

UNIVERSIDADE PAULISTA

**ESTUDOS DO MICROPLÁSTICO EM
MODELO EXPERIMENTAL DE ZEBRAFISH:
COMPORTAMENTO E ENCÉFALO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

ALEX LUCIANO FERNANDES

SÃO PAULO

2022



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa



ALEX LUCIANO FERNANDES

**ESTUDOS DO MICROPLÁSTICO EM MODELO EXPERIMENTAL
DE ZEBRAFISH: COMPORTAMENTO E ENCÉFALO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental

Orientador: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista - Vice-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (VRPPG/UNIP)

Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental

SÃO PAULO

DEZEMBRO / 2022

Fernandes, Alex Luciano.

Estudos do microplástico em modelo experimental de zebrafish: comportamento e encéfalo / Alex Luciano Fernandes. - 2022.

84 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2022.

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten.

1. *Danio rerio*. 2. Modelo animal. 3. Plástico. 4. Ecotoxicologia. 5. Poluição ambiental. 6. Neuroinflamação. I. Kirsten, Thiago Berti (orientador). II. Título.

ALEX LUCIANO FERNANDES

**ESTUDOS DO MICROPLÁSTICO EM MODELO EXPERIMENTAL
DE ZEBRAFISH: COMPORTAMENTO E ENCÉFALO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental

Aprovado(a) em: ___ / ___ / _____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof (a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof (a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento _____

O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES/PROSUP, processo número 88887.601969/2021-00), Código de Financiamento 001.

"Chegará o tempo em que o homem conhecerá o íntimo de um animal e nesse dia todo crime contra um animal será um crime contra a humanidade"

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten pela oportunidade, sabedoria, dedicação, afetuosidade e, sobretudo, pela receptividade que demonstrou desde o nosso primeiro encontro. Tê-lo como orientador foi uma honra para mim. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan, do Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista pela confecção e análise das lâminas de imuno-histoquímica do GFAP correspondente ao meu projeto.

À Profa. Dra. Ivana Barbosa Suffredini pela gentil colaboração nas complexas análises estatísticas relacionadas às avaliações diárias.

Ao mestrando Daniel Lago, que participou das etapas de análise comportamentais diárias e coletas de órgãos dos animais para avaliações posteriores.

Ao técnico do laboratório de Anatomia Patológica, Paulo Ailton Vedovato pela contribuição da parte histológica e processamento do material.

À Amanda Tolosana Mendes Fustinoni, Diretora Comercial da Duster Indústria e Comércio de Espanadores Ltda., pela gentileza em fornecer os microplásticos da empresa Braskem S. A.

Ao Wilton Pereira, técnico do Laboratório de Experimentação Animal, pela paciência e disposição nos momentos em que precisei de suas contribuições.

Agradeço aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ambiental e Experimental da UNIP pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados.

Agradeço a Universidade Paulista pela infraestrutura oferecida; desde os setores administrativos, as estruturas do laboratório e demais áreas para a realização dos experimentos. Em especial a Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Agradeço a CAPES/PROSUP pela bolsa concedida durante toda a realização do trabalho.

Agradeço aos colegas da Pós-Graduação pela amizade e companheirismo.

Agradeço aos meus pais, Domingos Fernandes (*in memoriam*) e Maria Aparecida Luciano Fernandes (*in memoriam*) pelo amor, dedicação e por priorizar a educação como base da nossa formação.

Agradeço a minha esposa, Carla Montuori Fernandes, grande incentivadora e responsável pelo início da minha vida acadêmica, sempre ao meu lado nos momentos difíceis, demonstrando o amor que existe entre nós.

Aos peixes que cederam sua vida, para que de maneira respeitosa, pudéssemos realizar um experimento que agregasse valor à ciência.

RESUMO

FERNANDES, A. L. **Estudos do microplástico em modelo experimental de zebrafish: comportamento e encéfalo**. Dissertação (Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental) - Universidade Paulista, São Paulo, 2022. 79 f. Orientação: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten

O acúmulo de lixo plástico em ambientes naturais é um problema global com impactos negativos na economia, na vida selvagem e na saúde humana. O microplástico vem sendo fortemente associado a doenças e morte de diversos tipos de animais aquáticos. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos que o torna tão danoso. O estudo do microplástico em condições controladas pode contribuir para um melhor entendimento das consequências da sua exposição em diferentes níveis da cadeia trófica. Assim, os objetivos deste trabalho foram de estudar os efeitos da exposição ao microplástico em parâmetros comportamentais e encefálicos de zebrafish, além de propor um modelo experimental e entender aspectos neurobiológicos relacionados aos prejuízos. Zebrafish adultos foram expostos aos microplásticos polietileno (PE) e polipropileno (PP, virgens, $\leq 1,2$ mm, 0,1, 1,0 e 10,0 mg/L) e foram diariamente avaliados por até oito dias quanto a aspectos gerais de saúde, distribuição espaciais dentro dos aquários, parâmetros comportamentais relacionados à atividade motora, exploratória e de ansiedade, taxa de letalidade, peso corporal e expressão astrocitária (proteína glial fibrilar ácida, GFAP) no encéfalo. A exposição por 96h aos microplásticos PE e PP afetou a distribuição espacial dos zebrafish, bem como seus comportamentos. A reação de alarme em resposta a um estímulo aversivo externo foi prejudicada após a exposição ao PP: maior permanência na superfície do aquário, de modo a revelar um comportamento ansiolítico. O estudo da distribuição espacial do tipo basal confirmou a resposta do tipo ansiolítica ao PP e revelou efeito contrário, isto é, ansiogênico após a exposição ao PE. O estudo comportamental corroborou o efeito ansiogênico do PE: maior latência para alcançar a superfície de um novo aquário. Além disso, ambos os microplásticos PE e PP induziram movimentos erráticos nos zebrafish. O estudo encefálico revelou que houve aumento da expressão de GFAP em astrócitos no tronco encefálico de zebrafish após oito dias de exposição ao PP. Concluindo, as exposições aos microplásticos PE e PP modularam o comportamento tipo-ansiedade dos zebrafish, associado a processo neuroinflamatório. O presente trabalho propôs um novo modelo experimental para estudar os efeitos da exposição a diferentes tipos de microplástico em parâmetros comportamentais e encefálicos de zebrafish.

Palavras-chave: *Danio rerio*; Modelo animal; Plástico; Ecotoxicologia; Poluição ambiental; Neuroinflamação.

ABSTRACT

FERNANDES, A. L. **Microplastic studies in an experimental zebrafish model: behavior and brain.** Master Dissertation (Environmental and Experimental Pathology) - Paulista University, São Paulo, 2022. 79 p. Advisor: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten

Accumulation of plastic waste in natural environments is a global issue with negative impacts on the economy, wildlife and human health. Microplastics have been strongly associated with disease and death in different aquatic animals. However, little is known about its mechanisms. The study about microplastics under controlled conditions contributes to a better understanding of the consequences of its exposure at different levels of the trophic chain. Therefore, the objectives of this study were to evaluate the effects of microplastics exposure on behavioral and brain parameters of zebrafish, in addition to proposing an experimental model, and understanding neurobiological aspects related to the impairments. Adult zebrafish were exposed to polyethylene (PE) and polypropylene (PP) microplastics (virgin, ≤ 1.2 mm, 0.1, 1.0 and 10.0 mg/L) and were evaluated daily for up to eight days for general aspects of health, spatial distribution within the aquariums, behavioral parameters related to motor, exploratory, and anxiety activity, lethality rate, body weight, and astrocytic expression (acid glial fibrillar protein, GFAP) in the brain. PE and PP 96h-exposure affected the spatial distribution of zebrafish, as well as their behavior. The alarm reaction in response to an external aversive stimulus was impaired after exposure to PP: more time on the surface of the aquarium, revealing anxiolytic behavior. The study of the basal spatial distribution confirmed the anxiolytic response to PP and revealed the opposite effect, i.e., anxiogenic effect after exposure to PE. The behavioral study corroborated the anxiogenic effect of PE: greater latency to reach the surface of a novel aquarium. Furthermore, both PE and PP microplastics induced erratic movements in zebrafish. The brain study revealed an increase in GFAP expression in astrocytes in the brainstem of zebrafish after eight days of exposure to PP. In conclusion, exposure to PE and PP microplastics modulated zebrafish anxiety-like behavior associated with a neuroinflammatory process. The present study proposed a novel experimental model to evaluate the effects of exposure to different types of microplastics on behavioral and brain parameters of zebrafish.

Keywords: *Danio rerio*; Animal model; Plastic; Ecotoxicology; Environment pollution; Neuroinflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Confeção dos microplásticos. Processo de confecção dos dois tipos de microplásticos (polietileno e polipropileno). (A e B) Plásticos virgens adquiridos em formato de esfera da fabricante (BRASKEN, Mais Polimeros do Brasil LTDA, Cajamar, São Paulo, Brasil); (C) microplásticos confeccionados por trituração mecânica e peneirados em peneira de granulometria, de modo a garantir tamanho $\leq 1,2$ mm; (D) diferentes concentrações de microplásticos, mínima, média e máxima, estocados para a exposição dos zebrafish nos aquários 25

Figura 2 – Zebrafish. Zebrafish mantidos no aquário de manutenção de nosso laboratório. O aquário de manutenção possuía 300 L e lá foram mantidos os 90 zebrafish para aclimação e em fases prévias para o aquário de experimentação 26

Figura 3 – Aquários experimentais e comportamentais. Aquários experimentais onde os zebrafish foram expostos aos microplásticos (polietileno e polipropileno) e avaliados diariamente e também quanto a parâmetros comportamentais. (A) Aquários experimentais contendo dez zebrafish por grupo para a exposição aos microplásticos e monitoramento diário da distribuição espacial (superior, intermediária e inferior), aspectos gerais de saúde e taxa de letalidade; (B) Aquários individuais para avaliações comportamentais no dia terminal do experimento..... 29

Figura 4 – Dendrograma de reação de alarme. Efeitos da exposição aos microplásticos polietileno (PE) e polipropileno (PP), em concentrações mínima, média e máxima na distribuição espacial diária nos aquários de zebrafish adultos em resposta a reação de alarme. A distribuição espacial contabilizou a posição superior (S), intermediária (I) e inferior (B) dos zebrafish em cada aquário. Os grupos cujos nomes terminam em 1 referem às concentrações mínima (0,1 mg/L), grupos cujos nomes terminam em 2 referem às concentrações médias (1,0 mg/L) e grupos cujos nomes terminam em 3 e 4 referem às concentrações máximas (10,0 mg/L). Os grupos cujos nomes terminam em 1, 2 e 3, bem como o grupo controle (CON) referem à exposições por 96h e grupos cujos nomes terminam em 4 referem à exposições por 192h (n = 10 peixes/grupo). Os resultados são expressos segundo a similaridade baseada nos dados espaciais ao posicionamento dos zebrafish..... 35

Figura 5 – Análise de componentes principais da reação de alarme. Efeitos da exposição aos microplásticos polietileno (PE) e polipropileno (PP), em concentrações mínima, média e máxima na distribuição espacial diária nos aquários de zebrafish adultos em resposta a reação de alarme. A distribuição espacial contabilizou a posição superior (S), intermediária (I) e inferior (B) dos zebrafish em cada aquário. Os grupos cujos nomes terminam em 1 referem às concentrações mínima (0,1 mg/L), grupos cujos nomes terminam em 2 referem às concentrações médias (1,0 mg/L) e grupos cujos nomes terminam em 3 e 4 referem às concentrações máximas (10,0 mg/L). Os grupos cujos nomes terminam em 1, 2 e 3, bem como o grupo controle (CON) referem à exposições por 96h e grupos cujos nomes terminam em 4 referem à exposições por 192h (n = 10 peixes/grupo). Os resultados são expressos segundo o gradiente originado dos dados espaciais ao posicionamento dos zebrafish..... 37

Figura 6 – Dendrograma de distribuição espacial basal. Efeitos da exposição aos microplásticos polietileno (PE) e polipropileno (PP), em concentrações mínima, média e máxima na distribuição espacial diária do tipo basal nos aquários de zebrafish adultos. A distribuição espacial contabilizou a posição superior (S), intermediária (I) e inferior (B) dos zebrafish em cada aquário. Os grupos cujos nomes terminam em 1 referem às concentrações mínima (0,1 mg/L), grupos cujos nomes terminam em

2 referem às concentrações médias (1,0 mg/L) e grupos cujos nomes terminam em 3 e 4 referem às concentrações máximas (10,0 mg/L). Os grupos cujos nomes terminam em 1, 2 e 3, bem como o grupo controle (CON) referem à exposições por 96h e grupos cujos nomes terminam em 4 referem à exposições por 192h (n = 10 peixes/grupo). Os resultados são expressos segundo a similaridade baseada nos dados espaciais ao posicionamento dos zebrafish..... 39

