

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Microplásticos em vários tecidos de espécies de peixes
pelágicos com interesse comercial**

Ana Catarina Ambrosino da Silva

Mestrado em Ecologia Marinha

Dissertação orientada por:

Prof. Doutora Isabel Domingos
Doutora Joana Raimundo Pimenta

2020

Esta dissertação de mestrado foi realizada no âmbito dos projetos:

- **SARDINHA2020**, “An Ecosystem Approach to Sardine Fisheries Management”, funded by program MAR2020, IPMA, MAR-01.04.02-FEAMP-0009.

- **PLASTICGLOBAL**, “Assessment of plastic mediated chemicals transfer and effects in food webs of deep, coastal and estuarine ecosystems under global change scenarios”, funded by the “Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P. (FCT), Portugal,” with national funds (FCT/MCTES, “orçamento de Estado,” project reference PTDC/MAR-PRO/1851/2014, 2016-2019).



Parte dos resultados preliminares desta dissertação foram apresentados na 2ª Conferência Portuguesa sobre Lixo Marinho (2ª CPLM), organizada pela APLM (Associação Portuguesa de Lixo Marinho) realizada nos dias 19 e 20 de setembro de 2019, em Setúbal.

Silva, C., Raimundo, J., Domingos, I., Garrido, S., Lopes, C. (2019) 'Presença de Microplásticos em diferentes tecidos de pequenos pelágicos da costa portuguesa', in *Workshop de Investigação sobre Microplásticos. 2ª Conferência Portuguesa sobre Lixo Marinho e Workshop de Investigação em Microplásticos*. Setúbal, Portugal, 19 – 21 de setembro de 2019.





“With every drop of water you drink, every breath you take, you’re connected to the sea. No matter where on Earth you live”-

Sylvia Earle

“The sea, the great unifier, is man’s only hope. Now, as never before, the old phrase has a literal meaning: we are all in the same boat”-

Jacques Yves Cousteau

“Only when the last tree has died and the last river been poisoned and the last fish been caught will we realise we cannot eat Money”-

Provérbio da tribo Cree indígena americana

Agradecimentos

A realização desta dissertação de mestrado não teria sido possível sem a ajuda de pessoas maravilhosas que ajudaram e que contribuíram para que este trabalho chegasse a bom porto.

Gostaria de agradecer ao Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) por ter apoiado este trabalho e pela disponibilização do espaço e equipamentos necessários. Um sincero obrigado a todas as pessoas que me acolheram de braços abertos. Trabalhar no IPMA foi uma experiência muito gratificante e desafiante que me fez crescer enquanto pessoa.

Agradeço à minha orientadora, a Doutora. Joana Raimundo por todo o apoio, atenção, paciência e disponibilidade. Obrigada pela confiança que depositou em mim e no meu trabalho, pelos conhecimentos transmitidos e orientação. Pela oportunidade de integrar a sua equipa de trabalho no IPMA, pela oportunidade de apresentar este trabalho na 2ª Conferência Portuguesa sobre Lixo Marinho (2ºCPLM) e pela possibilidade de embarcar NI-Noruega.

Obrigada à minha orientadora Prof. Doutora Isabel Domingos, por todo o apoio disponibilizado, pelas críticas construtivas, pelos seus conselhos e ajuda prestada na orientação deste trabalho.

Um agradecimento especial à Dra. Clara Lopes do IPMA. Obrigada por toda a ajuda, por todas as dúvidas tiradas, pela partilha dos seus conhecimentos científicos e por me ter mostrado as maravilhas dos MPs e da espectroscopia FTIR. Sem a sua ajuda imprescindível e apoio esta dissertação nunca teria sido possível.

Agradeço ainda à equipa do departamento de contaminantes do IPMA, pela amabilidade, simpatia e por me terem acolhido na equipa.

A todas as pessoas com quem tive o prazer de embarcar no NI Noruega, pela experiência inesquecível. Agradecimento a toda a equipa de embarque em especial às minhas colegas de camarote: Beta e Andreia.

Ao professor doutor Gonçalo Calado, meu professor da licenciatura em Biologia que me iniciou no mundo da biologia marinha e que continua a ser uma fonte de inspiração.

Obrigada aos meus colegas de mestrado que também realizaram as suas dissertações no IPMA, pelos momentos divertidos e alguns “sujos” passados no laboratório a dissecar os peixes.

Aos meus companheiros de batalha, colegas e amigos de mestrado que tive a felicidade de conhecer: Sara, Filipe, Rita e Pedro. Por estarem presentes, mesmo que não nos encontremos sempre que queremos. Obrigada pelos bons momentos passados na FCUL e pelos almoços divertidos nos Montaditos. À Sara Garcia Morales, pela amizade que persiste e que continua a crescer.

Em especial à minha família pelo apoio incondicional ao longo da minha educação e vida: avós, tios e primos. Especialmente aos meus pais, por me terem aberto os horizontes às maravilhas do mundo natural e por terem apoiado os meus estudos. Sem a vossa ajuda, nada disto teria sido possível. Especialmente à minha mãe por me ter inculcido o gosto pela leitura e me ter ajudado sempre e ao meu pai por, desde pequena, me levar à pesca e cultivar o gosto pelo mar. Obrigada por me ouvirem e incentivarem a lutar para alcançar os meus objetivos. Espero que fiquem orgulhosos de mim. As palavras não chegam para demonstrar a minha gratidão para com vocês.

Aos meus amigos, especialmente à minha melhor amiga de licenciatura Vanessa, obrigada pela tua amizade e força. Pelos momentos animados e por estar sempre lá quando precisei. À Catarina, a minha amiga de infância, muito obrigada por me ouvir e pela amizade que dura há 19 anos.

Um agradecimento especial ao meu namorado Pedro. Obrigada por todo o apoio, amor e compreensão. Por ter estado sempre lá para me ouvir e ao meu lado. Por tornar a minha vida mais completa e me fazer querer ser uma pessoa melhor.

E na reta final...os meus sinceros agradecimentos a todos os outros que também contribuíram.

