



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG

INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**USO DA QUITOSANA COMO ALTERNATIVA PARA MINIMIZAR OS
EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AOS MICROPLÁSTICOS NO CAMARÃO *Penaeus
vannamei*.**

BIÓLOGA CHAELEN RODRIGUES ORTIZ

RIO GRANDE-RS, 2023.

Universidade Federal do Rio Grande

Instituto de Oceanografia

Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

**USO DA QUITOSANA COMO ALTERNATIVA PARA MINIMIZAR OS
EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AOS MICROPLÁSTICOS NO CAMARÃO *Penaeus
vannamei*.**

BIÓLOGA CHAELEN RODRIGUES ORTIZ

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de Mestre
em Aquicultura no Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura da Universidade
Federal do Rio Grande - FURG.

Orientadora: Profa. Dra. Juliane Ventura Lima.

Coorientador: Prof. Dr. Wilson Wasielesky Jr.

Rio Grande - RS, 2023.

Ficha Catalográfica

O77u Ortiz, Chaelen Rodrigues.

Uso da quitosana como alternativa para minimizar os efeitos da exposição aos microplásticos no camarão *Penaeus vannamei* / Chaelen Rodrigues Ortiz. – 2023.

50 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Rio Grande/RS, 2023.

Orientadora: Dra. Juliane Ventura Lima.

Coorientador: Dr. Wilson Wasielesky Jr.

1. Crustáceo 2. Antioxidante 3. Micropartículas de poliestireno
4. Estresse oxidativo 5. Histopatologia I. Lima, Juliane Ventura
II. Wasielesky Jr., Wilson III. Título.

CDU 639.512

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344



ATA 11/2023

DE DEFESA DA 225ª DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AQUICULTURA

No dia 21 de julho de dois mil e vinte e três, às nove horas, reuniu-se a Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado em Aquicultura, da **CHAELEN RODRIGUES ORTIZ**, orientada pela Prof.^a Dr.^a Juliane Ventura Lima composta pelos seguintes membros: Prof.^a Dr.^a Juliane Ventura Lima (orientadora – ICB/FURG), Prof. Dr. José Maria Monserrat (ICB/FURG) e Prof. Dr. Kleber Campos Miranda Filho (UFMG). Título da dissertação: “**USO DA QUITOSANA COMO ALTERNATIVA PARA MINIMIZAR OS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AOS MICROPLÁSTICOS NO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei***”. Dando início à defesa, o Coordenador do PPGAq Prof. Dr. Ricardo Vieira Rodrigues, passou a presidência da sessão a Prof.^a Dr.^a Juliane Ventura Lima, que na qualidade de orientadora, passou a palavra para a candidata apresentar a Dissertação. Após ampla discussão entre os membros da Banca e a candidata, a Banca se reuniu sob a presidência do Coordenador. Durante esse encontro ficou estabelecido que as sugestões dos membros da Banca Examinadora devem ser incorporadas na versão final da dissertação, ficando a cargo do Orientador o cumprimento desta decisão. A candidata **CHAELEN RODRIGUES ORTIZ** foi considerada **APROVADO**, devendo a versão definitiva da Dissertação ser entregue a Secretaria do PPGAq, no prazo estabelecido nas Normas Complementares do Programa. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, será assinada pela Banca Examinadora, pelo candidato e pelo Coordenador do PPGAq.

gov.br Documento assinado digitalmente
JULIANE VENTURA LIMA
Data: 26/07/2023 20:56:02-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

PROF.^a DR.^a JULIANE VENTURA LIMA (ORIENTADORA – ICB/FURG)

gov.br Documento assinado digitalmente
JOSE MARIA MONSERRAT
Data: 21/06/2023 11:11:35-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

PROF. DR. JOSÉ MARIA MONSERRAT (ICB/FURG)

gov.br Documento assinado digitalmente
KLEBER CAMPOS MIRANDA FILHO
Data: 23/06/2023 16:57:32-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

PROF. DR. KLEBER CAMPOS MIRANDA FILHO (UFMG)

gov.br Documento assinado digitalmente
CHAELEN RODRIGUES ORTIZ
Data: 24/08/2023 15:23:15-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

CHAELEN RODRIGUES ORTIZ

gov.br Documento assinado digitalmente
RICARDO VIEIRA RODRIGUES
Data: 26/07/2023 17:00:40-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

PROF. DR. RICARDO VIEIRA RODRIGUES (Coordenador do PPGAq)

1	ÍNDICE	
2	AGRADECIMENTOS	0
3	LISTA DE TABELAS	0
4	LISTA DE FIGURAS	0
5	RESUMO	0
6	ABSTRACT	0
7	1. INTRODUÇÃO	1
8	2. OBJETIVOS	6
9	2.1. Geral	6
10	2.2. Específicos	6
11	(1) Avaliar se a exposição aos MP pode induzir a uma situação de estresse oxidativo em	
12	hepatopâncreas, brânquias e músculo de <i>P. vannamei</i>.	6
13	3. MATERIAL E MÉTODOS	7
14	3.1. Local de realização do experimento e material biológico	7
15	3.2. Delineamento experimental	7
16	3.3. Síntese e caracterização da quitosana	7
17	3.4. Formulação e preparo das dietas	8
18	3.6. Suplementação dos animais com a quitosana (experimento I)	9
19	3.6.1. Exposição aos microplásticos (experimento I)	9
20	3.7. Suplementação dos animais com a quitosana (experimento II)	10
21	3.7.1 Exposição aos microplásticos (experimento II)	10
22	3.8. Monitoramento da qualidade da água	11
23	3.9. Desempenho zootécnico	11
24	3.10. Análises bioquímicas	12
25	3.10.3. Atividade da glutathione-S-transferase (GST)	12
26	3.10.4. Níveis de glutathione reduzida (GSH)	13
27	3.10.5. Atividade da superóxido dismutase (SOD)	13
28	3.10.6. Níveis de lipídios peroxidados (TBARS)	13
29	3.11. Análises histológicas	13
30	3.12. Análise de acumulação dos microplásticos	14
31	3.13. Análise estatística	14
32	4.1. Qualidade de água	15
33	4.2. Desempenho zootécnico e composição proximal	15
34	4.3. Análises bioquímicas	16
35	4.3.1. Superóxido dismutase (SOD)	16
36	4.3.2. Catalase (CAT)	18
37	4.3.3. Glutathione reduzida (GSH)	19

1	4.3.4. Glutathione-S-transferase (GST).....	20
2	4.3.5. Peroxidação lipídica (TBARS)	21
3	4.4. Análise histológica	22
4	4.5. Análise de acumulação dos microplásticos.....	24
5	5. DISCUSSÃO	25
6	6. CONCLUSÕES	32
7	7. REFERÊNCIAS	34
8		
9		

DEDICATÓRIA

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

Dedico essa dissertação a toda minha família, em especial aos meus pais Nilson e Claudia e também a minha avó Loiracy por todo apoio, meus exemplos de força e coragem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todos os momentos em que me manteve firme e constante durante o mestrado.

Muito obrigada também a todos os professores, técnicos, funcionários e estagiários da Estação Marinha de Aquicultura (EMA), em especial ao grupo do projeto camarão que de alguma forma participaram e contribuíram durante esse processo importante na minha vida.

Aos meus orientadores Juliane e Wilson, meu muito obrigado por estarem sempre dispostos e me acompanharem ao longo dessa jornada, atentos e confiantes no trabalho. Vocês são exemplos de pesquisadores e tenho imensa satisfação de ter sido orientada por vocês. A Juliane, que continues sendo este ser humano incrível que és, da qual aprendi admirar.

Aos meus amigos da EMA, pelo acolhimento, companheirismo e carinho, sou muito grata por ter vivido momentos memoráveis e com vocês a vida acadêmica foi um pouco mais leve. Pessoas que me proporcionaram inúmeros momentos de descontração, suporte emocional e que dividiram comigo seu tempo, conhecimento, experiências, e auxílio nos experimentos.

Ao time de laboratório do Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Larissa, Gabriela, Marcelo, Eduarda e Lirii com certeza vocês também fazem parte dessa caminhada, o meu muito obrigada por toda ajuda, trocas, ensinamentos e paciência.

A minha família, que sempre me apoiou e acreditou em mim e nos meus sonhos, aos meus pais Nilson e Claudia, vocês foram minha base e força para perseverar na jornada, a minha irmã Sherolen e meu cunhado Aluan que mesmo de longe sempre torceram por mim e a minha afilhada Maressa que é o sol da minha vida a dinda te ama.

E por fim a CAPES, pela concessão da bolsa.

Muito obrigada!

1		
	LISTA DE TABELAS	
2	Tabela 1. Formulação da dieta basal.....	8
3	Tabela 2. Composição proximal das dietas.....	9
4	Tabela 3. Parâmetros de qualidade da água (média $\pm$ desvio padrão) do cultivo de <i>P.</i>	
5	<i>vannamei</i> durante 30 dias. Níveis de quitosana na dieta: 0 g kg ⁻¹ (C0), 1 g kg ⁻¹ (Q1), 3 g	
6	kg ⁻¹ (Q3).....	15
7	Tabela 4. Desempenho zootécnico e composição proximal (média $\pm$ desvio padrão) de	
8	juvenis de <i>P. vannamei</i> alimentados com dieta contendo diferentes níveis de quitosana	
9	durante 30 dias. Níveis de quitosana na dieta: 0 g kg ⁻¹ (C0), 1 g kg ⁻¹ (Q1), 3 g kg ⁻¹	
10	(Q3).....	16
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		

LISTA DE FIGURAS

1		
2	Figura 1. Fontes, distribuições e características de comportamento dos MP no ambiente	
3	de aquacultura.....	2
4	Figura 2. Estrutura molecular da quitosana.....	5
5	Figura 3. Atividade da SOD (média $\pm$ erro padrão) em brânquias (a), hepatopâncreas	
6	(b) e músculo (c) de juvenis de <i>P. vannamei</i> alimentados com dieta contendo diferentes	
7	níveis de quitosana durante 30 dias e após, serem expostos por 7 dias aos	
8	microplásticos.....	17
9	Figura 4. Atividade da CAT (média $\pm$ erro padrão) em brânquias (a), hepatopâncreas	
10	(b) e músculo (c) de juvenis de <i>P. vannamei</i> alimentados com dieta contendo diferentes	
11	níveis de quitosana durante 30 dias e após, serem expostos por 7 dias aos	
12	microplásticos.....	18
13	Figura 5. Concentração de GSH (média $\pm$ erro padrão) em brânquias (a),	
14	hepatopâncreas (b) e músculo (c) de juvenis de <i>P. vannamei</i> alimentados com dieta	
15	contendo diferentes níveis de quitosana durante 30 dias e após, serem expostos por 7	
16	dias aos microplásticos.....	19
17	Figura 6. Atividade da GST (média $\pm$ erro padrão) em brânquias (a), hepatopâncreas	
18	(b) e músculo (c) de juvenis de <i>P. vannamei</i> alimentados com dieta contendo diferentes	
19	níveis de quitosana durante 30 dias e após, serem expostos por 7 dias aos	
20	microplásticos.....	20
21	Figura 7. Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	
22	(média $\pm$ erro padrão) em brânquias (a), hepatopâncreas (b) e músculo (c) de juvenis de	
23	<i>P. vannamei</i> alimentados com dieta contendo diferentes níveis de quitosana durante 30	
24	dias e após, serem expostos por 7 dias aos microplásticos.....	21
25	Figura 8. Imagens dos tecidos (brânquias, hepatopâncreas e músculo) de juvenis de <i>P.</i>	
26	<i>vannamei</i> alimentados com dieta contendo diferentes níveis de quitosana durante 30	
27	dias, sendo os tratamentos controle (CTR), controle mais quitosana 1mg/kg (CTR+Q1)	
28	e controle mais quitosana 3mg/kg (CTR+Q3).....	22
29	Figura 9. Imagens dos tecidos (brânquias, hepatopâncreas e músculo) de juvenis de <i>P.</i>	
30	<i>vannamei</i> alimentados com dieta contendo diferentes níveis de quitosana durante 30	

1 dias e após a exposição de 7 dias aos microplásticos de poliestireno, sendo os
2 tratamentos microplásticos (MP), microplásticos mais quitosana 1mg/kg (MP+Q1) e
3 microplásticos mais quitosana 3mg/kg (MP+Q3).....23

4 **Figura 10.** Acumulação dos microplásticos nos tecidos (brânquias, hepatopâncreas e
5 músculo) de juvenis de *P. vannamei* alimentados com dieta contendo diferentes níveis
6 de quitosana durante 30 dias e após a exposição de 7 dias, sendo os tratamentos
7 microplásticos (MP), microplásticos mais quitosana 1mg/kg (MP+Q1) e microplásticos
8 mais quitosana 3mg/kg (MP+Q3).....24

9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

RESUMO

Microplásticos (MP) são partículas com tamanho inferior a 5 mm. Dentre os efeitos, destaca-se o estresse oxidativo evidenciado por modulação do sistema antioxidante e danos oxidativos às macromoléculas. Alguns estudos mostram que a aquacultura é uma das práticas que estão mais sujeitas à exposição aos MP, portanto, estudar alternativas que visem minimizar/evitar os efeitos da exposição aos MP são de grande importância. Neste contexto, o uso de antioxidantes que sejam acessíveis e de baixo custo pode contribuir para diminuir os efeitos dos MP sobre os organismos de cultivo. A quitosana é um antioxidante obtido principalmente a partir da quitina presente na carapaça dos crustáceos, e é considerada rejeito para essa indústria de processamento, apesar de apresentar diversas propriedades, entre elas a capacidade antioxidante e imunoestimulante. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos toxicológicos da exposição aos MP no *P. vannamei* e se a inclusão da quitosana na dieta poderia minimizar ou evitar os efeitos que possam ser induzidos pela exposição aos MP em diferentes tecidos do camarão. Durante 30 dias, camarões receberam ração suplementada com quitosana (1 e 3 mg/Kg de ração, Q1 e Q3, respectivamente) e após este período os animais foram divididos em grupos onde foram expostos aos MP, do tipo poliestireno (PS), tamanho (1,0 µm) e concentração de 0,5 mg/L durante sete dias. Ao final do experimento, os camarões foram eutanasiados para a coleta do hepatopâncreas, brânquias e músculo para posteriores análises como atividades da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST), níveis de glutathione reduzida (GSH) e peroxidação lipídica (TBARS), além das análises histológicas e de acumulação. Os resultados mostraram que os MP induziram aumento na atividade da SOD, indicando um aumento da geração de radical ânion superóxido e diminuição da atividade da CAT, reduzindo desta forma a capacidade de lidar com H₂O₂, e a suplementação com quitosana (Q3) mostrou reverter estes resultados. Os níveis de GSH foram reduzidos em músculo e hepatopâncreas após exposição aos MP e a (Q1) reverteu esta redução. Em hepatopâncreas também foi observado danos lipídicos e a Q1 mostrou reverter estes danos. Os MP causaram danos estruturais e acúmulo nos diferentes tecidos do camarão. Os resultados mostram que a exposição aos MP pode induzir alterações no estado redox dos tecidos e que a suplementação com quitosana pode atenuar estes efeitos podendo ser uma estratégia de quimioprevenção na aquacultura.

Palavras-chave: crustáceo, antioxidante, micropartículas de poliestireno, estresse oxidativo, histopatologia.

ABSTRACT

Microplastics (MP) are particles smaller than 5 mm. Among the effects, oxidative stress stands out, evidenced by modulation of the antioxidant system and oxidative damage to macromolecules. Some studies show that aquaculture is one of the practices that are more subject to exposure to MP, therefore, studying alternatives that to minimize/avoid the effects of exposure to MP is of greater importance. In this context, the use of accessible and low-cost antioxidants can reduce the effects of MP on cultured organisms. Chitosan is an antioxidant obtained mainly from the chitin present in the carapace of crustaceans, and is considered waste for this processing industry, despite having several properties, including antioxidant and immunostimulant capacity. Therefore, the goal of the study was to evaluate the toxicological effects of exposure to MP on *P. vannamei* and whether the inclusion of chitosan in the diet can minimize/avoid the effects that may be induced by exposure to MP in different shrimp tissues. For 30 days, shrimp received chitosan-supplemented feed (1 and 3 mg/Kg of feed, Q1 and Q3, respectively) and after this period, the animals were divided into groups where they were exposed to MP, of the polystyrene (PS) type, size (1, 0 μm) and concentration of 0.5 mg/L for seven days. At the end of the experiment, the shrimp were euthanized and hepatopancreas, gills and muscle were removed and used to analysis of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione S-transferase (GST) activities, levels of reduced glutathione (GSH) and lipid peroxidation (TBARS), in addition to histological and accumulation analyses. The results showed that MP induced an increase in SOD activity, indicating an increase in superoxide anion radical generation and a decrease in CAT activity, thus reducing the ability to deal with H_2O_2 , and supplementation with chitosan (Q3) showed to reverse these results. GSH levels were reduced in muscle and hepatopancreas after exposure to MP and (Q1) reversed this reduction. In hepatopancreas, lipid damage was also observed and Q1 was shown to reverse this damage. MP caused structural damage and accumulation in different shrimp tissues. The results show that exposure to MP can induce changes in the redox status of tissues and that supplementation with chitosan can attenuate these effects and could be a chemoprevention strategy in aquaculture.

Keywords: crustacean, antioxidant, polystyrene microparticles, oxidative stress, histopathology.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento acelerado da população global tem levado a um aumento na procura sobre os recursos naturais do planeta, incluindo fontes de alimentos. Nesse cenário, o pescado vem ganhando espaço como fonte de proteína, o que levou a uma maior produção de organismos aquáticos nos últimos anos, de forma que, mais de 70% de toda a produção de pescados, advindos da aquacultura, são desenvolvidos em países asiáticos (FAO, 2022). Assim, a Aquacultura tem experimentado um crescimento constante, com uma expansão global na produção de peixes, crustáceos, moluscos e algas (Garlock et al., 2019).

Dentro do grupo dos crustáceos, que compreende as lagostas, caranguejos e camarões, a espécie mais produzida e comercializada mundialmente, é o camarão branco do Pacífico *Penaeus vannamei* (FAO, 2020). O principal motivo de seu grande uso é devido à alta taxa de crescimento e sobrevivência, uma boa eficiência na conversão alimentar, adaptação as mais diversas condições de cultivo e uma boa aceitação no mercado consumidor (Andreatta e Beltrame, 2004).

