



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Efeito da exposição de microplásticos de polietileno sobre a integridade nuclear eritrocitária em lambari-do-rabo-amarelo,

***Astyanax lacustris* (Lütken, 1875)**

MARIA CLÁUDIA ARÉCA MATOS

**CAMPO GRANDE – MS
NOVEMBRO – 2025**

MARIA CLÁUDIA ARÉCA MATOS

**Efeito da exposição de microplásticos de polietileno sobre a integridade nuclear eritrocitária em lambari-do-rabo-amarelo,
Astyanax lacustris (Lütken, 1875)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para graduação no curso de Ciências Biológicas Bacharelado, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes.

CAMPO GRANDE – MS
NOVEMBRO – 2025

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer à realização deste trabalho primeiramente a Deus, que me deu a vida, a saúde, a força e a sabedoria para executar esta pesquisa e por ter me acompanhado durante todo o meu processo de graduação.

Agradeço ao meu orientador Carlos Eurico dos Santos Fernandes por ter confiado em mim para realizar esse trabalho, pela oportunidade de fazer parte por três anos do Laboratório de Patologia Experimental (LAPEx) e, é claro, por toda a orientação e parceria na execução dessa pesquisa.

Quero também agradecer à Stéfanni Loureiro, técnica do LAPEx por ter me acompanhado durante todo o processo laboratorial, pelos ensinamentos e pela parceria.

Agradeço aos meus pais, irmão e familiares por todo o apoio que me deram durante os meus anos de formação, pela base, por serem os pilares da minha vida e por toda a torcida para o meu sucesso na graduação, sem eles nada disso seria possível.

Também quero agradecer aos meus amigos Kamilly, Laura, Lucellya, Beatriz, Rafaela e João Victor, pessoas que me acompanharam durante os anos de graduação em Biologia. Agradeço por terem feito parte de cada momento e acreditado em mim sempre. A caminhada foi mais leve e divertida porque pude contar com vocês.

Faço aqui meus agradecimentos ao Laboratório de Patologia Experimental (LAPEx) e a toda a equipe, por terem sido meu refúgio, auxílio e companhia.

Agradeço à Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) pela oportunidade de estar realizando o curso superior de Ciências Biológicas (Bacharelado), aos professores, técnicos, monitores e aos colegas de curso.

RESUMO

A expansão contínua da produção de polímeros sintéticos, especialmente plásticos, tem resultado em maior disponibilidade desses materiais no ambiente. O manejo e descarte inadequado dos resíduos plásticos em corpos hídricos contribuem significativamente para o aumento da concentração de microplásticos (MPs) — partículas poliméricas com dimensões reduzidas — em diferentes compartimentos aquáticos, incluindo lagos, rios e ambientes marinhos. Essa dinâmica favorece a exposição direta de organismos aquáticos a tais contaminantes, potencializando riscos ecotoxicológicos associados. Esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos causados no DNA dos núcleos eritrocitários em *Astyanax lacustris*, expostos a microplástico de polietileno (MP-PE). Espécimes ($n = 24$) de *A. lacustris*, foram expostos a diferentes concentrações de MP-PE (controle, 15, 30 e 60 mg/L) por 10 dias. Ao final deste período, o sangue foi colhido para análise do ensaio do Cometa e os núcleos eritrocitários foram avaliados qualitativamente (graus de alterações) e quantitativamente (% de DNA na cauda do cometa), além da análise da morfometria nuclear acompanhada do teste do micronúcleo associado às anormalidades nucleares. O aumento da concentração de MP-PE resultou em níveis mais elevados de danos ao material genético. Todos os graus de alterações nucleares foram observados a partir de 30 mg/L de exposição. Grau 3 foi superior nos espécimes expostos a 60 mg/L. O percentual de DNA (rastro) na cauda do cometa também foi superior em todas as concentrações, com destaque para 15 mg/L. Houve também alterações significativas da compactação da cromatina e área nuclear e a observação de alterações nucleares. Nossos resultados demonstram que as concentrações estudadas causam genotoxicidade e citotoxicidade em peixes expostos e podem ser nocivas à qualidade do ecossistema aquático.

Palavras-chave: peixe, genotoxicidade, nucleometria, poluição ambiental

ABSTRACT

The continuous expansion of synthetic polymer production, especially plastics, has resulted in greater availability of these materials in the environment. Improper management and disposal of plastic waste in water bodies contributes significantly to the increase in the concentration of microplastics (MPs) —small polymer particles—in different aquatic compartments, including lakes, rivers, and marine environments. This dynamic favors the direct exposure of aquatic organisms to such contaminants, increasing the associated ecotoxicological risks. This study aimed to evaluate the effects on the DNA of erythrocyte nuclei in *Astyanax lacustris* exposed to polyethylene microplastics (MP-PE). Specimens ($n = 24$) of *A. lacustris* were exposed to different concentrations of MP-PE (control, 15, 30, and 60 mg/L) for 10 days. At the end of this period, blood was collected for Comet assay analysis, and erythrocyte nuclei were evaluated qualitatively (degrees of alteration) and quantitatively (% of DNA in the comet tail), in addition to nuclear morphometry analysis accompanied by the micronucleus test associated with nuclear abnormalities. The increase in MP-PE concentration resulted in higher levels of damage to genetic material. All degrees of nuclear changes were observed from 30 mg/L exposure. Grade 3 was higher in specimens exposed to 60 mg/L. The percentage of DNA (trail) in the comet tail was also higher at all concentrations, especially at 15 mg/L. There were also significant changes in chromatin compaction and nuclear area, and nuclear alterations were observed. Our results demonstrate that the concentrations studied cause genotoxicity and cytotoxicity in exposed fish and may be harmful to the quality of the aquatic ecosystem.

Key-words: fish, genotoxicity, nucleometry, environmental pollution

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVO	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Local e condução do experimento	10
3.2 Ensaio do Cometa (<i>single-cell gel electrophoresis</i>)	11
3.3 Análise dos dados	12
3.4 Morfologia e morfometria nuclear eritrocitária	12
4 RESULTADOS	13
5 DISCUSSÃO	18
6 CONCLUSÃO	21
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas têm-se observado um aumento expressivo na produção de plástico ao redor do planeta, isso porque, esse material pode ser utilizado em diversas áreas industriais por possuir um baixo custo de produção e fácil processamento, pela sua capacidade de resistir a água e o seu grau de confiança pelos produtores e consumidores, sendo o continente asiático o principal fabricante de plástico no mundo (Sonke *et al.*, 2025). O consumismo exacerbado dos últimos anos também tem contribuído para a fabricação em larga escala desse produto, já que o plástico está presente em embalagens, em automóveis, em dispositivos elétricos e também na agricultura, com isso, pode-se dizer que o mundo está passando pela chamada “era do plástico” (Khan *et al.*, 2024).

Os microplásticos (MPs) são constituídos por diferentes tipos de polímeros, que de acordo com a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), podem ou não conter outros materiais na sua composição, além de ser um material muito versátil. O polímero mais utilizado é do tipo polietileno (PE) por conta da praticidade, fácil processamento e pela alta resistência química (Souza *et al.*, 2024). Os resíduos desses polímeros são encontrados em formas e tamanhos variados, e podem estar presentes como fragmentos, fibras, esferas, etc. Geralmente em corpos aquáticos, são encontrados resíduos com menos de 5 milímetros de comprimento (Vargas *et al.*, 2022). Esse material, tem sido encontrado em diversos ambientes no planeta, como em montanhas, ambientes aquáticos e regiões polares desde a década de 70, uma época bem distante da primeira vez que o termo microplástico foi usado para determinar fragmentos de plástico por Thompson *et al.* em 2004 (Sulaiman *et al.*, 2023). Os microplásticos de polietileno são os mais produzidos pelas indústrias e também o com maior índice de presença em ecossistemas marinhos e, nesse ambiente, a sua ocorrência tem relação com diversas alterações na biota (Teng *et al.*, 2021).