Resumo

A ingestão e acumulação de microplásticos (MPs) por espécies marinhas de interesse comercial representa uma grande preocupação, nomeadamente para o consumo humano. Este estudo analisou a acumulação de MPs em três espécies de peixes pelágicos com elevado valor comercial, sardinha (*Sardina pilchardus*), biqueirão (*Engraulis encrasicolus*) e carapau (*Trachurus trachurus*), recolhidas ao longo da costa portuguesa e Golfo de Cádiz. Foram analisadas amostras de trato gastrointestinal, brânquias e músculo tendo-se observado um total de 757 potenciais MPs. Verificou-se a presença de MPs em todos os tecidos-alvo das espécies analisadas, embora o trato gastrointestinal apresente concentrações significativamente mais elevadas ($p < 0.05$). A percentagem de ingestão de MPs foi superior nos carapaus (81%), seguido da sardinha (72%) e por último o biqueirão (52%). O carapau foi a espécie que registou a maior percentagem de indivíduos com partículas no músculo (67%), seguido da sardinha (46%) e por fim do biqueirão (43%). A percentagem de indivíduos que apresentaram MPs nas brânquias foi similar entre espécies. Para além de existirem diferenças significativas entre os tecidos de cada uma das espécies ($p < 0,05$), foram ainda verificadas diferenças significativas entre os vários tecidos das espécies. Dos microplásticos analisados através da técnica do FTIR (35% do total contabilizado) foram obtidos uma grande variedade de polímeros termofixos e termoplásticos. Os polímeros mais frequentes em todos os peixes foram: polímero semi sintético de celulose (rayon, 40,2%), poliéster (PES, 11,1%), acrílico (PMMA, 8,5%), acrilato (BMA, 7,4%), PEI (6,9%) e PE (5,8%). Os tamanhos dos MPs nas várias espécies e tecidos variaram entre 0,009 mm e o máximo de 4,8 mm. A maioria dos MPs detetados foi constituída por fibras (76,8%) e a cor mais frequente foi a azul (66,8%). O estudo sugere ainda que a espécie *T. trachurus* seja o bioindicador mais adequado para a avaliação dos critérios do Descritor 10 (D10) da Diretiva Quadro Estratégia Marinha (DQEM) relativa ao lixo marinho e MPs. Os resultados obtidos são importantes pois evidenciam a presença de MP em diferentes tecidos de espécies de peixe com elevado interesse comercial. Contudo os mecanismos de transferência dos MPs através dos tecidos ainda são desconhecidos e são necessárias investigações futuras para entender estes processos e quais as implicações que representam para a saúde humana.

Palavras-chave: DQEM, FTIR, lixo marinho, polímeros, Portugal

Abstract

The ingestion and accumulation of microplastics (MPs) by marine species with commercial interest is a major concern particularly for human consumption. This study analysed the accumulation of MPs in three pelagic fish species with high commercial value, European sardine (*Sardina pilchardus*), European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*), collected along the Portuguese coast and Gulf of Cadiz. The percentage of MPs intake was higher in horse mackerel (81%), followed by sardine (72%) and finally anchovy (52%). Samples of gastrointestinal tract, gills and muscle were analysed and a total of 757 potential MPs were observed. MPs were found in all target tissues of the species analysed, although the gastrointestinal tract showed significantly higher concentrations ($p < 0,05$). Horse mackerel was the species with the highest percentage of individuals with particles in the muscle (67%), followed by the sardine (46%) and finally anchovy (43%). In addition to the existence of significant differences between the tissues of each species ($p < 0,05$), significant differences were also observed between the various tissues of the species. The percentage of individuals with MP in the gills was similar between species. Of the microplastics analysed using the FTIR technique (35% of the total potential MP) a wide variety of thermoset and thermoplastic polymers were obtained. The most frequent polymers in all fish were: semi synthetic polymer cellulose (rayon, 40, 2%), polyester (PES, 11.1%), acrylic (PMMA, 8, 5%), acrylate (BMA, 7, 4%), PEI (6, 9%) and PE (5, 8%). The MP sizes in the various species and tissues ranged from 0,009 mm to a maximum of 4, 8 mm. Most MPs detected were fibers (76, 8%) and the most frequent colour was blue (66, 8%). The study also suggests that the species *T. trachurus* is the most appropriate bio-indicator for the assessment of D10 criteria for marine debris and MPs. The results obtained are important as they show the presence of MP in different fish tissues with high commercial interest. However, the mechanisms of transfer of MPs through tissues are still unknown and future research is needed to understand these processes and what the implications are for human health.

Keywords: DQEM, FTIR, marine litter, polymers, Portugal

Lista de abreviaturas

BEA - Bom Estado Ambiental

BMA- Butil metacrilato

CNUDM - Convenção das Nações Unidas sobre o Direito do Mar

DGRM- Direção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos

DMS- Sulfureto de dimetilo

DQEM - Diretiva Quadro Estratégia Marinha

EP- Resina épxi

EPS - Poliestireno expandido

ETAR - Estação de Tratamento de Águas Residuais

FTIR- espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

HPMC- Hidroximetilpropilcelulose

IUCN-União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais

KOH- Hidróxido de Potássio

LC- *“Least-Concern”*

MED POL - Programa de Avaliação e Controle da Poluição Marinha no Mediterrâneo

MSFD- Marine Strategy Framework Directive

NAFTA - Acordo de Livre Comércio da América do Norte

NT- *“Near threatened”*

OSPAR- Convenção para a Proteção do Meio Marinho do Atlântico Nordeste

PA - Poliamidas

PC - Policarbonato

PE - Polietileno

PEI- Polietilenoimina

PES - Poliéster

PET - Polietileno tereftalato

PMMA - Polimetilmetacrilato (acrílico)