Figura 7 – Análise de componentes principais da distribuição espacial basal. Efeitos da exposição aos microplásticos polietileno (PE) e polipropileno (PP), em concentrações mínima, média e máxima na distribuição espacial diária do tipo basal nos aquários de zebrafish adultos. A distribuição espacial contabilizou a posição superior (S), intermediária (I) e inferior (B) dos zebrafish em cada aquário. Os grupos cujos nomes terminam em 1 referem às concentrações mínima (0,1 mg/L), grupos cujos nomes terminam em 2 referem às concentrações médias (1,0 mg/L) e grupos cujos nomes terminam em 3 e 4 referem às concentrações máximas (10,0 mg/L). Os grupos cujos nomes terminam em 1, 2 e 3, bem como o grupo controle (CON) referem à exposições por 96h e grupos cujos nomes terminam em 4 referem à exposições por 192h (n = 10 peixes/grupo). Os resultados são expressos segundo o gradiente originado dos dados espaciais ao posicionamento dos zebrafish 41

Figura 8 – Comportamento. Efeitos da exposição aos microplásticos polietileno (PE) e polipropileno (PP), em concentrações mínima, média e máxima no comportamento de zebrafish adultos. Os grupos cujos nomes terminam em 1 referem às concentrações mínima (0,1 mg/L), grupos cujos nomes terminam em 2 referem às concentrações médias (1,0 mg/L) e grupos cujos nomes terminam em 3 e 4 referem às concentrações máximas (10,0 mg/L). Os grupos cujos nomes terminam em 1, 2 e 3, bem como o grupo controle (CON) referem à exposições por 96h e grupos cujos nomes terminam em 4 referem à exposições por 192h. Parâmetros: (A) latência para alcançar os quadrantes superiores do aquário, (B) atividade exploratória, (C) tempo total de permanência nos quadrantes superiores, (D) tempo total de permanência nos quadrantes inferiores e (E) tempo total de movimentos erráticos. A avaliação foi realizada no dia terminal da exposição (n = 10 peixes/grupo). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ (ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey ou teste de Wilcoxon). Os resultados são expressos como *box & whiskers*, mostrando todos os valores ou somatórias e mediana 44

Figura 9 – Peso corporal. Efeitos da exposição aos microplásticos polietileno (PE) e polipropileno (PP), em concentrações mínima, média e máxima no peso corporal (g) de zebrafish adultos. Os grupos cujos nomes terminam em 1 referem às concentrações mínima (0,1 mg/L), grupos cujos nomes terminam em 2 referem às concentrações médias (1,0 mg/L) e grupos cujos nomes terminam em 3 e 4 referem às concentrações máximas (10,0 mg/L). Os grupos cujos nomes terminam em 1, 2 e 3, bem como o grupo controle (CON) referem à exposições por 96h e grupos cujos nomes terminam em 4 referem à exposições por 192h. A avaliação foi realizada no dia terminal da exposição (n = 10 peixes/grupo). * $p < 0.05$ (ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey). Os resultados são expressos como *box & whiskers*, mostrando todos os valores 46

Figura 10 – GFAP. Efeitos da exposição aos microplásticos polietileno (PE) e polipropileno (PP), em concentrações mínima, média e máxima na expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em astrócitos no tronco encefálico de zebrafish adultos. Os grupos cujos nomes terminam em 1 referem às concentrações mínima (0,1 mg/L), grupos cujos nomes terminam em 2 referem às concentrações médias (1,0 mg/L) e grupos cujos nomes terminam em 3 e 4 referem às concentrações máximas (10,0 mg/L). Os grupos cujos nomes terminam em 1, 2 e 3, bem como o grupo controle (CON) referem à exposições por 96h e grupos cujos nomes terminam em 4 referem à exposições por 192h. A avaliação

foi realizada no dia terminal da exposição (n = 8 peixes/grupo, 2 fotomicrografias de cada seção individual do tronco cerebral). Análise morfométrica de seções imunomarcadas com GFAP (objetiva 40X). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ (ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey). Os resultados são expressos como *box & whiskers*, mostrando todos os valores..... 47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Microplástico: características e impactos ambientais.....	14
1.2 Zebrafish: características e uso em pesquisas experimentais.....	17
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivos específicos.....	22
3. METODOLOGIA.....	23
3.1 Declaração de ética.....	23
3.2 Microplástico.....	23
3.3 Zebrafish.....	26
3.4 Exposição, grupos e delineamento experimental.....	27
3.5 Distribuição espacial diária nos aquários, aspectos gerais de saúde e letalidade.....	29
3.6 Comportamento.....	30
3.7 Peso e sexo.....	31
3.8 GFAP no encéfalo.....	31
3.9 Análises estatísticas.....	32
3.10 Próximos passos.....	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1 Distribuição espacial diária nos aquários, aspectos gerais de saúde e letalidade.....	34
4.2 Comportamento.....	42
4.3 Peso e sexo.....	45
4.4 GFAP no encéfalo.....	46
5. DISCUSSÃO.....	48
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXOS Anexo 1 – Certificado de aprovação do Projeto junto a CEUA/UNIP.....	69
Anexo 2 – Emenda de aprovação do Projeto junto a CEUA/UNIP.....	70
Anexo 3 – Certificado de qualidade, características e procedência dos plásticos.....	71
Anexo 4 – Atestado de procedência e saúde dos peixes.....	75
Anexo 5 – Dados estatísticos suplementares das análises multivariadas realizadas para a distribuição espacial diária dos peixes.....	76

1. INTRODUÇÃO

Esta seção aborda assuntos disponíveis na literatura especializada relacionados ao microplástico, incluindo suas características e impactos ambientais e aos organismos animais. Além disso, são apresentados estudos sobre o zebrafish que descrevem suas características e uso em pesquisas experimentais. Assim, os assuntos a serem estudados experimentalmente neste trabalho são introduzidos e justificados nesta seção.

1.1 Microplástico: características e impactos ambientais

O acúmulo de lixo plástico em ambientes naturais é um problema global com impactos negativos na economia, na vida selvagem e na saúde humana (HARTMANN et al., 2019). A tendência é de piora, uma vez que no Brasil e em todo o mundo ocorre incremento da produção e uso de plástico (ALI et al., 2021).

Nesse cenário, destaca-se o papel do microplástico, cujas partículas têm dimensão menores que 5 mm (RICE; HIRAMA; WITHERINGTON, 2021). A poluição por microplástico representa um potencial danoso à saúde animal, especialmente no ambiente marinho, mas também na água doce e no ambiente terrestre, incluindo-se aqui moluscos, crustáceos, peixes, anfíbios, répteis, aves, mamíferos e até mesmo o homem (SMITH et al., 2018; CAMPANALE et al., 2020; SHARIFINIA et al., 2020; STANTON et al., 2020; ARAUJO et al., 2021; ZANTIS et al., 2021).

O problema do consumo do microplástico e sua presença no trato digestório não se refere a princípio a sua toxicidade, mas ao sufocamento e a sensação de saciedade quando do seu consumo, podendo levar a morte por inanição (BROWNE; GALLOWAY; THOMPSON, 2007; SCHMID; COZZARINI; ZAMBELLO, 2021). Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação que fazem o microplástico ser tão prejudicial.

O microplástico pode ser originário de maneira primária ou secundária. Microplásticos primários são aqueles produzidos deliberadamente como micropartícula e incorporado aos produtos, como cosméticos, produtos de higiene pessoal, tintas e produtos de limpeza. Microplásticos secundários são originados devido ao desgaste, fragmentação ou uso de produtos plásticos, como pneus, fibras têxteis e plásticos oxidegradáveis (OLIVATTO et al., 2018). Em outras palavras, o microplástico secundário surge decorrente da exposição ambiental de resíduos plásticos maiores, os quais vão sofrendo sucessivas fragmentações,

gerando detritos de plásticos progressivamente menores. Os principais polímeros relacionados à formação de microplásticos são polietileno tereftalato (PET), polipropileno (PP), poliestireno (PS), poliuretano (PU), policloreto de vinila (PVC), polietileno (PE), poliéster (PES), poliamidas (PA) e náilon (LEI et al., 2018; OLIVATTO et al., 2018; GARCIA et al., 2021).

Entre os microplásticos mais encontrados em animais aquáticos, tanto no ambiente marinho como de água doce, em diferentes continentes, destaca-se o PE e o PP (HENDRICKSON; MINOR; SCHREINER, 2018; KHAN et al., 2020; GARCIA et al., 2021). O PE, conhecido popularmente como plástico rígido, pode ser encontrado com diferentes tamanhos, cores e formas (ZHANG et al., 2017). Os PEs mais comuns são os PEAD (Polietileno de Alta Densidade), o PEMD (Polietileno de Média Densidade), o PEBDL (Polietileno de Baixa Densidade Linear) e o PEBD (Polietileno de Baixa Densidade). O PE, usado principalmente em filmes para produção de embalagens, tem sido objeto de investigação, pois tende a se acumular com o tempo, causando possíveis riscos ambientais (ROY et al., 2011). O PP é um plástico muito versátil, empregado para diversos fins, como na indústria têxtil, embalagem para alimentos e componentes para fabricação de automóveis (HENDRICKSON; MINOR; SCHREINER, 2018).

Além da contaminação ambiental e dos animais pelos diferentes tipos de microplástico, alguns aditivos químicos adicionados durante o processo de produção dos plásticos, para conferir características como dureza, durabilidade e resistência, podem conter substâncias tóxicas. Alguns exemplos são os plastificantes, retardantes de chamas, estabilizadores, corantes, endurecedores, agentes antiestáticos (aminas) e adjuvantes (ésteres e amidas), que podem sofrer lixiviação e sua toxicidade se torna prejudicial para os seres humanos e para a vida selvagem (PRATA et al., 2020).

Os microplásticos também podem absorver outros poluentes ao se ligarem com outros contaminantes ambientais, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilopoliclorados (PCBs), diclorodifeniltricloroetanos (DDT) e metais (EERKES-MEDRANO; THOMPSON; ALDRIDGE, 2015; ROCHMAN et al., 2019) e funcionam como uma espécie de esponja química, que, quando em contato com fluidos biológicos, são capazes de causar efeitos tóxicos no ambiente. No ambiente marinho, os plásticos se fragmentam inclusive sob efeitos combinados da ação das ondas e da abrasão de partículas de sedimento (THOMPSON et al., 2004). Também podem percorrer longas distâncias e assim funcionam como vetores para dispersão de toxinas e/ou microrganismos patogênicos (ZETTLER; MINCER; AMARAL-ZETTLER, 2013).

Há um potencial considerável de detritos plásticos microscópicos que se acumulam em ambientes de água doce e marinha (BROWNE; GALLOWAY; THOMPSON, 2007). Os plásticos têm uma meia-vida mais longa do que a maioria dos substratos marinhos flutuantes naturais. Por exemplo, o PP utilizado em embalagens para alimentos (em média com 800 μm de espessura) tem meia-vida estimada em 87 anos em ambiente marinho. O PE de alta densidade utilizado em canos para construção civil (em média com 10.000 μm de espessura) tem meia-vida estimada em 1200 anos em ambiente marinho (CHAMAS et al., 2020). Além disso, esses plásticos possuem uma superfície hidrofóbica que promove a colonização microbiana e a formação de biofilme, diferindo de substratos autóctones nas camadas superiores do oceano. Em função do seu pequeno tamanho, os microplásticos são considerados biodisponíveis para organismos e por serem tão pequenos são confundidos com alimentos. Pesquisas apontam que a ingestão e a translocação de partículas microplásticas trazem impactos para os organismos aquáticos (WRIGHT; THOMPSON; GALLOWAY, 2013), incluindo zooplâncton (COLE et al., 2015), invertebrados (VON MOOS; BURKHARDT-HOLM; KOHLER, 2012; ROCH; FRIEDRICH; BRINKER, 2020), peixes (LUSHER; HOLLMAN; MENDOZA-HILL, 2017) e aves (PROVENCHER et al., 2014).

Deve-se destacar que a ingestão de microplásticos pode introduzir toxinas em toda base da cadeia alimentar, já que são aparentemente transferidos de um nível biológico para outro (FARRELL; NELSON, 2013). Após serem ingeridos, os microplásticos podem afetar os organismos aquáticos de muitas maneiras. Pesquisas quantificam o impacto do microplástico nas espécies marinhas, sendo que mais de 690 já foram descritas como afetadas pelo componente, como também apontam as implicações físicas e de saúde da ingestão de microplástico por esses organismos (COLE et al., 2015; ROCHMAN et al., 2015; PEDA et al., 2016). No trato digestivo, a presença do microplástico tem potencial para inibir a absorção dos alimentos, bloquear o intestino, interferindo no crescimento, reprodução e sobrevivência da biota (GALLAGHER et al., 2016).