Os MPs podem ser classificados em duas categorias. A primeira é aquela que designa os MPs produzidos a fim de compor outros tipos de materiais e possuem formas e tamanhos estabelecidos no momento de sua fabricação, incluindo medicamentos, embalagens, entre outros. A segunda classificação, refere-se aos MPs gerados no momento em que ocorrem os processos de decomposição e fragmentação destes produtos. Isso ocorre pela degradação proveniente do próprio ambiente, como o impacto físico causado pelas ondas e a exposição à radiação ultravioleta. Os fragmentos provenientes desses polímeros, tanto os primários como os secundários, se comportam no ambiente de forma semelhante e por essa razão, há uma dificuldade de separá-los na identificação (Vargas *et al.*, 2022). A grande quantidade de plástico que vem sendo produzida nos últimos anos, e o descarte de produtos feitos com esse material, tem contribuído para a contaminação de corpos aquáticos e de todo o seu ecossistema (Yu *et al.*, 2023).

Os MPs podem ser ingeridos pelos diferentes grupos de animais aquáticos de forma intencional ou accidental, a partir de uma série de fatores como sua flutuabilidade, coloração e por serem muito semelhantes a alimentos. A presença de MPs de diferentes tamanhos pode ser encontrada em animais aquáticos, principalmente nos peixes, especialmente em espécies onívoras ou predadoras, devido a sua permeabilidade pelas membranas biológicas desses organismos (Iheanacho; Odo, 2020). Esses polímeros possuem capacidade de se acumular no organismo dos animais aquáticos potencializando danos fisiológicos. Essa acumulação, pode ocorrer pela ingestão ou pela respiração através das brânquias, onde o MP pode se fixar aos filamentos lamelares, causando alterações estruturais afetando as trocas gasosas e a osmorregulação orgânica, dessa forma a ingestão de MPs, pode ocasionar problemas na absorção de nutrientes, processos inflamatórios endoteliais, além de alterações imunológicas, hematológicas e metabólicas (Yu *et al.*, 2023). Os MPs têm capacidade de se aderir na membrana de células dos eritrócitos, causando hemólise, a qual reduz os níveis de hemoglobina. Esses fatores causam alterações nos parâmetros hematológicos, afetando a homeostase fisiológica, e consequentemente a saúde de animais como os peixes, por essa razão, a avaliação do impacto do MP nos indicadores hematológicos de peixes pode ser uma alternativa para avaliar a saúde desses animais e a qualidade da água no ambiente em que estão inseridos (Yu *et al.*, 2023).

Nos últimos anos, diversas metodologias têm sido desenvolvidas e aprimoradas para a avaliação de danos na molécula de DNA, com especial destaque para aquelas capazes de detectar alterações genéticas de forma sensível e precisa. Tais técnicas são amplamente aplicadas em diferentes áreas da biologia, notadamente na toxicologia ambiental, onde servem como ferramentas para o monitoramento da genotoxicidade em organismos expostos a contaminantes (Cordelli *et al.*, 2021; Jiang *et al.*, 2023).

Entre essas metodologias, destaca-se o teste do cometa (*single gel electrophoresis assay* ou *comet assay*), proposto originalmente por Singh *et al.* (1988). Basicamente, essa técnica permite a visualização e mensuração das quebras na molécula de DNA em células submetidas a um processo que envolve a sua lise por detergentes e sais, sob condições alcalinas. Em seguida, as amostras, embebidas em gel de agarose, são submetidas à eletroforese, etapa na qual fragmentos de DNA danificados migram em direção ao ânodo, formando uma estrutura semelhante a um cometa (El Yamani *et al.*, 2022). Após a neutralização, as lâminas são expostas a um corante fluorescente e analisadas em microscopia de fluorescência, na qual a intensidade e o comprimento da cauda do cometa refletem o grau do dano genético (Gajski *et al.*, 2021).

O teste do cometa é amplamente empregado em estudos de biomonitoramento devido à sua alta sensibilidade, baixo custo e aplicabilidade em diferentes tipos celulares. Células com DNA íntegro permanecem predominantemente na região da “cabeça” (núcleo celular) do

cometa, enquanto aquelas que sofreram quebras apresentam migração de fragmentos em direção à “cauda” (rastro) (Osipov *et al.*, 2014). Os danos ao DNA podem resultar da exposição a diversos agentes genotóxicos, como radiação ultravioleta, poluentes químicos e compostos reativos, os quais podem induzir alterações irreversíveis associadas à redução da sobrevivência e do sucesso reprodutivo de diferentes espécies. Do ponto de vista biológico, esses danos podem desencadear efeitos em cascata, comprometendo a integridade celular, o funcionamento de órgãos e, consequentemente, a capacidade de sobrevivência populacional dos organismos afetados (Lee; Steinert, 2003).

Outra metodologia frequentemente utilizada para a detecção de efeitos citotóxicos e genotóxicos é o teste do micronúcleo, frequentemente associado à análise de anormalidades nucleares. Esses biomarcadores têm se mostrado eficazes na avaliação do estresse celular e da exposição a poluentes em ambientes aquáticos, apresentando como vantagens a simplicidade de execução, baixo custo e ampla aplicabilidade em diferentes espécies de peixes. Além disso, o teste do micronúcleo destaca-se por seu potencial diagnóstico da genotoxicidade de compostos ambientais, uma vez que as alterações nucleares observadas constituem indicadores consistentes de danos citotóxicos e genotóxicos (Hussain *et al.*, 2018).

Os peixes constituem um dos grupos de bioindicadores amplamente utilizados na identificação e avaliação de riscos ambientais associados à contaminação por substâncias químicas, dessa forma, sua relevância decorre da capacidade de bioacumular e biotransformar compostos tóxicos presentes no ambiente aquático, refletindo de forma sensível as condições de qualidade ambiental (Gajski *et al.*, 2019). Além disso, por apresentarem alta integração fisiológica com o meio e respostas genotóxicas facilmente detectáveis, os peixes se consolidaram como modelos experimentais centrais em estudos ecotoxicológicos. Nesse contexto, o ensaio cometa tem se destacado como uma das principais ferramentas para a detecção de danos no DNA em diferentes tecidos de peixes expostos a contaminantes ambientais. Nos últimos anos, aproximadamente 90 espécies foram utilizadas em investigações que aplicaram esse método, sendo o sangue periférico o principal material biológico empregado na avaliação de danos genéticos induzidos por agentes tóxicos (Gajski *et al.*, 2019). Assim, o uso de peixes como bioindicadores genotóxicos representa uma abordagem consolidada e de alta sensibilidade para o monitoramento da integridade ambiental dos ecossistemas aquáticos (Karlsson *et al.*, 2023).

Astyanax lacustris (Lütken, 1875) (Teleostei: Characidae), popularmente conhecido como lambari-do-rabo-amarelo, destaca-se como um excelente bioindicador ambiental em razão de sua ampla distribuição, plasticidade trófica e elevada tolerância a diferentes condições ecológicas. Essa espécie, comumente encontrada em lagos, riachos e pequenos rios, apresenta hábito onívoro e comportamento oportunista, características que favorecem sua adaptação a ambientes sob diferentes pressões antrópicas. Além disso, seu pequeno

porte, rápido crescimento e fácil manejo em laboratório fazem do *A. lacustris* um organismo modelo amplamente utilizado em experimentos ecotoxicológicos (Gnocchi *et al.*, 2023). Os efeitos dos MPs em organismos aquáticos, como os peixes, tendem a impactar a cadeia trófica, ameaçando os ecossistemas e, consequentemente, a saúde ambiental, animal e humana. Isso ocorre por meio de mecanismos de contato direto ou indireto, variando conforme as concentrações de MPs presentes no meio ambiente e suas propriedades. Dessa forma, acredita-se que a ampla dispersão desse poluente e sua capacidade de contaminar sistemas naturais podem afetar tanto o equilíbrio ambiental quanto a saúde pública (Prata *et al.*, 2021).