O uso de materiais plástico, como o polietileno tereftalato (PET), polietileno de vinila (PVC), polietileno de alta densidade (PEAD), poliestireno (PS) e os diferentes tipos de polipropileno, vem sendo utilizados em diversos setores, como embalagens, dispositivos elétricos e eletrônicos, agricultura e esportes (PlasticsEurope, 2017; Wang et al., 2019; Zhang et al., 2020). Nesse sentido, Thompson et al. (2004) foi o primeiro a conceituar os microplásticos (MP), definindo-os como detritos plásticos com tamanho de aproximadamente 20 mm e posteriormente, o tamanho dos MP foi definido como micropartículas de até 5 mm (Ryan et al., 2009). Os MP podem ser divididos em duas categorias, de acordo da derivação de tamanho de micrômetro fabricado ou a partir de sua fragmentação (Liu et al., 2019; Wright et al., 2013). Os microplásticos primários (MPP) são produzidos para aplicação comercial, como por exemplo, produtos de higiene pessoal, cosméticos, agentes de limpeza, entre outros. Em contrapartida, os microplásticos secundários (MPS) são derivados da fragmentação de plásticos de tamanho maior oriundos de produtos comumente usados como garrafas, embalagens, sacolas, entre outros, por fatores físico-químicos como radiação, ondas, vento, temperatura, abrasão física (Xiang et al., 2022). Na aquacultura, as principais fontes de MP são oriundas das importações de fontes terrestres, turismo costeiro, transportes de

navios, atividade pesqueira, criadouros e deposição atmosférica (Zhao, 2019). Dentro de um cultivo, os organismos estão em constante exposição aos MP, uma vez que, os materiais utilizados são de origem plástica, e estão presentes no revestimento dos tanques, termostatos, bandejas de alimentação, aeradores, bioballs (Lusher et al., 2017).

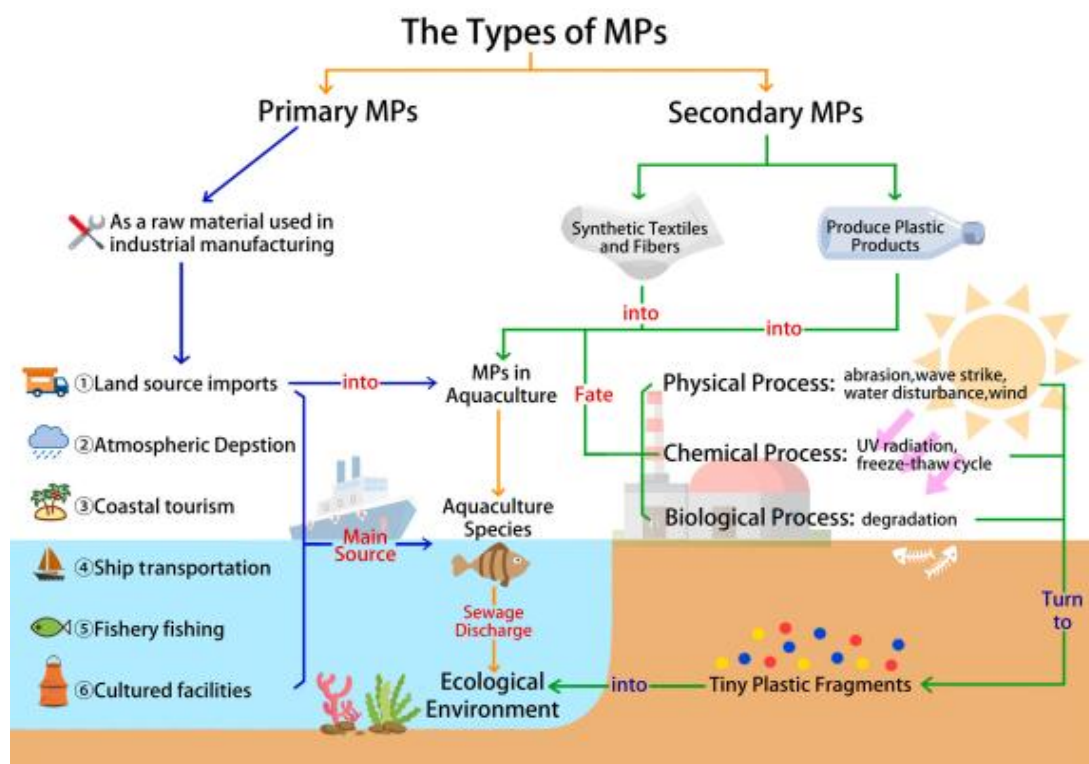


Figura 1. Fontes, distribuições e características de comportamento dos MP no ambiente de aquacultura. Fonte: Dong et al. (2021).

Os MP, por apresentarem baixa degradação, leveza, durabilidade são persistentes no ambiente, o que favorece que seja um substrato para aderência de microorganismos e compostos químicos (Dong et al., 2021). Logo, quando presentes no corpo hídrico, os MP podem ser ingeridos pelos organismos aquáticos, se tornando um potencial agente de dano físico, químico e/ou biológico (Grossart, 2019; Hou et al., 2020). Estudos já demonstraram que os MP têm efeitos nocivos em organismos aquáticos, causando alterações na microbiota intestinal e até podendo estar presentes no músculo que é a parte comestível (Yan et al., 2020; Hsieh et al., 2021). Da mesma forma, estudos têm demonstrado que os MP também podem afetar a reprodução, sistema imune, nutrição e desenvolvimento (Wang et al., 2020), além de causar a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), modular o sistema de defesa antioxidante (SDA) e interferir em vias de sinalização celular (Jeong e Choi, 2019) causando diversos danos aos organismos.

1 Um dos mecanismos de efeitos dos MP mais abordados em estudos científicos é a
2 indução de estresse oxidativo. O conceito do termo foi definido por Helmut Sies em
3 1985, como um desbalanço no equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, em favor
4 dos primeiros e em 2006, Jones atualizou o conceito considerando que o estresse
5 oxidativo também pode ser induzido por alterações em vias de sinalização redox na
6 ausência ou presença de danos oxidativos. As espécies reativas de oxigênio (ERO), são
7 produzidas pelos organismos aeróbicos principalmente durante a respiração celular onde
8 oxigênio molecular (O_2) necessita receber 4 (quatro) elétrons para a formação da água,
9 porém, o oxigênio recebe os elétrons de forma univalente gerando as espécies
10 intermediárias que são as ERO, tais como, radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais
11 hidroxila ($\cdot OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Murphy, 2009; Hermes Lima, 2004).
12 Vale ressaltar a importância de se identificar/degradar essas ERO produzidas, uma vez
13 que, se não controlado podem causar danos oxidativos em ácidos nucleicos, lipídios e
14 proteínas (Halliwell e Gutteridge, 2007; Lushchak, 2011). De fato, estudos já tem
15 demonstrado que a exposição aos MP induz danos oxidativos lipídicos associados a uma
16 diminuição na atividade de enzimas antioxidantes como catalase (CAT) e superóxido
17 dismutase (SOD) em *Penaeus vannamei* (Hsieh et al., 2021; Wang et al., 2021).

18 Para evitar/minimizar os prejuízos causados pelo excesso de ERO, os organismos
19 aeróbicos desenvolveram um sistema de defesa antioxidante (SDA) que possui a
20 capacidade de evitar, minimizar ou reverter os efeitos induzidos pelas ERO (Trestrail et
21 al., 2020). O SDA mantém o equilíbrio redox das células protegendo as biomoléculas
22 contra insultos oxidativos (Halliwell & Gutteridge, 2007). Este sistema pode ser
23 dividido em dois grandes grupos: enzimáticos e não enzimáticos, dentre os enzimáticos
24 pode-se destacar a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase
25 (GPx) e glutathione-S-transferase (GST), entre outras.

26 A superóxido dismutase é responsável por degradar o radical ânion superóxido
27 ($O_2^{\cdot-}$), catalisando uma reação de dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em oxigênio (O_2) e peróxido de
28 hidrogênio (H_2O_2). A catalase, por sua vez, faz a degradação do H_2O_2 , em água (H_2O) e
29 O_2 . Dessa forma, vale ressaltar a importância da ação da CAT, uma vez que, apesar do
30 H_2O_2 não ser um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado em sua última
31 camada eletrônica, é uma espécie com potencial deletério, por participar de reações que
32 geram radical hidroxila ($HO\cdot$). A GPx também exerce esse papel de reduzir os níveis de
33 H_2O_2 além de outros peróxidos, utilizando como co-substrato o tripeptídeo GSH

1 (glutathione reduzida) (Barbosa et al., 2010; Silva e Gonçalves, 2010). Outra enzima
2 importante, a GST, está envolvida no processo de detoxificação de xenobióticos e
3 hidroperóxidos, combinada a GSH (Huber et al., 2008).

4 As defesas antioxidantes não-enzimáticas são constituídas por uma diversidade de
5 substâncias, que podem ter origem exógena ou dietética como, por exemplo, vitaminas
6 E (α tocoferol) e C (ácido ascórbico), flavonóides e outras que são sintetizadas pelo
7 próprio organismo como, por exemplo, a glutathione reduzida (GSH) (Lobato et al.,
8 2018; Barbosa et al., 2010). A GSH por ser abundante nas células e o principal
9 antioxidante, ela desempenha um papel importante no sistema de defesa, visto que, atua
10 como substrato de várias enzimas e protege moléculas da oxidação (Birben et al., 2012;
11 Jiang et al., 2017).

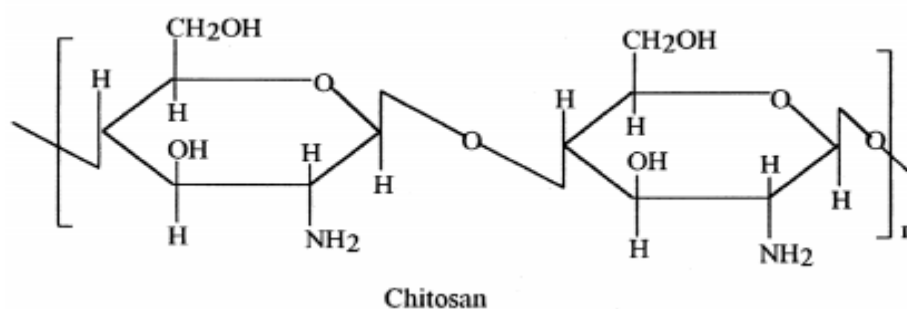
12 Como mencionado anteriormente, as ERO tem potencial de danificar
13 macromoléculas como proteínas, lipídios e DNA (Hermes Lima, 2004) causando
14 prejuízos à saúde do animal e podendo comprometer funções fisiológicas como
15 crescimento, comportamento e reprodução podendo levar até mesmo a morte do animal
16 (de Sá et al., 2018; Elizalde-Velázquez e Gómez-Oliván, 2021). Além disso, a oxidação
17 dos lipídios apresenta diversos problemas, incluindo a perda de valores nutricionais e
18 das propriedades organolépticas, bem como a formação de compostos potencialmente
19 tóxicos oriundos da peroxidação lipídica que comprometem a qualidade da carne,
20 reduzindo seu tempo de prateleira (Okpala et al., 2016).

21 Outra problemática associada à exposição aos MP é a sua transferência ao longo
22 da cadeia alimentar (Chae et al., 2018; Hossain et al., 2020), pois se os organismos de
23 cultivo estão sujeitos a exposição e a iminente acumulação (além dos efeitos tóxicos)
24 isso significa que o consumidor final poderá receber estes MP através destes produtos.
25 De acordo com Curren et al., (2020) foi constatado a presença de MP em vários
26 camarões que estavam à venda em supermercados, incluindo *Penaeus vannamei*. Então,
27 além de estudar a toxicologia dos MP associados à aquacultura é necessário que
28 concomitantemente se inicie também estudos que possam contribuir para
29 minimizar/reverter estes potenciais efeitos e/ou acumulação.

30 Nesse sentido, o uso de suplementos antioxidantes através da dieta pode ser um
31 forte aliado, uma vez que aumentam o sistema de defesa do animal, melhorando sua
32 condição fisiológica, além de prevenir e/ou reduzir a oxidação induzida por ERO

1 (Huang et al., 2020; Lobato et al., 2018). Os antioxidantes naturais, renováveis e que
2 são amplamente encontrados na natureza, como a quitosana, é uma alternativa
3 interessante, pois cooperam para uma aquicultura mais sustentável. Seus compostos
4 bioativos podem ser obtidos a partir da própria cadeia aquícola de produção, pois o que
5 é considerado rejeito (casca e cabeça), na verdade pode ser reaproveitado (Abdel-Ghany
6 e El-S. Salem, 2020).

7 A quitosana é um polímero natural obtido a partir da desacetilação alcalina da
8 quitina, um polissacarídeo encontrado na carapaça de crustáceos, insetos e na parede
9 celular de alguns fungos (Elsoud e Kady, 2019). Neste sentido, a quitosana por possuir
10 em sua forma molecular além de grupos hidroxila (OH), grupos amina (NH_2) e essa
11 característica lhe confere maior aplicabilidade e consequentemente maior interesse de
12 uso, uma vez que, faz com que a molécula adquira uma carga positiva, tornando-a
13 catiônica, solúvel em soluções ácidas, enquanto os grupamentos hidroxila conferem
14 propriedades antioxidantes à molécula (Kurita, 2006; Kamil et al., 2002).



15

16 **Figura 2.** Estrutura molecular da quitosana. Fonte: Kumar, 2000.

17 De fato, este antioxidante tem mostrado propriedades biológicas importantes com
18 amplas aplicações, visto que é de baixo custo, pode atuar na eliminação de radicais
19 livres, quelar metais, restabelecer outros antioxidantes, inibir a ação de bactérias, exibir
20 propriedades imunoestimulantes, aumentar a capacidade de conservação dos alimentos,
21 promover o crescimento dos animais aquáticos, além de ser biossegura, biodegradável e
22 biocompatível (Abdel-Ghany & El-S. Salem, 2020). Estudos já têm demonstrado os
23 benefícios da inclusão da quitosana na dieta dos animais, Brol et al., (2021) observaram
24 que a quitosana melhorou significativamente algumas respostas antioxidantes quando o
25 *Penaeus vannamei* cultivado em sistema de bioflocos (BFT) foi submetido à redução
26 abrupta da salinidade, demonstrando que a inclusão deste antioxidante melhora os
27 mecanismos de defesa e resistência ao estresse.

1 Os sistemas de cultivo podem ser classificados de diversas formas, uma delas é
2 quanto ao uso da água. Sendo que os sistemas abertos são aqueles em que o meio é
3 usado como local de cultivo e não há necessidade de bombeamento de água, por
4 exemplo. No caso dos sistemas semiabertos, é necessária uma estrutura para a
5 realização do cultivo onde a água de uma fonte (que pode ser do meio ambiente, e
6 geralmente é) deverá ser direcionada para o local da produção, enquanto nos sistemas
7 fechados, a água é totalmente reutilizada no sistema após filtrações (principalmente
8 biológicas). Neste último tipo de sistema, a concentração de contaminantes (incluindo
9 os MP) é potencializada o que pode facilitar a incorporação destes pelos organismos,
10 exercer diferentes efeitos tóxicos (incluindo estresse oxidativo) e ainda ser fonte destes
11 contaminantes para o consumidor final. Devido a isso, estudos toxicológicos são cada
12 vez mais frequentes e necessários na área da aquacultura para que conhecendo-se os
13 efeitos de diferentes compostos (sozinhos ou em combinação com outros
14 contaminantes) também se possa desenvolver estratégias que possam evitar, minimizar
15 ou reverter os efeitos da exposição a diferentes compostos.

16 Nesse contexto, o presente estudo avaliou os efeitos toxicológicos da exposição
17 aos microplásticos (MP) no *P. vannamei* utilizando um sistema fechado e se a inclusão
18 da quitosana na dieta pode minimizar ou evitar os potenciais efeitos induzidos em
19 diferentes tecidos do camarão decorrentes da exposição aos MP.

20

21 **2. OBJETIVOS**

22 **2.1. Geral**

23 Avaliar os efeitos induzidos pela exposição aos MP e se a inclusão da quitosana
24 através da dieta pode minimizar os efeitos induzidos por esta exposição em juvenis de
25 camarão branco do Pacífico (*Penaeus vannamei*).

26 **2.2. Específicos**

27

28 **(1)** Avaliar se a exposição aos MP pode induzir a uma situação de estresse oxidativo em
29 hepatopâncreas, brânquias e músculo de *P. vannamei*.

30 **(2)** Identificar se os MP podem se acumular nos diferentes tecidos do camarão.

31 **(3)** Avaliar se os MP podem induzir alterações estruturais nos diferentes tecidos do
32 camarão.

1 **(4)** Avaliar se a inclusão da quitosana na dieta de *P. vannamei* pode reverter ou
2 minimizar os parâmetros descritos nos itens **(1), (2) e (3)**.

3 **3. MATERIAL E MÉTODOS**

5 **3.1. Local de realização do experimento e material biológico**

6 O experimento de suplementação e exposição foi realizado na Estação Marinha de
7 Aquacultura (EMA), do Instituto de Oceanografia (IO) da Universidade Federal do Rio
8 Grande - FURG, localizada na praia do Cassino, em Rio Grande, RS, Brasil.

9 Os náuplios de *Penaeus vannamei* foram adquiridos do laboratório comercial Aquatec
10 Ltda., situado no estado do Rio Grande do Norte, Brasil, mantidos no setor de larvicultura do
11 Laboratório de Carcinocultura da EMA até atingirem o estágio de pós-larva (PL) e
12 posteriormente transferidos à estufa para o processo de engorda até alcançarem o peso médio
13 de $0,20 \pm 0,12$ g. Quando os organismos chegaram a este peso foram estocados em suas
14 respectivas unidades experimentais situadas na sala experimental.

15 **3.2. Delineamento experimental**

16 Foram realizados 2 experimentos, o primeiro foi para analisar os efeitos da exposição
17 aos MP (a nível histológico e bioquímico) utilizando-se MP não fluorescente (poliestireno,
18 esférico $1,0 \mu\text{m}$). O segundo experimento foi realizado para identificar a presença de MP
19 (acumulação) nos diferentes tecidos do camarão, para isso, foi necessário utilizar MP
20 fluorescente (poliestireno, esférico $1,0 \mu\text{m}$) para permitir a análise usando microscópio de
21 fluorescência. Em ambos os experimentos, houveram os grupos alimentados com dieta
22 controle (sem quitosana) e as dietas suplementadas com ambas as concentrações (1 e 3
23 mg/Kg) de quitosana e posteriormente expostas aos MP.