Além da possível obstrução do trato digestivo, as micropartículas ingeridas podem funcionar como vetores de microrganismos e contaminantes, responsáveis pela toxicidade dos organismos aquáticos, com implicações fisiológicas, comportamentais, de crescimento, reprodutivas e genéticas (CHAE; AN, 2017). Ainda, por se constituírem de minúsculas partículas, os microplásticos trazem o risco de entrar em teias alimentares aquáticas e propagar substâncias tóxicas dos níveis mais baixos aos níveis mais elevados tróficos, causando danos em todo o ecossistema (BESSELING et al., 2013). Em mexilhões, partículas plásticas de PS e PE são capazes de translocar do trato intestinal para o sistema circulatório, entrar nas

células e provocar efeitos negativos na estrutura celular e tecidual (LUSHER; HOLLMAN; MENDOZA-HILL, 2017).

Diante do potencial dos detritos plásticos se acumularem nos organismos, o consumo por inteiro de determinadas espécies aquáticas, sem a remoção do trato digestório completo, representa uma forma de exposição para os humanos (ROCHMAN et al., 2015; SMITH et al., 2018). Estudos recentes também indicam que a exposição de humanos a microplásticos ocorre por meio do consumo diários de outros alimentos, uma vez que pequenas partículas plásticas foram detectadas em diferentes frutos do mar, artigos de alimentos processados e em bebidas, como a cerveja. Deve-se considerar também a exposição por inalação e contato dérmico, devido à presença do microplástico no ar (SMITH et al., 2018). Por exemplo, já foi demonstrada a presença de microplástico no pulmão de pessoas que vivem em cidades poluídas como São Paulo provenientes da inalação do microplástico disperso no ar (AMATO-LOURENCO et al., 2021). Aliás, os microplásticos mais encontrados neste estudo de 2021 foram o PE e o PP.

Nos diferentes sistemas biológicos, a exposição ao microplástico pode causar toxicidade celular, ocasionando estresse oxidativo e lesões inflamatórias. Diante da incapacidade do sistema imunológico de remover partículas sintéticas, também pode ocasionar inflamações crônicas e aumentar o risco de neoplasias. Os microplásticos também podem liberar seus constituintes, contaminantes adsorvidos e organismos patogênicos (PRATA et al., 2020).

Assim, a presença de microplásticos no ecossistema representa uma preocupação ambiental global diante do risco potencial associados à exposição de longo prazo para animais e humanos (LUSHER; HOLLMAN; MENDOZA-HILL, 2017). No entanto, como o conhecimento da toxicidade do microplástico ainda é reduzido, a ampliação do número de pesquisas sobre o tema se torna necessária (PRATA et al., 2020).

A avaliação da presença do microplástico no ambiente, em particular no ambiente aquático, em condições controladas, pode contribuir para um melhor entendimento das consequências da sua exposição em diferentes níveis da cadeia trófica chegando até o homem.

1.2 Zebrafish: características e uso em pesquisas experimentais

O zebrafish (*Danio rerio*) é um pequeno peixe teleósteo tropical de água doce, que pertence à família Cyprinidae. É originário do rio Ganges, no leste da Índia, além do

Bangladesh, Nepal e norte de Mianmar (SPENCE et al., 2006). Trata-se de uma espécie que, na fase adulta, apresenta medida em torno de 4-5 cm e traz como característica corpo cilíndrico e padrão, com 7 a 9 listras horizontais claras e escuras, que percorrem todo o corpo e se alternam em tons de azul escuro sobre prata, com coloração verde ou amarela na região dorsal (GERLAI et al., 2000; PAULL et al., 2010).

Eles exibem dimorfismo na maturidade sexual, com diferenças na coloração que surgem após seis semanas de vida. Na fase reprodutiva, os machos apresentam coloração amarelo dourado na parte ventral, são mais afilados e leves que as fêmeas, que apresentam cor prateada e arredondadas, principalmente na região ventral, características que se tornam mais evidentes próximo do período da desova (GERLAI et al., 2000; PAULL et al., 2010).

A capacidade de desova de uma fêmea se estabelece em torno de 200 a 300 ovos fertilizados por semana e completa sua embriogênese em 72 horas, passando por estágios bem definidos; a saber: a fase de zigoto, clivagem, blástula, gástrula, segmentação, faringula e fase filotípica, em que o tubo neural está formado com as vesículas cefálicas e estruturas sensoriais, assim como a musculatura segmentar e as extremidades; as nadadeiras estão presentes, o coração na região ventral do corpo e os arcos branqueais na região bucal. Ao final do processo da embriogênese, forma-se uma larva com morfogênese praticamente completa, livre-natante e que exibe visíveis movimentos oculares, da mandíbula e nadadeiras (PARICHY et al., 2009). Os embriões do zebrafish medem em torno de 0,7 mm de diâmetro, são opticamente transparentes e podem atingir a maturidade sexual dentro de dois a três meses (GERLAI et al., 2000; SPENCE et al., 2008).

O zebrafish tem se constituído como um modelo muito procurado para experimentos científicos, já que compartilham aproximadamente 70% de semelhança genética com os humanos, com aspectos morfológicos e fisiológicos semelhantes, tais como sistema nervoso central, sistema esquelético complexo, células hematopoiéticas múltiplas (eritrócitos, células mieloides, linfócitos B e T etc.) e sistema cardiovascular (LIESCHKE; CURRIE, 2007; KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014). Assim, quando genes causadores de doenças em humanos são injetados nos embriões de zebrafish, os peixes em crescimento acabam por adquirir grande parte dessas enfermidades. Deve-se destacar que o corpo translúcido do do embrião do zebrafish permite melhor visualização de órgãos e processos biológicos *in vivo*, sem a necessidade de procedimentos invasivos. Além disso, essa espécie é favorável a abordagens genéticas avançadas e seu genoma totalmente sequenciado está disponível desde 2013. As vantagens de incorporá-los como modelo de experimento se relacionam ao fato de ter um baixo custo de manutenção em cativeiro, possuírem alta fecundidade e

desenvolvimento rápido (LIESCHKE; CURRIE, 2007; KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014).

A ascensão do zebrafish como modelo experimental também guarda relação com a boa tolerância a condições ambientais em cativeiro, ainda que a qualidade da água e da alimentação exerça importância significativa para sua sobrevivência e reprodução (WATTS et al., 2016). No que tange a questão alimentar, são onívoros e possuem como componentes de dieta na natureza zooplâncton e insetos. Pesquisas também indicam a presença de fitoplâncton, algas filamentosas e plantas vasculares, ovos e pequenos crustáceos no sistema digestório do zebrafish (SPENCE et al., 2008).

Um dos sistemas que guarda notável semelhança dos zebrafish com os humanos é o sistema nervoso, tornando-se importante objeto de pesquisa em distintas áreas como no campo da neurociência, biologia do desenvolvimento, oncologia, toxicologia, análises comportamentais e estudos genéticos. Aliás, identifica-se um aumento dos estudos utilizando adultos e larvas de zebrafish, em função da semelhança com a genética humana e da facilidade de manipulação do sistema nervoso central (GERLAI, 2003). Diversas células e estruturas neurais dos zebrafish são semelhantes as nossas, como a micróglia, os astrócitos e neurônios motores, inclusive no que diz respeito à produção de neurotransmissores como serotonina, ácido gama-aminobutírico (GABA), dopamina, histamina etc. (IJAZ; HOFFMAN, 2016). Por falar em astrócitos, têm se avaliado a expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) no encéfalo de zebrafish como marcador de neuroinflamação e danos ecotoxicológicos (LEME et al., 2018). Ademais, tornou-se modelo para o estudo de fármacos para enfermidades ligadas ao transtorno do espectro autista (MAASWINKEL; ZHU; WENG, 2013) e análise de mecanismos genéticos associados a doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer (LEE; FREEMAN, 2014).

Pesquisas apontam que o zebrafish tem sido útil para detectar a presença de algumas toxinas ambientais, com compostos que vão desde metais e metaloides de ocorrência natural, até componentes sintéticos de produtos de consumo, pesticidas e subprodutos de processamento industrial e incineração de resíduos (BAMBINO; CHU, 2017). Efeitos tóxicos do fungicida piraclostrobina e do poluente ambiental ftalato de benzila butil (BBP) constam como estudos recentes sobre o impacto desses produtos na saúde do animal (ZHANG et al., 2017).

Na linha de pesquisa comportamental, o zebrafish tem sido um modelo experimental para abordagens cognitivas e sociais, com utilidade para mensurar a utilização de drogas terapêuticas para distúrbios depressivos graves (FONSEKA et al., 2016). A contaminação por

produtos farmacêuticos em ecossistemas aquáticos, em especial as psicoativas (diazepam ou fluoxetina) e os efeitos do estresse agudo na ansiedade, memória, interação social e agressividade em zebrafish, também aparece entre as recentes pesquisas que abordam como a presença dessas drogas causa alterações comportamentais significativas nos peixes (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014; GIACOMINI et al., 2016).

Outras abordagens usando zebrafish incluem doenças cardiovasculares de origem congênitas, trombose, desenvolvimento de vasos colaterais, inflamação, cardiomiopatia e arritmias (CHICO; INGHAM; CROSSMAN, 2008; ASNANI; PETERSON, 2014), bem como recentes estudos ligados a medicina regenerativa (GERHARD, 2007; GOESSLING; NORTH, 2014). A alta capacidade regenerativa e comodidade à manipulação genética tornam o peixe um modelo terapêutico para avaliar a capacidade de regeneração de distintos órgãos como: nadadeiras, sistema nervoso central, coração, pâncreas, fígado e rim (ARJMAND et al., 2020).

O zebrafish também se tornou modelo para estudos de doenças endócrinas e metabólicas, objetivando encontrar novas terapias para obesidade, diabetes mellitus tipo 2, esteatohepatite não alcoólica, distúrbios da tireóide e insuficiência das glândulas adrenais (ARJMAND et al., 2020).

Por fim, deve-se destacar que a utilização de peixes como o zebrafish enfrentam menos obstáculos éticos e minimizam as dificuldades técnicas e de alto custo quando comparada ao uso de mamíferos em investigações científicas.

Assim, o zebrafish foi proposto como modelo experimental pelo fato deste peixe ser usado como um modelo animal para toxicologia do desenvolvimento (TERAOKA; DONG; HIRAGA, 2003; HILL et al., 2005; BAILEY; OLIVERI; LEVIN, 2013), em testes de neurotoxicidade e compreensão de distúrbios encefálicos (DE ESCH et al., 2012; KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014). Além disso, o estudo comportamental do zebrafish vem sendo usado como biomarcador de toxicidade (EISSA et al., 2010), bem como para a neurociência translacional, por exemplo, para compreender as vias neurais, biomarcadores fisiológicos e fundamentos genéticos da função cerebral normal e patológica (KALUEFF et al., 2013; KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014).

Desse modo, o objetivo do presente projeto foi de estudar os efeitos de diferentes tipos de microplástico em parâmetros comportamentais e encefálicos de zebrafish, para, em condições controladas, propor um modelo experimental para o estudo do microplástico.

Também foi objetivo entender aspectos neurobiológicos relacionados aos prejuízos induzidos pelo microplástico, para contribuir com o entendimento dos mecanismos neurobiológicos.

2. OBJETIVOS

São três objetivos principais: estudar os efeitos da exposição a diferentes tipos de microplástico em parâmetros comportamentais e encefálicos de zebrafish; propor um modelo experimental para o estudo do microplástico; e entender aspectos neurobiológicos relacionados aos prejuízos induzidos pelo microplástico.

2.1 Objetivos específicos

- Expor zebrafish adultos a dois tipos de microplásticos, PE e PP, em diferentes concentrações;
- Avaliar diariamente os efeitos da exposição ao PE e PP quanto a aspectos gerais da saúde do zebrafish;
- Avaliar diariamente os efeitos da exposição ao PE e PP quanto à distribuição espaciais dentro dos aquários em dois contextos: resposta de alarme e distribuição espacial do tipo basal dos zebrafish;
- Avaliar os efeitos da exposição ao PE e PP quanto a parâmetros comportamentais relacionados à atividade motora, exploratória, intoxicação, deficiências do sistema respiratório e expressão de ansiedade dos zebrafish;
- Avaliar os efeitos da exposição ao PE e PP quanto à eventual taxa de letalidade e peso corporal dos zebrafish;
- Avaliar os efeitos da exposição ao PE e PP quanto à expressão astrocitária de GFAP no encéfalo dos zebrafish.
- Propor modelo experimental de estudo do microplástico em zebrafish.