POP - Poluentes orgânicos persistentes

PP - Polipropileno

PS - Poliestireno

PSU- Polisulfona

PTFE- Politetrafluoretileno

PU - Poliuretano

PVC - Policloreto de vinilo

TPE - Elastómeros termoplásticos

UE - União Europeia

UNEP- United Nations Environment Programme

Índice

| | |
|--|-----------|
| Agradecimentos | v |
| Resumo | vi |
| Abstract | vii |
| Lista de abreviaturas | viii |
| Índice de tabelas | xi |
| Índice de figuras | xii |
| Índice de Anexos | xv |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Plásticos e microplásticos | 2 |
| 1.2. Impactos do plástico nos organismos marinhos e no ser humano | 4 |
| 1.3. Costa Portuguesa – Vulnerabilidade aos MPs | 6 |
| 1.4. DQEM e descritor 10 | 6 |
| 1.5. Objetivos | 8 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 9 |
| 2.1. Caracterização da Área de estudo | 10 |
| 2.2. Biologia e características das espécies estudadas | 11 |
| 2.3. Tecidos analisados | 12 |
| 2.4. Parâmetros Biométricos e parametrização das unidades utilizadas | 12 |
| 2.5. Amostragem, preparação e digestão das amostras | 14 |
| 2.6. Caracterização e deteção de microplásticos | 14 |
| 2.7. Minimização de contaminações | 15 |
| 2.8. Análise Estatística | 16 |
| 2.9. Identificação de Polímeros | 17 |
| 3. RESULTADOS | 18 |
| 3.1. Microplásticos totais nas espécies | 19 |
| 3.2. Abundância e caracterização de MPs no Carapau | 21 |
| 3.2.1. Comparação da abundância de MPs entre tecidos do carapau | 24 |
| 3.3. Abundância e caracterização de MPs na Sardinha | 25 |
| 3.3.1. Comparação da abundância de MPs entre tecidos da sardinha | 28 |
| 3.4. Abundância e caracterização de MPs no Biqueirão | 29 |
| 3.4.1. Comparação da abundância de MPs entre tecidos do biqueirão | 33 |
| 3.5. Comparações interespecíficas | 34 |
| 3.6. Resultados da Identificação FTIR | 35 |
| 4. DISCUSSÃO | 37 |
| 4.1. Microplásticos totais nas espécies | 38 |
| 4.2. Comparação entre os tecidos das espécies | 40 |
| 4.3. Identificação de Polímeros | 44 |
| 4.4. Seleção do Bioindicador | 46 |