24 **3.3. Síntese e caracterização da quitosana**

25 A quitosana foi produzida e caracterizada no Laboratório de Tecnologia Industrial (LTI)
26 da FURG (EQA) a partir de rejeitos (cascas e cabeças) de camarões provenientes de indústrias
27 de pescado localizadas na cidade do Rio Grande, RS, Brasil. O procedimento foi realizado de
28 acordo com Moura et al., (2007), com a limpeza dos resíduos em água corrente, seguido de
29 desmineralização, desproteínação e desodorização/despigmentação em um tambor de agitação
30 sob temperatura ambiente, resultando na quitina úmida. Após a secagem do material em
31 estufa (80°C por 4 horas) a quitosana foi obtida a partir da desacetilação alcalina da quitina
32 com NaOH (45°Bé) em um reator sob temperatura (130°C) e agitação (50 rpm) constantes.
33 Em seguida a quitosana foi purificada e seca para análise do grau de desacetilação pelo

1 método de titulação potenciométrico linear e massa molecular com o método viscosimétrico
2 para polímero, resultando em um grau de desacetilação >90 % e PM 125 kDa.

3 **3.4. Formulação e preparo das dietas**

4

5 Uma dieta basal foi formulada com 39% de proteína bruta e 8% de lipídeos e a
6 quitosana, sintetizada conforme descrito acima, foi adicionada na proporção de 0, 1 e 3 g kg⁻¹
7 de dieta (tratamentos C0, Q1 e Q3, respectivamente), com base em trabalhos de Niu et al.,
8 2015, 2011. A formulação e composição proximal das dietas estão representadas nas **Tabelas**
9 **1 e 2.**

10 Previamente a formulação, foi feita a moagem dos ingredientes e a análise da
11 composição bromatológica, de acordo com metodologia da AOAC (1999). Para o preparo das
12 dietas os ingredientes foram misturados da menor para a maior proporção, com adição de óleo
13 e água (40 %) no final. Depois de homogeneizado os ingredientes, a pasta formada foi
14 peletizada e os pellets formados foram secos em estufa a 60 °C por 24 h, fragmentados e
15 peneirados para obtenção de tamanho entre ~1 e ~2 mm, armazenados em vidros e mantidos
16 em freezer a -18 °C.

17 **Tabela 1.** Formulação da dieta basal.

Ingredientes	%
Farinha de peixe	39
Farelo de soja	18
Amido de milho	20
Levedura	5,0
Farelo de trigo	10
Óleo de peixe	2,5
Mistura mineral e vitamínica	1,0
Colesterol	0,5
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1,0
Celulose	3,0

18

19 **3.5. Análise da composição centesimal da ração**

20 A análise da composição centesimal das rações foi realizada seguindo a metodologia
21 descrita pela AOAC (1999). Assim, o teor de umidade foi determinado por secagem das
22 amostras em estufa, onde as rações permaneceram por 1 h a 105 °C. Para as análises de

proteína bruta, extrato etéreo e cinzas as dietas foram previamente trituradas. A proteína bruta foi analisada de acordo com a metodologia de Kjeldahl, com digestão das amostras e destilação do nitrogênio, o resultado foi multiplicado por 6,25. O extrato etéreo foi determinado no extrator de Soxhlet, utilizando-se éter de petróleo como solvente por 5 h. Para o teor de cinzas as amostras foram levadas à mufla a 360 °C por 4 h.

Tabela 2. Composição proximal das dietas.

Dieta basal (g)	1166	1166	1166
Inclusão de quitosana (g)	0	1,0	3,0
Composição proximal (% matéria seca)			
Umidade	5,00 ± 0,11	4,44 ± 0,08	5,12 ± 0,11
Cinzas	13,97 ± 0,2	14,93 ± 0,07	14,71 ± 0,4
Proteína Bruta	33,48 ± 0,25	33,03 ± 0,03	33,05 ± 0,28
Extrato Etéreo	7,62 ± 0,09	7,33 ± 0,16	7,72 ± 0,25

3.6. Suplementação dos animais com a quitosana (experimento I)

Foram utilizados 12 tanques de poliestireno com volume útil de 150 litros, que foram dispostos em 3 tratamentos com 4 réplicas, contendo 30 camarões por tanque, com peso médio de $0,20 \pm 0,12$ g. Durante 30 dias a ração foi oferecida em bandejas de alimentação duas vezes ao dia (8:30 e 16:00) com as respectivas dietas: C0 (sem adição de quitosana), Q1 (1 g de quitosana kg^{-1} de dieta) e Q3 (3 g de quitosana kg^{-1} de dieta). Na primeira semana a taxa de alimentação foi de 8% da biomassa total dos camarões e ajustada com base nas biometrias semanais de acordo com a metodologia proposta por Jory et al., (2001).

3.6.1. Exposição aos microplásticos (experimento I)

Ao final dos 30 dias, os animais foram redistribuídos individualmente em 5 recipientes de vidro com volume útil de 3 litros que foram colocados dentro de tanques e dispostos em 6 tratamentos que passaram a ser denominados respectivamente de CTR (animais que não foram alimentados com quitosana), CQ1 (animais que receberam 1 g de quitosana kg^{-1} de dieta), CQ3 (animais que receberam 3 g de quitosana kg^{-1} de dieta), MP (animais que não receberam quitosana e receberam a [MP]), MPQ1 (animais que receberam quitosana 1 mg na dieta + [MP]) e MPQ3 (animais que receberam quitosana 3 mg na dieta + [MP]).

1 Neste período análises de oxigênio dissolvido e temperatura foram mensurados
2 através de um oxímetro digital multiparâmetros (YSI®-550A) duas vezes ao dia (manhã
3 e tarde). Todos os dias antes de colocar os MP na água, a solução foi sonicada em um
4 sonificador de bancada a uma velocidade de 20 Hz/ 125 W por 60 segundos, após o uso a
5 solução foi armazenada na geladeira. Assim foram pipetados na água 438µl de MP em
6 cada vidro. A troca de água e a reexposição aos MP foi realizada todos os dias pela
7 manhã e os animais foram alimentados 1x ao dia (tarde). Ao término do período de
8 exposição (7 dias), os animais foram eutanasiados por congelamento, foi realizada a
9 dissecação dos tecidos (hepatopâncreas, brânquias e músculo) de forma que uma parte
10 dos tecidos foi para as análises histológicas e outra para as análises bioquímicas que
11 foram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C.

12 O MP utilizado no experimento foi de forma esférica e uniforme, poliestireno com
13 tamanho 1,0 µm obtido da Sigma-Aldrich. A concentração utilizada foi baseada no
14 estudo de Chen et al. (2020), sendo de 0,5 mg/L.

15 **3.7. Suplementação dos animais com a quitosana (experimento II)**

16 Foram utilizados 6 tanques de poliestireno com volume útil de 150 litros, que
17 foram dispostos em 3 tratamentos com 2 réplicas, contendo 33 camarões por tanque,
18 com peso médio de $0,47 \pm 0,23$ g. Durante 30 dias a ração foi oferecida em bandejas de
19 alimentação duas vezes ao dia (8:30 e 16:00) com as respectivas dietas: C0 (sem adição
20 de quitosana), Q1 (1 g de quitosana kg⁻¹ de dieta) e Q3 (3 g de quitosana kg⁻¹ de dieta).
21 Na primeira semana a taxa de alimentação foi de 8% da biomassa total dos camarões e
22 ajustada com base nas biometrias semanais de acordo com a metodologia proposta por
23 Jory et al., (2001).

24 **3.7.1 Exposição aos microplásticos (experimento II)**

25 Após 30 dias, os animais foram redistribuídos individualmente em 5 recipientes
26 de vidro com volume útil de 3 litros que foram colocados dentro de tanques e dispostos
27 em 3 tratamentos que passaram a ser denominados respectivamente de MP (animais que
28 não receberam quitosana e receberam a [MP] fluorescente), MPQ1 (animais que
29 receberam quitosana 1 mg na dieta + [MP]) e MPQ3 (animais que receberam quitosana
30 3 mg na dieta + [MP]). Neste período análises de oxigênio dissolvido e temperatura
31 foram mensurados através de um oxímetro digital multiparâmetros (YSI®-550A) duas
32 vezes ao dia (manhã e tarde). Todos os dias antes de colocar os MP na água, a solução
33 foi sonicada em um sonificador de bancada a uma velocidade de 20 Hz/ 125 W por 60

segundos, após o uso a solução foi armazenada na geladeira. Assim foram pipetados na água 438µl de MP em cada vidro. A troca de água e a reexposição aos MP foi realizada todos os dias pela manhã e os animais foram alimentados 1x ao dia (tarde). Ao término do período de exposição (7 dias), os animais foram eutanasiados por congelamento, foi realizada a dissecação dos tecidos (hepatopâncreas, brânquias e músculo) para análise de acumulação.

O MP utilizado no experimento II foi de forma esférica e uniforme, fluorescente, poliestireno com tamanho 1,0 µm obtido da Sigma-Aldrich. A concentração utilizada foi baseada no estudo de Chen et al. (2020), sendo de 0,5 mg/L.

3.8. Monitoramento da qualidade da água

Durante todo o período experimental de suplementação com a quitosana dos experimentos I e II parâmetros como oxigênio dissolvido (mg L⁻¹), temperatura (°C), pH e salinidade foram monitorados diariamente, sendo mensurados através de um oxímetro digital multiparâmetros (YSI®-550A), pHmêtro digital de bancada (±0,01, YSI®-pH100) e refratômetro, respectivamente. Diariamente foram monitoradas as concentrações de nitrogênio amoniacal total (Grashoff et al., 1999) e nitrito, e uma vez por semana o nitrato e fosfato. Quando os níveis de amônia ultrapassaram 1 mg L⁻¹ foi realizado a troca da água nos tanques. A alcalinidade foi monitorada três vezes na semana (APHA, 1998). Quando a alcalinidade apresentava valores abaixo de 150 mg L⁻¹ CaCO₃, foi realizado correções com hidróxido de cálcio. O oxigênio em cada unidade experimental foi provido através de mangueira microperfurada (Aerotube®) conectadas a um soprador de ar.

Para a exposição aos MP dos experimentos I e II, os animais foram submetidos às mesmas condições da água de cultivo que estavam no período de suplementação com a quitosana, sendo que somente os parâmetros de temperatura e oxigênio dissolvido foram monitorados neste período (diariamente manhã e tarde).

3.9. Desempenho zootécnico

Ao final dos 30 dias de alimentação (experimento I) os camarões foram pesados em balança analítica (@Bel Engineering) e o desempenho zootécnico avaliado pelos seguintes parâmetros:

- Peso final (g)

- 1 • Ganho de peso (g): (peso médio final - peso médio inicial)
- 2 • Taxa de Crescimento Específica (TCE) %: $100 \times ((\ln \text{ peso final}) - (\ln \text{ peso inicial})) /$
- 3 (dias de experimento))
- 4 • Conversão alimentar aparente (CA): ração fornecida (g) / ganho de peso (g)
- 5 • Sobrevivência (%): $100 \times (\text{número final de camarões} / \text{número inicial de camarões})$.

6 **3.10. Análises bioquímicas**

7 **3.10.1. Homogeneização das amostras**

8 Os tecidos hepatopâncreas, brânquias e músculo foram homogeneizados (1:4, p/v)
9 em tampão contendo 0,5 M de sacarose, Tris-Base 20 mM, EDTA 1mM, ditioneitol
10 (DTT) 1 mM, KCl 0,15 M, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (0,05 mM), com pH
11 ajustado em 7,6. Em seguida foram centrifugados a $10.000 \times g$ por 20 min a 4° C e os
12 sobrenadantes foram utilizados para as dosagens de atividade enzimática e
13 quantificação de lipídeos peroxidados. Para a análise de GSH os tecidos foram
14 homogeneizados com tampão sem DTT. A análise de proteínas totais do sobrenadante
15 foi determinada usando kit comercial (Bioclin, Brasil) baseado no método de Biureto a
16 550 nm utilizando uma leitora de microplacas (BioTek Elx 800).

17 **3.10.2. Atividade da catalase (CAT)**

18 A atividade da CAT foi baseada na metodologia descrita por Beutler (1975)
19 através da decomposição de 50 mM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) quantificado em
20 espectrofotômetro (BioMate 3, Thermo Scientific) a 240 nm e os resultados foram
21 expressos como unidades de CAT (uma unidade correspondente a hidrólise de um μmol
22 de H_2O_2 por min e por mg de proteína a 25 °C e pH 8,0).

23 **3.10.3. Atividade da glutathione-S-transferase (GST)**

24 A atividade da GST foi mensurada segundo Habig et al., (1974), a partir da
25 conjugação GSH (1mM) com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (1 mM), na presença
26 de 20 μL de extrato das amostras homogeneizadas, gerando um complexo CDBN-GSH.
27 Como meio de reação, utilizou-se um tampão de fosfato de potássio 0,1 M e pH 7,0,
28 previamente aquecido em 25 °C em banho maria. A absorbância do complexo formado
29 foi lida a 340 nm (ELx 800, BioTek). A atividade foi expressa em nmol de CDBN por
30 min e por mg de proteína.

3.10.4. Níveis de glutathiona reduzida (GSH)

A análise dos níveis de GSH foi baseada no protocolo de Sedlak e Lindsay (1968). Em amostras ajustadas em 2 mg mL⁻¹ com tampão de homogeneização sem DTT, foi adicionado 240 µL de amostra de tecido, 28 µL de TCA (ácido tricloroacético a 50% P/V), e colocado para centrifugar em 20.000 x g a 4 °C durante 10 minutos para a precipitação de proteínas. Do sobrenadante foi retirado 100 µL e adicionados à microplacas transparentes, junto com 200 µL de Tris Base 0,4 M em pH 8,9 e 10 µL de DTNB (5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) diluído em metanol. A microplaca foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos e as leituras efetuadas a 405 nm (Elx 800, BioTek). A concentração foi expressa em µmoles de GSH por mg de proteína.

3.10.5. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade desta enzima foi baseada na metodologia de McCord e Fridovich (1969). Neste ensaio, o radical ânion superóxido (O₂^{•-}) é gerado pelo sistema da xantina oxidase e a redução do citocromo C foi detectada a 550 nm em espectrofotômetro (BioMate 3, Thermo Scientific). A atividade da SOD foi expressa em unidades de SOD (onde uma unidade é a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do citocromo C por min e por mg de proteína à 25°C e pH 7,8).

3.10.6. Níveis de lipídios peroxidados (TBARS)

A peroxidação lipídica foi avaliada pelo método de TBARS (substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico) seguindo a metodologia descrita por Oakes e Van de Kraak (2003). Este método envolve a reação do malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica com o ácido tiobarbitúrico (TBA) sob condições de alta temperatura e acidez, gerando um cromógeno, quantificado por fluorimetria com excitação e emissão de 515 nm e 550 nm, respectivamente (Victor 2, Perkin Elmer). Como padrão foi utilizado o tetrametoxipropano (TMP). Os resultados foram expressos em nmol de MDA por mg de proteína.

3.11. Análises histológicas

Foram utilizados 4 camarões por tratamento, totalizando 24 camarões (experimento I). De forma que, os animais foram eutanasiados em gelo e fixados em solução de Davidson, transferidos para álcool 70% para posteriormente fazer a coleta dos tecidos (hepatopâncreas, brânquias e músculo) da região do cefalotórax e abdômen. Assim, os tecidos coletados foram colocados em cassetes devidamente identificados e

1 foram processados no processador automático de tecidos (LEICA TP 1020) e
2 posteriormente embebidos com Paraplast (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri EUA).
3 Os blocos de parafina com os tecidos foram seccionados no micrótomo (LEICA RM
4 2245) a uma espessura de 5 μ m, montados na lâmina e corados com Hematoxilina e
5 Eosina (Bell e Lightner, 1988). Para analisar as alterações estruturais nos tecidos as
6 lâminas coradas foram examinadas em um microscópio óptico (Nikon Eclipse e200)
7 equipado com uma câmera e software (Axio Vision 4.8.2) (Carl Zeiss, Oberkochen,
8 Alemanha) onde as imagens foram capturadas em uma magnitude de 40x.

9 **3.12. Análise de acumulação dos microplásticos**

10 A acumulação de MP foi realizada com os animais do experimento II (Seção
11 3.7.1) usando procedimentos descritos por Xiao et al. (2022) com adaptações realizadas
12 por Suanes et al. (2023). Os MP fluorescentes foram detectados usando microscópio
13 invertido de epifluorescência (Olympus IX81 com câmera Olympus DP72 CCD
14 acoplada). Os diferentes tecidos foram escaneados para detecção da fluorescência à 510
15 e 550 nm (excitação e emissão, respectivamente).

16 **3.13. Análise estatística**

17 Para verificar a homogeneidade das variâncias dos diferentes tratamentos e a
18 normalidade da distribuição dos dados, foram aplicados os testes de Shapiro-Wilks e
19 Levene, respectivamente (Zar, 1984). Após comprovados os pressupostos, os dados
20 foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via. Para verificar as
21 diferenças significativas entre os tratamentos foi usado o teste de Newman-Keuls. O
22 nível de significância foi definido em 0,05 em todos os casos.

23

4. RESULTADOS

4.1. Qualidade de água

Os parâmetros de qualidade de água durante os 30 dias (experimento I) estão apresentados na **Tabela 3**. Os parâmetros de qualidade da água não apresentaram diferenças significativas em quase todos os tratamentos ($p > 0,05$). Somente foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na temperatura no tratamento Q3.

Tabela 3. Parâmetros de qualidade da água (média $\pm$ desvio padrão) do cultivo de *P. vannamei* durante 30 dias. Níveis de quitosana na dieta: 0 g kg⁻¹ (C0), 1 g kg⁻¹ (Q1), 3 g kg⁻¹ (Q3).