3. METODOLOGIA

Nesta seção, são apresentados os procedimentos éticos e legais, informações relativas aos microplásticos e zebrafish utilizados, os protocolos de exposições, os grupos experimentais, as avaliações realizadas, que incluem a distribuição espacial diária dos zebrafish nos aquários, seus comportamentos e análises encefálicas, bem como as análises estatísticas realizadas.

3.1 Declaração de ética

Este projeto foi submetido para a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIP) e só foi iniciado experimentalmente após sua aprovação, sob número 4386210222 (**Anexo 1**). Os procedimentos estão de acordo com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório. Essas diretrizes são baseadas nas normas do *National Institutes of Health* (Bethesda, MD). Os experimentos foram realizados de acordo com os protocolos de boas práticas de laboratório com métodos de garantia de qualidade. Todos os esforços possíveis foram realizados para minimizar o sofrimento dos animais.

3.2 Microplástico

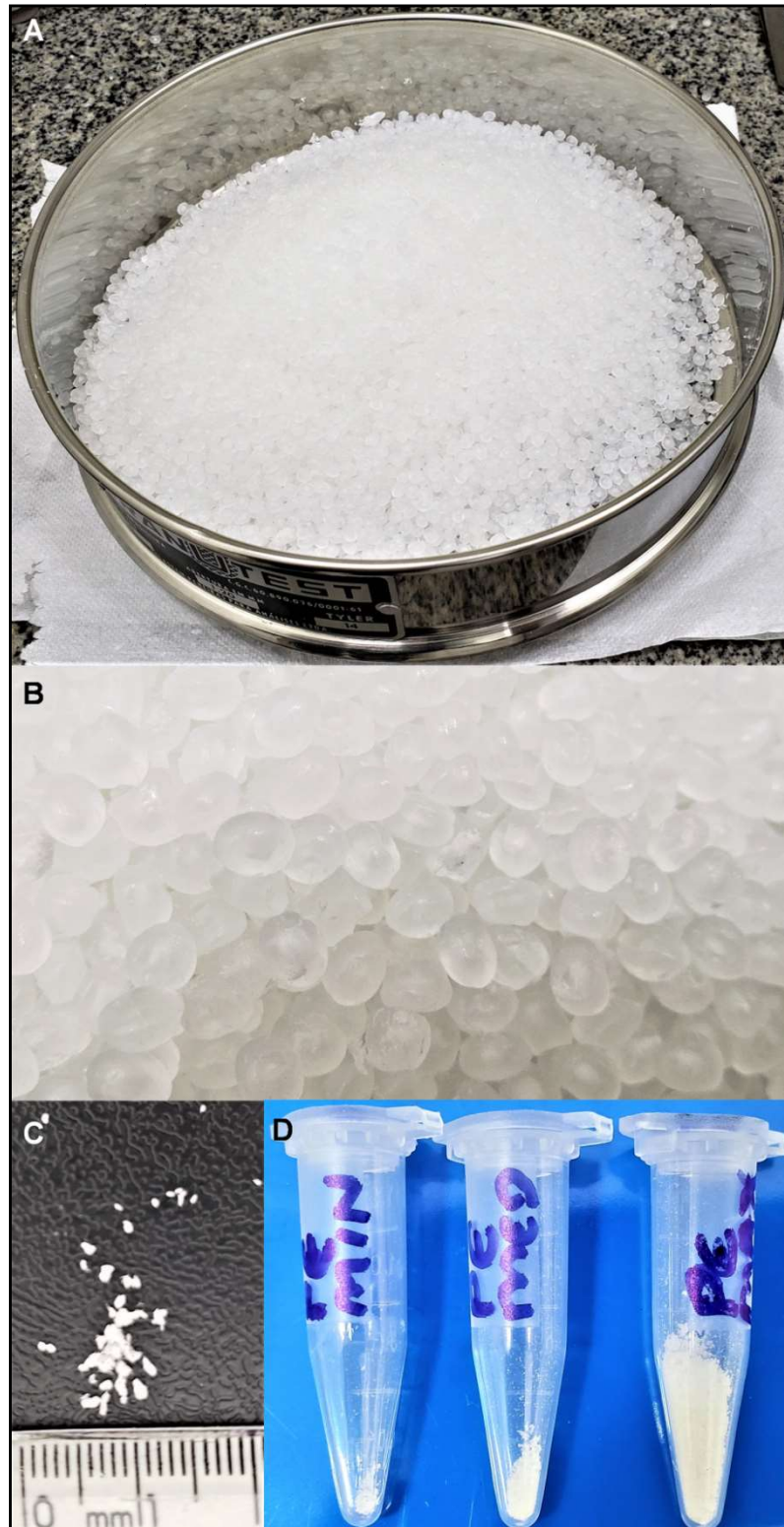
Foram estudados dois tipos de microplástico, o PE e o PP, devido ao fato deles serem comumente encontrados no sistema digestório de peixes de água doce e marinha de diferentes regiões do mundo, como na Colômbia (GARCIA et al., 2021), no Rio Nilo (KHAN et al., 2020) e nos EUA e Canadá (HENDRICKSON; MINOR; SCHREINER, 2018). Inclusive, existem estudos com protocolos experimentais de exposição em zebrafish (LEI et al., 2018).

Os dois tipos de plásticos foram adquiridos na forma virgem, pura, de um fabricante fornecedor certificado (BRASKEN, Mais Polimeros do Brasil LTDA, Cajamar, São Paulo, Brasil). Os certificados de qualidade, as características físicas e atestados de pureza e procedência dos plásticos PE e PP estão disponíveis no **Anexo 2**.

O dois microplásticos foram confeccionados por processo de trituração mecânica, com constatação de partículas de no máximo 1,2 mm por meio de peneira (inox) de granulometria. Foram confeccionadas soluções para cada um desses microplásticos em três diferentes

concentrações. As concentrações mínima, média e máxima de cada microplástico foram 0,1, 1,0 e 10,0 mg/L, respectivamente, de acordo com estudos de exposição de zebrafish adultos a diferentes tipos de microplástico (LEI et al., 2018; UMAMAHESWARI et al., 2021). A **Figura 1** ilustra os plásticos virgens adquiridos em formato de esfera (**Figuras 1A e B**), os microplásticos já triturados e peneirados, de modo a garantir tamanho $\leq 1,2$ mm (**Figura 1C**) e as diferentes concentrações de microplásticos, mínima, média e máxima, estocados para a exposição dos zebrafish nos aquários (**Figura 1D**).

Figura 1 – Confeção dos microplásticos. Processo de confecção dos dois tipos de microplásticos (polietileno e polipropileno). (A e B) Plásticos virgens adquiridos em formato de esfera da fabricante (BRASKEN, Mais Polimeros do Brasil LTDA, Cajamar, São Paulo, Brasil); (C) microplásticos confeccionados por trituração mecânica e peneirados em peneira de granulometria, de modo a garantir tamanho $\leq 1,2$ mm; (D) diferentes concentrações de microplásticos, mínima, média e máxima, estocados para a exposição dos zebrafish nos aquários



Fonte: dos autores

3.3 Zebrafish

Um total de 90 zebrafish adultos de 4–5 cm e 3–4 meses de idade foram obtidos de um criador comercial certificado. O **Anexo 3** dispõe informações que atestam a procedência dos zebrafish bem como sua saúde.

O transporte do zebrafish, sua aclimação na água e condições de manutenção e alimentação foram condições padrão, as mesmas descritas anteriormente em estudo realizado em nosso laboratório (LEME et al., 2018). A manutenção dos zebrafish utilizou água desclorada da Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP, São Paulo, Brasil) mantida a uma temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ por termostato, pH $7,5\pm 0,2$, amônia total zero, nitrito zero e nitrato até 200 mg/L. A sala possuía iluminação artificial (ciclo claro de 14 horas/escuro de 10 horas, luzes acesas às 8h00 da manhã). No aquário de manutenção (300 L), as trocas parciais de água (20% do volume) ocorreram quinzenalmente e o material filtrante do filtro tipo canister era substituído mensalmente. Todos os parâmetros físicos e químicos de manutenção foram empregados de acordo com o Manual de Criação em Biotério para Zebrafish (DAMMSKI et al., 2011). Os zebrafish foram mantidos por um período mínimo de dez dias nas condições de nossos laboratórios antes do início dos experimentos para aclimação. A **Figura 2** ilustra os zebrafish mantidos no aquário de manutenção de nosso laboratório.

Figura 2 – Zebrafish. Zebrafish mantidos no aquário de manutenção de nosso laboratório. O aquário de manutenção possuía 300 L e lá foram mantidos os 90 zebrafish para aclimação e em fases prévias para o aquário de experimentação



Fonte: dos autores

3.4 Exposição, grupos e delineamento experimental

Um total de nove grupos foi avaliado neste estudo. Cada grupo foi composto por dez zebrafish. Durante os procedimentos experimentais, cada grupo ficou em um aquário de vidro (20 × 20 × 20 cm, aerado usando compressores de ar e com controle de temperatura por termostato). A água utilizada nestes aquários experimentais foi proveniente do aquário de manutenção. Os zebrafish de cada um dos nove grupos foram expostos as seguintes condições:

- (1) Grupo controle (CON): água controle;
- (2) Grupo PE1: solução contendo concentração mínima de PE, com exposição por quatro dias (96h);
- (3) Grupo PE2: solução contendo concentração média de PE, com exposição por quatro dias (96h);
- (4) Grupo PE3: solução contendo concentração máxima de PE, com exposição por quatro dias (96h);
- (5) Grupo PE4: solução contendo concentração máxima de PE, com exposição por oito dias (192h);
- (6) Grupo PP1: solução contendo concentração mínima de PP, com exposição por quatro dias (96h);
- (7) Grupo PP2: solução contendo concentração média de PP, com exposição por quatro dias (96h);
- (8) Grupo PP3: solução contendo concentração máxima de PP, com exposição por quatro dias (96h);
- (9) Grupo PP4: solução contendo concentração máxima de PP, com exposição por oito dias (192h).

Os microplásticos nas diferentes concentrações foram sempre adicionados em cada aquário experimental somente após constatação de que a temperatura da água do aquário estava estável e igual aquela do aquário de manutenção, bem como somente 10 minutos após o acondicionamento dos 10 zebrafish gentilmente dentro do aquário (dia 0), de modo a garantir sua habituação.

Todos os nove grupos foram avaliados diariamente (a cada 24h) com relação as suas distribuições espaciais dentro dos aquários (superior, intermediária e inferior), avaliando-se

também aspectos gerais da saúde animal e eventual taxa de letalidade. A distribuição espacial dentro dos aquários foi avaliada em dois contextos: resposta de alarme e distribuição do tipo basal, explicadas no próximo item.