| | |
|--|----|
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 49 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 50 |
| 7. ANEXOS | 63 |
| Anexo A | 64 |
| Anexo B | 71 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 2.1- Resumo das características biométricas dos exemplares das espécies <i>Trachurus trachurus</i> (HOM), <i>Sardina pilchardus</i> (PIL) e <i>Engraulis encrasicolus</i> (ANE) analisados: classes de tamanho (cm), pesos totais (g) e n° total de indivíduos | 13 |
| Tabela 2.2- Medianas, mínimos e máximos do N° de MPs e do N° de MPs/g encontrados nos tratos gastrointestinais de <i>Trachurus trachurus</i> (HOM), <i>Sardina pilchardus</i> (PIL) e <i>Engraulis encrasicolus</i> (ANE), capturadas na costa portuguesa e Golfo de Cádiz. | 13 |
| Tabela 3.1- Número total de indivíduos (ind.) e percentagem (%) de indivíduos com MPs nas brânquias, tratos gastrointestinais e músculos das espécies <i>Trachurus trachurus</i> (HOM), <i>Sardina pilchardus</i> (PIL) e <i>Engraulis encrasicolus</i> (ANE) capturadas na costa portuguesa e Golfo de Cádiz. | 19 |
| Tabela 3.2- Variação de tamanho (mm) mínimo e máximo (min-máx) dos MPs encontrados nos diferentes tecidos, brânquias, trato gastrointestinal e músculo de <i>Trachurus trachurus</i> (HOM), <i>Sardina pilchardus</i> (PIL) e <i>Engraulis encrasicolus</i> (ANE) capturadas na costa portuguesa e Golfo de Cádiz. | 20 |
| Tabela 3.3- Número total de MPs nos vários tecidos das espécies: <i>Trachurus trachurus</i> (HOM), <i>Sardina pilchardus</i> (PIL) e <i>Engraulis encrasicolus</i> (ANE). | 20 |
| Tabela 3.4- Número (N°) total de MPs e respetivas percentagens (%) de indivíduos com MPs, mediana, mínimo e máximo de MPs/g nos vários tecidos de <i>Trachurus trachurus</i> (N =84) na costa portuguesa e Golfo de Cádiz | 21 |
| Tabela 3.5- Mediana, mínimo e máximo do N° MPs/g de tecido nos vários tecidos de <i>Trachurus trachurus</i> | 25 |
| Tabela 3.6- Número (N°) total de MPs e respetivas percentagens (%) de indivíduos com MPs, mediana, mínimo e máximo de MPs/g nos vários tecidos de <i>Sardina pilchardus</i> (N =68) na costa portuguesa e Golfo de Cádiz | 26 |
| Tabela 3.7- Mediana, mínimo e máximo do N° MPs/g de tecido nos vários tecidos de <i>Sardina pilchardus</i> | 29 |
| Tabela 3.8- Número (N°) total de MPs e respetivas percentagens (%) de indivíduos com MPs, mediana, mínimo e máximo de MPs/g nos vários tecidos de <i>Engraulis encrasicolus</i> (N =44) na costa portuguesa e Golfo de Cádiz | 30 |
| Tabela 3.9- Mediana, mínimo e máximo do N° MPs/g de tecido nos vários tecidos de <i>Engraulis encrasicolus</i> | 33 |
| Tabela 3.10- Valores de p calculados através de um teste U de Mann-Whitney entre os tecidos entre espécies. (*) Diferença estatisticamente significativa | 34 |
| Tabela A1- Contagens dos vários tipos de polímeros e categorias. São apresentados os números de polímeros encontrados em cada espécie e tecidos..... | 66 |
| Tabela A2- Percentagens de polímeros identificados em cada espécie | 66 |
| Tabela A3- Principais tipos polímeros encontrados nas espécies com as suas respetivas densidades (g/cm ³) e as suas utilizações (adaptado de Mark. E, James., 2007). | 67 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1.1 - Interações dos microplásticos com as matrizes físicas e químicas no ambiente marinho. Setas com preenchimento sólido representam as ligações ambientais e as setas a tracejado representam as ligações biológicas (Reproduzido de Lusher <i>et al.</i> , 2015)..... | 4 |
| Figura 2.1 – Plataforma continental portuguesa e Golfo de Cádiz com as estações de amostragem dos indivíduos capturados de biqueirão, sardinha e carapau | 10 |
| Figura 2.2 - Espécies estudadas (a) Carapau-branco; (b) Sardinha europeia; (c). (Adaptação de Martins e Carneiro, 2018)..... | 11 |
| Figura 2.3 - Dissecção de um exemplar de <i>Engraulis encrasicolus</i> para separação de tecidos | 14 |
| Figura 2.4 - Principais formas de MPs identificados: 1) fibras; 2) filamento; 3) fragmento; 4) esfera; 5) grupo de fibras; 6) outros (esponjas e borrachas) | 15 |
| Figura 2.5 - Imagens de cúpula aberta e fechada, utilizada durante as observações à lupa de modo a diminuir contaminações | 16 |
| Figura 2.6 - Espectro de acrilato (Butil metacrilato- BMA) obtido a partir de uma amostra de um fragmento azul encontrado em biqueirão. Em cima, a preto figura o espectro da amostra, em baixo, a vermelho encontra-se ilustrado o espectro de BMA da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm^{-1})..... | 17 |
| Figura 3.1 - Percentagem (%) de cores (a) e formas (b) de MPs totais encontrados nos peixes estudados | 19 |
| Figura 3.2 - Proporção, em percentagem (%), das cores (a), formas (b) e classes de tamanho (c) do total de MPs encontrados na espécie <i>Trachurus trachurus</i> , capturada na costa portuguesa e Golfo de Cádiz | 21 |
| Figura 3.3 - - Proporção, em percentagem (%), das cores de MPs encontrados nos vários tecidos de carapau: (a) brânquias, (b) tratos gastrointestinais e (c) músculo | 22 |
| Figura 3.4 - Proporção, em percentagem (%), das formas de MPs encontrados nos vários tecidos de carapau: (a) brânquias, (b) tratos gastrointestinais e (c) músculo | 22 |
| Figura 3.5 - Diversidade de cores e formas de MPs encontrados no carapau nos diferentes tecidos: (a) brânquias, (b) tratos gastrointestinais e músculos (c) | 23 |
| Figura 3.6 - Proporção, em percentagem (%), de MPs/g por classe de tamanho dos MPs encontrados nos diferentes tecidos de <i>Trachurus trachurus</i> da costa portuguesa e Golfo de Cádiz..... | 23 |
| Figura 3.7 - Mediana, mínimo e máximo e percentis 25 e 75 do número de microplásticos (Nº de MP/g tecido) obtidos nas brânquias (B), tratos gastrointestinais (TG) e músculo (M) de <i>Trachurus trachurus</i> capturado na costa portuguesa e Golfo de Cádiz. | 24 |
| Figura 3.8 - Proporção, em percentagem (%), das cores (a), formas (b) e classes de tamanho (c) do total de MPs encontrados na espécie <i>Sardina pilchardus</i> , capturada na costa portuguesa e Golfo de Cádiz | 25 |
| Figura 3.9 - Proporção, em percentagem (%), das cores de MPs encontrados nos vários tecidos de sardinha: (a) brânquias, (b) tratos gastrointestinais e (c) músculo | 26 |
| Figura 3.10 - Proporção, em percentagem (%), das formas de MPs encontrados nos vários tecidos de sardinha: (a) brânquias, (b) tratos gastrointestinais e (c) músculo | 27 |
| Figura 3.11 - Diversidade de cores e formas de MPs encontrados nos diferentes tecidos da sardinha: (a) brânquias, (b) tratos gastrointestinais e (c) músculo | 27 |
| Figura 3.12 - Proporção, em percentagem (%), de MPs/g por classe de tamanho dos MPs encontrados nos diferentes tecidos de <i>Sardina pilchardus</i> da costa portuguesa e Golfo de Cádiz | 28 |