		Tratamentos		
		C0	Q1	Q3
Temperatura (°C)	^{ab}	27,46 $\pm$ 0,26	^a 27,18 $\pm$ 0,30	^b 26,88 $\pm$ 0,19
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)		5,50 $\pm$ 0,03	5,54 $\pm$ 0,03	5,65 $\pm$ 0,05
pH		8,15 $\pm$ 0,00	8,15 $\pm$ 0,00	8,10 $\pm$ 0,01
Salinidade		31,2 $\pm$ 0,00	31,2 $\pm$ 0,00	31,2 $\pm$ 0,00
Amônia total (mg L ⁻¹)		0,59 $\pm$ 0,05	0,59 $\pm$ 0,09	0,55 $\pm$ 0,09
Nitrito (mg L ⁻¹)		0,92 $\pm$ 0,17	1,15 $\pm$ 0,32	0,91 $\pm$ 0,29
Nitrato (mg L ⁻¹)		2,0 $\pm$ 0,20	2,0 $\pm$ 0,34	2,0 $\pm$ 0,37
Fosfato (mg L ⁻¹)		0,0 $\pm$ 0,01	0,0 $\pm$ 0,01	0,0 $\pm$ 0,01
Alcalinidade (mg L ⁻¹ CaCO ₃)		133 $\pm$ 4,1	134 $\pm$ 3,0	136 $\pm$ 3,0

4.2. Desempenho zootécnico e composição proximal

O peso final foi significativamente maior ($p < 0,05$) no tratamento Q1 em relação à Q3, mas não diferiu do controle (C0), conforme apresentado na **Tabela 4**. Os valores de ganho de peso, taxa de crescimento específico (TCE), conversão alimentar (CA) e sobrevivência não apresentaram diferença do controle ou entre os tratamentos ($p > 0,05$). A composição proximal não mostrou diferenças significativas ($p > 0,05$), na matéria seca, proteína bruta e extrato etéreo. Somente no teor de cinzas foi verificado um teor maior no tratamento Q1.

Tabela 4. Desempenho zootécnico e composição proximal (média $\pm$ desvio padrão) de juvenis de *P. vannamei* alimentados com dieta contendo diferentes níveis de quitosana durante 30 dias. Níveis de quitosana na dieta: 0 g kg⁻¹ (C0), 1 g kg⁻¹ (Q1), 3 g kg⁻¹ (Q3).

		Tratamentos		
		C0	Q1	Q3
Peso inicial (g)		0,20 $\pm$ 0,12	0,20 $\pm$ 0,12	0,20 $\pm$ 0,12
Peso final (g)		^{ab} 3,19 $\pm$ 0,27	^a 3,17 $\pm$ 0,20	^b 3,06 $\pm$ 0,15
Ganho de peso (g)		^{ab} 2,99 $\pm$ 0,27	^a 2,97 $\pm$ 0,20	^b 2,86 $\pm$ 0,15
TCE (%)		9,23 $\pm$ 0,28	9,21 $\pm$ 0,21	9,09 $\pm$ 0,16
CA		1,24 $\pm$ 0,11	1,25 $\pm$ 0,09	1,30 $\pm$ 0,06
Sobrevivência (%)		100 $\pm$ 0,00	100 $\pm$ 0,00	100 $\pm$ 0,00
Composição proximal (%)				
Matéria seca		95,00 $\pm$ 0,11	95,56 $\pm$ 0,08	94,88 $\pm$ 0,11
Proteína bruta		33,48 $\pm$ 0,25	33,03 $\pm$ 0,03	33,05 $\pm$ 0,28
Extrato etéreo		7,62 $\pm$ 0,09	7,33 $\pm$ 0,16	7,72 $\pm$ 0,25
Cinzas		^{ab} 13,97 $\pm$ 0,2	^a 14,93 $\pm$ 0,07	^b 14,71 $\pm$ 0,4

4.3. Análises bioquímicas

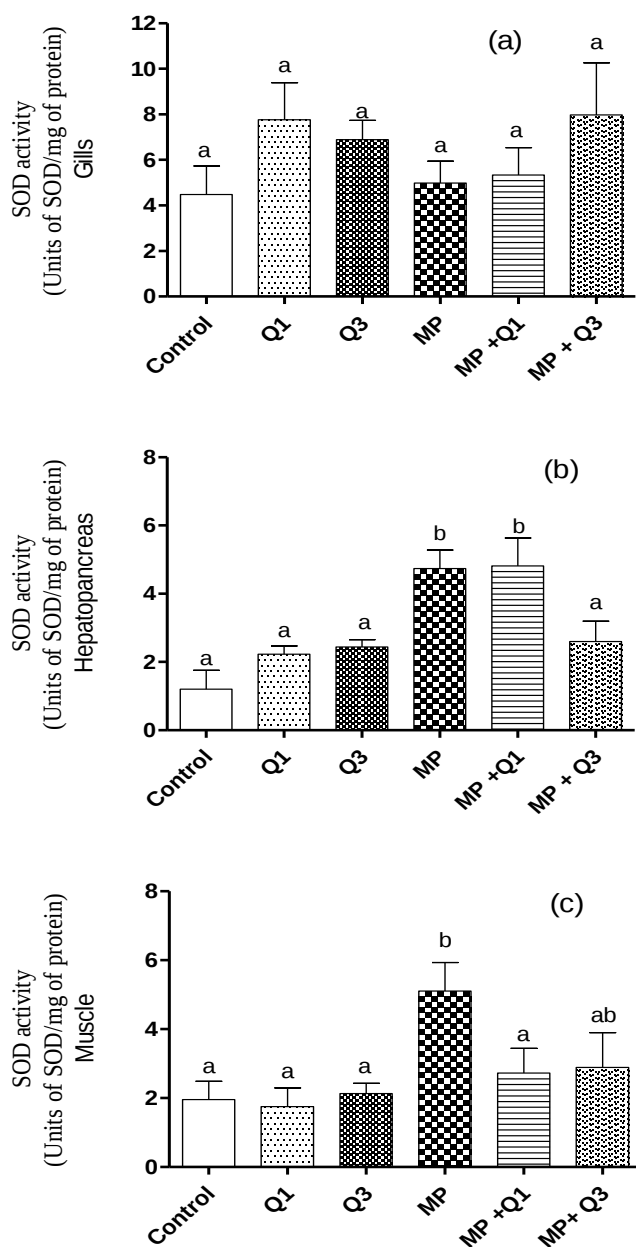
As comparações entre os tratamentos foram feitas da seguinte forma: **(1)** comparação dos efeitos da exposição somente aos MP ou quitosana (Q1 ou Q3) em relação ao grupo controle, para avaliar se o tratamento isolado teria algum efeito. **(2)** Os grupos que receberam tratamento com quitosana e MP (MP+Q1 e MP+Q3) foram comparados com o grupo exposto somente aos MP para avaliar se a quitosana poderia reverter o possível efeito induzido pela exposição aos MP.

4.3.1. Superóxido dismutase (SOD)

Em brânquias (a), nenhum tratamento mostrou alterar significativamente ($p > 0,05$) a atividade da SOD. Em hepatopâncreas (b), os grupos expostos somente aos MP aumentaram significativamente ($p < 0,05$) a atividade da SOD, os pré-tratamento com quitosana na menor concentração (MP + Q1) manteve o aumento da SOD enquanto o grupo que recebeu 3 mg de quitosana (MP + Q3) mostrou reverter este aumento. Em músculo (c), o grupo exposto somente aos MP ($p < 0,05$) mostrou aumentar a atividade

1 da enzima (Figura 3) e a suplementação com 1 mg de quitosana (MP +Q1) mostrou
 2 reverter este aumento da SOD.

3
 4

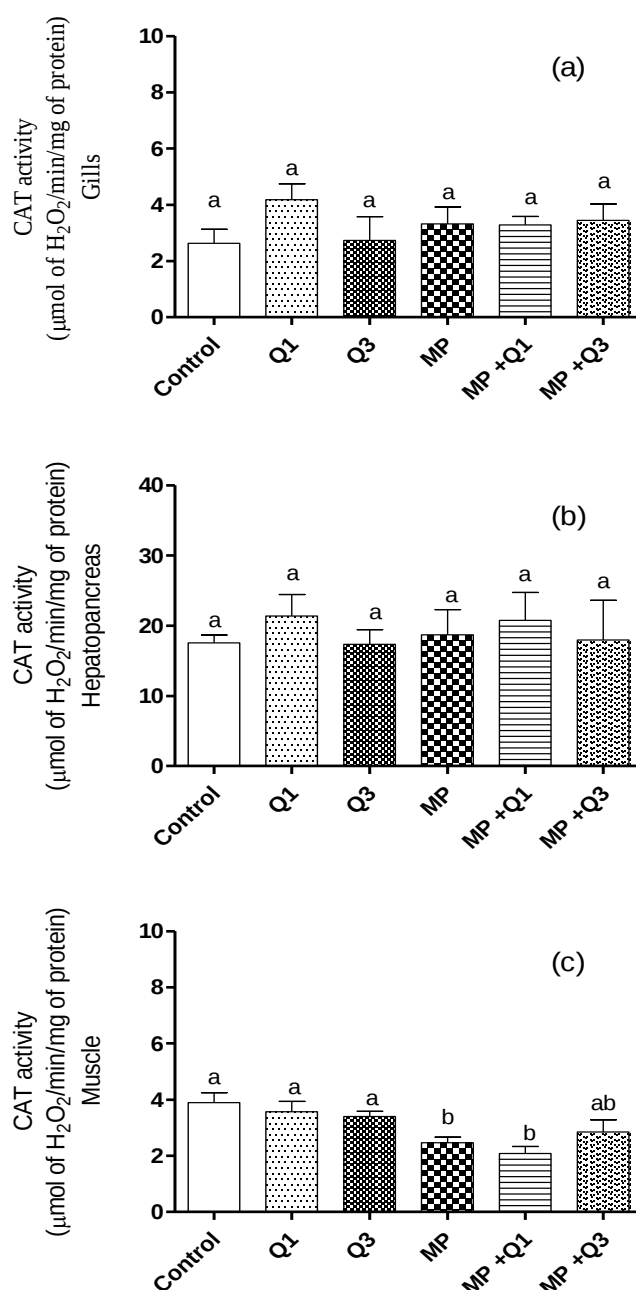


5
 6

7 **Figura 3.** Atividade da SOD (média $\pm$ erro padrão) em brânquias (a), hepatopâncreas
 8 (b) e músculo (c) de juvenis de *P. vannamei* alimentados com dieta contendo diferentes níveis
 9 de quitosana durante 30 dias e após, serem expostos por 7 dias aos microplásticos. Letras
 10 iguais indicam ausência de diferenças significativas ($p > 0,05$).

1 4.3.2. Catalase (CAT)

2 Em brânquias e hepatopâncreas (a e b, respectivamente) nenhum tratamento induziu
 3 mudanças na atividade da CAT ($p > 0,05$). Em músculo (c), os grupos expostos aos MP
 4 reduziu a atividade da CAT ($p < 0,05$), porém, nenhum tratamento com quitosana (MP + Q1 e
 5 MP + Q3) mostraram reverter este efeito (Figura 4).



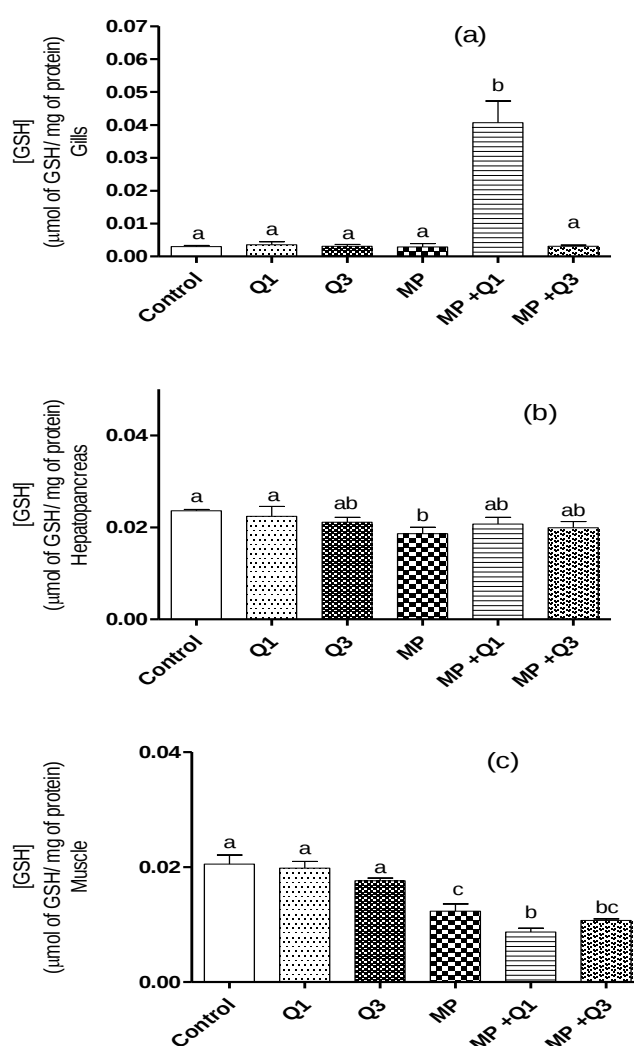
6

7 **Figura 4.** Atividade da CAT (média $\pm$ erro padrão) em brânquias (a), hepatopâncreas
 8 (b) e músculo (c) de juvenis de *P. vannamei* alimentados com dieta contendo diferentes níveis

de quitosana durante 30 dias e após, serem expostos por 7 dias aos microplásticos. Letras iguais indicam ausência de diferenças significativas ($p>0,05$).

4.3.3. Glutathiona reduzida (GSH)

Em brânquias (a) foi observado um aumento significativo ($p<0,05$) dos níveis de GSH no grupo exposto aos MP+Q1, enquanto nos outros tratamentos nenhuma alteração nos níveis de GSH foi observada ($p>0,05$). No hepatopâncreas (b) os níveis de GSH foram diminuídos no grupo exposto somente aos MP ($p<0,05$). No músculo (c), houve diminuição ($p<0,05$) nos níveis de GSH nos grupos expostos aos MP sozinho ou nos pré-tratados com quitosana (MP+Q1) (Figura 5).



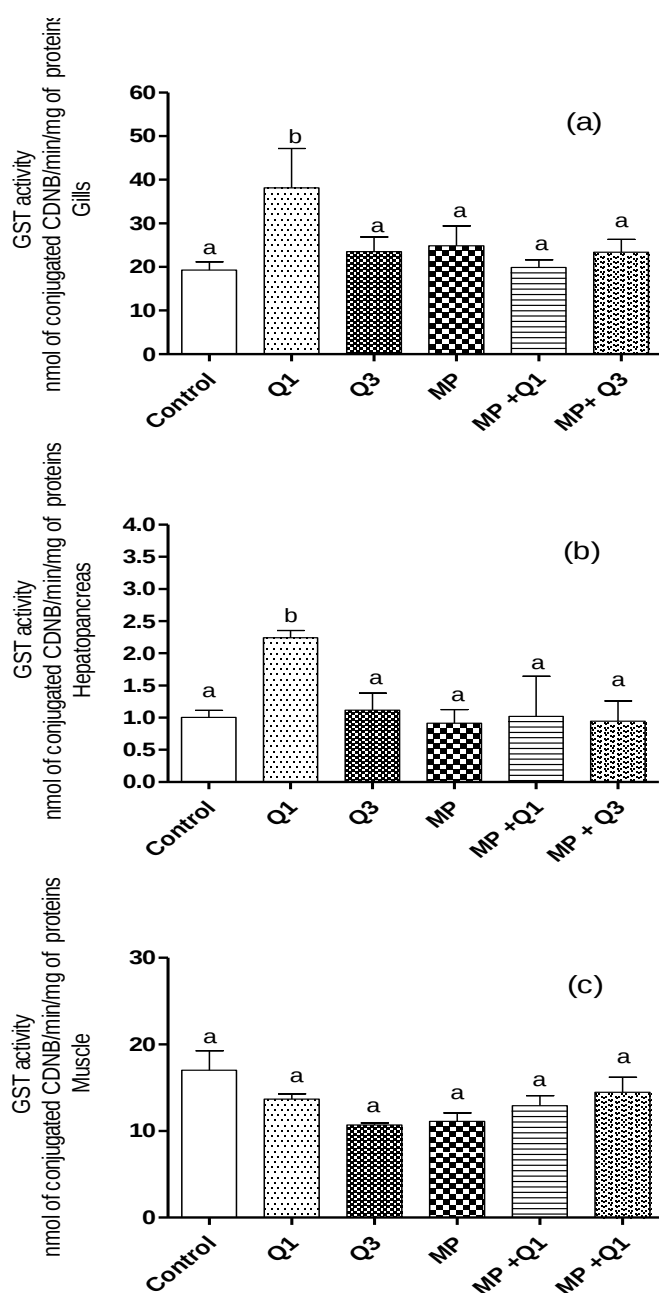
10

11 **Figura 5.** Concentração de GSH (média $\pm$ erro padrão) em brânquias (a),
 12 hepatopâncreas (b) e músculo (c) de juvenis de *P. vannamei* alimentados com dieta
 13 contendo diferentes níveis de quitosana durante 30 dias e após, serem expostos por 7

1 dias aos microplásticos. Letras iguais indicam ausência de diferenças significativas
 2 ($p>0,05$).

3 4.3.4. Glutathione-S-transferase (GST)

4 Tanto em brânquias (a) quanto hepatopâncreas (b), somente no grupo exposto a
 5 quitosana (1 mg/kg) foi observado um aumento na atividade da GST ($p<0,05$) os demais
 6 tratamentos não mostraram alterar a atividade da enzima ($p>0,05$). No músculo (c) a
 7 atividade da GST não foi modulada por nenhum tratamento ($p>0,05$) (Figura 6).



8
 9 **Figura 6.** Atividade da GST (média $\pm$ erro padrão) em brânquias (a), hepatopâncreas
 10 (b) e músculo (c) de juvenis de *P. vannamei* alimentados com dieta contendo diferentes níveis

de quitosana durante 30 dias e após, serem expostos por 7 dias aos microplásticos. Letras iguais indicam ausência de diferenças significativas ($p>0,05$).

4.3.5. Peroxidação lipídica (TBARS)

Em brânquias (a) nenhum tratamento induziu peroxidação lipídica ($p>0,05$). Em hepatopâncreas (b), a exposição somente aos MP induziu peroxidação lipídica e o pré-tratamento com quitosana na concentração mais baixa (MP + Q1) mostrou reverter estes danos enquanto nos grupos MP + Q3 esta reversão não foi observada. Em músculo (c), nenhum tratamento mostrou induzir danos lipídicos ($p>0,05$) (Figura 7).