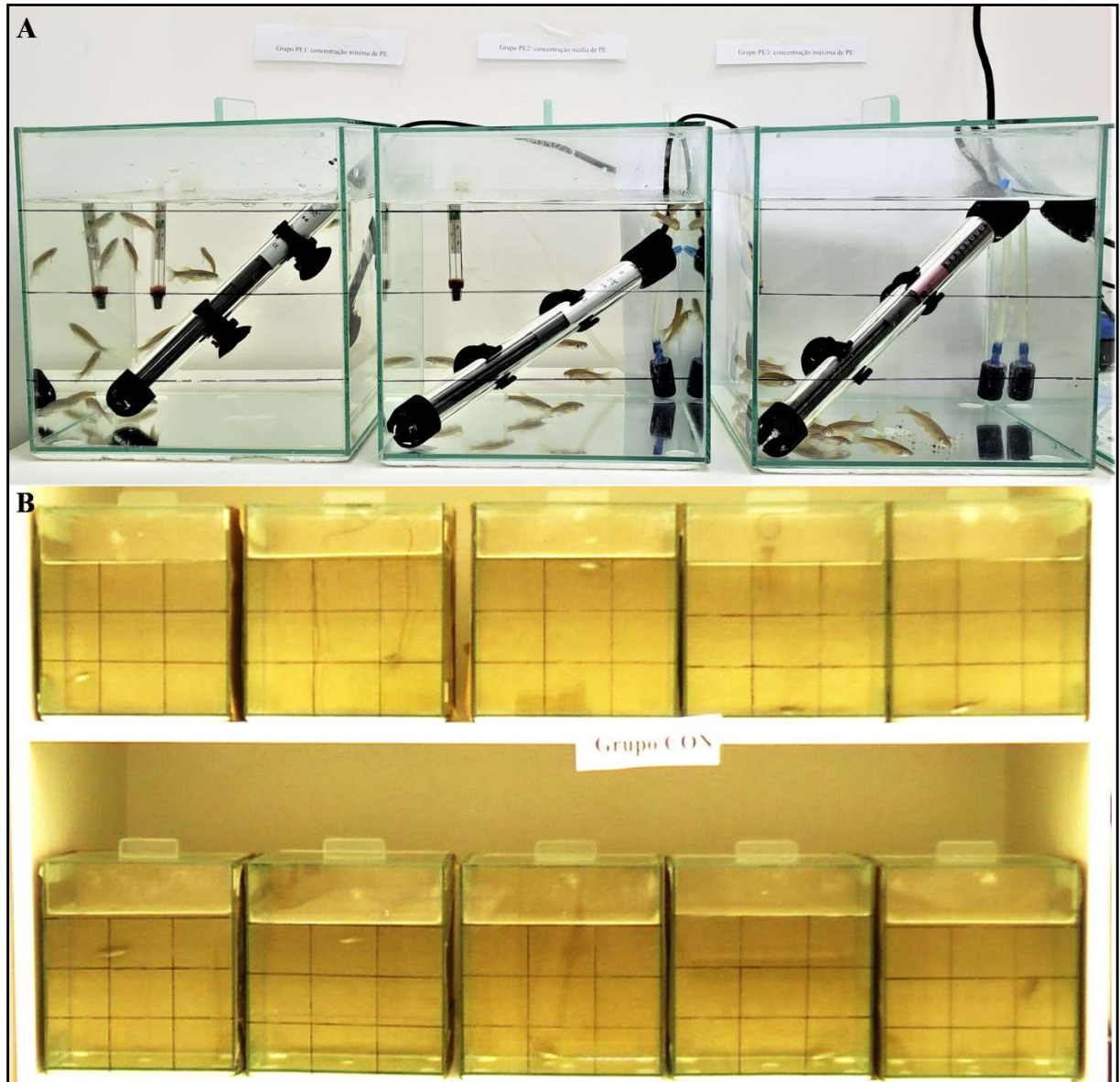
A cada 24h a água do aquário era gentilmente agitada com auxílio de bastão de vidro a fim de ressuspender eventual microplástico depositado no fundo e então os zebrafish eram alimentados.

No dia terminal (T), os zebrafish foram avaliados individualmente quanto a parâmetros comportamentais. Imediatamente depois, os zebrafish foram submetidos à eutanásia, pesados, sexados e foram coletados seus encéfalos. O encéfalo foi processado para técnica de imuno-histoquímica de quantificação da expressão de GFAP (marcador de astrócitos).

O início das exposições aos microplásticos, as avaliações diárias e comportamentais, bem como a eutanásia foram sempre realizados entre 9h00 e 11h00 AM para minimizar variações induzidas por alterações no ritmo circadiano dos zebrafish.

A **Figura 3A** ilustra os aquários experimentais onde cada um dos nove grupos foi exposto ou não aos diferentes tipos de microplásticos em diferentes protocolos de concentrações e dias de exposição.

Figura 3 – Aquários experimentais e comportamentais. Aquários experimentais onde os zebrafish foram expostos aos microplásticos (polietileno e polipropileno) e avaliados diariamente e também quanto a parâmetros comportamentais. (A) Aquários experimentais contendo dez zebrafish por grupo para a exposição aos microplásticos e monitoramento diário da distribuição espacial (superior, intermediária e inferior), aspectos gerais de saúde e taxa de letalidade; (B) Aquários individuais para avaliações comportamentais no dia terminal do experimento



Fonte: dos autores

3.5 Distribuição espacial diária nos aquários, aspectos gerais de saúde e letalidade

Os zebrafish dos nove grupos experimentais foram avaliados diariamente, a cada 24h, quanto sua distribuição espacial dentro de cada aquário experimental (**Figura 3A**) em duas situações diferentes. Primeiro, os zebrafish foram expostos a uma situação aversiva de

abertura de porta sanfonada disposta imediatamente à frente dos aquários, com 1 metro de distância entre o aquário e a porta, de modo que cada peixe era exposto a um distúrbio visual e auditivo. Essa resposta ambiental aversiva foi chamada de reação de alarme. O segundo contexto avaliado na distribuição espacial diária dos peixes foi após 120 segundos da situação aversiva, considerado como uma distribuição espacial basal. Para os dois parâmetros (reação de alarme e distribuição basal) foi anotado a quantidade de peixes de cada aquário dispostos nos extratos: superior, intermediário e inferior. Os zebrafish respondem a comportamentos aversivos e que causam ansiedade procurando extratos mais inferiores do aquário (KALUEFF et al., 2013).

Ao término das avaliações diárias de reação de alarme e distribuição espacial basal, os peixes eram individualmente inspecionados quanto a aspectos gerais de saúde e eventuais padrões comportamentais anômalos, incluindo mudança de postura e coloração, segundo catálogo de comportamento do zebrafish (KALUEFF et al., 2013).

Além disso, diariamente foi monitorado eventual letalidade dos zebrafish, para fornecer a taxa de letalidade.

3.6 Comportamento

No dia terminal das avaliações diárias (após 96h ou 192h, a depender do grupo experimental), cada um dos dez zebrafish de cada um dos nove grupos foi individualmente alocado em aquários de vidro pequenos ($21 \times 10 \times 21,5$ cm de largura) contendo água do aquário de manutenção. A parede frontal de cada aquário era dividida em nove retângulos iguais (7×5 cm, **Figura 3B**). A análise comportamental era iniciada imediatamente após a inserção suave do zebrafish no meio do aquário. A sessão de análise de 10 minutos era sempre filmada em uma sala pequena e silenciosa, sem a presença do experimentador em seu interior. Os aquários eram isolados visualmente entre si por meio de papel pardo disposto na parte exterior de cada aquário, de modo a impedir a comunicação visual entre zebrafish durante a gravação da análise comportamental simultânea dos dez zebrafish de cada grupo. As condições da sala de análise comportamental e da filmagem foram as mesmas daquelas descritas anteriormente (LEME et al., 2018). Os parâmetros analisados incluíram: latência (em segundos) para alcançar os quadrantes superiores do aquário pela primeira vez; frequência de atividade exploratória (número total de quadrantes percorridos, contabilizando somente quando o corpo inteiro do zebrafish entrou em cada quadrante); tempo total (em

segundos) de permanência nos quadrantes superiores do aquário; tempo total (em segundos) de permanência nos quadrantes inferiores do aquário; e tempo total (em segundos) de movimentos erráticos (episódios de mudanças bruscas na direção e/ou velocidade e/ou disparos rápidos [*dartings*], movimentos em ziguezague, saltos, movimentos circulares e reação de alarme). Esses parâmetros representam diferentes padrões de comportamento relacionados a mudanças motoras, exploratórias, intoxicação, deficiências do sistema respiratório e expressão de ansiedade e foram baseados em um catálogo de comportamento do zebrafish (KALUEFF et al., 2013).

3.7 Peso e sexo

Imediatamente depois da avaliação comportamental, os zebrafish foram submetidos à eutanásia por método padrão autorizado pela CEUA-UNIP, no caso, a submersão completa por no mínimo 30 segundos em óleo de cravo/eugenol 3000 mg/L, seguido por incisões com bisturi (LUCENA et al., 2013). Então, os peixes foram lavados em água corrente e secados em papel toalha para serem pesados (peso corporal, g) e sexados (discriminando os machos e fêmeas). Machos e fêmeas adultos de zebrafish podem ser identificados com base em vários fenótipos sexualmente dimórficos. Os três dimorfismos externos utilizados presentemente para identificar o sexo dos zebrafish foram: (1) abdômen maior nas fêmeas, devido ao fato dos ovários serem significativamente maiores que os testículos); (2) cor dimórfica da barbatana anal e do abdômen, no caso, as células pigmentares xantáforos, que resultam na faixa amarela no corpo, são mais pigmentadas nos machos; (3) diferenças na aparência do poro genital, localizado na linha média ventral do abdômen logo anterior à barbatana anal e posterior ao ânus (MENKE et al., 2011; KOSSACK; DRAPER, 2019).

3.8 GFAP no encéfalo

Os mesmos zebrafish submetidos à eutanásia descritos para a avaliação do peso e sexo foram utilizado para a coleta de seus encéfalos, que seguiram procedimentos padronizados em nossos laboratórios (LEME et al., 2018). Resumidamente, seções sagitais de cada encéfalo foram feitas para atingir o tronco cerebral. A imuno-histoquímica para GFAP foi realizada usando o método de coloração conjugada com polímero de cadeia (sistema Dako EnVision,

Glostrup, Dinamarca), usando a imunoglobulina policlonal de coelho anti-GFAP (1:50; Z033401, Dako, Glostrup, Dinamarca) como o anticorpo primário, seguido pelo kit EnVision+ (HRP, Rabbit, DAB +, K4011, Dako, Glostrup, Dinamarca). Duas fotomicrografias de cada seção individual do tronco cerebral foram feitas usando uma objetiva de 40×. A área das células semelhantes à astrócitos GFAP+ e seus processos, marcados em marrom foram calculados automaticamente, em pixels, usando o software Image-ProPlus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA) calibrado com filtros de cores digitais que incluíram apenas células positivas e a coloração de fundo foi excluída. A análise morfométrica dos cortes marcados por imuno-histoquímica foi realizada utilizando o *index per area* do *software* que representa a proporção da área marcada em relação à área total da imagem, sendo zero a completa ausência de marcação e 1 a marcação total da área. O GFAP está presente no citoplasma e nos processos dos astrócitos e por meio de técnicas de imuno-histoquímica é possível verificar a astrogliose como um biomarcador de neuroinflamação (SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

3.9 Análises estatísticas

As avaliações diárias relativas à distribuição espacial dos zebrafish de cada grupo experimental dentro de cada aquário foram analisadas estatisticamente por análises multivariadas, considerando três possibilidades de distribuição espacial no aquário – superior, intermediária e inferior, os nove grupos experimentais (com diferentes concentrações de diferentes microplásticos PE e PP) e as avaliações diárias nos quatro últimos dias de exposição (denominadas de T para o último dia de avaliação, ou dia terminal e os três dias anteriores: T-1, T-2 e T-3). Assim, foram usadas quatro variáveis de tempo e 27 casos (isto é, os nove tratamentos e as três variáveis espaciais no aquário). A unidade experimental considerada foi cada aquário com dez zebrafish. Foram realizadas duas análises: o dendrograma, ou análise hierárquica de cluster (AC) pelo método de UPGMA e distância Euclidiana, e a análise de componentes principais (ACP, ou do inglês PCA, de *principal component analysis*).

Foram verificadas a homocedasticidade (teste de Bartlett) e a normalidade dos dados (testes Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov, a depender do tamanho amostral). Os dados foram obtidos de forma independente. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey para comparar dados

paramétricos de peso, comportamento e órgãos entre os nove grupos. Nestes casos, cada zebrafish foi considerado a unidade experimental.

Parâmetros não paramétricos relativos ao tempo de movimentos erráticos foram analisados pelo teste de Wilcoxon de classificação sinalizada, considerando-se o valor hipotético igual a zero, que é relativo aos movimentos observados para o grupo controle. Para esta análise, a unidade experimental foi cada aquário com dez zebrafish, de modo a realizar a somatória dos valores de cada grupo.

O nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi considerado suficiente para mostrar diferenças significativas em todos os dados analisados. Os dados são expressos como média e respectivos erros-padrão, medianas, ou como *box & whiskers*, mostrando todos os valores.

3.10 Próximos passos

Os mesmos zebrafish utilizados para a coleta de encéfalo também foram aproveitados para a coleta de suas brânquias e sistema digestório. As brânquias e o sistema digestório serão processados utilizando técnicas padronizadas para confecção de lâminas de Hematoxilina-Eosina (HE) para estudos histológicos qualitativos e quantitativos. Também está previsto o estudo da expressão de GFAP em outra área encefálica.

4. RESULTADOS

Nesta seção, são apresentados os resultados relativos aos estudos: da distribuição espacial diária nos aquários, de aspectos gerais de saúde, letalidade, comportamento, peso corporal, sexo e GFAP no encéfalo de zebrafish expostos aos diferentes microplásticos (PE e PP), em diferentes concentrações e em diferentes intervalos de exposição.