Portanto, a avaliação dos impactos causados por MPs sobre organismos aquáticos tem se tornado uma prioridade científica, dado o potencial desses contaminantes em afetar a integridade dos ecossistemas e a biodiversidade. Para que estudos dessa natureza forneçam resultados robustos e comparáveis, é fundamental a adoção de metodologias padronizadas e reproduzíveis. A consistência experimental depende da definição criteriosa dos parâmetros avaliados, das concentrações testadas e do controle rigoroso das condições ambientais, de modo a reduzir interferências externas e contaminações cruzadas (de Ruijter *et al.*, 2020).

2 OBJETIVO

Este estudo teve como principal objetivo avaliar a capacidade genotóxica e citotóxica de microplástico de polietileno (MP-PE) no DNA das células eritrocitárias da espécie *Astyanax lacustris* por meio do ensaio Cometa (*single cell gel electrophoresis*), morfometria e anormalidades morfológicas nucleares eritrocitárias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este ensaio está vinculado ao projeto “Modelos experimentais para o estudo da toxicidade em organismos aquáticos”, protocolo MPQME.110221, PROPP/UFMS, e do subprojeto de mestrado vinculado ao PPG em Biologia Animal “Marcadores Bioquímicos e Histopatologia Branquial em Lambari (*Astyanax lacustris*) expostos ao microplástico de polietileno” da acadêmica Sabrina Fuzer Gonçalves do PPG em Biologia Animal, sob o protocolo n. 1.343/2024 da CEUA/UFMS.

3.1 Local e condução do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Patologia Experimental (LAPEx) localizado no Instituto de Biociências (INBIO), na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Antes do tratamento, os peixes foram aclimatados em aquários de 5.000L com renovação parcial de água e sistema de aeração artificial com bombas de recirculação. Juvenis machos e fêmeas de *Astyanax lacustris* (n=24), com peso e comprimento médio de

1,91 ±0,66 g e 3,8 ±2,91 cm, respectivamente, obtidos junto ao Bioparque Pantanal, foram aleatoriamente distribuídos em quatro aquários de 15L: Controle (n=6), 15 mg/L (n = 6), 30 mg/L (n = 6) e 60 mg/L (n = 6), por um período de 10 dias. Durante esse período, os peixes foram alimentados diariamente e a água dos aquários era totalmente trocada a cada 48 horas. Os peixes foram transferidos com o uso de um puçá para os aquários com água limpa e após a limpeza dos aquários dos tratamentos, retornavam com as concentrações restabelecidas. A agitação promovida pelas bombas de oxigênio instaladas nos aquários manteve os MPs em suspensão, evitando sua sedimentação e assegurando condições homogêneas de exposição para todos os indivíduos. Os MPs utilizados no experimento foram microesferas de polietileno (MP-PE), comerciais, de coloração branca com tamanho médio de 94,33 ±37,22 µm e com pureza acima de 95%. Ao final de cada período, os espécimes foram eutanasiados para coleta de sangue em solução alcoólica de eugenol (450 mg/L) diluída em água resfriada.

3.2 Ensaio do Cometa (*single-cell gel electrophoresis*)

Alíquotas de 5 µl de sangue colhidas imediatamente após eutanásia foram diluídas em 250 µl de solução soro bovino fetal ou HAM's-F10 (Sigma-Aldrich). Esses conteúdos foram combinados à agarose de baixo ponto de fusão (*low melting agarose*) a 37 °C, aplicando-se 105 µl em lâminas de agarose previamente preparadas, após isso, foram solidificadas. Em seguida, essas lâminas foram imersas em solução tampão de lise: lise uso (Triton X – 100, DMSO) + lise estoque (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Trizma base) /4 °C/ 45 min. Posteriormente foram imersas por 15 minutos em solução com pH 13 (300 nM NaOH/1 mM EDTA). Após aplicação em campo eletroforético (25 V/ 300 mA/ 30 min.), as lâminas foram retiradas, submetidas à solução de neutralização (pH 7,5/ 15 min.), posteriormente, após secarem em temperatura ambiente, foram fixadas com etanol P.A por 5 min e secas também em temperatura ambiente, baseado em Tice *et al.* (2000).

Núcleos e rastros (cometas) foram analisados em microscopia de fluorescência (Leica DMI8 – sistema LAS X) após serem corados por brometo de etídio (Sigma-Aldrich). A análise dos núcleos eritrocitários foi realizada pelo *OpenComet* (*plug in* do software *ImageJ* - www.rsbweb.nih.gov/ij/). Brevemente, 5 imagens (200x de magnitude) de cada lâmina/peixe foram capturadas, totalizando 300 núcleos/peixe. Em cada núcleo, foram considerados as variáveis: intensidade e comprimento do cometa e do núcleo (soma total de *pixels*), assim como o percentual de DNA e o percentual de DNA na cauda (% de *pixels* totais), segundo Gyori *et al.* (2014).

3.3 Morfologia e morfometria nuclear eritrocitária

Imediatamente após a eutanásia, foram coletadas amostras do sangue obtidas por secção peduncular que foram utilizadas na confecção de expansões laminares. As lâminas com o esfregaço sanguíneo foram fixadas em metanol, as extensões foram coradas com o corante Azul de Toluidina. O corante azul de toluidina foi utilizado para a coloração dos núcleos das células eritrocitárias, visto que é um considerado um corante metacromático acidofílico e tem grande compatibilidade pelos ácidos nucleicos, ou seja, pode se ligar a moléculas como o DNA (Sridharan; Shanka, 2012). Para a análise da morfometria nuclear foram realizadas capturas digitalmente de 5 imagens (RGB 4096 x 3286 pixels) em magnitude de 1000x de cada extensão sanguínea no sistema Optican LOPT14001 em microscopia de campo claro (Optican 500R). Em cada imagem foram selecionados, ao acaso, 25 núcleos. Em cada núcleo, foi mensurado parâmetros como a área (μm^2) e o DOI (densidade óptica integrada), conforme Hardie *et al.*, (2002):

$$\sum_{i=0}^n -\log 10 \left(\frac{IF_i}{IB_i} \right)$$

Onde:

n = número total de pixels do núcleo;

InFi = intensidade de pixels nucleares e

InBi = intensidade de pixels do fundo de cada imagem (background).

Essa análise foi realizada com auxílio do software *ImageJ* versão 1.53^a, segundo Ferreira & Rasband (2011).

3.4 Análise dos dados

A ANOVA (modelo linear misto generalizado) foi usada para comparar os valores dos graus de alterações nucleares (0, 1, 2 e 3) e quantificação do percentual de DNA na cauda (rastro) entre as concentrações e o grupo controle. Os graus do cometa foram identificados pela análise da intensidade de fluorescência, considerando o diâmetro do núcleo e o comprimento do rastro como indicadores da desintegração do DNA. Em cada lâmina foram avaliados 100 núcleos, classificados de 0 a 3: grau 0 (sem danos), graus 1 e 2 (danos moderados a consideráveis) e grau 3 (danos graves), conforme Araldi *et al.* (2015).

Dessa maneira, a análise da porcentagem de DNA presente na cauda (rastro), como um parâmetro para avaliar a genotoxicidade de tais compostos, foi realizada pela seguinte equação: DNA (cauda) = (% DNA na cauda/% DNA total) x 100 (Gyori *et al.*, 2014).

4 RESULTADOS

Nos resultados obtidos pelo ensaio do cometa nos espécimes expostos por 10 dias, foi possível observar a relação entre os tratamentos e os graus do cometa que estão reportados na Figura 1. Observou-se que o grau 0 teve maior frequência no tratamento controle, apresentando valores superiores a 80% de células sem danos na estrutura do DNA. Já nos grupos expostos, houve redução progressiva: cerca de 40% em 15 mg/L, aproximadamente 20% em 30 mg/L e menos de 10% na concentração de 60 mg/L. O grau 1 apareceu em maior quantidade nos tratamentos de 15 mg/L e 30 mg/L, ambos com frequências próximas de 50–60%, diferenciando-se do controle, que apresentou apenas cerca de 20%. Na concentração de 60 mg/L, o grau 1 manteve valores intermediários, em torno de 40%. Enquanto que o grau 2 foi mais frequente nos de 30 mg/L (30-40%) e 60 mg/L (<50%) em 15 mg/L, a ocorrência foi baixa, entre 10–20%. Núcleos classificados como grau 3, foram observados na concentração de 60 mg/L, com valores superiores a 30%, enquanto em 15 mg/L e 30 mg/L permaneceram próximos de 10%. No controle, esse grau não foi constatado. Isso demonstra que durante o período de exposição, quanto maior a concentração de MP maior foi o dano às moléculas de DNA dos núcleos eritrocitários, indicando um claro efeito dose-dependente. A Figura 2 representa as variações morfológicas e seus respectivos graus de danos no DNA.