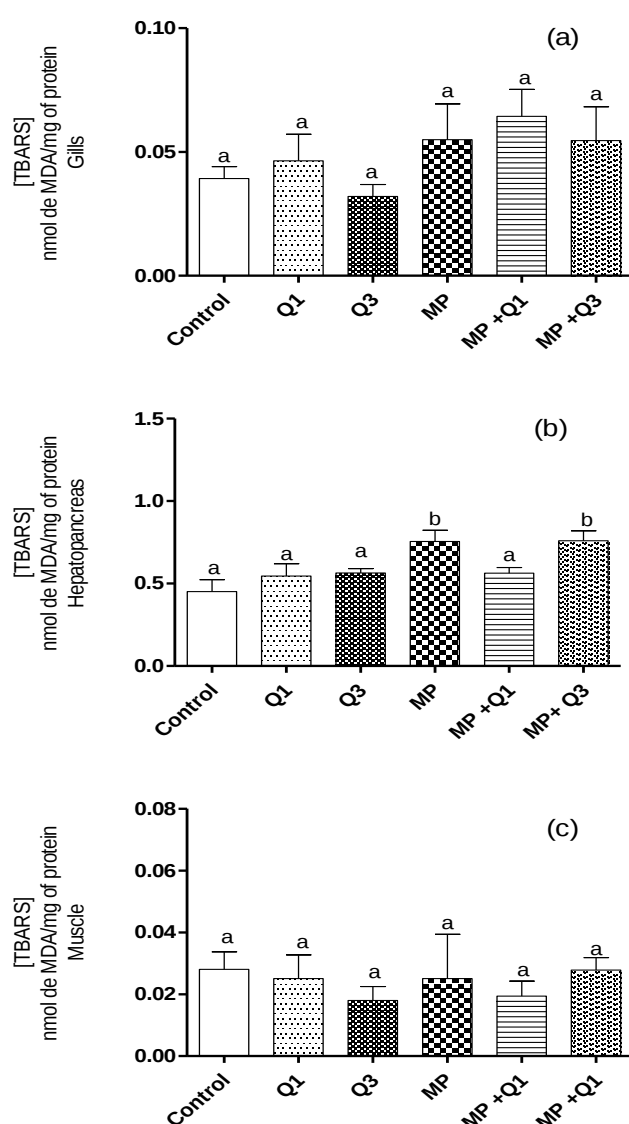
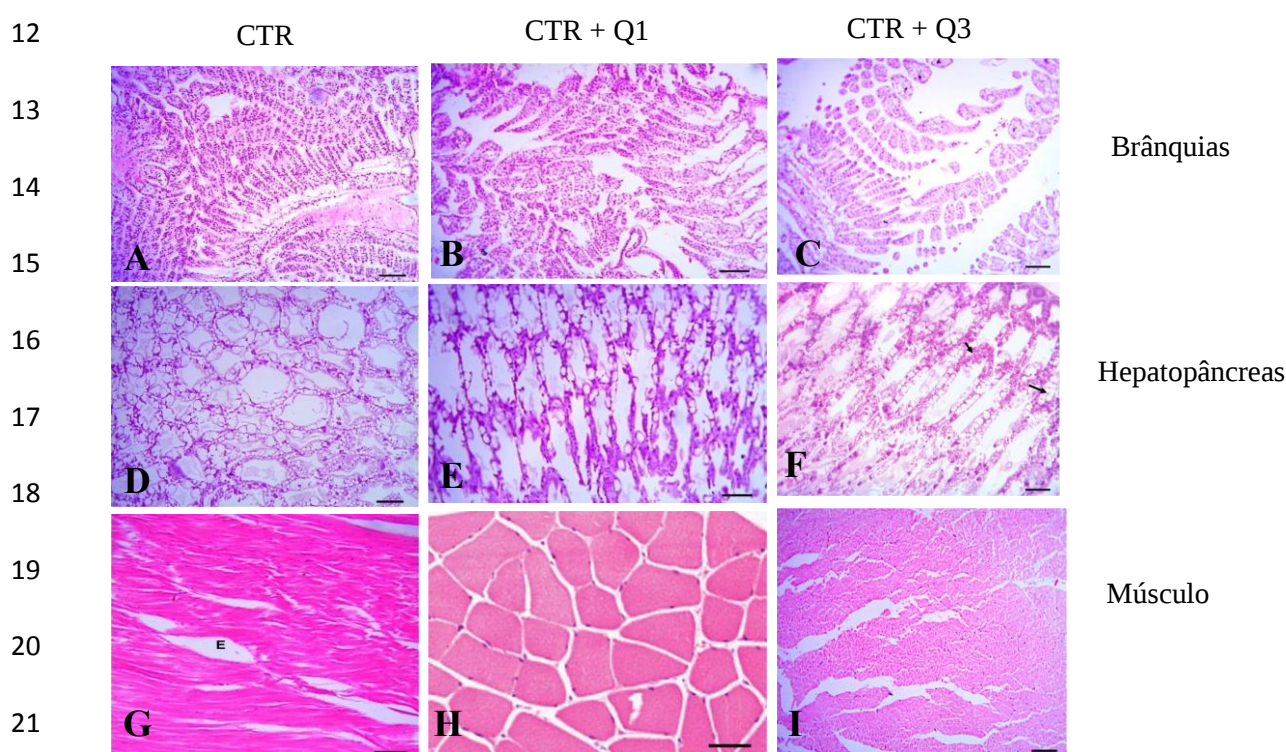


Figura 7. Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (média $\pm$ erro padrão) em brânquias (a), hepatopâncreas (b) e músculo (c) de juvenis de *P. vannamei* alimentados com dieta contendo diferentes níveis de quitosana durante 30

1 dias e após, serem expostos por 7 dias aos microplásticos. Letras iguais indicam
2 ausência de diferenças significativas ($p>0,05$).

3 4.4. Análise histológica

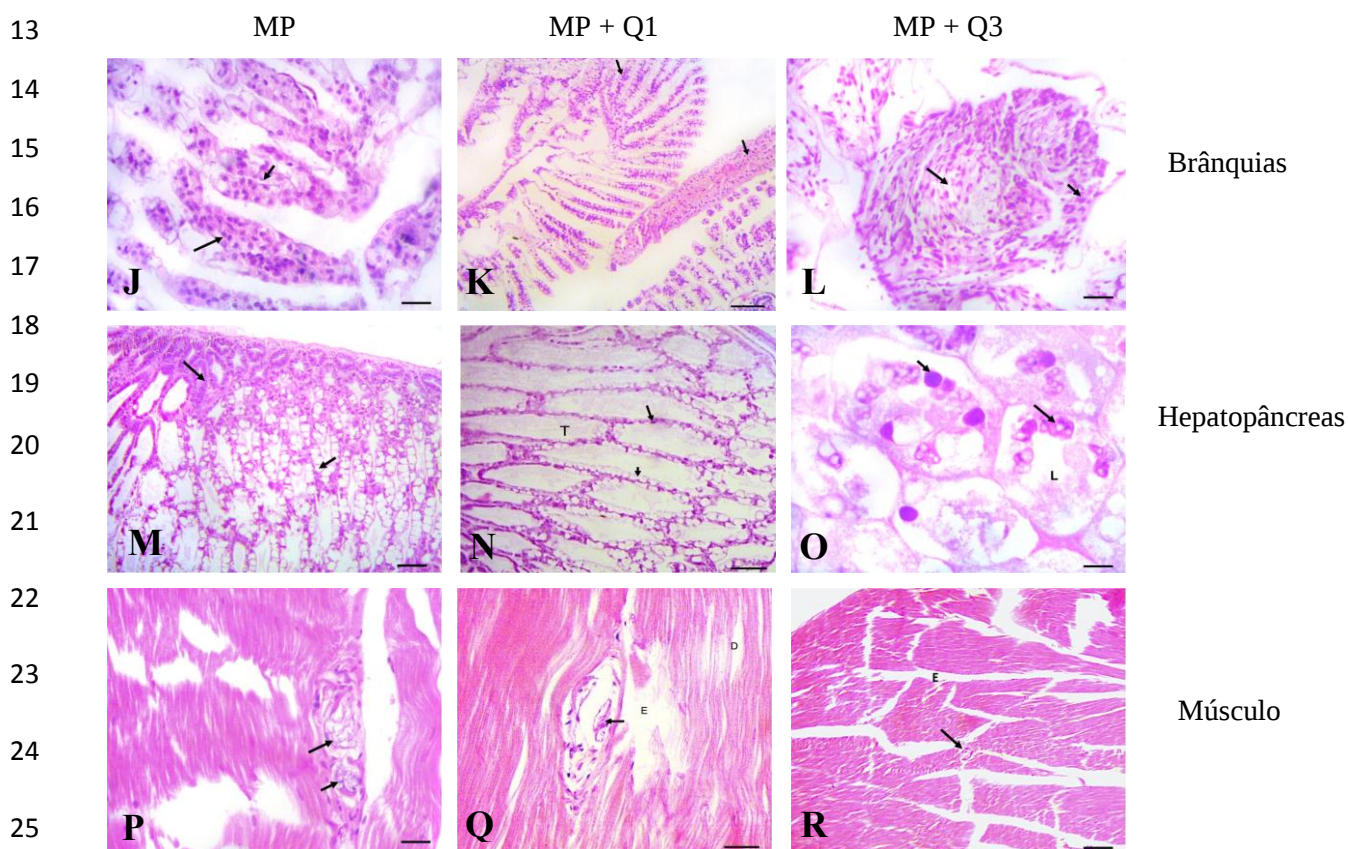
4 No grupo controle e nos tratamentos tratados com quitosana as brânquias (a, b e c,
5 respectivamente) não apresentaram lesões significativas. Em hepatopâncreas (d, e, f,
6 respectivamente) o grupo CTR e CTR+Q1 também não apresentaram lesões
7 significativas, porém no grupo CTR+Q3 observou-se leve hiperplasia de células
8 tubulares (seta curta) e aumento de células muco secretantes (seta longa). Enquanto no
9 músculo esquelético (g, h e i, respectivamente) somente o tratamento CTR apresentou
10 edema interfibrilar (E), de forma que, os grupos CTR+Q1 e CTR+Q3 não apresentaram
11 lesões significativas (Figura 8).



22 **Figura 8.** Imagens dos tecidos (brânquias, hepatopâncreas e músculo) de juvenis
23 de *P. vannamei* alimentados com dieta contendo diferentes níveis de quitosana durante
24 30 dias, sendo os tratamentos controle (CTR), controle mais quitosana 1mg/kg
25 (CTR+Q1) e controle mais quitosana 3mg/kg (CTR+Q3). Corados com hematoxilina-
26 eosina (H-E), BAR = 200 μ m.

27 Em brânquias (j, k e l, respectivamente) nos tratamentos MP e MP+Q1 observou-
28 se hiperplasia das células da lamínula branquial, além de aderências focais entre as
29 lamínulas (setas), enquanto no tratamento MP+Q3 além da hiperplasia e aderências

1 houve uma alteração da estrutura branquial (setas). O hepatopâncreas (M) no grupo MP
2 apresentou hiperplasia tubular basal (seta longa) e hiperplasia de células muco
3 secretantes (seta curta), em MP+Q1 (N) além da hiperplasia (seta curta) houve uma
4 dilatação tubular (T) e inclusão eosinófila nas células tubulares (seta longa), enquanto
5 em MP+Q3 (O) observou-se células tubulares hipercromáticas (seta curta) e material
6 eosinófilo citoplasmático (seta longa) ao redor da luz tubular (L). No músculo
7 esquelético do grupo MP (P) observou-se lesão de aspecto granulomatosa com células
8 contendo material eosinófilo no citoplasma (seta longa) e células de aspecto espumoso
9 com vesículas parcialmente eosinófilas (seta curta). Enquanto em MP+Q1 (Q) houve
10 dissociação das fibras (D), edema interfibrilar (E) e inclusão de material eosinófilo
11 (seta), além de edema interfibrilar (E) e inclusão eosinófilas entre as fibras (seta) no
12 tratamento MP+Q3 (R) (Figura 9).



26 **Figura 9.** Imagens dos tecidos (brânquias, hepatopâncreas e músculo) de juvenis
27 de *P. vannamei* alimentados com dieta contendo diferentes níveis de quitosana durante
28 30 dias e após a exposição de 7 dias aos microplásticos de poliestireno, sendo os
29 tratamentos microplásticos (MP), microplásticos mais quitosana 1mg/kg (MP+Q1) e

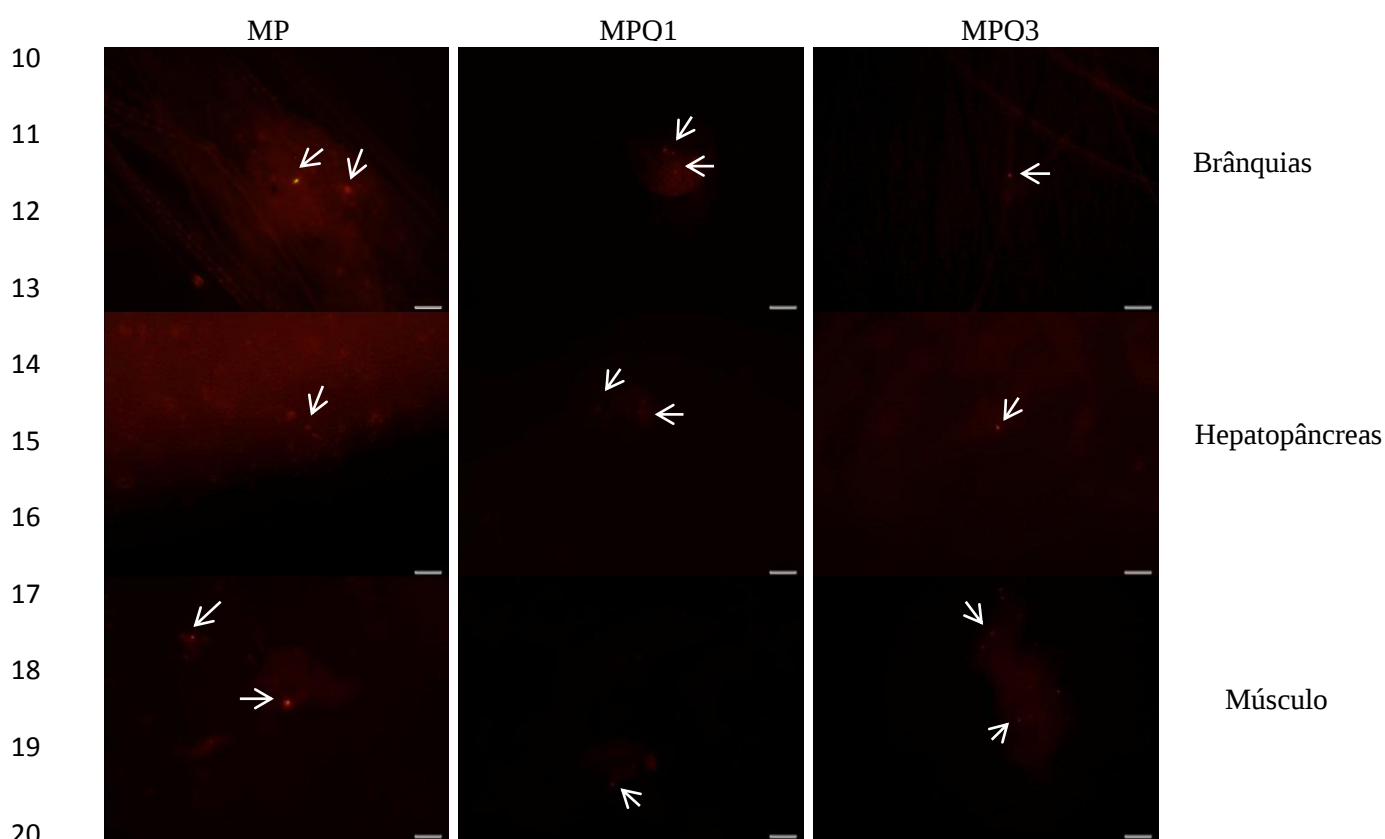
1 microplásticos mais quitosana 3mg/kg (MP+Q3). Corados com hematoxilina-eosina (H-
2 E), BAR = 200 µm.

3

4 4.5. Análise de acumulação dos microplásticos

5 O acúmulo dos microplásticos fluorescente (poliestireno, esférico 1,0 µm) foi
6 observado em microscópio de fluorescência e se constatou que os microplásticos se
7 acumulam nos diferentes tecidos do animal, de forma que a quitosana não mostrou
8 evitar este acúmulo (Figura 10).

9



21 **Figura 10.** Acumulação dos microplásticos nos tecidos (brânquias,
22 hepatopâncreas e músculo) de juvenis de *P. vannamei* alimentados com dieta contendo
23 diferentes níveis de quitosana durante 30 dias e após a exposição de 7 dias, sendo os
24 tratamentos microplásticos (MP), microplásticos mais quitosana 1mg/kg (MP+Q1) e
25 microplásticos mais quitosana 3mg/kg (MP+Q3). As setas brancas indicam a posição
26 acumulada nos diferentes tecidos.

5. DISCUSSÃO

Em um sistema de cultivo a qualidade da água é fundamental para que o animal tenha um bom desempenho, no presente trabalho os resultados mostraram que durante o período de alimentação das dietas do experimento I, apesar de ter sido detectada diferença significativa na temperatura no tratamento quitosana (3 mg) esse parâmetro juntamente com os demais (oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade e salinidade) estiveram dentro dos recomendados para a espécie (Ebeling et al., 2006; Zhang et al., 2006). Da mesma forma os compostos nitrogenados como a amônia total, nitrito, nitrato e fosfato estiveram dentro dos níveis seguros para a espécie em todos os tratamentos (Lin e Chen, 2001, 2003; Van Wyk e Scarp, 1999). Em relação aos parâmetros de crescimento, os resultados mostraram que suplementação com a quitosana não foi um fator limitante para o desenvolvimento de *P. vannamei* já que não houve diferenças entre os parâmetros e a sobrevivência foi de 100% para ambos os tratamentos. Um resultado semelhante também foi observado por Brol et al. (2021) em *P. vannamei* submetido ao mesmo tempo de suplementação que este estudo. Entretanto, Abd El-Naby et al. (2018) ao suplementar *Oreochromis niloticus* com diferentes níveis de quitosana, mostraram diferenças significativas na atividade das enzimas digestivas, levando a aumentos subsequentes no consumo de ração, e consequentemente ao aumento no crescimento dos peixes. Talvez, a quitosana para *P. vannamei* tenha um papel mais quimioprotetor do que contribuir para o crescimento como é observado para outras espécies.