A exposição por 96h aos microplásticos PE e PP afetou a distribuição espacial dos zebrafish, bem como seus comportamentos. A reação de alarme em resposta a um estímulo aversivo externo foi prejudicada após a exposição ao PP: maior permanência na superfície do aquário, de modo a revelar um comportamento ansiolítico. O estudo da distribuição espacial do tipo basal confirmou a resposta do tipo ansiolítica ao PP e revelou efeito contrário, isto é, ansiogênico após a exposição ao PE. O estudo comportamental corroborou o efeito ansiogênico do PE: maior latência para alcançar a superfície de um novo aquário. Além disso, ambos os microplásticos PE e PP induziram movimentos erráticos nos zebrafish. O estudo encefálico revelou que houve aumento da expressão de GFAP em astrócitos no tronco encefálico de zebrafish após oito dias de exposição ao PP.

Este volume de Dissertação de Mestrado apresenta somente o resumo dos principais resultados obtidos com este estudo. Para maiores detalhes, consultar a publicação em artigo científico, ou contatar o orientador deste estudo via e-mail: Prof. Dr. Thiago B. Kirsten, thiago.kirsten@docente.unip.br ou thik@outlook.com

5. DISCUSSÃO

Este volume de Dissertação de Mestrado apresenta somente as conclusões do trabalho, sem sua discussão. Para maiores detalhes, consultar a publicação em artigo científico, ou contatar o orientador deste estudo via e-mail: Prof. Dr. Thiago B. Kirsten, thiago.kirsten@docente.unip.br ou thik@outlook.com

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição por 96h aos microplásticos PE e PP afetou a distribuição espacial diária dos zebrafish nos aquários, bem como seus comportamentos. Especificamente, a reação de alarme em resposta a um estímulo aversivo externo foi prejudicada após a exposição ao PP, observado pela maior permanência na superfície do aquário, de modo a revelar um comportamento ansiolítico. O estudo da distribuição espacial do tipo basal confirmou a resposta do tipo ansiolítica nos zebrafish expostos ao PP e revelou efeito contrário, isto é, ansiogênico após a exposição ao PE. O estudo comportamental corroborou o efeito ansiogênico do PE, demonstrado pela maior latência para alcançar pela primeira vez a superfície do novo aquário. Além disso, ambos os microplásticos PE e PP induziram movimentos erráticos nos zebrafish, também vinculados a modulações na ansiedade. O estudo encefálico revelou que houve aumento da expressão de GFAP em astrócitos no tronco encefálico de zebrafish após oito dias de exposição ao PP. Concluindo, as exposições aos microplásticos PE e PP modularam o comportamento tipo-ansiedade dos zebrafish, associado a processo neuroinflamatório. O presente estudo propõe um novo modelo experimental para estudar os efeitos da exposição a diferentes tipos de microplástico em parâmetros comportamentais e encefálicos de zebrafish.

REFERÊNCIAS

ALI, M. U.; LIN, S.; YOUSAF, B.; ABBAS, Q.; MUNIR, M. A. M.; ALI, M. U.; RASIHD, A.; ZHENG, C.; KUANG, X.; WONG, M. H. Environmental emission, fate and transformation of microplastics in biotic and abiotic compartments: Global status, recent advances and future perspectives. **Science of the Total Environment**, v. 791, n., p. 148422, 2021.

AMATO-LOURENCO, L. F.; CARVALHO-OLIVEIRA, R.; JUNIOR, G. R.; DOS SANTOS GALVAO, L.; ANDO, R. A.; MAUAD, T. Presence of airborne microplastics in human lung tissue. **Journal of Hazardous Materials**, v. 416, n., p. 126124, 2021.

ARAUJO, A.; ROCHA, T. L.; DM, E. S.; MALAFAIA, G. Micro(nano)plastics as an emerging risk factor to the health of amphibian: A scientometric and systematic review. **Chemosphere**, v. 283, n., p. 131090, 2021.

ARJMAND, B.; TAYANLOO-BEIK, A.; FOROUGHI HERAVANI, N.; ALAEI, S.; PAYAB, M.; ALAVI-MOGHADAM, S.; GOODARZI, P.; GHOLAMI, M.; LARIJANI, B. Zebrafish for Personalized Regenerative Medicine; A More Predictive Humanized Model of Endocrine Disease. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 11, n., p. 396, 2020.

ASNANI, A.; PETERSON, R. T. The zebrafish as a tool to identify novel therapies for human cardiovascular disease. **Dis Model Mech**, v. 7, n. 7, p. 763-767, 2014.

BAILEY, J.; OLIVERI, A.; LEVIN, E. D. Zebrafish model systems for developmental neurobehavioral toxicology. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v. 99, n. 1, p. 14-23, 2013.

BAMBINO, K.; CHU, J. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 124, n., p. 331-367, 2017.

BESSELING, E.; WEGNER, A.; FOEKEMA, E. M.; VAN DEN HEUVEL-GREVE, M. J.; KOELMANS, A. A. Effects of microplastic on fitness and PCB bioaccumulation by the lugworm *Arenicola marina* (L.). **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 1, p. 593-600, 2013.

BROWNE, M. A.; GALLOWAY, T.; THOMPSON, R. Microplastic--an emerging contaminant of potential concern? **Integr Environ Assess Manag**, v. 3, n. 4, p. 559-561, 2007.

CAMPANALE, C.; MASSARELLI, C.; SAVINO, I.; LOCAPUTO, V.; URICCHIO, V. F. A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. **Int J Environ Res Public Health**, v. 17, n. 4, p., 2020.

CHAE, Y.; AN, Y. J. Effects of micro- and nanoplastics on aquatic ecosystems: Current research trends and perspectives. **Marine Pollution Bulletin**, v. 124, n. 2, p. 624-632, 2017.

CHAMAS, A.; MOON, H.; ZHENG, J.; QIU, Y.; TABASSUM, T.; JANG, J. H.; ABU-OMAR, M.; SCOTT, S. L.; SUH, S. Degradation Rates of Plastics in the Environment. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering** v. 8, n. 9, p. 3494–3511, 2020.

CHICO, T. J.; INGHAM, P. W.; CROSSMAN, D. C. Modeling cardiovascular disease in the zebrafish. **Trends Cardiovasc Med**, v. 18, n. 4, p. 150-155, 2008.

COLE, M.; LINDEQUE, P.; FILEMAN, E.; HALSBAND, C.; GALLOWAY, T. S. The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 2, p. 1130-1137, 2015.

DAMMSKI, A. P.; MÜLLER, B. R.; GAYA, C.; REGONATO, D. **Zebrafish: Manual de Criação em Biotério** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2011. 107 p.

DE ESCH, C.; SLIEKER, R.; WOLTERBEEK, A.; WOUTERSEN, R.; DE GROOT, D. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: a mini review. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 34, n. 6, p. 545-553, 2012.

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

EISSA, B. L.; OSSANA, N. A.; FERRARI, L.; SALIBIAN, A. Quantitative behavioral parameters as toxicity biomarkers: fish responses to waterborne cadmium. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, n. 4, p. 1032-1039, 2010.

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

FONSEKA, T. M.; WEN, X. Y.; FOSTER, J. A.; KENNEDY, S. H. Zebrafish models of major depressive disorders. **Journal of Neuroscience Research**, v. 94, n. 1, p. 3-14, 2016.

GALLAGHER, A.; REES, A.; ROWE, R.; STEVENS, J.; WRIGHT, P. Microplastics in the Solent estuarine complex, UK: An initial assessment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 102, n. 2, p. 243-249, 2016.

GARCIA, A. G.; SUAREZ, D. C.; LI, J.; ROTCHELL, J. M. A comparison of microplastic contamination in freshwater fish from natural and farmed sources. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 28, n. 12, p. 14488-14497, 2021.

GERHARD, G. S. Small laboratory fish as models for aging research. **Ageing Research Reviews**, v. 6, n. 1, p. 64-72, 2007.

GERLAI, R.; LAHAV, M.; GUO, S.; ROSENTHAL, A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67, n. 4, p. 773-782, 2000.

GERLAI, R. Zebra fish: an uncharted behavior genetic model. **Behavior Genetics**, v. 33, n. 5, p. 461-468, 2003.

GIACOMINI, A.; ABREU, M. S.; GIACOMINI, L. V.; SIEBEL, A. M.; ZIMERMAN, F. F.; RAMBO, C. L.; MOCELIN, R.; BONAN, C. D.; PIATO, A. L.; BARCELLOS, L. J. G. Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 296, n., p. 301-310, 2016.

GOESSLING, W.; NORTH, T. E. Repairing quite swimmingly: advances in regenerative medicine using zebrafish. **Dis Model Mech**, v. 7, n. 7, p. 769-776, 2014.

HARTMANN, N. B.; HUFFER, T.; THOMPSON, R. C.; HASSELLOV, M.; VERSCHOOR, A.; DAUGAARD, A. E.; RIST, S.; KARLSSON, T.; BRENNHOLT, N.; COLE, M.; HERRLING, M. P.; HESS, M. C.; IVLEVA, N. P.; LUSHER, A. L.; WAGNER, M. Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 3, p. 1039-1047, 2019.

HENDRICKSON, E.; MINOR, E. C.; SCHREINER, K. Microplastic Abundance and Composition in Western Lake Superior As Determined via Microscopy, Pyr-GC/MS, and FTIR. **Environmental Science & Technology**, v. 52, n. 4, p. 1787-1796, 2018.

HILL, A. J.; TERAOKA, H.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R. E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 6-19, 2005.

IJAZ, S.; HOFFMAN, E. J. Zebrafish: A Translational Model System for Studying Neuropsychiatric Disorders. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 55, n. 9, p. 746-748, 2016.

KALUEFF, A. V.; GEBHARDT, M.; STEWART, A. M.; CACHAT, J. M.; BRIMMER, M.; CHAWLA, J. S.; CRADDOCK, C.; KYZAR, E. J.; ROTH, A.; LANDSMAN, S.; GAIKWAD, S.; ROBINSON, K.; BAATRUP, E.; TIERNEY, K.; SHAMCHUK, A.; NORTON, W.; MILLER, N.; NICOLSON, T.; BRAUBACH, O.; GILMAN, C. P.; PITTMAN, J.; ROSEMBERG, D. B.; GERLAI, R.; ECHEVARRIA, D.; LAMB, E.; NEUHAUSS, S. C.; WENG, W.; BALLY-CUIF, L.; SCHNEIDER, H. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70-86, 2013.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 63-75, 2014.

KHAN, F. R.; SHASHOUA, Y.; CRAWFORD, A.; DRURY, A.; SHEPPARD, K.; STEWART, K.; SCULTHORP, T. 'The Plastic Nile': First Evidence of Microplastic Contamination in Fish from the Nile River (Cairo, Egypt). **Toxics**, v. 8, n. 2, p., 2020.

KOSSACK, M. E.; DRAPER, B. W. Genetic regulation of sex determination and maintenance in zebrafish (*Danio rerio*). **Current Topics in Developmental Biology**, v. 134, n., p. 119-149, 2019.

LEE, J.; FREEMAN, J. L. Zebrafish as a model for investigating developmental lead (Pb) neurotoxicity as a risk factor in adult neurodegenerative disease: a mini-review. **Neurotoxicology**, v. 43, n., p. 57-64, 2014.

LEI, L.; WU, S.; LU, S.; LIU, M.; SONG, Y.; FU, Z.; SHI, H.; RALEY-SUSMAN, K. M.; HE, D. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. **Science of the Total Environment**, v. 619-620, n., p. 1-8, 2018.

LEME, E.; SILVA, E. P.; RODRIGUES, P. S.; SILVA, I. R.; MARTINS, M. F. M.; BONDAN, E. F.; BERNARDI, M. M.; KIRSTEN, T. B. Billings reservoir water used for human consumption presents microbiological contaminants and induces both behavior impairments and astrogliosis in zebrafish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, n., p. 364-373, 2018.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 5, p. 353-367, 2007.

LUCENA, C. A. S.; CALEGARI, B. B.; PEREIRA, E. H. L.; DALLEGRAVE, E. O uso de óleo de cravo na eutanásia de peixes. **Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia**, v. 105, n., p. 20-24, 2013.

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

MAASWINKEL, H.; ZHU, L.; WENG, W. Using an automated 3D-tracking system to record individual and shoals of adult zebrafish. **J Vis Exp**, v., n. 82, p. 50681, 2013.

MENKE, A. L.; SPITSBERGEN, J. M.; WOLTERBEEK, A. P.; WOUTERSEN, R. A. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. **Toxicologic Pathology**, v. 39, n. 5, p. 759-775, 2011.

OLIVATTO, G. P.; CARREIRA, R.; TORNISIELO, V. L.; MONTAGNER, C. C. Microplastics: Contaminants of Global Concern in the Anthropocene. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 6, p. 1968-1989, 2018.

PARICHY, D. M.; ELIZONDO, M. R.; MILLS, M. G.; GORDON, T. N.; ENGESZER, R. E. Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. **Developmental Dynamics**, v. 238, n. 12, p. 2975-3015, 2009.