Por outro lado, a porcentagem de DNA encontrada nos “rastros” foi maior em relação aos núcleos dos cometas na concentração de 15 mg/L, com valores próximos de 46–48%, o que representa o maior nível de dano observado entre os tratamentos. Já nas concentrações de 30 mg/L e 60 mg/L, os percentuais foram semelhantes, variando entre 27–30% (Fig. 3).

A análise da densidade óptica integrada (DOI) e da área nuclear está descrita na Figura 4. Os resultados demonstram que os núcleos dos espécimes expostos nas concentrações estudadas causaram aumento nos níveis de condensação da cromatina. Níveis mais elevados de condensação foram observados em concentrações de 30 e 60 mg/L, onde as curvas nessas concentrações estão deslocadas para valores mais altos de DOI (aproximadamente 5,05–5,15) em comparação ao grupo controle e ao tratamento de 15 mg/L, onde os valores se concentraram próximos de 4,85–5,0. Esse aumento nos valores de DOI indica maior compactação da cromatina em concentrações de MP mais elevadas. O mesmo padrão foi observado na comparação da área nuclear, em que houve redução progressiva nos tratamentos de maior concentração, enquanto o grupo controle apresentou área média próxima de 12 μm^2 , os tratamentos de 15 mg/L, 30 mg/L e 60 mg/L mostraram áreas reduzidas, aproximando-se de 8 μm^2 , 7 μm^2 e 6 μm^2 , respectivamente.

Além disso, o teste do micronúcleo associado às anormalidades nucleares foi significativo. A presença dos micronúcleos foi observada principalmente nas concentrações

de 15 e 30 mg/L, além de núcleos eritrocitários binucleados, invaginados, lobulados e com brotamentos (Fig. 5). Algumas das alterações morfológicas nucleares encontradas estão representadas na Figura 6.

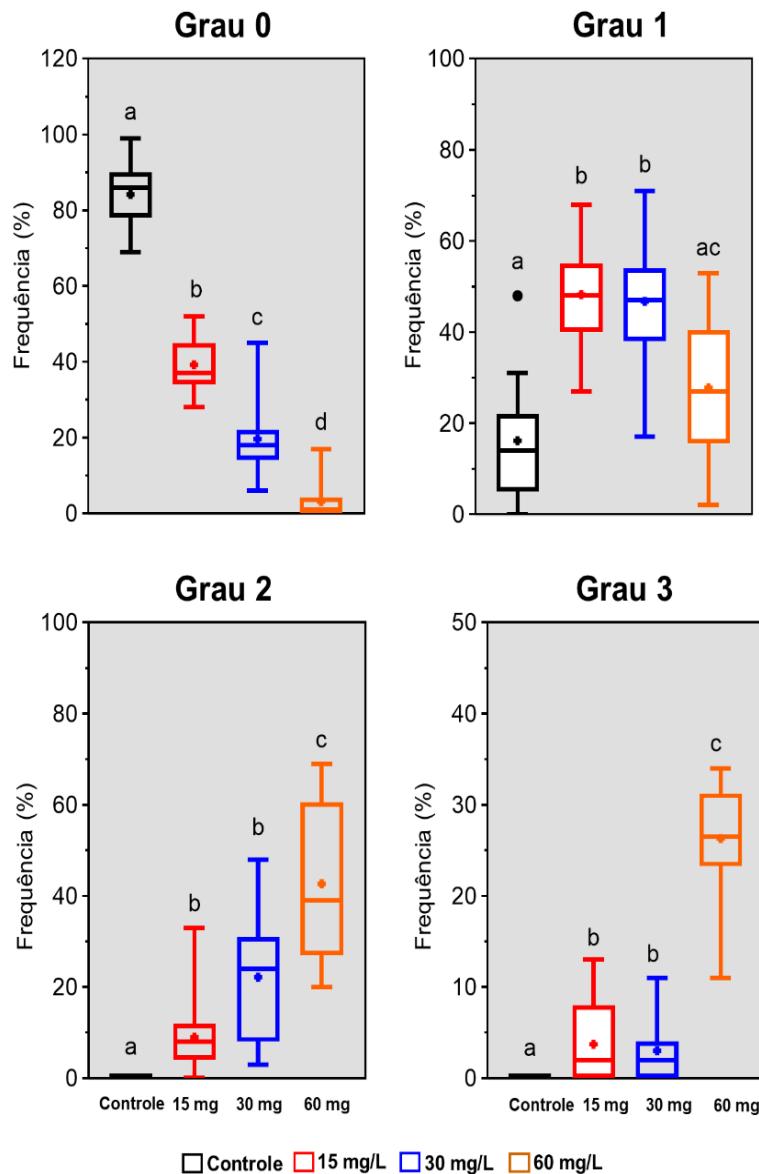


Figura 1. Box plot mostrando a distribuição e média (+) dos graus de alterações no DNA nuclear eritrocitário de *A. lacustris* expostos a diferentes concentrações de MP-PE através da análise de variância (ANOVA). Letras distintas denotam diferença significativa entre as concentrações ($p<0,05$). Grau 0 (sem danos); grau 1 e grau 2 (danos moderados), grau 3 (danos graves).

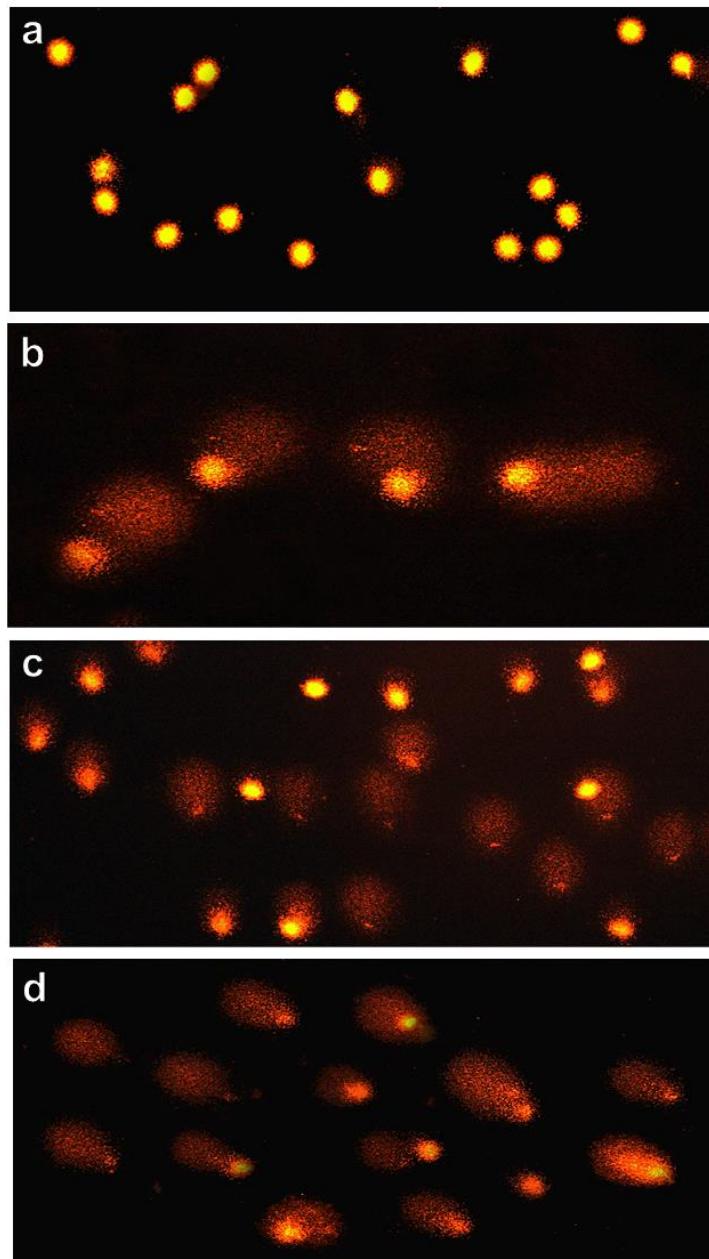


Figura 2. Imagens correspondentes aos graus de cometa de acordo com o tratamento de exposição, sendo (a) grau 0; (b) grau 1; (c) grau 2; (d) grau 3. Fonte: Autora.