Considerando a exposição aos MP, estes podem ser ingeridos por crustáceos podendo chegar ao trato gastrointestinal, atravessar as barreiras biológicas e serem distribuídos em diferentes tecidos através do sistema linfático (D'Costa, 2022) chegando em tecidos como brânquias, músculo e hepatopâncreas. Por esta razão, neste estudo, foi avaliado os efeitos dos MP e o potencial efeito protetor da quitosana em diferentes tecidos do camarão *Penaeus vannamei*.

Neste estudo, foi observado a presença de MP em todos os tecidos analisados, similarmente, Zeng et al. (2023) e Suanes et al. (2023) também observaram a acumulação de MP em diferentes tecidos do camarão *P. vannamei*. Yu et al. (2018) observaram microesferas de poliestireno em fígado, intestino e brânquias de *Eriocheir sinensis*. Embora os diferentes organismos possuam capacidade de eliminar parte dos

1 MP principalmente através das fezes, alguns devido ao seu pequeno tamanho se
2 distribuem e acumulam em diferentes tecidos, mas o tempo de permanência nestes
3 tecidos pode ser suficiente para causar efeitos nestes tecidos (Hsieh et al., 2021).

4 A exposição aos MP tem mostrado induzir diversas alterações nos organismos
5 como alterações comportamentais, diminuição do sistema imune, crescimento e
6 reprodução em diferentes modelos biológicos (Mueller et al., 2020; Sun et al., 2022;
7 Zeng et al., 2023). Estes efeitos mostram estar associados a um cenário de estresse
8 oxidativo que pode ser evidenciado por alterações no sistema de defesa antioxidante,
9 danos oxidativos ou alterações em vias de sinalização redox das células (Jones, 2006).
10 Enzimas como SOD e CAT fazem parte da linha de defesa primária contra as Espécies
11 Reativas de Oxigênio (ERO) que são produzidas, com a SOD catalisando a dismutação
12 do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez, é
13 transformado em oxigênio molecular (O_2) e água (H_2O) pelas enzimas CAT e GPx
14 (Lushchak, 2016; Ighodaro e Akinloye, 2018).

15 Neste estudo, nas brânquias, a atividade da enzima SOD não mostrou diferença
16 significativa em nenhum tratamento. Este resultado é similar ao de Santos et al. (2022)
17 para brânquias de *Danio rerio* após exposição aos MP (2 mg/L). Nos crustáceos o
18 tecido branquial é conhecido por desempenhar um papel importante na respiração e
19 manutenção do equilíbrio iônico via osmorregulação, portanto, as brânquias além da
20 glândula antenal, são consideradas um local excretor, do qual é utilizado pelo animal,
21 neste sentido, podemos inferir que as brânquias por ser uma estrutura que está
22 diretamente em contato com a água deva ter mecanismos de defesa mais sensíveis e
23 desta forma diminuir o comprometimento de funções fisiológicas importantes
24 associadas às brânquias.

25 No hepatopâncreas, a exposição somente aos MP mostrou aumentar a atividade da
26 SOD indicando que neste tecido o contaminante induziu um desequilíbrio redox devido
27 ao aumento do radical ânion superóxido (**Figura 3b**). Um resultado semelhante também
28 foi observado no intestino médio do camarão *Palaemon varians* expostos a diferentes
29 tamanhos de poliestireno (Saborowski et al., 2022), reforçando que estes tecidos são
30 vulneráveis aos efeitos dos MP e que o contato com estas micropartículas induz a
31 produção de radical ânion superóxido. Entretanto, no presente estudo, nos animais que
32 receberam o pré-tratamento com quitosana de 3 mg/kg de ração mostrou reverter esta
33 situação reduzindo a atividade da enzima ao nível basal (controle), porém, o pré-

1 tratamento com 1 mg/ kg de ração não foi efetivo para normalizar a atividade da
2 enzima. Brol et al. (2021) também observaram que a suplementação com quitosana (3
3 mg/Kg de ração) reduz a atividade da SOD em hepatopâncreas de *P. vannamei*
4 submetido ao choque salino. A hipótese para este resultado é que a quitosana por ser um
5 antioxidante com capacidade de “sequestrar” radicais livres diminui a disponibilidade
6 de radical ânion superóxido não sendo, portanto, necessário aumentar a atividade da
7 enzima para lidar com esta ERO. Entretanto, a exposição aos MP mostrou induzir um
8 cenário pró-oxidativo em hepatopâncreas e isso pode levar a sérias consequências aos
9 organismos uma vez que o hepatopâncreas é um órgão multifuncional, com capacidade
10 de desintoxicação, absorção de nutrientes, síntese de enzimas digestivas, resposta
11 imune, bem como desenvolvimento gonadal (Vogt, 2019). Comprometer o
12 funcionamento desse órgão implica afetar qualquer uma de suas funcionalidades, como
13 inibir/reduzir o crescimento, por exemplo, uma vez que, a má absorção induzida por
14 microplásticos, resulta em diminuição da ingestão de energia e conversão alimentar. De
15 fato, Yu et al. (2018) mostraram redução no crescimento do caranguejo (*Eriocheir*
16 *sinensis*) expostos aos MP.

17 O músculo mostrou aumentar a atividade da enzima somente no grupo que foi
18 exposto aos MP indicando que neste tecido também houve uma disrupção do equilíbrio
19 redox das células. Porém, MP+Q1 mostrou reverter esta situação, indicando que a
20 menor concentração de quitosana pode melhorar as defesas do músculo. Nesse sentido,
21 o resultado evidencia a importância da inclusão de antioxidantes na dieta, como o uso
22 da quitosana, uma vez que, o tecido conseguiu se recuperar frente à exposição, e que
23 pode também contribuir no melhoramento da qualidade da carne como produto final,
24 além de aumentar o tempo de prateleira. Isso se dá através da redução da peroxidação
25 lipídica no músculo, a qual mantém também os valores nutricionais (Qiu et al., 2016;
26 Simião et al., 2020), tendo em vista que o músculo é uma fonte de proteína para o
27 consumo humano e de grande interesse para a aquacultura. Nessa mesma linha, Banaee
28 et al. (2015) investigou os efeitos dos antioxidantes suplementados na dieta, incluindo
29 vitamina C e quitosana na carpa (*Cyprinus carpio*) exposto ao cádmio. Os resultados
30 mostraram que a suplementação de vitamina C combinada com a quitosana pode
31 aumentar a eficiência do sistema de defesa antioxidante de peixes expostos ao metal.

32 A catalase é responsável por catalisar a degradação do H_2O_2 em água e oxigênio.
33 A ação dessa enzima é de grande importância, uma vez que o H_2O_2 tem a capacidade,

1 por meio de reações gerar o radical hidroxila (HO•), considerado o radical mais reativo
2 e que não há uma enzima específica para sua remoção (Halliwell e Gutteridge, 2007). A
3 atividade desta enzima tende a ser aumentada quando há um aumento na concentração
4 de H₂O₂ (Powers et al., 1999). No presente estudo, a atividade da enzima foi reduzida
5 significativamente em músculo dos animais expostos somente aos MP (**Figura 4b**).
6 Uma possível explicação para isso é que os MP induziram uma alteração no estado
7 redox do músculo a ponto de causar inibição na atividade da CAT. De fato, é bem
8 conhecido que o aumento nos níveis de ERO reduz a atividade de enzimas como a CAT
9 por atuarem diretamente sobre a estrutura da enzima (Barbosa et al., 2010; Kim et al.,
10 2021). Wan et al. (2019) mostraram que a atividade da CAT foi diminuída em peixe-
11 zebra tratado com microplásticos de poliestireno, este declínio pode ser explicado pelo
12 gasto energético do estresse oxidativo em resposta à exposição aos MP. Além disso,
13 este cenário pode afetar não só o sistema de defesa antioxidante, como também outros
14 processos fisiológicos, como por exemplo, o crescimento, reprodução ou
15 comportamento, uma vez que, os MP ao permanecerem no trato digestivo do organismo
16 podem bloquear o canal alimentar e induzir a uma falsa saciedade, reduzindo as reservas
17 energéticas e contribuindo para redução do crescimento do animal. De fato, Liang et al.
18 (2021) ao avaliarem a influência dos microplásticos de poliestireno em rotíferos
19 (*Brachionus calyciflorus*) sobre o crescimento, reprodução e respostas antioxidantes,
20 mostraram que a exposição aos MP afetou estes processos no animal. Um estudo
21 anterior confirmou que substâncias tóxicas inibem a atividade de enzimas antioxidantes,
22 a suplementação energética e afetam a reprodução de rotífero (Liang et al., 2020).

23 O tripeptídeo glutathiona reduzida (GSH) é crucial na detoxificação e regulação do
24 estresse oxidativo atuando como um co-substrato da GST, além de estar envolvida em
25 uma série de outros processos que mantém a homeostasia celular, logo, a manutenção
26 dos níveis de GSH é de extrema importância, visto que, é um importante indicador da
27 capacidade antioxidante dos tecidos (Liu et al., 2020). No presente estudo, a exposição
28 aos MP mostrou reduzir os níveis de GSH em hepatopâncreas e músculo indicando que
29 a exposição ao contaminante reduz a capacidade antioxidante do animal. Um resultado
30 semelhante foi observado por Lee et al. (2023) no peixe *Pseudobagrus fulvidraco*
31 expostos aos MP. No presente estudo, o pré-tratamento com quitosana não mostrou
32 reverter esta diminuição nas concentrações de quitosana utilizadas (1 e 3 mg/ Kg de
33 ração). Entretanto, a suplementação de quitosana (3 mg/Kg) mostrou aumentar os níveis

1 de GSH em hepatopâncreas de *P. vannamei* quando os camarões foram submetidos ao
2 choque salino, porém, esta diferença pode estar associada ao efeito antioxidante do
3 bioflocos (BFT) em que os animais foram mantidos no experimento de choque salino
4 (Brol et al., 2021). Esta redução dos níveis de GSH observadas em resposta à exposição
5 aos MP pode ter efeitos nocivos importantes à longo prazo uma vez que o
6 hepatopâncreas é o principal órgão de acumulação de xenobióticos além de ser o
7 principal órgão metabolizador em camarões. Portanto, a redução dos níveis de GSH em
8 algum tecido pode resultar em maior acumulação de xenobióticos bem como redução na
9 capacidade detoxificatória e proteção contra danos oxidativos.

10 Outro resultado preocupante, é que no músculo, a exposição aos MP também
11 mostrou reduzir os níveis de GSH e a quitosana também não mostrou reverter esta
12 diminuição. A redução nos níveis de GSH deixa o músculo mais vulnerável, uma vez
13 que, a GSH está ligada à reação antioxidante para remover as ERO geradas pela
14 exposição aos MP bem como conjugar com xenobióticos ou produtos de danos para
15 eliminação das células. Levando em consideração os animais de cultivo, a redução nos
16 níveis de GSH pode acarretar na perda de valores nutricionais, oxidação de lipídeos e
17 proteínas e por fim na qualidade da carne do animal, além de reduzir o tempo de
18 prateleira. Além disso, devido à redução de GSH pode também haver mais acúmulo de
19 MP e/ou outros contaminantes e consequentemente aumentar a exposição do
20 consumidor final uma vez que a maior parte dos MP chega a estes através da
21 alimentação.

22 A GST é mais uma das enzimas envolvidas na detoxificação celular sendo uma
23 das principais responsáveis pela eliminação de compostos tóxicos bem como produtos
24 de danos (Goto et al., 2009). Os resultados do presente estudo mostraram que tanto em
25 brânquias quanto hepatopâncreas, somente no grupo exposto a quitosana (1 mg/kg) foi
26 observado um aumento na atividade da GST. Esse aumento da atividade da enzima
27 pode indicar o papel da quitosana na melhora da capacidade de detoxificação dos
28 animais, sugerindo que a suplementação nesta concentração pode deixar o animal mais
29 resistente a outras situações estressoras dentro do cultivo. Essa modulação positiva pode
30 estar associada à capacidade da quitosana em modular o fator de transcrição Nrf2
31 (Hyung et al., 2016; Wang et al., 2020; Yan et al., 2017). O Nrf2 desempenha um papel
32 central na homeostase dos animais ao regular a expressão de diversos genes, entre eles,
33 genes ligados ao sistema antioxidante e de detoxificação (Suzuki e Yamamoto, 2017).

1 Porém, na presença de MP parece que a quitosana se torna indisponível para estimular a
2 atividade da enzima.

3 A peroxidação lipídica apresenta diversos inconvenientes, incluindo a perda de
4 valores nutricionais e sensoriais, bem como a formação de compostos potencialmente
5 tóxicos que comprometem a qualidade da proteína e reduzem sua vida útil (Okpala et
6 al., 2016). No presente estudo, brânquias e músculo não apresentaram danos lipídicos
7 em nenhum tratamento. Porém, em hepatopâncreas, a exposição aos MP induziu
8 peroxidação lipídica, Zeng e colaboradores (2023) também observaram danos lipídicos
9 em *P. vannamei* após exposição à microesferas de poliestireno. Danos lipídicos podem
10 também comprometer outras funções do animal, uma vez que, na maioria dos
11 crustáceos, o hepatopâncreas é o local importante para armazenar e metabolizar
12 carboidratos e lipídios, que por sua vez atende à demanda energética de atividades
13 fisiológicas, como a muda e reprodução, além de auxiliar o animal a superar condições
14 adversas, como a fome e poluição. Diversos estudos têm mostrado que a exposição aos
15 MP desencadeia um cenário de estresse oxidativo podendo resultar em diversos
16 problemas fisiológicos como alterações no sistema imune, neurotoxicidade, retardo no
17 crescimento, diminuição das reservas energéticas, composição nutricional, distúrbios
18 hormonais, alterações comportamentais e danos aos órgãos reprodutores (Dhar et al.,
19 2023; Chisada et al., 2019; Yin et al., 2018).

20 Os microplásticos podem induzir danos estruturais que podem comprometer o
21 funcionamento dos diferentes tecidos do animal. No presente trabalho, na análise
22 histológica das brânquias em todos os tratamentos foi possível observar danos como
23 hiperplasia das células da lamínula branquial, aderências focais entre as lamínulas, além
24 de alteração da estrutura branquial. As brânquias dos crustáceos é um órgão
25 multifuncional sendo responsável por vários processos fisiológicos, incluindo o
26 transporte de íons, que é a base da osmorregulação da hemolinfa, equilíbrio ácido-base e
27 excreção de amônia. Além de ser o local pelo quais muitos compostos tóxicos são
28 absorvidos por organismos aquáticos e, portanto, desempenha um papel importante na
29 toxicologia dessas espécies (Henry et al., 2012). Isso implica dizer que, danos causados
30 nesse tecido pode comprometer a funcionalidade do organismo como um todo,
31 principalmente na respiração, uma vez que, como observado a hiperplasia está entre as
32 primeiras alterações que surgem quando há um aumento na concentração de compostos

1 tóxicos, caracterizando-se pelo aumento na proliferação das células no epitélio a qual
2 pode levar à fusão lamelar e rompimento das células pilares (sustentação das brânquias
3 e circulação da hemolinfa), de forma a diminuir a área de superfície e aumentando a
4 barreira de difusão ao poluente, deixando o tecido branquial vulnerável. Em resultado
5 semelhante, Hsieh et al. (2021) evidenciaram encolhimento dos filamentos branquiais
6 nas concentrações mais baixas de microplásticos (0.1, 0.2 e 1.0 µg/L) e uma
7 deformidade da estrutura branquial nas concentrações mais altas utilizadas (0.2, 0.5 e
8 1.0 µg/L). Em hepatopâncreas, o grupo de MP apresentou hiperplasia tubular basal e
9 hiperplasia de células muco secretantes, já nos tratados com quitosana (MP+Q1) além
10 da hiperplasia houve uma dilatação tubular e inclusão eosinófila nas células tubulares,
11 enquanto que nos MP+Q3 observou-se células tubulares hipercromáticas e material
12 eosinófilo citoplasmático ao redor da luz tubular. É importante ressaltar que o
13 hepatopâncreas é responsável pela metabolização e nutrição dos crustáceos, de forma
14 que, alterações nesse órgão podem afetar drasticamente na capacidade de
15 desintoxicação do organismo, dificultando a eliminação dos MP. O aumento do número
16 de células (hiperplasia) pode causar alterações fisiológicas, como por exemplo, na
17 alimentação, comportamento, reprodução, crescimento do animal, uma vez que, os MP
18 podem se translocar do trato gastrointestinal para o hepatopâncreas causando disfunção
19 celular e lesões graves. Niemcharoen et al. (2022) ao suplementar *P. vannamei* com
20 ração contaminada com microplásticos, mostraram lesões histopatológicas como
21 infiltração de hemócitos intersticiais, hiperplasia do epitélio, deformidade tubular,
22 formação de nódulos e melanização, evidenciando inflamação crônica, resultando na
23 diminuição da expressão gênica do sistema imunológico. No músculo esquelético
24 observou-se lesão de aspecto granulomatosa com células contendo material eosinófilo
25 no citoplasma e células de aspecto espumoso com vesículas parcialmente eosinófilas,
26 além de dissociação das fibras e edema interfibrilar. Nos crustáceos o tecido muscular é
27 responsável por dar suporte ao corpo do animal, funcionando como um tecido primário
28 que está envolvido na locomoção e movimento dos apêndices, peristaltismo e
29 movimento da hemolinfa (Ross et al., 2019). Como mostrado no presente trabalho,
30 danos estruturais como os que foram observados podem comprometer a função desse
31 tecido deixando o animal mais vulnerável. Hsieh et al., 2021 mostraram que as fibras
32 musculares foram lisadas na concentração mais baixa de MP e uma deformidade e
33 dissociação das fibras nas concentrações mais altas utilizadas. Neste estudo a
34 suplementação com quitosana não mostrou evitar os danos causados pelos MP embora

em alguns parâmetros de estresse oxidativo foi possível observar que a quitosana pode reverter ou melhorar os efeitos induzidos pela exposição aos MP.