| | |
|---|----|
| Figura 3.13- Mediana, mínimo e máximo e percentis 25 e 75 do número de microplásticos (Nº de MP/g tecido) obtidos nas brânquias (B), tratos gastrointestinais (TG) e músculo (M) de <i>Sardina pilchardus</i> capturado na costa portuguesa e Golfo de Cádiz | 29 |
| Figura 3.14- Proporção, em percentagem (%), das cores (a), formas (b) e classes de tamanho (c) do total de MPs encontrados na espécie <i>Engraulis encrasicolus</i> , capturada na costa portuguesa e Golfo de Cádiz | 30 |
| Figura 3.15- Proporção, em percentagem (%), das cores de MPs encontrados nos vários tecidos de biqueirão: (a) brânquias, (b) tratos gastrointestinais e (c) músculo | 31 |
| Figura 3.16- Proporção, em percentagem (%), das formas de MPs encontrados nos vários tecidos de biqueirão: (a) brânquias, (b) tratos gastrointestinais e (c) músculo | 31 |
| Figura 3.17- Diversidade de cores e formas de MPs encontrados nos diferentes tecidos do biqueirão: (a) brânquias, (b) tratos gastrointestinais e (c) músculo | 32 |
| Figura 3.18- Proporção, em percentagem (%), de MPs/g por classe de tamanho dos MPs encontrados nos diferentes tecidos de <i>Engraulis encrasicolus</i> da costa portuguesa e Golfo de Cádiz..... | 32 |
| Figura 3.19- Mediana, mínimo e máximo e percentis 25 e 75 do número de microplásticos (Nº de MP/g tecido) obtidos nas brânquias (B), tratos gastrointestinais (TG) e músculo (M) de <i>Engraulis encrasicolus</i> capturado na costa portuguesa e Golfo de Cádiz | 33 |
| Figura 3.20- Gráfico de Boxplots com o Nº de MPs/ g de tecido nas brânquias (B), trato gastrointestinal (TG) e músculo (M) de <i>Trachurus trachurus</i> (HOM), <i>Sardina pilchardus</i> (PIL) e <i>Engraulis encrasicolus</i> (ANE)..... | 34 |
| Figura 3.21- Percentagens (%) dos vários tipos de partículas identificados pelo FTIR | 35 |
| Figura 3.22- Espectro de celulose-rayon obtido a partir de uma amostra de uma fibra azul encontrada em sardinha. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a vermelho encontra-se ilustrado o espectro de rayon da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm ⁻¹) | 36 |
| Figura 3.23- Percentagem (%) dos vários polímeros encontrados em cada uma das espécies estudadas, <i>Trachurus trachurus</i> (HOM), <i>Sardina pilchardus</i> (PIL) e <i>Engraulis encrasicolus</i> (ANE)..... | 36 |
| Figura A1- Gráfico com as principais classes de tamanhos mais encontrados em cada tecido e nas várias espécies em estudo em função da percentagem de MPs/g | 64 |
| Figura A2- Gráfico de Boxplots com o Nº de MPs/ g de tecido nos vários tecidos nas três espécies estudadas: <i>Trachurus trachurus</i> (HOM), <i>Sardina pilchardus</i> (PIL) e <i>Engraulis encrasicolus</i> (ANE) | 64 |
| Figura A3- Percentagens (%) dos vários polímeros dos MPs encontrados nos peixes estudados | 65 |
| Figura A4- Principais mecanismos de assimilação de MPs em peixes (Reproduzido de Roch <i>et al.</i> , 2020) | 65 |
| Figura A5- Exemplos de Microplásticos encontrados nas brânquias de carapau | 68 |
| Figura A6- Exemplos de Microplásticos encontrados nos tratos gastrointestinais de carapau | 68 |
| Figura A7- Exemplos de Microplásticos encontrados nos músculos de carapau | 68 |
| Figura A8- Exemplos de Microplásticos encontrados nas brânquias de sardinha | 69 |
| Figura A9- Exemplos de Microplásticos encontrados nos tratos gastrointestinais de sardinha | 69 |
| Figura A10- Exemplos de Microplásticos encontrados nos músculos de sardinha | 69 |
| Figura A11- Exemplos de Microplásticos encontrados nas brânquias de biqueirão | 70 |
| Figura A12- Exemplos de Microplásticos encontrados nos tratos gastrointestinais de biqueirão | 70 |
| Figura A13- Exemplos de Microplásticos encontrados nos músculos de biqueirão..... | 70 |

| | |
|--|----|
| Figura B1- Espectro de Celulose-HPMC obtido a partir de uma amostra de uma fibra azul encontrada em carapau. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a vermelho encontra-se ilustrado o espectro de HPMC da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm ⁻¹). 71 | 71 |
| Figura B2- Espectro de PE (polietileno) obtido a partir de uma amostra de um fragmento rosa encontrado em carapau. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a verde encontra-se ilustrado o espectro de PE da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm ⁻¹). 71 | 71 |
| Figura B3- Espectro de acrilato (Butil metacrilato- BMA) obtido a partir de uma amostra de um fragmento verde encontrado em sardinha. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a vermelho encontra-se ilustrado o espectro de BMA da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm ⁻¹). 71 | 71 |
| Figura B4- Espectro de PP (polipropileno) obtido a partir de uma amostra de um filamento vermelho encontrado em sardinha. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a vermelho encontra-se ilustrado o espectro de PP da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm ⁻¹). 72 | 72 |
| Figura B5- Espectro de borracha obtido a partir de uma amostra de um fragmento azulado encontrado em carapau. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a verde encontra-se ilustrado o espectro de borracha da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm ⁻¹). 72 | 72 |
| Figura B6- Espectro de PS (poliestireno) obtido a partir de uma amostra de um fragmento verde encontrado em sardinha. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a verde encontra-se ilustrado o espectro de PS da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm ⁻¹). 72 | 72 |
| Figura B7- Espectro de PA (poliamida- nylon 6) obtido a partir de uma amostra de uma fibra azul encontrada em carapau. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a verde encontra-se ilustrado o espectro de PA da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm ⁻¹). 73 | 73 |
| Figura B8- Espectro de PMMA (acrílico) obtido a partir de uma amostra de uma fibra vermelha encontrada em sardinha. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a verde encontra-se ilustrado o espectro de PMMA da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm ⁻¹). 73 | 73 |
| Figura B9- Espectro de PEI (celulose + polietilenoimina) obtido a partir de uma amostra de uma fibra azul encontrada em carapau. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a verde encontra-se ilustrado o espectro de PEI da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm ⁻¹). 73 | 73 |
| Figura B10- Espectro de PET (polietileno tereftalato) obtido a partir de uma amostra de uma fibra preta encontrada em sardinha. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a verde encontra-se ilustrado o espectro de PET da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm ⁻¹). 74 | 74 |
| Figura B11- Espectro de PES (poliéster) obtido a partir de uma amostra de uma fibra azul encontrada em carapau. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a vermelho encontra-se ilustrado o espectro de PES da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm ⁻¹). 74 | 74 |

Índice de Anexos

| | |
|---|----|
| Anexo A- Gráficos, tabelas e fotografias adicionais | 63 |
| Anexo B- Exemplos de espectros FTIR dos principais polímeros encontrados | 70 |

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Plásticos e microplásticos

A produção mundial de plásticos aumentou consideravelmente desde o desenvolvimento dos polímeros sintéticos, no princípio do século XX (Andrady, 2011). A partir do início da produção em massa em 1940, a quantidade de plásticos aumentou de forma exponencial, tendo atingido cerca de 350 milhões de toneladas em 2017 (PlasticsEurope, 2018). Só na Europa, em 2017, foram produzidas cerca de 64,4 milhões de toneladas de plástico (PlasticsEurope, 2018). No que diz respeito à distribuição da produção global de plásticos o maior produtor é a China, seguido pela Europa e pelos países que integram a NAFTA (PlasticsEurope, 2018).