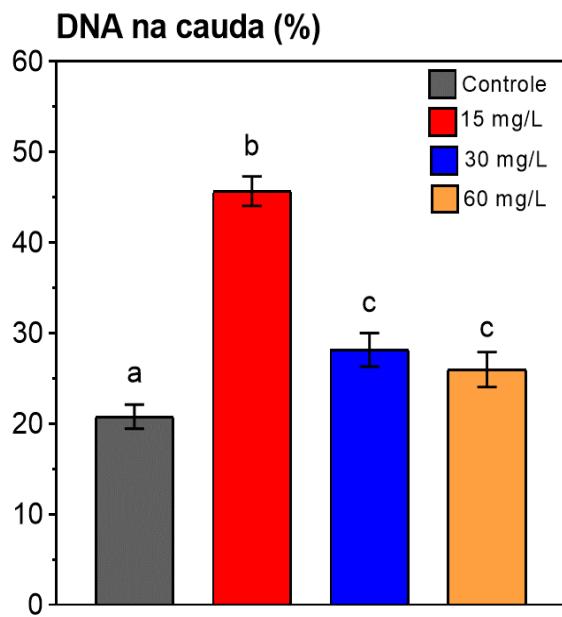


Figura 3. Percentual médio (\pm IC95%) de DNA encontrado na cauda (rastro) de núcleos eritrocitários de *A. lacustris* expostos de acordo com a concentração de MP-PE através da análise de variância (ANOVA). Letras distintas demonstram diferença significativa entre as concentrações ($p<0,05$).

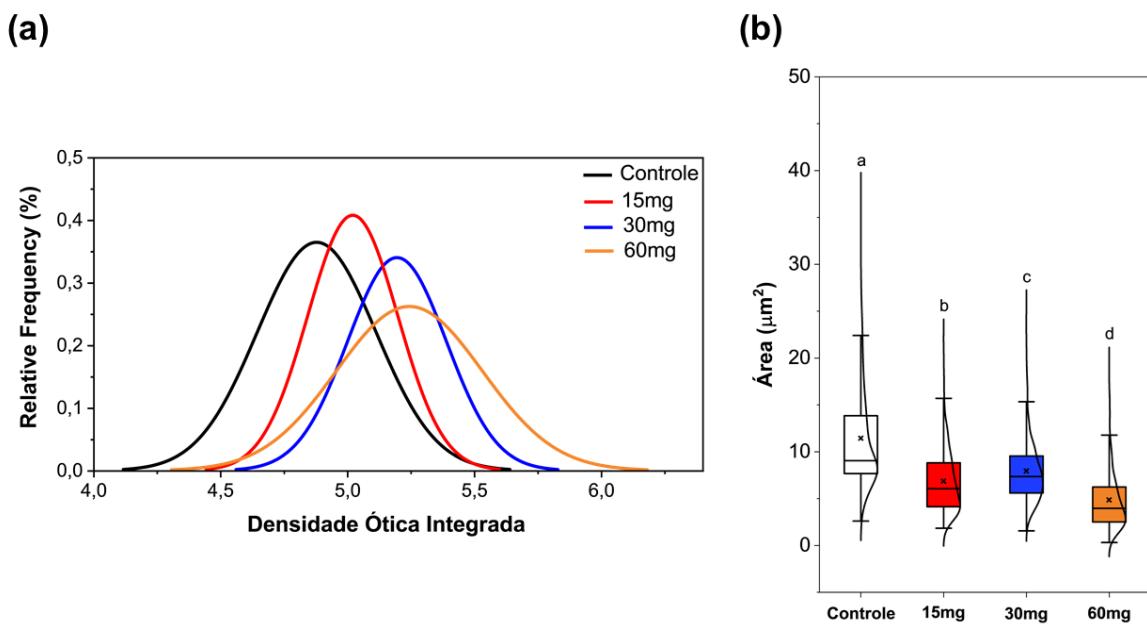


Figura 4. Gráficos representando em (a) as curvas do histograma que determinam a densidade óptica integrada (DOI) e em (b) o box plot determinando a área nuclear dos núcleos expostos ao MP-PE nas concentrações de 15, 30 e 60 mg/L em comparação ao controle.

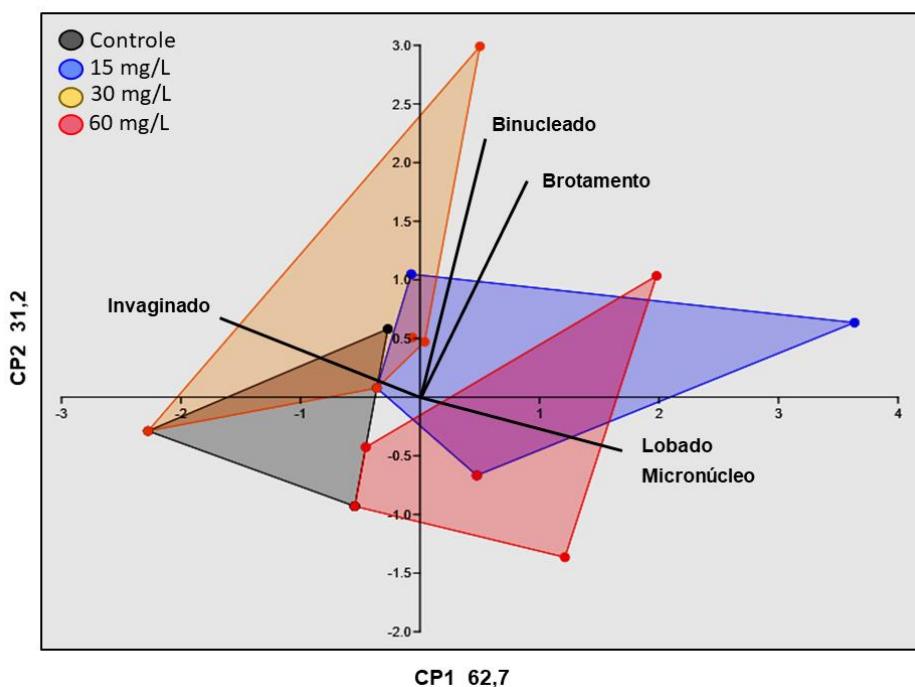


Figura 5. Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada às anormalidades nucleares observadas nas células de peixes expostos às concentrações estabelecidas de MP-PE (15, 30 e 60 mg/L).

