environmental Pollution* 221 (2017): 141-149.

Jemec, Anita, et al. "Uptake and effects of microplastic textile fibers on freshwater crustacean *Daphnia magna*." *Environmental Pollution* 219 (2016): 201-209.

Jovanović, Boris, et al. "Virgin microplastics are not causing imminent harm to fish after dietary exposure." *Marine pollution bulletin* 130 (2018): 123-131.

Kershaw, P. J., and C. M. Rochman. "Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: part 2 of a global assessment." *Reports and Studies-IMO/FAO/Unesco-IOC/WMO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection (GESAMP) Eng No. 93* (2015).

Law, Kara Lavender. "Plastics in the marine environment." *Annual review of marine science* 9 (2017): 205-229.

Li, Chaoran, Rosa Busquets, and Luiza C. Campos. "Assessment of microplastics in freshwater systems: A review." *Science of the Total Environment* 707 (2020): 135578.

Li, Jiana, et al. "Microplastics in commercial bivalves from China." *Environmental pollution* 207 (2015): 190-195.

Long, Marc, et al. "Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: impact on their respective fates." *Marine Chemistry* 175 (2015): 39-46.

Lusher, Amy L., et al. "Microplastics in Arctic polar waters: the first reported values of particles in surface and sub-surface samples." *Scientific reports* 5.1 (2015): 1-9.

Luz, Jamile Arruda da. "Caracterização de microplásticos em conteúdos de tratos gastrointestinais de peixes do estuário do Rio Tramandaí-Litoral Norte do Rio Grande do Sul através de digestão de tecidos biológicos." (2018).

Malafaia, Guilherme, et al. "Novel methodology for identification and quantification of

microplastics in biological samples." *Environmental Pollution* 292 (2022): 118466.

Murray, Fiona, and Phillip Rhys Cowie. "Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758)." *Marine pollution bulletin* 62.6 (2011): 1207-1217.

Napper, Imogen E., and Richard C. Thompson. "Release of synthetic microplastic plastic fibres from domestic washing machines: Effects of fabric type and washing conditions." *Marine pollution bulletin* 112.1-2 (2016): 39-45.

Nel, H. A., and P. W. Froneman. "A quantitative analysis of microplastic pollution along the south-eastern coastline of South Africa." *Marine pollution bulletin* 101.1 (2015): 274-279.

Nelson, J. S. "Fishes of the world. John Wiley and Sons." *Inc., Hoboken, New Jersey* (2006).

Obbard, Rachel W., et al. "Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice." *Earth's Future* 2.6 (2014): 315-320.

Ogonowski, Martin, et al. "The effects of natural and anthropogenic microparticles on individual fitness in *Daphnia magna*." *PloS one* 11.5 (2016): e0155063.

Olivatto, G. P., et al. "Microplásticos: Contaminantes de preocupação global no Antropoceno." *Rev. Virtual Quim* 10.6 (2018): 1968-1989.

Ory, Nicolas Christian, et al. "Amberstripe scad *Decapterus muroadsi* (Carangidae) fish ingest blue microplastics resembling their copepod prey along the coast of Rapa Nui (Easter Island) in the South Pacific subtropical gyre." *Science of the Total Environment* 586 (2017): 430-437.

Pannetier, Pauline, et al. "Environmental samples of microplastics induce significant toxic effects in fish larvae." *Environment international* 134 (2020): 105047.

Pannetier, Pauline, et al. "Toxicity assessment of pollutants sorbed on environmental microplastics collected on beaches: Part II-adverse effects on Japanese medaka early life stages." *Environmental pollution* 248 (2019): 1098-1107.

Peda, Cristina, et al. "Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: preliminary results." *Environmental pollution* 212 (2016): 251-256.

Pirc, U., et al. "Emissions of microplastic fibers from microfiber fleece during domestic washing." *Environmental Science and Pollution Research* 23.21 (2016): 22206-22211.

Porto-Foresti, Fabio, et al. "Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*)." *Espécies nativas para piscicultura no Brasil* 2 (2005): 101-116.

Rainieri, Sandra, et al. "Combined effects of microplastics and chemical contaminants on the organ toxicity of zebrafish (*Danio rerio*)." *Environmental research* 162 (2018): 135-143.

Rochman, Chelsea M., et al. "Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress." *Scientific reports* 3.1 (2013): 1-7.

Setälä, Outi, Vivi Fleming-Lehtinen, and Maiju Lehtiniemi. "Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web." *Environmental pollution* 185 (2014): 77-83.

Triebkorn, Rita, et al. "Relevance of nano-and microplastics for freshwater ecosystems: A critical review." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 110 (2019): 375-392.

Van Franeker, Jan A., and Kara Lavender Law. "Seabirds, gyres and global trends in plastic pollution." *Environmental Pollution* 203 (2015): 89-96.

Water Environment Federation, 2003. *Wastewater Treatment Plant Design*. 1st ed. IWA Publishing, Virginia, USA.