Com o aumento da produção global de plásticos e a sua utilização em inúmeros produtos do dia-a-dia, os resíduos plásticos no ambiente, incluindo os microplásticos, têm recebido cada vez mais atenção dos cientistas e meios de comunicação, principalmente nos últimos 10 anos (GESAMP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection, 2016). O plástico é um termo que deriva do latim *plasticus* que deriva do grego *plastikos* e que foi utilizado para descrever algo capaz de ser moldado ou que é adequado para moldagem. Esta terminologia foi utilizada no século XVII, muito antes do primeiro material de plástico ter sido inventado. Hoje em dia, o termo plástico é utilizado para descrever uma família numerosa de materiais muito distintos, com diferentes características, usos e propriedades (PlasticsEurope, 2018).

Dada a sua versatilidade, reduzido peso, durabilidade e transparência, os plásticos são idealmente utilizados para uma grande variedade de aplicações. O seu baixo custo, excelentes propriedades de barreira de oxigênio e humidade, bio inércia e leveza, tornam os plásticos excelentes materiais para embalagens. Assim, cerca de um terço da produção de resina plástica, é convertida em material descartável e de uso único (Andrady, 2003).

Os plásticos são normalmente obtidos a partir de petróleo, gás natural e carvão (Shah *et al.*, 2008). São compostos por uma grande variedade de materiais e dividem-se em duas categorias: termoplásticos e termofixos. Os plásticos termoplásticos podem ser derretidos e endurecidos quando arrefecidos, sendo as características do material, reversíveis. Exemplos de termoplásticos incluem: polietileno (PE), polipropileno (PP), Policloreto de vinilo (PVC), Tereftalato de polietileno (PET), Poliestireno (PS), Poliestireno expandido (EPS), Poliamidas (PA), Policarbonato (PC), Elastómeros termoplásticos (TPE), etc. Os plásticos termofixos são uma família de plásticos que passam por alterações químicas quando aquecidos. Depois de aquecidos e formados, estes plásticos não podem ser reformados ou refundidos. Exemplos destes plásticos incluem Poliuretano (PUR), poliéster insaturado, resinas epóxi, resinas de melamina, éster de vinil, silicone, e resinas acrílicas, entre outros (PlasticsEurope, 2018).

Os polímeros plásticos possuem inúmeras aplicações em todos os aspetos da vida quotidiana, incluindo o fabrico de embalagens para alimentos, produtos de consumo, dispositivos médicos e construção. Estima-se que em 2050 sejam adicionadas ao planeta cerca de 33 mil milhões de toneladas de plástico. Devido ao facto de a maioria dos polímeros plásticos utilizados atualmente serem altamente resistentes à degradação, este influxo de materiais complexos é um risco para a saúde humana e o ambiente (Galloway, 2015)

Os plásticos podem entrar nos ambientes aquáticos através de duas fontes principais: marinhas e terrestres. Estima-se que 80 % do plástico existente nos oceanos seja emitido por fontes terrestre (Hohenblum *et al.*, 2015) que incluem os rios, escoamento de águas pluviais, águas residuais, lixo

transportado pelo vento e descartado nas praias pelo ser humano e proveniente de atividades turísticas (Ryan *et al.*, 2009). As fontes marinhas incluem atividades marítimas, como o abandono de artes de pesca e descargas ilegais de resíduos provenientes de navios (Ryan *et al.*, 2009).

Uma vez no ambiente aquático, os plásticos são degradados em pedaços de menores dimensões, podendo ser encontrados sob formas macro (>25 mm), meso (5-25 mm) e microplásticos (≤ 5 mm) (Arthur *et al.*, 2009). Apesar desta classificação, um dos principais desafios na avaliação dos impactos dos plásticos no ambiente marinho é a falta de metodologias padronizadas utilizadas nos diferentes estudos, tornando problemática as comparações entre eles (Avio *et al.*, 2015).

Os processos de degradação dos plásticos podem ser químicos, mecânicos, físico-químicos e biológicos e levam à redução drástica do peso molecular médio dos polímeros (Cózar *et al.*, 2014). Os plásticos tornam-se frágeis e quebradiços principalmente devido à erosão mecânica por ação de ventos, ondas e partículas de sedimentos e devido à ação da radiação solar (fotólise) (Moore, 2008).

Os microplásticos (MPs) definem-se como partículas com um tamanho <5 mm, que podem resultar da degradação de partículas de maiores dimensões ou da produção de plásticos de pequenas dimensões (Moore, 2008; Arthur *et al.*, 2009; Kazmiruk *et al.*, 2018). Atualmente não existem definições que indiquem explicitamente um limite de tamanho inferior, que normalmente é assumido como sendo o tamanho da malha da rede através do qual a amostras passam durante a amostragem, preparação ou extração (Filella, 2015).

Os MPs podem ser classificados em primários e secundários. Os MPs primários são definidos como sendo plásticos que são fabricados para serem de um tamanho microscópico (Zitko e Hanlon, 1991). Estes plásticos incluem as microesferas utilizadas em esfoliantes faciais, pastas de dentes, fibras sintéticas e pellets de resina industrial, que servem de precursores para a produção de produtos de plástico. Os MPs secundários são originados através da ação mecânica e destruição oxidativa de plásticos de maiores dimensões (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012) que podem ter origem no mar ou em terra. Exemplos de fontes de plásticos com origem no mar incluem equipamentos de pesca e esgotos de navios. As fontes em terra incluem vários itens das indústrias de plásticos como materiais de embalagens, sacos de plásticos e outros resíduos (EU, 2016).