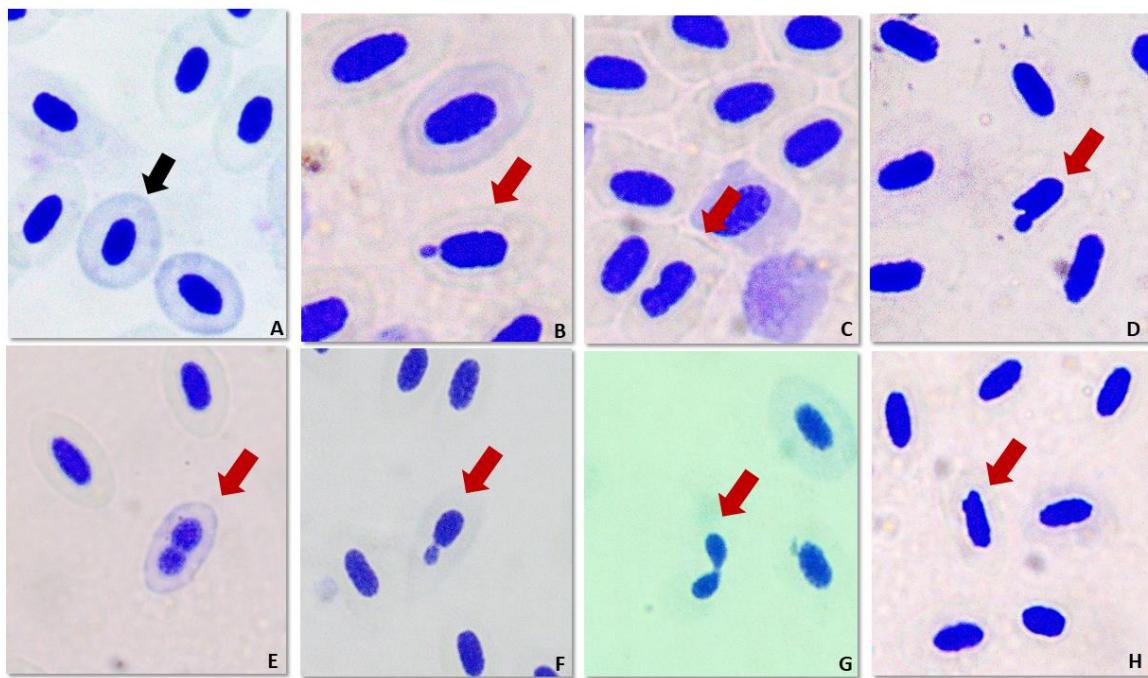


Figura 6. Fotomicrografia de eritrócitos de *A. lacustris* expostos ao MP-PE nas concentrações de 15, 30 e 60 mg/L em lâminas histológicas coradas com o corante azul de toluidina. As alterações nucleares encontradas: A) Seta preta indicando núcleo “padrão”, setas vermelhas indicando algumas das anormalidades nucleares observadas, onde B) Micronúcleo; C) Núcleo lobado; D) Brotamento nuclear; E), F), G) Eritrócito binucleado e H) Núcleo invaginado.

5 DISCUSSÃO

A manutenção da integridade do DNA é fundamental para a homeostase celular, garantindo o desempenho contínuo de processos fisiológicos essenciais. No entanto, a exposição a agentes externos pode induzir quebras em cadeias simples ou duplas da molécula, e, na ausência de mecanismos eficazes de reparo, tais alterações podem culminar em mutações e no desenvolvimento de neoplasias (Bivehed *et al.*, 2023). Nesse contexto, a presença de MPs em organismos aquáticos representa uma preocupação crescente, uma vez que esses contaminantes estão associados a estresse fisiológico e oxidativo, inibição enzimática, respostas inflamatórias e danos celulares. O sangue, por constituir um dos primeiros tecidos em contato com MPs, torna-se particularmente vulnerável, com alterações significativas em parâmetros hematológicos frequentemente utilizados como biomarcadores de citotoxicidade e condição de saúde. Evidências recentes indicam que partículas de PE presentes no tecido sanguíneo podem desencadear estresse oxidativo, comprometer a imunocompetência e acumular-se em níveis relevantes nos tecidos, favorecendo efeitos ecotoxicológicos persistentes (Jo *et al.*, 2025).

O potencial genotóxico do MP-PE em células como os eritrócitos pode ocorrer de maneira indireta, sendo estimulado pela produção de espécies reativas de oxigênio (radicais

livres) que possuem capacidade de danificar o DNA (da Costa Araújo *et al.*, 2020a). Uma das possíveis vias de interação entre as partículas de MP e as células transportadoras de oxigênio é a membrana plasmática, ainda não se conhece exatamente os mecanismos que o MP utiliza para interagir com a membrana, contudo, o contato direto com MP pode produzir aberturas na estrutura celular modificando a sua permeabilidade, além de ter a capacidade de alterar o potencial da membrana plasmática pelo processo de sinalização jusante induzindo possíveis degenerações oxidativas no meio intracelular (da Costa Araújo *et al.*, 2020b).

Os resultados deste estudo demonstraram perda da organização e compactação da cromatina nuclear assim como diferentes graus de fragmentação do DNA nos peixes expostos ao MP-PE. Acredita-se que essas estruturas induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) levando a instabilidade genômica, a partir da oxidação e carbonilação das histonas, proteínas responsáveis pelo empacotamento da cromatina (Jo *et al.*, 2025).

Essas análises evidenciam o potencial genotóxico do MP-PE na espécie *A. lacustris*, uma vez que todas as concentrações avaliadas (15, 30 e 60 mg/L) promoveram alterações significativas na integridade do DNA. Observou-se que a concentração de 15 mg/L apresentou a maior porcentagem de DNA fragmentado no rastro do cometa, o que indica um nível expressivo de quebras na molécula. Entretanto, nas concentrações de 30 e principalmente 60 mg/L, apesar da porcentagem relativa de DNA no rastro ter sido menor, é possível que os efeitos tóxicos mostraram-se mais severos, sendo considerados potencialmente letais. Portanto, a menor proporção de DNA livre no rastro pode indicar maior fragmentação nuclear e desorganização da cromatina, reflexos de quebras de fita simples e duplas induzidas possivelmente pelo estresse oxidativo associado à presença das partículas poliméricas. Esse padrão caracteriza uma relação dose-dependente entre a exposição e o grau de genotoxicidade, demonstrando que os MPs comprometem a integridade genômica dos peixes, representando um risco potencial à saúde e estabilidade das populações aquáticas, fenômeno observado por Hamed *et al.* (2021) e Sampsonidis *et al.* (2024). Acredita-se ainda, que nas concentrações mais elevadas, o dano induzido pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) não se limita à fragmentação do DNA, mas avança para mecanismos celulares mais abrangentes, como a ativação de apoptose.

Por meio da análise nucleométrica eritrocitária, avaliou-se a compactação da cromatina, expressa pela densidade óptica integrada (DOI). Nos eritrócitos de peixes expostos ao MP-PE nas concentrações de 30 e 60 mg/L, a cromatina se encontrava-se mais compacta em comparação com a exposição à 15 mg/L. A redução da área nuclear, a partir da compactação da cromatina, sugere redução ou disruptura no processo de divisão celular. Variações na densidade dos sítios de ligação da cromatina podem explicar as diferenças observadas na mobilidade da cromatina durante o ciclo celular e o desenvolvimento celular. Embora grandes rearranjos cromossômicos ou mobilidade translacional em cromossomos

individuais não sejam aparentes durante a interfase, a dinâmica da cromatina é rápida o suficiente para permitir interações intracromossômicas, como a associação cis ou trans de um promotor, ocorrendo em segundos, e abrangendo distâncias de menos de 1 µm (Hüber; Spector, 2010). Segundo Rothmann *et al.* (2000), em *Cyprinus carpio*, eritrócitos em estágios de maturação revelaram domínios de cromatina de baixa e alta densidade, bem como um domínio intercromatina com alta transmitância de luz e baixa densidade óptica. Assim, acredita-se que o estresse oxidativo gerado pelos MPs poderia não apenas alterar a organização e a condensação da cromatina, mas também afetar o ciclo celular, levando à interrupção da geração de novos eritrócitos, mantendo-os mais maduros e condensados.

Dessa maneira, a exposição ao MP-PE por um período de 10 dias, nas diferentes concentrações propostas neste estudo, resultou em aumento da condensação da cromatina e em redução progressiva da área celular dos eritrócitos. Esse processo, denominado picnose, constitui uma característica marcante que geralmente antecede a apoptose celular (Elmore, 2007). Esses resultados evidenciam a citotoxicidade desses compostos sobre os organismos estudados, ressaltando a importância de compreender os mecanismos pelos quais tais substâncias desencadeiam essas alterações. A morte programada de células essenciais, como os eritrócitos, compromete o funcionamento fisiológico dos organismos, uma vez que a ausência ou redução contínua no transporte de oxigênio afeta diretamente seus hábitos. Esse cenário levanta sérias preocupações acerca da produção em larga escala de MP-PE e de seu descarte inadequado em ecossistemas aquáticos.