PAULL, G. C.; FILBY, A. L.; GIDDINS, H. G.; COE, T. S.; HAMILTON, P. B.; TYLER, C. R. Dominance hierarchies in zebrafish (*Danio rerio*) and their relationship with reproductive success. **Zebrafish**, v. 7, n. 1, p. 109-117, 2010.

PEDA, C.; CACCAMO, L.; FOSSI, M. C.; GAI, F.; ANDALORO, F.; GENOVESE, L.; PERDICHIZZI, A.; ROMEO, T.; MARICCHIOLO, G. Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: Preliminary results. **Environmental Pollution**, v. 212, n., p. 251-256, 2016.

PRATA, J. C.; DA COSTA, J. P.; LOPES, I.; DUARTE, A. C.; ROCHA-SANTOS, T. Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. **Science of the Total Environment**, v. 702, n., p. 134455, 2020.

PROVENCHER, J. F.; BOND, A. L.; HEDD, A.; MONTEVECCHI, W. A.; MUZAFFAR, S. B.; COURCHESNE, S. J.; GILCHRIST, H. G.; JAMIESON, S. E.; MERKEL, F. R.; FALK, K.; DURINCK, J.; MALLORY, M. L. Prevalence of marine debris in marine birds from the North Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, v. 84, n. 1-2, p. 411-417, 2014.

RICE, N.; HIRAMA, S.; WITHERINGTON, B. High frequency of micro- and meso-plastics ingestion in a sample of neonate sea turtles from a major rookery. **Marine Pollution Bulletin**, v. 167, n., p. 112363, 2021.

ROCH, S.; FRIEDRICH, C.; BRINKER, A. Uptake routes of microplastics in fishes: practical and theoretical approaches to test existing theories. **Sci Rep**, v. 10, n. 1, p. 3896, 2020.

ROCHMAN, C. M.; TAHIR, A.; WILLIAMS, S. L.; BAXA, D. V.; LAM, R.; MILLER, J. T.; TEH, F. C.; WERORILANGI, S.; TEH, S. J. Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. **Sci Rep**, v. 5, n., p. 14340, 2015.

ROCHMAN, C. M.; BROOKSON, C.; BIKKER, J.; DJURIC, N.; EARN, A.; BUCCI, K.; ATHEY, S.; HUNTINGTON, A.; MCILWRAITH, H.; MUNNO, K.; DE FROND, H.; KOLOMIJECA, A.; ERDLE, L.; GRBIC, J.; BAYOUMI, M.; BORRELLE, S. B.; WU, T.; SANTORO, S.; WERBOWSKI, L. M.; ZHU, X.; GILES, R. K.; HAMILTON, B. M.; THAYSEN, C.; KAURA, A.; KLASIOS, N.; EAD, L.; KIM, J.; SHERLOCK, C.; HO, A.; HUNG, C. Rethinking microplastics as a diverse contaminant suite. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 703-711, 2019.

ROY, P. K.; HAKKARAINEN, M.; VARMA, I. K.; ALBERTSSON, A. C. Degradable polyethylene: fantasy or reality. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 10, p. 4217-4227, 2011.

SCHMID, C.; COZZARINI, L.; ZAMBELLO, E. Microplastic's story. **Marine Pollution Bulletin**, v. 162, n., p. 111820, 2021.

SHARIFINIA, M.; BAHMANBEIGLOO, Z. A.; KESHAVARZIFARD, M.; KHANJANI, M. H.; LYONS, B. P. Microplastic pollution as a grand challenge in marine research: A closer look at their adverse impacts on the immune and reproductive systems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 204, n., p. 111109, 2020.

SMITH, M.; LOVE, D. C.; ROCHMAN, C. M.; NEFF, R. A. Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health. **Curr Environ Health Rep**, v. 5, n. 3, p. 375-386, 2018.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 7-35, 2010.

SPENCE, R.; FATEMA, M. K.; REICHARD, M.; HUQ, K. A.; WAHAB, M.; AHMED, Z.; SMITH, C. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. **Journal of Fish Biology**, v. 69, n., p. 1435-1448, 2006.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 83, n. 1, p. 13-34, 2008.

STANTON, T.; JOHNSON, M.; NATHANAIL, P.; MACNAUGHTAN, W.; GOMES, R. L. Freshwater microplastic concentrations vary through both space and time. **Environmental Pollution**, v. 263, n. Pt B, p. 114481, 2020.

TERAOKA, H.; DONG, W.; HIRAGA, T. Zebrafish as a novel experimental model for developmental toxicology. **Congenit Anom (Kyoto)**, v. 43, n. 2, p. 123-132, 2003.

THOMPSON, R. C.; OLSEN, Y.; MITCHELL, R. P.; DAVIS, A.; ROWLAND, S. J.; JOHN, A. W.; MCGONIGLE, D.; RUSSELL, A. E. Lost at sea: where is all the plastic? **Science**, v. 304, n. 5672, p. 838, 2004.

UMAMAHESWARI, S.; PRIYADARSHINEE, S.; BHATTACHARJEE, M.; KADIRVELU, K.; RAMESH, M. Exposure to polystyrene microplastics induced gene modulated biological responses in zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 281, n., p. 128592, 2021.

VON MOOS, N.; BURKHARDT-HOLM, P.; KOHLER, A. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 20, p. 11327-11335, 2012.

WATTS, S. A.; LAWRENCE, C.; POWELL, M.; D'ABRAMO, L. R. The Vital Relationship Between Nutrition and Health in Zebrafish. **Zebrafish**, v. 13 Suppl 1, n., p. S72-76, 2016.

WRIGHT, S. L.; THOMPSON, R. C.; GALLOWAY, T. S. The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. **Environmental Pollution**, v. 178, n., p. 483-492, 2013.

ZANTIS, L. J.; CARROLL, E. L.; NELMS, S. E.; BOSKER, T. Marine mammals and microplastics: A systematic review and call for standardisation. **Environmental Pollution**, v. 269, n., p. 116142, 2021.

ZETTLER, E. R.; MINCER, T. J.; AMARAL-ZETTLER, L. A. Life in the "plastisphere": microbial communities on plastic marine debris. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 13, p. 7137-7146, 2013.

ZHANG, C.; WANG, J.; ZHANG, S.; ZHU, L.; DU, Z.; WANG, J. Acute and subchronic toxicity of pyraclostrobin in zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 188, n., p. 510-516, 2017.

ANEXOS

Anexo 1 – Certificado de aprovação do Projeto junto a CEUA/UNIP



Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudos do microplástico em modelo experimental de zebrafish: comportamento, encéfalo, brânquias e sistema digestório", protocolada sob o CEUA nº 4386210222 (ID 000769), sob a responsabilidade de **Thiago Berti Kirsten e equipe; Alex Luciano Fernandes; Welber Senteio Smith** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (CEUA/UNIP) na reunião de 09/03/2022.

We certify that the proposal "Microplastic studies in an experimental zebrafish model: behavior, brain, gills, and digestive system", utilizing 70 Fishes (males and females), protocol number CEUA 4386210222 (ID 000769), under the responsibility of **Thiago Berti Kirsten and team; Alex Luciano Fernandes; Welber Senteio Smith** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Paulista University (CEUA/UNIP) in the meeting of 03/09/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [04/2022](#) a [04/2024](#) Área: [Patologia Ambiental E Experimental](#)

Origem: [Animais provenientes de estabelecimentos comerciais](#)

Espécie: [Peixes](#) sexo: [Machos e Fêmeas](#) idade: [3 a 4 meses](#) N: [70](#)

Linhagem: [zebrafish \(Danio rerio\)](#) Peso: [02 a 08 g](#)

Local do experimento: Laboratório de criação e experimentação de Peixes, Biotério do Centro de Pesquisa da Universidade Paulista

São Paulo, 10 de março de 2022

Profa. Dra. Maria Martha Bernardi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista

Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista

Anexo 3 – Certificado de qualidade, características e procedência dos plásticos



Folha de Dados

26/12/2018

Polietileno de Baixa Densidade EB853/72

Descrição:

O EB853/72 é uma resina PEBD. Apresenta como características de destaque: boa processabilidade e excelentes propriedades óticas nos filmes obtidos.

Aditivação:

Deslizante, Antibloqueio.

Aplicações:

Empacotamento automático, Filmes de alta transparência

Processos:

Extrusão de Filmes Tubulares

Propriedades de Controle:

Característica	Método	Unidades	Valores
Índice de fluidez (190°C/2,16kg)	D 1238	g/10min	2.7
Densidade	D 1505	g/cm ³	0.923

Propriedades Típicas - Filmes:

Propriedades referência ao filme soprado (a)

Característica	Método	Unidades	Valores
Tensão de Ruptura (DM/DT)	D 882	MPa	25/20
Alongamento na Ruptura (DM/DT)	D 882	%	350/1050
Módulo Secante a 1% (DM/DT)	D 882	MPa	145/150
Resistência ao Impacto por Queda de Dardo	D 1709	g/F50	80
Resistência ao Rasgo Elmendorf (DM/DT)	D 1922	gF	580/210
Opacidade	D 1003	%	7
Brilho - Ângulo 60°	D 2457	%	75

(a) Filme de 40 µm de espessura, obtido em extrusora de 75 mm, com razão de sopro de 2,2:1 (DM = Direção de Extrusão e DT=Direção Transversal à Extrusão);

Observações Finais:

1. As informações aqui contidas são dadas de boa fé, indicando valores típicos obtidos em nossos laboratórios, não devendo ser consideradas como absolutas ou como garantia. Apenas as propriedades e os valores que constam no Certificado de Qualidade devem ser considerados como garantia do produto.
2. Para informações regulatórias do produto, consulte o Documento Regulatório ou entre em contato com a área de Serviços Técnicos.
3. Para informações de segurança, manuseio, proteção individual, primeiros socorros e disposição de resíduos, consultar FISPQ - Ficha de Informações de Segurança do Produto Químico.
4. Os valores constantes nesse documento poderão sofrer alterações sem comunicação prévia da Braskem.



MAIS POLIMEROS DO BRASIL LTDA
RUA SERRA NEGRA - A PRQ EMPRESA
292
CEP: 07753-060
CAJAMAR
SP - BR

Certificado de Qualidade

Número do Certificado
0170390/2022
Data de emissão
24.02.2022
Item de pedido/data
190003/0004 / 18.02.2022
Item de remessa/data
807107470 900005 / 28.02.2022
Item de ordem/data
51781874 000011 / 18.02.2022
Código do cliente
1000010466
Nota Fiscal
000769150-1
Placa Veiculo/Navio

Material - Descrição
EB853/72-POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE

Lote (batch): RSABLB067E / Data de Validade: 19.02.2024
Quantidade: 19,250 TO / Data de Fabricação: 19.02.2022

Propriedade	Unidade	Resultado	Valor Mínimo	Valor Máximo	Método de Referência
IF (190°C/2,16kg)	g/10'	2,7	2,4	3,0	ASTM D 1238
Densidade	g/cm3	0,923	0,921	0,925	ASTM D 1505

Confirmamos o fornecimento conforme acordado quando da aceitação do pedido.

Responsável Técnico: Rosele Botelho Coelho
CRQ n° 05202328 / 5ª Região

Em caso de dúvidas sobre nossos produtos contate-nos pelo e-mail pp-pe@braskem.com.br.

Este certificado é impresso eletronicamente e é válido sem assinatura



Polipropileno PH 0952

Descrição:

Homopolímero

O PH 0952 é uma resina de polipropileno com médio índice de fluidez, aditivada com agente deslizante e antibloqueio. Este produto é indicado para filmes técnicos e embalagens em geral obtidas por extrusão tubular e plana. Apresenta excelentes propriedades óticas e boa processabilidade.

Aplicações:

Filme muito fino em linha de alta velocidade, de baixo calibre, Embalagens para Alimentos, Filme para laminação, Bobina Técnica para Empacotamento Automático, Aplicações Têxteis

Processos:

Extrusão de Filmes Planos, Extrusão de Filmes Tubulares

Propriedades de Controle

Característica	Método	Unidades	Valores
Índice de Fluidez (230°C/2,16kg)	D 1238	g/10 min	8.0

Propriedades Típicas^a

Característica	Método	Unidades	Valores
Densidade	D 792	g/cm ³	0.905
Módulo de Flexão Secante a 1%	D 790	MPa	1200
Resistência à Tração no Escoamento	D 638	MPa	35
Alongamento no Escoamento	D 638	%	11
Dureza Rockwell (Escala R)	D 785	-	90
Resistência ao Impacto Izod a 23°C	D 256	J/m	30
Temperatura de Deflexão Térmica a 0,455 MPa	D 648	°C	95
Temperatura de Deflexão Térmica a 1,820 MPa	D 648	°C	55
Temperatura de Amolecimento Vicat a 10 N	D 1525	°C	149

a) Ensaios em corpo de prova moldado por injeção conforme ASTM D 4101. NB = No Break.