Os MPs já foram identificados numa grande variedade de ambientes marinhos incluindo a superfície do oceano, coluna de água, mar profundo e em sedimentos costeiros (Andrady, 2011; Cole *et al.*, 2011) desde os habitats mais remotos no Ártico (Obbard *et al.*, 2014; Lusher *et al.*, 2015) até ao oceano Antártico (Isobe *et al.*, 2017) ilustrando a sua elevada dispersão nos ecossistemas. Depois de entrarem nos oceanos, os MPs compostos por polímeros mais densos afundam no fundo do mar. No entanto, os pedaços mais leves e flutuantes são dispersados através de correntes, entrando assim na circulação oceânica acumulando-se nos giros oceânicos e mares semifechados (Cózar *et al.*, 2017). Vários estudos demonstraram que os plásticos de baixa densidade (ex: polipropileno ou o polietileno) são predominantes nas camadas superiores da coluna de água, embora os plásticos flutuantes possam sofrer incrustação biológica, fazendo com que estes eventualmente afundem. Por outro lado, os plásticos de elevada densidade como o PVC, PA e poliéster, normalmente são encontrados no fundo do mar (Andrady, 2011). Consequentemente, os três principais tipos de polímeros encontrados nos oceanos, que constituem os MPs, são o polietileno (PE), polipropileno (PP) e poliestireno (PS) (EU, 2016).

Outro tipo de MPs são as microfibras que derivam da libertação de fibras para o ambiente durante a produção, uso e rejeição em fim de vida de produtos têxteis. Uma das principais fontes de

microfibras são as máquinas de lavar a roupa. Estima-se que são perdidas cerca de 0 a 2 gramas de microfibras por peça de roupa (Hartline *et al.*, 2016).

Atualmente, cerca de dois terços de todos os itens têxteis são sintéticos e compostos por polímeros orgânicos à base de petróleo como o acrílico (PMMA), poliamida (PA) e poliéster (PES) (Henry *et al.*, 2019). Estas fibras têm sido encontradas na precipitação atmosférica, ambientes interiores (apartamentos e escritórios) e exteriores (Dris *et al.*, 2016; Gasperi *et al.*, 2018) e em vários ecossistemas em todas as regiões do planeta e constituem cerca de 35% dos microplásticos primários em ambientes marinhos (Henry *et al.*, 2019).

Um dos primeiros estudos sobre a libertação de microfibras foi realizado por Browne *et al.* (2011) que mostrou que uma única peça de roupa pode libertar mais de 1900 fibras por lavagem. Posteriormente, em 2016, Napper e Thompson (2016) estimaram que por lavagem de uma carga de 6 kg de roupa de tecido acrílico podem ser libertadas cerca de 700000 fibras. A libertação destas microfibras faz com que estas fiquem disponíveis no meio ambiente sendo facilmente confundíveis com o alimento natural dos organismos marinhos como os peixes.

1.2. Impactos do plástico nos organismos marinhos e no ser humano

O primeiro estudo em que se observou a ocorrência de detritos plásticos em peixes foi efetuado em 1972, tendo sido identificada a presença de microplásticos em larvas e juvenis de solha-de-inverno (*Pseudopleuronectes americanus*) no norte do oceano Atlântico (Carpenter *et al.*, 1972). O tamanho dos microplásticos sobrepõe-se com a dimensão de muitos organismos planctónicos e como resultado são frequentemente ingeridos por organismos detritívoros e planctívoros como os peixes (Wright *et al.*, 2013). Os microplásticos podem ser transferidos ao longo das cadeias tróficas marinhas através de várias espécies de peixes, muitas das quais possuem importância comercial (Ory *et al.*, 2018). Uma vez no ambiente marinho, os microplásticos são colonizados por algas produtoras de compostos organossulfuros conhecidos como DMS que mimetizam os odores das presas naturais, levando ao consumo por equívoco (Procter *et al.*, 2019).

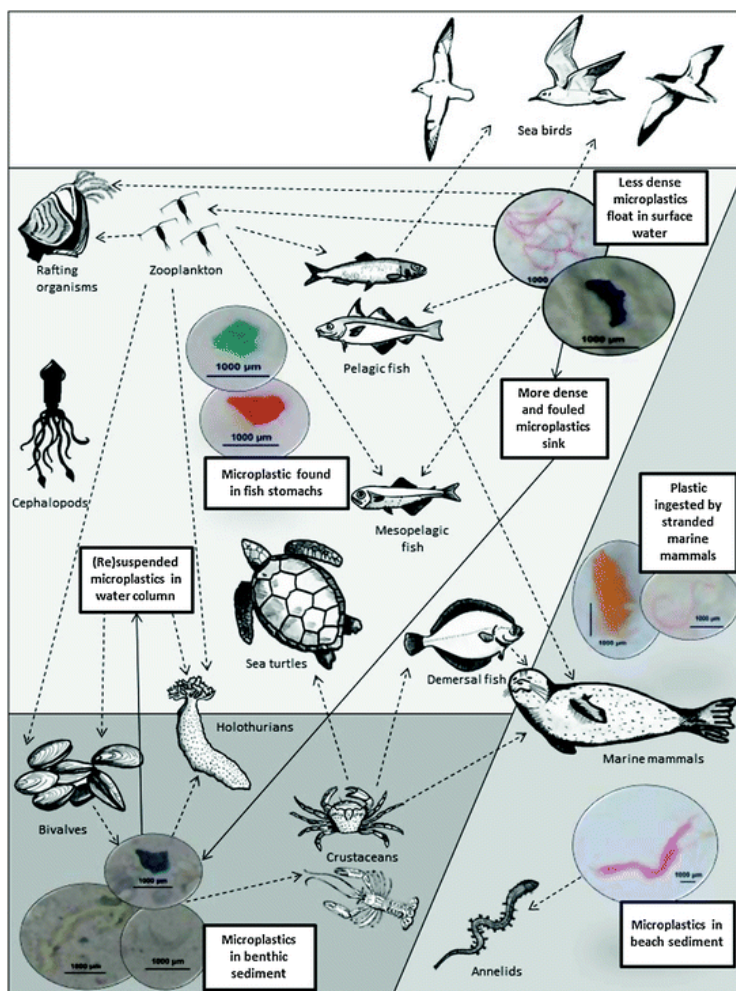


Figura 1.1- Interações dos microplásticos com as matrizes físicas e químicas no ambiente marinho. Setas com preenchimento sólido representam as ligações ambientais e as setas a tracejado representam as ligações biológicas (Reproduzido de Lusher *et al.*, 2015).