Além disso, foi possível observar nos tratamentos em que os peixes da espécie *Astyanax lacustris* foram expostos às concentrações de 15 e 30 mg/L uma maior frequência de anormalidades nucleares como núcleos binucleados, brotamentos nucleares, núcleos lobulados e invaginados confirmado a hipótese de que o MP-PE tem capacidade citotóxica, isso porque MPs tem a capacidade de desencadear essas alterações físicas no núcleo de eritrócitos ao interromper processos no fuso mitótico dessas células (Menezes *et al.*, 2024).

Hamed *et al.* (2021) observaram um aumento significativo na ocorrência de anormalidades nucleares eritrocitárias em peixes expostos a diferentes concentrações de MP-PE. No presente estudo, foram identificadas alterações, como micronúcleos, núcleos binucleados e lobulados, resultados que corroboram os achados de Hamed *et al.* (2021). Essas alterações estão associadas a processos de aneuploidia decorrentes de falhas na segregação cromossômica durante a mitose. Além disso, algumas anormalidades nucleares podem ter origens distintas. Por exemplo, a formação de núcleos invaginados está relacionada ao ciclo quebra-fusão-ponte, no qual cromátides-irmãs se unem pelas extremidades rompidas, originando pontes dicêntricas que, ao se romperem novamente, promovem amplificação do DNA e possíveis deleções (Wu; Rai, 2022; da Costa Araújo *et al.*, 2022). Outras anormalidades, como núcleos lobados, podem resultar de processos

aneugênicos associados à polimerização da tubulina, componente essencial para a formação do fuso mitótico. Os brotamentos nucleares, por sua vez, estão frequentemente relacionados a falhas ou inibições nos mecanismos de reparo do DNA, que favorecem a fusão de estruturas teloméricas pelas extremidades cromossômicas. Já a ocorrência de células eritrocitárias binucleadas pode estar vinculada a processos de aneuploidia que comprometem a adequada formação do fuso mitótico durante a divisão celular (da Costa Araújo *et al.*, 2022).

Muitas mutações que ocorrem no DNA a partir da exposição ao MP, são resultado da 8-oxo-7,8-di-hidroguanina, uma base nucleotídica alterada capaz de emparelhar de forma errônea a base nitrogenada adenina, isso ocorre também pela ação de espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo causado pelas mesmas, onde a molécula de ácido desoxirribonucleico oxidada recebe de forma recorrente a base guanina (8-oxo-7,8-di-hidroguanina (OG)), eventualmente mutagênica (Mahmud *et al.*, 2024). A ativação da via de resposta a danos presentes na molécula de DNA, como as quebras de fita dupla ou simples, ocorrem a fim de sinalizar a interrupção no processo de divisão celular, na maior parte das vezes, esse sistema tem como objetivo principal reparar os danos presentes no DNA e recomeçar o ciclo, contudo, dependendo da exposição sofrida e das falhas presentes na molécula, o mecanismo é responsável por levar a interrupção do ciclo celular, e consequentemente a morte da célula (Hayashi; Karlseder, 2013).

A espécie *Astyanax lacustris*, destaca-se por sua elevada plasticidade trófica e capacidade de ajustar sua dieta conforme a disponibilidade de recursos no ambiente. Nessa perspectiva, partículas de MP podem ser confundidas com alimento por indivíduos dessa espécie, configurando importante via de entrada do MP-PE no organismo. Além disso, o hábito onívoro de *A. lacustris* amplia sua influência ecológica e o potencial de transferência desses contaminantes ao longo da cadeia trófica (dos Santos *et al.*, 2020). Nos últimos anos, a crescente presença de MPs em ambientes dulcícolas, como rios, riachos e lagos, tem representado uma ameaça significativa à ictiofauna, uma vez que os peixes são capazes de acumular esses contaminantes em seus tecidos. O MP-PE, em particular, apresenta potencial genotóxico que pode ser propagado ao longo dos níveis tróficos, intensificando os riscos ecológicos.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados confirmaram a capacidade MP-PE de induzir alterações na molécula de DNA e alterar a integridade celular. Além disso, esses achados podem contribuir para avaliar possíveis processos que envolvam a bioacumulação do MP-PE em organismos aquáticos, permitindo entender suas implicações ao longo da cadeia trófica incluindo o ser humano. Dessa forma, nosso estudo reforça a importância de investigações com perspectivas

mais abrangentes, uma vez que a contaminação ambiental está diretamente relacionada à saúde animal e humana. Contudo, ainda são necessárias pesquisas para aprofundar a compreensão sobre os efeitos da exposição prolongada e das diferentes concentrações encontradas nos diferentes ecossistemas aquáticos, de modo a ampliar o conhecimento sobre os riscos ecotoxicológicos e sanitários associados aos MPs.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araldi, R.P.; de Melo, T.C.; Mendes, T.B.; Júnior, P.L.S.; Nozima, B.H.N.; Ito, E.T.; de Carvalho, R.F.; de Souza, E.B.; Stocco, R.C. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **2015**, *72*, 74–82.

Bivehed, E.; Hellman, B.; Fan, Y.; Haglöf, J.; Buratovic, S. DNA integrity under alkaline conditions: An investigation of factors affecting the comet assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **2023**, *891*, 1–7.

Cordelli, E.; Bignami, M.; Pacchierotti, F. Comet assay: A versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology Research*. **2021**, *10*(1), 68–78.

da Costa Araújo, A.P.; de Andrade Vieira, J.E.; Malafaia, G. Toxicity and trophic transfer of polyethylene microplastics from *Poecilia reticulata* to *Danio rerio*. *Science of the Total Environment*. **2020**(a), *742*, 1–16.

da Costa Araújo, A.P.; de Melo, N.F.S.; de Oliveira Junior, A.G.; Rodrigues, F.P.; Fernandes, T.; de Andrade Vieira, J.E.; et al. How much are microplastics harmful to the health of amphibians? A study with pristine polyethylene microplastics and *Physalaemus cuvieri*. *Journal of Hazardous Materials*. **2020**(b), *382*, 1–20.

da Costa Araújo, A.P.; da Luz, T.M.; Rocha, T.L.; Ahmed, M.A.I.; e Silva, D.D.M.; Rahman, M.M.; Malafaia, G. Toxicity evaluation of the combination of emerging pollutants with polyethylene microplastics in zebrafish: Perspective study of genotoxicity, mutagenicity, and redox unbalance. *Journal of Hazardous Materials*. **2022**, *432*, 1–16.

de Ruijter, V.N.; Redondo-Hasselerharm, P.E.; Gouin, T.; Koelmans, A.A. Quality criteria for microplastic effect studies in the context of risk assessment: A critical review. *Environmental Science & Technology*. **2020**, *54*, 11692–11705.

dos Santos, T.; Bastian, R.; Felden, J.; Rauber, A.M.; Reynalte-Tataje, D.A.; de Mello, F.T. First record of microplastics in two freshwater fish species (*Iheringhthys labrosus* and *Astyanax lacustris*) from the middle section of the Uruguay River, Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensis*. **2020**, *32*, 1–9.

El Yamani, N.; Rundén-Pran, E.; Collins, A.R.; Longhin, E.M.; Elje, E.; Hoet, P.; Dusinska, M. The miniaturized enzyme-modified comet assay for genotoxicity testing of nanomaterials. *Frontiers in Toxicology*. **2022**, *4*, 1–10.

Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. **2007**, *35*(4), 495–516.

Ferreira, T.; Rasband, W. ImageJ User Guide—IJ 1.46r. *National Institutes of Health (NIH) / ImageJ*. **2002**.