Outro aspecto importante é que os MP servem de carreadores de microorganismos a longa distância que podem promover a disseminação de patógenos, além de ter a capacidade de adsorver poluentes como metais, portanto, a exposição aos MP pode também ser vetor de contaminação por outros xenobióticos e patógenos. Assim, os MP ao se acumular no músculo do animal, podem acarretar em um grave problema de segurança de saúde alimentar aos humanos, uma vez que, este tecido é a parte comestível e comercializada. Estudos já tem demonstrado essa problemática do acúmulo de MP em animais de aquacultura, uma vez que, os MP podem ser transferidos através da cadeia alimentar chegando até o consumidor final (Dong et al., 2021; Elizalde-Velázquez e Gómez-Oliván, 2021; Amélia et al., 2021).

6. CONCLUSÕES

A exposição aos MP tem mostrado diversos efeitos tóxicos sobre diferentes organismos aquáticos e grande parte destes efeitos está associada ao estresse oxidativo. Neste estudo, foi possível observar a presença de MP em todos os tecidos, indicando que mesmo que a exposição tenha sido através da água e o animal tenha absorvido o contaminante principalmente através das brânquias, os MP distribuem-se em diferentes tecidos como hepatopâncreas e músculo, provavelmente, o tamanho do MP tenha influenciado nesta distribuição, visto que partículas maiores são mais difíceis de atravessar as barreiras biológicas. De fato, alguns estudos mostram que partículas maiores acumulam menos que partículas menores (Jeong et al., 2016; Jin et al., 2018; Patra et al., 2022). Além da presença deste MP, os diferentes tecidos mostraram diferentes respostas biológicas sendo que o hepatopâncreas foi o órgão mais afetado por esta exposição, onde foi possível evidenciar danos histológicos e lipídicos bem como diminuição nos níveis de GSH e aumento da atividade da SOD. Porém, o músculo também mostrou ser afetado pela exposição aos MP diminuindo a atividade da CAT, aumentando atividade da SOD e reduzindo os níveis de GSH, porém, neste tecido nenhum dano lipídico foi observado. Estes resultados, mostram que a exposição aos MP induz alterações no equilíbrio redox dos diferentes tecidos do camarão *P. vannamei*, estas alterações redox que a longo prazo pode comprometer funções fisiológicas

1 importantes como crescimento e reprodução uma vez que para lidar com um cenário
2 oxidativo existe uma demanda energética (Sussarellu et al., 2016; Trestrail et al., 2020)
3 comprometendo assim o desenvolvimento dos animais de cultivo.

4 Neste contexto, o uso de antioxidantes exógenos que possam minimizar efeitos e
5 até mesmo economizar o uso de antioxidantes endógenos são bem vindos na prática da
6 aquacultura. Diversos estudos têm sugerido diversos antioxidantes como estratégia de
7 quimioprevenção contra desafios impostos pelo cultivo como hipoxia/reoxigenação,
8 choque salino, entre outros (Lobato et al., 2018, Brol et al., 2021). Neste estudo, foi
9 utilizado a quitosana que é produzida quimicamente usando cascas e cabeças de
10 camarão (rejeitos). A quitosana tem a capacidade de eliminar radicais livres, quelar
11 metais, reestabelecer outros antioxidantes bem como estimular a expressão de genes
12 envolvidos no sistema de defesa antioxidante (Tamer et al., 2016; Abu-Elala et al.,
13 2015; Abdel-Ghany e El-S. Salem, 2020). No presente estudo, o tratamento somente
14 com a quitosana na menor concentração (1 mg/kg de ração) mostrou aumentar a
15 capacidade detoxificatória, através do aumento da atividade da GST em brânquias e
16 hepatopâncreas, porém, quando os animais foram submetidos a exposição aos MP esse
17 aumento na capacidade de detoxificação não foi observado indicando que os MP de
18 alguma forma diminuíram o efeito da quitosana. Considerando o efeito em outros
19 biomarcadores, foi possível observar que dependendo do tecido e do biomarcador a
20 suplementação com quitosana e posterior exposição aos MP mostram efeitos distintos,
21 por exemplo, em hepatopâncreas o tratamento com quitosana (Q3+MP) mostrou
22 restabelecer a atividade da SOD aos níveis do grupo controle e no músculo a menor
23 concentração de quitosana (Q1+ MP) foi o suficiente para induzir este mesmo efeito. A
24 menor concentração de quitosana também mostrou reverter danos lipídicos no
25 hepatopâncreas comparado com o grupo exposto somente aos MP, no entanto, a
26 quitosana não se mostrou eficiente para evitar danos histológicos em resposta à
27 exposição aos MP. As concentrações de quitosana utilizadas no presente estudo foram
28 baseadas no trabalho de Brol et al. (2021) como uma alternativa de suplementação para
29 proteger os efeitos do choque salino e os resultados obtidos no presente estudo sugerem
30 que estas concentrações talvez não sejam as mais adequadas para induzir um efeito
31 protetor generalizado contra os efeitos da exposição aos MP.

32

7. REFERÊNCIAS

- ABU-ELALA, N.M., MOHAMED, S.H., ZAKI, M.M., EISSA, A.E. 2015. Assessment of the immune-modulatory and antimicrobial effects of dietary chitosan on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with special emphasis to its bio-remediating impacts. Fish Shellfish Immunology, 46: 678-685. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.08.004>
- ABD EL-NABY, F.S.A., MOHAMED, A.E., NAIEL ADHAM, A., AL-SAGHEER, S.S., NEGM. 2018. Dietary chitosan nanoparticles enhance the growth, production performance, and immunity in *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 501: 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.014>
- ABDEL-GHANY, H.M., EL-S. SALEM, M. 2020. Effects of dietary chitosan supplementation on farmed fish: a review. Aquaculture, 12: 438-452. <https://doi.org/10.1111/raq.12326>
- AMELIA, T.S.M., KHALIK, W.M.AW.M., ONG, M.C., SHAO, Y.T., PAN, H.J., BHUBALAN, K. 2021. Marine microplastics as vectors of major ocean pollutants and its hazards to the marine ecosystem and humans: a review. Progress in Earth and Planetary Science, 8:12. <https://doi.org/10.1186/s40645-020-00405-4>
- ANDREATTA, E. R., BELTRAME, E. 2004. Cultivo de camarões marinhos. In: POLI, C. R. Aquicultura experiências brasileiras, Florianópolis: Multitarefa, p. 199- 220.
- AOAC International. (1999). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (16th ed), Washington: 114p.
- APHA (American Public Health Association). 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20st edition, Washington, DC: 1193p.
- BANAE, M., MEHRPAK, M., HAGHI, B.N., NOORI, A. 2015. Amelioration of cadmium-induced changes in biochemical parameters of the muscle of Common Carp (*Cyprinus carpio*) by Vitamin C and Chitosan. International Journal of Aquatic Biology, 3 (6): 362-371.
- BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. C. G., PAULA, S. O., MININ, V. P. R., BRESSAN, J. 2008. Oxidative stress: assessment of biomarkers. Revista Nutrire, 33 (2): 111-128.
- BARBOSA, K.B.F., COSTA, N.M.B., DE CÁSSIA GONÇALVES ALFENAS, R., DE PAULA, S.O., MINIM, V.P.R., BRESSAN, J. 2010. Estresse oxidativo: Conceito,

1 implicações e fatores modulatórios. Revista de Nutrição, 23: 629-643.
2 <https://doi.org/10.1590/S141552732010000400013>

3 BELL, T.A., LIGHTNER, D.V. 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology.
4 World Aquaculture Society, Baton Rouge.

5 BEUTLER, E. 1975. Red cell metabolism: A manual of biochemical a methods. Grune
6 e Stron, New York.

7 BIRBEN, E., SAHINER, U.M., SACKESSEN, C., ERZURUM, S., KALAYCI, O. 2012.
8 Oxidative stress and antioxidant defense. World Allergy Organization Journal, 5: 9-
9 19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>

10 BROL, J., MULLER, L., PRATES, E.C.A., FARIAS, B.S., PEDROSA, V.F., PINTO,
11 L.A.A., CADAVAL, T.R.S., TESSER, M.B., WASIELESKY, W., VENTURA-
12 LIMA, J. 2021. Dietary chitosan supplementation in *Litopenaeus vannamei* reared in
13 biofloc system: Effect on antioxidant status facing saline stress. Aquaculture, 544:
14 737034. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737034>

15 CHAE, Y., KIM, D., KIM, S.W., AN, Y.J. 2018. Trophic transfer and individual impact
16 of nano-sized polystyrene in a four-species freshwater food chain. Scientific Reports,
17 8: (1), 284. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18849-y>

18 CHEN, Q., LV, W., JIAO, Y., LIU, Z., LI, Y., CAI, M., WU, D., ZHOU, W., ZHAO,
19 Y. 2020. Effects of exposure to waterborne polystyrene microspheres on lipid
20 metabolism in the hepatopancreas of juvenile redclaw crayfish, *Cherax*
21 *quadricarinatus*. Aquatic Toxicology, 224: 105497.
22 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105497>

23 CHISADA, S., YOSHIDA, M., KARITA, K. 2019. Ingestion of polyethylene
24 microbeads affects the growth and reproduction of medaka, *Oryzias latipes*.
25 Environmental Pollution, 254: 113094. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113094>

26 CURREN, E., LEAW, C.P., LIM, P.T., LEONG, S.C.Y. 2020. Evidence of marine
27 microplastics in commercially Harvested Seafood. Frontiers in Bioengineering and
28 Biotechnology, 8: 562760. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.562760>

29 D`COSTA, A.H., 2022. Microplastics in decapod crustaceans: accumulation, toxicity
30 and impacts, a review. Science of the Total Environment, 832: 154963.
31 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154963>

1 DE OLIVEIRA LOBATO, R., CRUZ, L.C., JOSENDE, M.E., TAVARES, P.B.,
2 WASIELESKY, W., MACIEL, F.E., VENTURA-LIMA, J. 2018. Lipoic acid
3 modulates energetic metabolism and antioxidant defense systems in *Litopenaeus*
4 *vannamei* under hypoxia/reoxygenation conditions. *Aquaculture*, 497: 396-404.
5 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.020>

6 DE SÁ, L. C., OLIVEIRA, M., RIBEIRO, F., ROCHA, T. L., FUTTER, M. N. 2018.
7 Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and
8 where should we focus our efforts in the future? *Science of the Total Environment*,
9 645: 1029-1039. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.207>

10 DHAR, M., JASROTIA, R., LANGER, S., SUWARTININGSIH, N. 2023. Impact of
11 microplastics on reproductive and physiological aspects of aquatic inhabitants. In:
12 RATHER, M.A., AMIN, A., HAJAM, Y.A., JAMWAL, A., AHMAD, I. (eds)
13 *Xenobiotics in aquatic animals*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-](https://doi.org/10.1007/978-981-99-1214-8_6)
14 [99-1214-8_6](https://doi.org/10.1007/978-981-99-1214-8_6)

15 DONG, H., CHEN, Y., WANG, J., ZHANG, Y., ZHANG, P., LI, X., ZOU, J., ZHOU,
16 A. 2021. Interactions of microplastics and antibiotic resistance genes and their effects
17 on the aquaculture environments: a review. *Journal of Hazardous Materials*, 403:
18 123961. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123961>

19 Elizalde-Velázquez, G. A., Gómez-Oliván, L. M. 2021. Microplastics in aquatic
20 environments: A review on occurrence, distribution, toxic effects, and implications
21 for human health. *Science of the Total Environment*, 780: 146551.
22 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146551>

23 ELSOUD, M.M.A., KADY, E.M. El. 2019. Current trends in fungal biosynthesis of
24 chitin and chitosan. *Bulletin of the National Research, Centre*. 43: 59.
25 <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0105-y>

26 EBELING, J.M., TIMMONS, M.B., BISOGNI, J.J. 2006. Análise de engenharia
27 Análise da estequiometria da remoção fotoautotrófica, autotrófica e heterotrófica de
28 amônia-nitrogênio em sistemas de aquicultura. *Aquicultura*, 257: 346-358.

29 FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture.
30 <https://doi.org/10.4060/ca9229en>

1 FAO, 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture. Towards Blue
2 Transformation. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>

3 GARLOCK, T., ASCHE, F., ANDERSON, J., BJØRNDAL, T., KUMAR, G.,
4 LORENZEN, K., ROPICKI, A., SMITH, M.D., TVETERAS, R. 2019. A global blue
5 revolution: Aquaculture growth across regions, species, and countries. Reviews in
6 Fisheries Science e Aquaculture. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1678111>

7 GOTO, S., KAWAKATSU, M., IZUMI, S. ICHI, URATA, Y., KAGEYAMA, K.,
8 IHARA, Y., KOJI, T., KONDO, T. 2009. Glutathione S-transferase π localizes in
9 mitochondria and protects against oxidative stress. Free Radical Biology and
10 Medicine, 46: 1392-1403. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.025>

11 GROSSART, H.P. 2019. The eukaryotic life on microplastics in brackish ecosystems.
12 Frontiers in Microbiology, 10: 538. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00538>

13 HABIG, W.H.P.J. 1974. The First the First. Journal of the Biological Chemistry, 240:
14 11.

15 HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. 2007. Free Radicals in Biology and
16 Medicine. Oxford University Press, New York, United States of America, 4 ed.

17 HANACHI, P., KARBALAEI, S., YU, S. 2021. Combined polystyrene microplastics
18 and chlorpyrifos decrease levels of nutritional parameters in muscle of rainbow trout
19 (*Oncorhynchus mykiss*). Environmental Science and Pollution Research, 28: 64908-
20 64920. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15536-4>

21 HENRY, R.P., LUCU, C., OKEN, H., WEIHRAUCH, D. 2012. Multiple functions of
22 the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion,
23 and bioaccumulation of toxic metals. Frontiers in Physiology, 3: 431.
24 <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00431>

25 HERMES-LIMA, M. 2004. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free
26 Radicals. In: Storey, K.B., Ed., Functional Metabolism: Regulation and Adaptation,
27 John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 319-368.
28 <https://doi.org/10.1002/047167558X.ch12>

29 HOSSAIN, M.S., RAHMAN, M.S., UDDIN, M.N., SHARIFUZZAMAN, S.M.,
30 CHOWDHURY, S.R., SARKER, S., NAWAZ CHOWDHURY, M.S. 2020.

1 Microplastic contamination in penaeid shrimp from the northern bay of bengal.
2 Chemosphere, 238: 124688. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124688>

3 HOU, J., XU, X.Y., CHENG, F., MIAO, L.Z., LIU, Z.L. 2020. Research progress on
4 interaction and environment behavior between microplastics and organic pollutants
5 (in Chinese). Journal of Hohai University (Natural Sciences), 48 (1): 22-28.
6 <http://doi.org/10.3876/j.issn.1000-1980.2020.01.004>

7 HSIEH, S.L., WU, Y.C., XU, R.Q., CHEN, Y.T., CHEN, C.W., SINGHANIA, R.R.,
8 DONG, C.D. 2021. Effect of polyethylene microplastics on oxidative stress and
9 histopathology damages in *Litopenaeus vannamei*. Environmental Pollution, 288:
10 117800. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117800>

11 HUANG, Q.C., ZHANG, S., DU, T., YANG, Q.H., CHI, S.Y., LIU, H.Y., YANG,
12 Y.Z., DONG, X.H., TAN, B.P. 2020. Effects of dietary vitamin E on growth,
13 immunity and oxidation resistance related to the Nrf2/Keap1 signalling pathway in
14 juvenile *Sillago sihama*. Animal Feed Science and Technology, 262: 114403.
15 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114403>

16 HUBER, P.C., ALMEIDA, W.P., FÁTIMA, Â. de. 2008. Glutathione e enzimas
17 relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. Química
18 Nova, 31: 1170-1179.

19 HYUNG, J.H., AHN, C.B., IL KIM, B., KIM, K., JE, J.Y. 2016. Involvement of Nrf2-
20 mediated heme oxygenase-1 expression in anti-inflammatory action of chitosan
21 oligosaccharides through MAPK activation in murine macrophages. European Journal
22 Pharmacology, 793: 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.11.002>

23 IGHODARO, O.M., AKINLOYE, O.A. 2018. First line defence antioxidants-
24 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX):
25 Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Journal
26 Medicine, 54: 287-293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>

27 JEONG, C.B., WON, E.J., KANG, H.M., LEE, M.C., HWANG, D.S., HWANG, U.K.,
28 ZHOU, B., SOUSSI, S., LEE, S.J., LEE, J.S. 2016. Microplastic size-dependent
29 toxicity, oxidative stress induction, and p-JNK and p-P38 activation in the
30 monogonont rotifer (*Brachionus koreanus*). Environmental Science e Technology.
31 <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.6b01441>

1 JEONG, J., CHOI, J. 2019. Adverse outcome pathways potentially related to hazard
2 identification of microplastics based on toxicity mechanisms. *Chemosphere*.

3 JIANG, Y., TANG, X., ZHOU, B., SUN, T., CHEN, H., ZHAO, X., WANG, Y. 2017.
4 The ROS-mediated pathway coupled with the MAPK-p38 signalling pathway and
5 antioxidant system plays roles in the responses of *Mytilus edulis* haemocytes induced
6 by BDE-47. *Aquatic Toxicology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.03.011>

7 JIN, Y., XIA, J., PAN, Z., YANG, J., WANG, W., FU, Z. 2018. Polystyrene
8 microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult
9 zebrafish. *Environmental Pollution*, 235: 322-329.
10 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.088>

11 JONES, D.P. 2006. Clinical Measures of the Balance. *Antioxidants and Redox*
12 *Signaling*, 8: 1865-1879.

13 JORY, D.E., CABRERA, T.R., DUGGER, D.M., FEGAN, D., LEE, P.G.,
14 LAWRENCE, A.L., JACKSON, C.J., MEINTOSH, R.P., CASTAÑEDA, J. 2001. A
15 global review of shrimp feed management: status and perspectives. The World
16 Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 104-152.