Propriedades de Filmes

Característica	Método	Unidades	Valores
Módulo Secante a 1% (DM/DT)	D 882	MPa	600/620
Resistência à Tração no Escoamento (DM/DT)	D 882	MPa	23/23
Alongamento no Escoamento (DM/DT)	D 882	%	11/10
Opacidade	D 1003	%	2.5
Brilho 45°	D 2457	-	93
Temperatura Inicial de Selagem	Método Braskem	°C	115

3) Filme de 30 µm de espessura, obtido em extrusora tubular de 50 mm e razão de sopro de 1,3:1 (DM=Direção de extrusão e DT=Direção Transversal à Extrusão)

Observações Finais

- As informações aqui contidas são dadas de boa fé, indicando valores típicos obtidos em nossos laboratórios, não devendo ser consideradas como absolutas ou como garantia. Apenas as propriedades e os valores que constam do certificado de qualidade devem ser considerados como garantia do produto.
- Em algumas aplicações a Braskem tem desenvolvido resinas tailor-made para alcançar características específicas.
- Em caso de dúvida na utilização ou para discutir outras aplicações, entre em contato com a Área de Serviços Técnicos.
- Para informações de segurança, manuseio, proteção individual, primeiros socorros e disposição de resíduos, consultar a FISPQ - Folha de Informações de Segurança de Produtos Químicos.
- Para informações regulatórias do produto, consulte o Documento Regulatório ou entre em contato com a Área de Serviços Técnicos.
- Os valores constantes nesse documento poderão sofrer alterações sem comunicação prévia da Braskem.



MAIS POLIMEROS DO BRASIL LTDA
RUA SERRA NEGRA - A PRQ EMPRESA
292
CEP: 07753-060
CAJAMAR
SP - BR

Certificado de Qualidade

Número do Certificado
0228749/2022
Data de emissão
16.03.2022
Item de pedido/data
190010/0023 / 04.03.2022
Item de remessa/data
807161395 900001 / 16.03.2022
Item de ordem/data
51812581 000011 / 04.03.2022
Código do Cliente
1000010466
Nota Fiscal
000405956-1
Placa Veiculo/Navio

Material - Descrição
PH 0952-POLIPROPILENO HOMOPOLÍMERO

Lote (batch): RJIALB042E / Data de Validade: 03.03.2024
Quantidade: 24,750 TO / Data de Fabricação: 04.03.2022

Propriedade	Unidade	Resultado	Valor Mínimo	Valor Máximo	Método de Referência
IF (230°C/2,16kg)	g/10'	8,8	7,0	9,0	ASTM D 1238

Confirmamos o fornecimento conforme acordado quando da aceitação do pedido.

Responsável Técnico: Claudio Cezar de Queiroz
CRQ nº 03212829 / 3ª Região

Este certificado é impresso eletronicamente e é válido sem assinatura

Anexo 4 – Atestado de procedência e saúde dos peixes

ATESTADO DE SAÚDE

Eu, Pedro Henrique Magalhães Cardoso, Médico-Veterinário, Responsável-Técnico, certifico que os animais constantes no presente atestado, comercializados pela empresa **KIUSLEI CASSIOLATO PEIXES ME (Ipiranga Peixes)**, localizada à Rua Rua 1822, Nº 1097 - Ipiranga - São Paulo - Cep 04216-001 São Paulo SP- Brasil , CNPJ 05.459.840/0001-30, são adquiridos do fornecedor **SHIGUEMI JINGUJI MICHITA**, Sítio Michita, Bairro Itimirim, Iguape – Cep: 11.920-000, CNPJ: **43.299.025/0001-40**.

Ao chegar na empresa, os animais foram identificados, descritos e examinados por mim e estavam clinicamente sadios, isentos de ectoparasitas à inspeção clínica e aptos a serem transportados nas condições adequadas de temperatura, oxigenação e tempo o mais curto possível para que haja o mínimo de estresse possível de modo que seja obedecido dos preceitos do bem estar animal.

Quantidade	Descrição	Nome Científico
120	Zebra Fish – Paulistinha (Animais adultos – 3 a 4 meses de vida)	<i>Danio rerio</i>

Observação:

Antes da soltura, verifique como está a qualidade de água do aquário em que serão soltos os animais. Para que estes fiquem confortáveis é de extrema importância que os parâmetros da água estejam dentro dos padrões regulares das espécies em questão.

São Paulo, 21 de setembro de 2022

05.459.840/0001-30
**KIUSLEI CASSIOLATO
 PEIXES - ME**
 R. Mil Oitocentos e Vinte e Dois, 1097
 Ipiranga - CEP 04216-001
 São Paulo - SP

Médico Veterinário:

Pedro H. M. Cardoso
 Médico Veterinário
 CRMV/SP 25.984
 pedrohenriquevetvet@usp.br

Anexo 5 – Dados estatísticos suplementares das análises multivariadas realizadas para a distribuição espacial diária dos peixes

Cálculo feito com o pacote estatístico MVSP

Dados da reação de alarme

CLUSTER ANALYSIS				
Imported data				
Analysis begun: sexta-feira, 11 de novembro de 2022 19:01:52				
Analysing 4 variables x 27 cases				
UPGMA				
Euclidean				
				Objects
Node	Group 1	Group 2	Dissimil.	in group
1	PP3.AR.I (2)	CON.AR.B (3)	0	2
2	Node 1	PE1.AR.B (3)	0	3
3	Node 2	PE2.AR.B (3)	0	4
4	Node 3	PE3.AR.B (3)	0	5
5	Node 4	PE4.AR.B (3)	0	6
6	Node 5	PP1.AR.B (3)	0	7
7	Node 6	PP2.AR.B (3)	0	8
8	Node 7	PP3.AR.B (3)	0	9
9	Node 8	PP4.AR.B (3)	0	10
10	CON.AR.S (1)	PE1.AR.S (1)	1	2
11	PP2.AR.S (1)	PP3.AR.S (1)	1	2
12	CON.AR.I (2)	PE1.AR.I (2)	1	2
13	PP2.AR.I (2)	Node 9	1	11
14	PE4.AR.S (1)	PP1.AR.S (1)	1.732	2
15	PE4.AR.I (2)	PP1.AR.I (2)	1.732	2
16	Node 11	PP4.AR.S (1)	1.825	3
17	Node 13	PP4.AR.I (2)	2.161	12
18	Node 14	Node 16	3.66	5
19	Node 15	Node 17	4.381	14
20	Node 10	PE2.AR.S (1)	5.05	3
21	Node 12	PE2.AR.I (2)	5.05	3
22	Node 20	Node 18	8.178	8
23	PE3.AR.S (1)	Node 19	8.58	15
24	Node 23	Node 21	9.842	18
25	Node 22	PE3.AR.I (2)	10.026	9
26	Node 25	Node 24	16.736	27

PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS			
Imported data			
Analysis begun: sexta-feira, 11 de novembro de 2022 19:01:22			
Analysing 4 variables x 27 cases			
Tolerance of eigenanalysis set at 1E-007			
Eigenvalues			
		Axis 1	Axis 2
Eigenvalues		59.142	14.462
Percentage		76.654	18.744
Cum. Percentage		76.654	95.399
PCA variable loadings			
		Axis 1	Axis 2
T-3		0.263	-0.958
T-2		0.553	0.065
T-1		0.512	0.219
T		0.602	0.173
PCA case scores			
	Groups	Axis 1	Axis 2
CON.AR.S	1	1.908	1.18
PE1.AR.S	1	1.807	1.137
PE2.AR.S	1	1.365	1.117
PE3.AR.S	1	-0.133	0.71
PE4.AR.S	1	2.109	0.04
PP1.AR.S	1	2.266	0.284
PP2.AR.S	1	2.472	-0.468
PP3.AR.S	1	2.524	-0.656
PP4.AR.S	1	2.32	-0.323
CON.AR.I	2	-0.646	-1.508
PE1.AR.I	2	-0.545	-1.465
PE2.AR.I	2	-0.103	-1.445
PE3.AR.I	2	1.395	-1.038
PE4.AR.I	2	-0.847	-0.368
PP1.AR.I	2	-1.004	-0.612
PP2.AR.I	2	-1.21	0.14
PP3.AR.I	2	-1.262	0.328
PP4.AR.I	2	-1.058	-0.005
CON.AR.B	3	-1.262	0.328
PE1.AR.B	3	-1.262	0.328
PE2.AR.B	3	-1.262	0.328
PE3.AR.B	3	-1.262	0.328
PE4.AR.B	3	-1.262	0.328
PP1.AR.B	3	-1.262	0.328
PP2.AR.B	3	-1.262	0.328
PP3.AR.B	3	-1.262	0.328
PP4.AR.B	3	-1.262	0.328

Dados da distribuição do tipo basal

CLUSTER ANALYSIS				
Imported data				
Analysis begun: sexta-feira, 11 de novembro de 2022 19:11:39				
Analysing 4 variables x 27 cases				
UPGMA				
Euclidean				
				Objects
Node	Group 1	Group 2	Dissimil.	in group
1	CON.BB.B (3)	PP1.BB.B (3)	0	2
2	Node 1	PP3.BB.B (3)	0	3
3	PE4.BB.B (3)	PP2.BB.B (3)	0	2
4	Node 2	PP4.BB.B (3)	1	4
5	CON.BB.S (1)	PE1.BB.S (1)	2	2
6	PP2.BB.I (2)	PP4.BB.I (2)	2	2
7	PE1.BB.B (3)	PE3.BB.B (3)	2	2
8	Node 4	Node 3	2.059	6
9	PE2.BB.S (1)	PE4.BB.S (1)	2.828	2
10	Node 5	Node 9	2.96	4
11	PE2.BB.I (2)	PE4.BB.I (2)	3	2
12	PP1.BB.I (2)	PE2.BB.B (3)	3	2
13	PP1.BB.S (1)	PP2.BB.S (1)	3.162	2
14	PE1.BB.I (2)	Node 6	3.384	3
15	Node 13	PP4.BB.S (1)	3.461	3
16	Node 14	PP3.BB.I (2)	4.241	4
17	Node 12	Node 7	4.407	4
18	Node 15	PE3.BB.I (2)	5.02	4
19	Node 16	Node 11	5.112	6
20	Node 10	Node 18	5.596	8
21	PE3.BB.S (1)	Node 19	6.089	7
22	Node 17	Node 8	6.369	10
23	Node 20	Node 21	6.501	15
24	PP3.BB.S (1)	CON.BB.I (2)	6.708	2
25	Node 23	Node 24	8.638	17
26	Node 25	Node 22	9.643	27

PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS			
Imported data			
Analysis begun: sexta-feira, 11 de novembro de 2022 19:10:15			
Analysing 4 variables x 27 cases			
Tolerance of eigenanalysis set at 1E-007			
Eigenvalues		Axis 1	Axis 2
Eigenvalues		22.753	9.346
Percentage		64.866	26.644
Cum. Percentage		64.866	91.509
PCA variable loadings		Axis 1	Axis 2
T-3		0.224	-0.974
T-2		0.55	0.089
T-1		0.546	0.141
T		0.592	0.156
PCA case scores			
	Groups	Axis 1	Axis 2
CON.BB.S	1	0.521	0.793
PE1.BB.S	1	0.753	0.854
PE2.BB.S	1	0.619	0.818
PE3.BB.S	1	-0.123	0.648
PE4.BB.S	1	0.939	0.497
PP1.BB.S	1	1.51	0.007
PP2.BB.S	1	0.912	0.064
PP3.BB.S	1	1.81	-0.713
PP4.BB.S	1	1.043	-0.499
CON.BB.I	2	0.728	-1.178
PE1.BB.I	2	0.101	0.48
PE2.BB.I	2	0.196	-0.303
PE3.BB.I	2	1.065	0.304
PE4.BB.I	2	0.222	-0.5
PP1.BB.I	2	-0.261	-0.391
PP2.BB.I	2	0.249	-0.067
PP3.BB.I	2	-0.561	0.329
PP4.BB.I	2	0.09	0.083
CON.BB.B	3	-1.249	0.385
PE1.BB.B	3	-0.854	-1.334
PE2.BB.B	3	-0.816	-0.515
PE3.BB.B	3	-0.942	-0.952
PE4.BB.B	3	-1.161	0.003
PP1.BB.B	3	-1.249	0.385
PP2.BB.B	3	-1.161	0.003
PP3.BB.B	3	-1.249	0.385
PP4.BB.B	3	-1.133	0.415