Gajski, G.; Ravlić, S.; Godschalk, R.; Collins, A.; Dusinska, M.; Brunborg, G. Application of the comet assay for the evaluation of DNA damage in mature sperm. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. **2021**, *788*, 1–20.

Gajski, G.; Žegura, B.; Ladeira, C.; Novak, C.L.M.; Sramkova, M.; Pourrut, B.; Bo, C.D.; Milić, M.; Gutzkow, K.B.; Costa, S.; Dusinska, M.; Brunborg, G.; Collins, A. The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 2 Vertebrates). *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. **2019**, *781*, 130–164.

Gnocchi, K.G.; Boldrini-França, J.; Passos, L.S.; Gomes, A.S.; Coppo, G.C.; Pereira, T.M.; Chippari-Gomes, A.R. Multiple biomarkers response of *Astyanax lacustris* (Teleostei: Characidae) exposed to manganese and temperature increase. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **2023**, *100*, 1–7.

Gyori, B.M.; Venkatachalam, G.; Thiagarajan, P.S.; Hsu, D.; Clement, M.-V. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology*. **2014**, *2*, 457–465.

Hamed, M.; Osman, A.G.M.; Badrey, A.E.A.; Soliman, H.A.M.; Sayed, A.E.-Din, H. Microplastics-induced eryptosis and poikilocytosis in early-juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Frontiers in Physiology*. **2021**, *12*, 1–10.

Hayashi, M.T.; Karlseder, J. DNA damage associated with mitosis and cytokinesis failure. *Oncogene*. **2013**, *32*, 4593–4601.

Hardie, D.C.; Ryan, T.; Hebert, P.D.N. From pixels to picograms: A review designed for those interested in genome size measurements. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. **2002**, *50*, 821–850.

Hübner, M.R.; Spector, D.L. Chromatin dynamics. *Annual Review of Biophysics*. **2010**, *39*, 471–489.

Hussain, B.; Sultana, T.; Sultana, S.; Masoud, M.S.; Ahmed, Z.; Mahboob, S. Fish eco-genotoxicology: Comet and micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ biomarker of freshwater pollution. *Saudi Journal of Biological Sciences*. **2018**, *25* (2), 393-398.

Iheanacho, S.C.; Odo, G.E. Neurotoxicity, oxidative stress biomarkers and haematological responses in African catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to polyvinyl chloride microparticles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. **2020**, *232*, 2–10.

IUPAC. *International Union of Pure and Applied Chemistry*. **2025**.

Jo, A.-H.; Yu, Y.-B.; Choi, J.-H.; Lee, J.-H.; Choi, C.Y.; Kang, J.-C.; Kim, J.-H. Microplastics induce toxic effects in fish: Bioaccumulation, hematological parameters and antioxidant responses. *Chemosphere*. **2025**, *375*, 1–12.

Jiang, N.; Naz, S.; Ma, Y.; Ullah, Q.; Khan, M.Z.; Wang, J.; Basang, W.D. An overview of comet assay application for detecting DNA damage in aquatic animals. *Agriculture*. **2023**, *13*(3), 623.

Karlsson, O.M.; Waldeoft, H.; Hållén, J.; Malmaeus, J.M.; Strömberg, L. Using fish as a sentinel in risk management of contaminated sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **2023**, *84*(1), 45–72.

Khan, M.L.; Hassan, H.U.; Khan, F.U.; Ghaffar, R.A.; Rafiq, N.; Bilal, M.; Khooharo, A.R.; Ullah, S.; Jafari, H.; Nadeem, K.; Siddique, M.A.M.; Araik, T. Effects of microplastics in freshwater fishes health and the implications for human health. *Brazilian Journal of Biology*. **2024**, *84*, 1–16.

Lee, R.F.; Steinert, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. **2003**, *544*, 43–64.

Mahmud, F.; Sarker, D.B.; Jocelyn, J.A.; Sang, Q.-X.A. Molecular and cellular effects of microplastics and nanoplastics: Focus on inflammation and senescence. *Cells*. **2024**, *13*, 1–22.

Menezes, M.; de Mello, F.T.; Ziegler, L.; Wanderley, B.; Gutiérrez, J.M.; Dias, J.D. Revealing the hidden threats: Genotoxic effects of microplastics on freshwater fish. *Aquatic Toxicology*. **2024**, *276*, 1–9.

Osipov, A.; Arkhangelskaya, E.; Vinokurov, A.; Smetanina, N.; Zhavoronkov, A.; Klokov, D. DNA comet Giemsa staining for conventional bright-field microscopy. *International Journal of Molecular Sciences*. **2014**, *15*, 6086–6095.

Prata, J.C.; da Costa, J.P.; Lopes, I.; Andrade, A.L.; Duarte, A.C.; Rocha-Santos, T. A One Health perspective of the impacts of microplastics on animal, human and environmental health. *Science of the Total Environment*. **2021**, *777*, 1–13.

Rothmann, C.; Levinthal, T.; Timan, B.; Avtalion, R.R.; Malik, Z. Spectral imaging of red blood cells in experimental anemia of *Cyprinus carpio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. **2000**, *125(1)*, 75–83.

Sampsonidis, I.; Michailidou, K.; Spritnoudi, K.; Dimitriadi, A.; Ainali, N.M.; Bobori, D.C.; Kalogiannis, S. Genotoxicity and metabolic changes induced via ingestion of virgin and UV-aged polyethylene microplastics by the freshwater fish *Perca fluviatilis*. *Chemosphere*. **2024**, *362*.

Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. **1988**, *175*, 184–191.

Sonke, J.E.; Koenig, A.; Segur, T.; Yakovenko, N. Global environmental plastic dispersal under OECD policy scenarios toward 2060. *Science Advances*. **2025**, *11(16)*, 1–10.

Souza, A.S.; Ferreira, P.G.; de Jesus, I.S.; de Oliveira, R.P.R.F.; de Carvalho, A.S.; Futuro, D.O.; Ferreira, V.F. Recent progress in polyolefin plastic: Polyethylene and polypropylene transformation and depolymerization techniques. *Molecules*. **2024**, *30*(1), 87.

Sulaiman, B.; Woodward, J.C.; Shiels, H.A. Riverine microplastics and their interaction with freshwater fish. *Water Biology and Security*. **2023**, *2*, 2–19.

Sridharan G.; Shankar A.A. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. **2012**, *16*(2), 251-255.

Teng, J.; Zhao, J.; Zhu, X.; Shan, E.; Zhang, C.; Zhang, W.; Wang, Q. Toxic effects of exposure to microplastics with environmentally relevant shapes and concentrations: Accumulation, energy metabolism and tissue damage in oyster *Crassostrea gigas*. *Environmental Pollution*. **2021**, *269*, 1–12.

Thompson, R.C.; Olson, Y.; Mitchell, R.P.; Davis, A.; Rowland, S.J.; John, A.W.G.; McGonigle, D.; Russell, A.E. Lost at sea: Where is all the plastic? *Science*. **2004**, *304*.

Tice, R.R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J.-C.; Sasaki, Y.F. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **2000**, *35*, 206–221.

Vargas, J.G.M.; da Silva, V.B.; de Oliveira, L.K.; Molina, E.F. Microplásticos: Uso na indústria cosmética e impactos no ambiente aquático. *Química Nova*. **2022**, *45*(6), 705–711.

Wu, M.; Rai, K. Demystifying extrachromosomal DNA circles: Categories, biogenesis, and cancer therapeutics. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. **2022**, *20*, 6011–6022.

Yu, Y.-B.; Choi, J.-H.; Choi, C.Y.; Kang, J.-C.; Kim, J.-H. Toxic effects of microplastic (polyethylene) exposure: Bioaccumulation, hematological parameters and antioxidant responses in crucian carp, *Carassius carassius*. *Chemosphere*. **2023**, *332*, 1–12.

A formatação das referências bibliográficas seguiu as regras de formatação da revista “International Journal of Molecular Sciences” (<https://www.mdpi.com/journal/ijms>).