17 KAMIL, J.Y.V.A., JEON, Y.J., SHAHIDI, F. 2002. Antioxidative activity of chitosans
18 of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*).
19 *Food Chemistry*, 79: 69-77. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00180-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00180-2)

20 KIM, J.H., YU, Y.B., CHOI, J.H. 2021. Toxic effects on bioaccumulation,
21 hematological parameters, oxidative stress, immune responses and neurotoxicity in
22 fish exposed to microplastics: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 413:
23 125423. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125423>

24 KUMAR M. N. V. R. 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive e*
25 *Functional Polymers*, 46: 1-27.

26 KURITA, K. 2006. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers
27 from Marine Crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8: 203-226.
28 <https://doi.org/10.1007/s10126-005-0097-5>

1 LEE, JU-HYEONG., KANG, JU-CHAN., KIM, JUN-HWAN. 2023. Toxic effects of
2 microplastic (Polyethylene) on fish: Accumulation, hematological parameters and
3 antioxidant responses in Korean Bullhead, *Pseudobagrus fulvidraco*. Science of the
4 Total Environment, 877: 162864. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162874>

5 LEI, L., WU, S., LU, S., LIU, M., SONG, Y., FU, Z., SHI, H., RALEY-SUSMAN,
6 K.M., HE, D. 2018. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse
7 effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. Science Total
8 Environment, v: 619-620, p: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.103>.

9 LI, Y., LIU, Z., LI, M., JIANG, Q., WU, D., HUANG, Y., JIAO, Y., ZHANG, M.,
10 ZHAO, Y. 2020. Effects of nanoplastics on antioxidant and immune enzyme
11 activities and related gene expression in juvenile *Macrobrachium nipponense*.
12 Journal of Hazard Mater, 398: 122990.
13 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122990>.

14 LIANG, Y., SHAO, L., JIANG, Q., YANG, J. 2020. Changes in the lifecycle
15 parameters and glutathione-related antioxidant defense system of rotifer *Brachionus*
16 *calyciflorus* under the combined stress of microcystin-LR and ammonia. Aquatic
17 Ecology, 54: 243-256. <https://doi.org/10.1007/s10452-019-09739-8>

18 LIANG, Y., YANG, X., WANG, Y., LIU, R., GU, H., MAO, L. 2021. Influence of
19 polystyrene microplastics on rotifer (*Brachionus calyciflorus*) growth, reproduction,
20 and antioxidant responses. Aquatic Ecology, 55: 1097-1111.
21 <https://doi.org/10.1007/s10452-021-09885-y>

22 LIU, J.D., LIU, W. BIN., ZHANG, C.Y., XU, C.Y., ZHENG, X.C., ZHANG, D.D.,
23 CHI, C. 2020. Dietary glutathione supplementation enhances antioxidant activity and
24 protects against lipopolysaccharide-induced acute hepatopancreatic injury and cell
25 apoptosis in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Fish Shellfish Immunology, 97:
26 440-454. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.049>

27 LIU, S.S., FU, J.P., GUO, C.L., DANG, Z. 2019. Research progress on environmental
28 behavior and ecological toxicity of microplastics. Journal of Agro-Environment
29 Science, 38: 05, 957-969. <https://doi.org/10.3876/j.issn.1000-1980.2020.01.004>

30 LUSHCHAK, V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals.
31 Aquatic Toxicology, 101: 13-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>

- 1 LUSHCHAK, V.I. 2016. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic
2 approach. *Fish Physiol Biochem*, 42: 711-747. [https://doi.org/10.1007/s10695-015-](https://doi.org/10.1007/s10695-015-0171-5)
3 0171-5
- 4 LUSHER, A.L., HOLLMAN, P.C.H., MENDOZA-HILL, J.J. 2017. Microplastics in
5 fisheries and aquaculture: status of knowledge on their occurrence and implications
6 for aquatic organisms and food safety. FAO Fisheries and Aquaculture Technical
7 Paper: 615. Rome, Italy of European plastics.
- 8 LIN, Y.C., CHEN, J.C. 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei*
9 (Boone) juveniles at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine*
10 *Biology and Ecology*, 259: 109-119.
- 11 LIN, Y.C., CHEN, J.C. 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei*
12 (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, 224: 193-201.
- 13 MOURA, C.M., MUSZINSKI, P., SCHMIDT, C., ALMEIDA, J., PINTO, LADA.
14 2007. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação
15 do processo em escala piloto. *VETOR - Revista Ciências Exatas e Engenharia*, 16
16 (1): 37-45.
- 17 MUELLER, M.T., FUESER, H., HOSS, S., TRAUNSPURGER, W. 2020. Species-
18 specific effects of long-term microplastic exposure on the population
19 growth of nematodes, with a focus on microplastic ingestion. *Ecological Indicators*,
20 118: 106698. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106698>
- 21 MURPHY, M.P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species.
22 *Biochemical Journal*, 417: 1-13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- 23 NIEMCHAROEN, S., HAETRAKUL, T., PALIĆ, D., CHANSUE, N. 2022.
24 Microplastic contaminated feed interferes with antioxidant enzyme and lysozyme
25 gene expression of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) leading to
26 hepatopancreas damage and increased mortality. *Animals*, 12: 3308.
27 <https://doi.org/10.3390/ani12233308>
- 28 NIU, J., LI, C.H., TIAN, L.X., LIU, Y.J., CHEN, X., WU, K.C., JUN, W., HUANG, Z.,
29 WANG, Y., LIN, H.Z. 2015. Suitable dietary chitosan improves the growth
30 performance, survival and immune function of tiger shrimp, *Penaeus monodon*.
31 *Aquaculture Research*, 46: 1668-1678. <https://doi.org/10.1111/are.12321>

1 NIU, J., LIU, Y.J., LIN, H.Z., MAI, K.S., YANG, H.J., LIANG, G.Y., TIAN, L.X.
2 2011. Effects of dietary chitosan on growth, survival and stress tolerance of
3 postlarval shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Nutrition, 17.
4 <https://doi.org/10.1111/j.13652095.2010.00775.x>

5 OAKES, K.D., DER, K.R.A.A.K., GJ, V. 2003. Aquatic Toxicology, 63: 447-463.

6 OKPALA, C.O.R., BONO, G., GERACI, M. L., SARDO, G., VITALE, S.,
7 SCHASCHKE, C.J. 2016. Lipid oxidation kinetics of ozone-processed shrimp during
8 iced storage using peroxide value measurements. Food Bioscience, 16: 5-10.
9 <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.07.005>

10 PLASTICSEUROPE, 2017. Plastics - the Facts 2017: an analysis of European plastics
11 production, demand and waste data. Available from: [https://www.plasticseurope.](https://www.plasticseurope.org/em)
12 [org/em](https://www.plasticseurope.org/em)

13 POWERS, S.K., JI, L.L., LEEUWENBURGH, C. 1999. Exercise training-induced
14 alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: A brief review. Medicine Science
15 Sports Exercise, 31: 1555 987-997. [https://doi.org/10.1097/00005768-199907000-](https://doi.org/10.1097/00005768-199907000-00011)
16 [00011](https://doi.org/10.1097/00005768-199907000-00011)

17 PATRA, I., HUY, D.T.N., ALSAIKHAN, F., OPULENCIA, M.J.C., TUAN, P.V.,
18 NURMATOVA, K.C., MAJDI, A., SHOUKAT, S., YASIN, G., MARGIANA, R.,
19 WALKER, T.R., KARBALAEI, S. 2022. Toxic effects on enzymatic activity, gene
20 expression and histopathological biomarkers in organisms exposed to microplastics
21 and nanoplastics: a review. Environmental Sciences Europe, 34: 80.
22 <https://doi.org/10.1186/s12302-022-00652-w>

23 QIU, X., CHEN, S., LIU, G., LIN, H. 2016. Inhibition of lipid oxidation in frozen
24 farmed ovate pompano (*Trachinotus ovatus* L.) fillets stored at -18 °C by chitosan
25 coating incorporated with citric acid or licorice extract. Journal of the Science Food
26 and Agriculture, 96: 3374-3379. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7517>

27 ROCHMAN, C.M., HOH, E., KUROBE, T., THE, S.J. 2013. Ingested plastic transfers
28 hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. Science Report, 3: 3263.
29 <https://doi.org/10.1038/srep03263>.

30 ROSS, E.P., BEHRINGER, D.C., MUÑOZ, A., DÍAZ, D., BOJKO, J. 2019. A
31 histological atlas for the Palinuridae (Crustacea: Decapoda: Achelata): A guide to

1 parasite discovery and spotting the abnormal in spiny lobsters. Journal of
2 Invertebrate Pathology, 163: 21-33. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.03.001>

3 RYAN, P.G., MOORE, C.J., VAN FRANEKER, J.A., MOLONEY, C.L. 2009.
4 Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. Philosophical
5 Transactions of the Royal Society Biological Sciences, 364: 1999-2012.

6 SUANES, A.S., MULLER, L., TAVELLA, R., JÚNIOR, F.M.R.S., PEDROSA, V.,
7 ROMANO, L.A., WASIELESKY, W., JOSENDE, M.E., VENTURA-LIMA, J.
8 2023. Oxidative effects of consuming microplastics in different tissues of white
9 shrimp *Litopenaeus vannamei*. Marine Pollution Bulletin, 193: 115137.
10 <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115137>

11 SANTOS, D., LUZIO, A., FÉLIX, L., BELLAS, J., MONTEIRO, S.M. 2022. Oxidative
12 stress, apoptosis and serotonergic system changes in zebrafish (*Danio rerio*) gills
13 after long-term exposure to microplastics and copper. Comparative Biochemistry and
14 Physiology, 258: 109363. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109363>

15 SEDLAK, J., LINDSAY, R.H. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein
16 sulfhydryl groups in tissue with Elman's reagent. Analytical Biochemistry, 25: 192-
17 205.

18 SIES, H. 1993. Strategies of antioxidant defense. EJB Reviews, 101-107.

19 SIES, H. 2018. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current
20 development. Current Opinion in Toxicology, 7: 122-126.
21 <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.01.002>

22 SILVA, A.A. da., GONÇALVES, R.C. 2010. Espécies reativas do oxigênio e as
23 doenças respiratórias em grandes animais. Ciência Rural, 40: 994-1002.
24 <https://doi.org/10.1590/s0103-84782010005000037>

25 SIMIÃO, C. dos S., COLOMBO, G.M., SCHMITZ, M.J., RAMOS, P.B., TESSER,
26 M.B., WASIELESKY, W., MONSERRAT, J.M. 2020. Inclusion of Amazonian
27 Mauritia flexuosa fruit pulp as functional feed in the diet for the juvenile Pacific
28 white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Research, 51: 1731-1742.
29 <https://doi.org/10.1111/are.14520>

30 SUN, S., JIN, Y., LUO, P., SHI, X. 2022. Polystyrene microplastics induced male
31 reproductive toxicity and transgenerational effects in freshwater prawn. Science of

1 the Total Environment, 842: 156820.
2 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156820>

3 SUZUKI, T., YAMAMOTO, M. 2017. Stress-sensing mechanisms and the
4 physiological roles of the Keap1–Nrf2 system during cellular stress. *Journal*
5 *Biology Chemistry*, 292: 16817-16824. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.800169>

6 SABOROWSKI, R., KOREZ, S., RIESBECK, S., WEIDUNG, M., BICKMEYER, U.,
7 GUTOW, L. 2022. Shrimp and microplastics: A case study with the Atlantic ditch
8 shrimp *Palaemon varians*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 234: 113394.
9 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113394>

10 SUSSARELLU, R., SUQUET, M., THOMAS, Y., LAMBERT, C., FABIUUX, C.,
11 PERNET, M.E.J., LE GOÏC, N., QUILLIEN, V., MINGANT, C., EPELBOIN, Y.,
12 CORPOREAU, C., GUYOMARCH, J., ROBBENS, J., PAULPONT, I.,
13 SOUDANT, P., HUVET, A. 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to
14 polystyrene microplastics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113:
15 2430-2435. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519019113>.

16 THOMPSON, R.C., OLSEN, Y., MITCHELL, R.P., DAVIS, A., ROWLAND, S.J.,
17 JOHN, A.W., MCGONIGLE, D., RUSSELL, A.E. 2004. Lost at sea: where is all the
18 plastic? *Science*, 304:838-838.

19 TAMER, T.M., VALACHOVÁ, K., MOHYELDIN, M.S., SOLTES, L. 2016. Free
20 radical scavenger activity of chitosan and its aminated derivative. *Journal of Applied*
21 *Pharmaceutical Science*, 6: 195-201. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60428>

22 TRESTRAIL, C., NUGEGODA, D., SHIMETA, J. 2020. Invertebrate responses to
23 microplastic ingestion: Reviewing the role of the antioxidant system. *Science of the*
24 *Total Environment*, 734: 138559. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138559>

25 VOGT, G. 2019. Functional cytology of the hepatopancreas
26 of decapod crustaceans. *Journal of Morphology*, p: 1-40.
27 <https://doi.org/10.1002/jmor.21040>

28 VAN WYK, P., SCARPA, J. 1999. Water Quality Requirements and Management:
29 Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. *Main*, 141-162.

30 WAN, Z., WANG, C., ZHOU, J., SHEN, M., WANG, X., FU, Z., JIN, Y. 2019. Effects
31 of polystyrene microplastics on the composition of the microbiome and metabolism

1 in larval zebrafish. Chemosphere, 217: 646-658.
2 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.070>

3 WANG, Q.J., ZHANG, Y., CHEN, Y., WANG JIN, X.X., WANG, Y.M. 2020.
4 Research progress on environmental influence behavior of microplastics in water (in
5 Chinese). Chemical Industry Engineering Progress, 39 (4): 1500-1510.
6 <https://doi.org/10.16085/j.issn.1000-6613.2019-1190>

7 WANG, S., ZHONG, Z., LI, Z., WANG, X., GU, H., HUANG, W., FANG, J.K., SHI,
8 H., HU, M., WANG, Y. 2021. Physiological effects of plastic particles on mussels
9 are mediated by food presence. Journal of Hazardous Materials, 404: 124136.
10 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124136>

11 WANG, W., GAO, H., JIN, S., LI, R., NA, G. 2019. The ecotoxicological effects of
12 microplastics on aquatic food web, from primary producer to human: a review.
13 Ecotoxicology Environmental Safety, 173: 110-117.
14 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.113>

15 WANG, Y., XIONG, YANLEI, ZHANG, A., ZHAO, N., ZHANG, J., ZHAO, D., YU,
16 Z., XU, N., YIN, Y., LUAN, X., XIONG, YANLIAN. 2020. Oligosaccharide
17 attenuates aging-related liver dysfunction by activating Nrf2 antioxidant signaling.
18 Food Science Nutrition, 8: 3872-3881. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1681>

19 WRIGHT, S.L., THOMPSON, R.C., GALLOWAY, T.S. 2013. The physical impacts of
20 microplastics on marine organisms: a review. Environmental Pollution, 178: 483-
21 492. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.031>

22 XIANG, Y., JIANG, L.I., ZHOU, Y., LUO, Z., ZHI, D., YANG, J., LAM, S.S. 2022.
23 Microplastics and environmental pollutants: Key interaction and toxicology
24 in aquatic and soil environments. Journal of Hazardous Materials, 422: 126843.

25 XIAO, X., HE, E., JIANG, X., LI, X., YANG, W., RUAN, J., ZHAO, C., QUI, R.,
26 TANG, Y. 2022. Visualizing and assessing the size-depending oral uptake, tissue
27 distribution and detrimental effect of polystyrene microplastic in *Eisenia fetida*.
28 Environmental Pollution, 306: 119436. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119436>

29 YAN, J., GUO, C., DAWOOD, M.A.O., GAO, J. 2017. Effects of dietary chitosan on
30 growth, lipid metabolism, immune response and antioxidant-related gene expression

1 in *Misgurnus anguillicaudatus*. Beneficial Microbes, 8: 439-449.
2 <https://doi.org/10.3920/BM2016.0177>

3 YAN, W., HAMID, N., DENG, S., JIAN, P.P., PEI, D.S. 2020. Individual and
4 combined toxicogenetic effects of microplastics and heavy metals (Cd, Pb, and Zn)
5 perturb gut microbiota homeostasis and gonadal development in marine medaka
6 (*Oryzias melastigma*). Journal of Hazardous Materials, 397: 122795.
7 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122795>

8 YIN, L., CHEN, B., XIA, B., SHI, X., QU K. 2018. Polystyrene microplastics alter the
9 behavior, energy reserve and nutritional composition of marine jacobever (*Sebastes*
10 *schlegelii*). Journal of Hazardous Materials.
11 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.110>

12 YU, P., LIU, Z., WU, D., CHEN, M., LV, W., ZHAO, Y. 2018. Accumulation of
13 polystyrene microplastics in juvenile *Eriocheir sinensis* and oxidative stress effects in
14 the liver. Aquatic Toxicology, 200: 28-36.
15 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.04.015>

16 ZAMORA, R., HIDALGO, F.J. 2016. The triple defensive barrier of phenolic
17 compounds against the lipid oxidation-induced damage in food products. Trends in
18 Food Science and Technology. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.06.006>.

19 ZAR, J.H. 1984. Biostatistical Analysis. 2nd Edition, Prentice-Hall Inc., Englewood
20 Cliffs, p 778.

21 ZENG, Y., DENG, B., KANG, Z., ARAUJO, P., MJØS, S.A., LIU, R., LIN, J., YANG,
22 T., QU, Y. 2023. Tissue accumulation of polystyrene microplastics causes oxidative
23 stress, hepatopancreatic injury and metabolome alterations in *Litopenaeus vannamei*.
24 Ecotoxicology and Environmental Safety, 256: 114871.
25 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114871>

26 ZHANG, Q., XU, E.G., LI, J., CHEN, Q., MA, L., ZENG, E.Y., SHI, H. 2020. A
27 review of microplastics in table salt, drinking water, and air: direct human exposure.
28 Environmental Science Technology, 54: 3740-3751.

29 ZHAO, X.Y., 2019. Compositions, identification, and Sources of microplastic debris
30 and microplastics in Coastal Environments - A case study of Sanggou Bay, yellow

- 1 Sea, China (in Chinese). University of Chinese Academy of Sciences (Yantai
2 Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences).
- 3 ZHANG, P., ZHANG, X., LI, J., HUANG, G. 2006. The effects of body
4 weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO
5 levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Aquaculture, 256:
6 579-587. <https://doi.org/10.1016/j.aquicultura.2006.02.020>
7