A ingestão de microplásticos pode ocorrer de forma direta, ou indireta através do consumo de organismos contaminados (Cole *et al.*, 2013). Existem inúmeras consequências da ingestão de partículas de microplásticos para os organismos marinhos. A sua ingestão pode causar bloqueios internos, abrasão e danos no aparelho digestivo dos peixes (Nadal *et al.*, 2016; Cannon *et al.*, 2016), o que poderá causar desnutrição e potencial morte do animal (Gregory *et al.*, 2009). Estudos médicos com roedores e humanos relatados por Browne *et al.* (2008), mostram que os microplásticos podem translocar-se da cavidade intestinal para a corrente sanguínea, acumulando-se nos tecidos e células. Assim, a ingestão destas partículas por peixes pelágicos é uma problemática de extrema relevância para o ser humano. Para além da toxicidade inerente da composição dos polímeros e a presença de aditivos, a química dos microplásticos pode ser alterada. Estas alterações ocorrem através da presença de substâncias tóxicas já existentes no ambiente marinho que adsorvem à superfície do plástico (Ziccardi *et al.*, 2016). Estas substâncias podem ser metais pesados e poluentes orgânicos persistentes (POP) que podem ser transferidos para os organismos, causando disrupções endócrinas (Teuten *et al.*, 2009) e entrar nas cadeias tróficas marinhas (Setälä *et al.*, 2014).

Os microplásticos podem ser absorvidos pelos organismos através de outros processos (Lusher *et al.*, 2015; Foley *et al.*, 2018). A relação entre a morfologia do aparelho filtrador e a presença de partículas antropogénicas foi estudada por Collard *et al.* (2017a) em três espécies de peixes planctívoros (sardinha, biqueirão e arenque), em que a sardinha foi a espécie que ingeriu o maior número de partículas antropogénicas devido ao facto de possuir a maior área de filtração e um espaço entre branquispinhas mais pequeno, tornando-se a espécie mais vulnerável.

Nos peixes planctívoros as branquispinhas protegem o epitélio branquial retendo as partículas da coluna de água durante a respiração (Gerking, 1994). Em algumas espécies, como os *Clupeiformes*, as branquispinhas podem ter uma segunda função relacionada com os mecanismos de alimentação (Elsheikh, 2013). Assim, a acumulação de microplásticos pode ocorrer e depende das diferentes morfologias dos aparelhos respiratórios dos peixes.

A presença de detritos de plástico já foi detetada em produtos que se destinam ao consumo humano, como peixe e marisco comprados em mercados e conservas (Neves *et al.*, 2015; Karami *et al.*, 2018) Para além destes estudos, foram ainda detetados microplásticos nos estômagos de peixes com importante interesse comercial no mediterrâneo (Romeo *et al.*, 2015) e no trato gastrointestinal e fígado de biqueirão e sardinhas que podem ser consumidos inteiros (Avio *et al.*, 2015; Collard *et al.*, 2017b; Compa *et al.*, 2018). Estas evidências levantam preocupações em relação à ingestão de microplásticos pelo ser humano e os seus potenciais efeitos na saúde humana.

Contudo, as implicações da ingestão de microplásticos para a saúde humana ainda são desconhecidas. Vários cientistas especulam que os microplásticos com tamanho superior a 150 μm provavelmente nunca serão absorvidos ao nível do intestino, enquanto os microplásticos menores que 150 μm podem ser translocados da cavidade intestinal para a linfa e sistema circulatório, causando exposição sistémica (Panel e Chain, 2016).

Especula-se ainda que apenas os microplásticos com tamanhos $\leq 20 \mu\text{m}$ sejam capazes de entrar nos órgãos, enquanto as frações menores ($0,1 > 10 \mu\text{m}$) são capazes de aceder a vários órgãos, atravessar as membranas celulares, barreiras hematoencefálicas e a placenta (Browne *et al.*, 2008; Galloway, 2015; Panel e Chain, 2016). Tendo em consideração esta probabilidade, a presença de microplásticos foi recentemente observada em órgãos (vísceras e brânquias) e carne eviscerada (peixe inteiro excluindo vísceras e brânquias) em cavala indiana (*Rastrelliger kanagaruta*),

anchova (*Stolephorus waitei*), tainha verde (*Chelon subviridis*) e *Johnius belangerii* (Karami *et al.*, 2017). Para além deste estudo, foram detetados microplásticos nos músculos de espécies de peixes com interesse comercial (Akhbarizadeh *et al.*, 2018; Barboza *et al.*, 2020). Estes estudos levantam preocupações sobre possíveis implicações para os consumidores humanos.

1.3. Costa Portuguesa – Vulnerabilidade aos MPs

Portugal encontra-se localizado no Sudoeste da Europa, na Península Ibérica e é o país mais ocidental da Europa continental, sendo delimitado pelo oceano Atlântico a oeste e sul e pela Espanha ao norte e leste. Este é atravessado por vários rios que têm origem em Espanha e que na sua maioria fluem de leste para oeste e que desaguam no oceano Atlântico. Um estudo recente efetuado em 2019 no rio Ebro, um dos maiores da península ibérica, concluiu que os rios constituem vias de transporte de microplásticos originados no interior para os oceanos (Barbuzano, 2019). Tendo em consideração as características da costa portuguesa e dos vários cursos de água existentes, a costa portuguesa é vulnerável aos resíduos de plásticos provenientes de fontes terrestres. Para além destas fontes terrestres, existem fontes marinhas de poluição que incluem a pesca e atividades marítimas recreativas. Adicionalmente, Portugal constitui uma importante rota para navios comerciais e de cruzeiro (Frias *et al.*, 2014). Normalmente são encontradas elevadas concentrações de microplásticos nas áreas costeiras, próximas de instalações industriais, grandes áreas metropolitanas e portos de pesca (Frias *et al.*, 2014).

Anteriormente foram efetuadas investigações ao nível dos detritos plásticos (Martins e Sobral, 2011) e microplásticos (Antunes *et al.*, 2018) nas praias da costa portuguesa, em amostras de zooplâncton recolhidas nas águas costeiras de Portugal (Frias *et al.*, 2014) e em várias espécies de peixes com interesse comercial (Neves *et al.*, 2015) e em peixes do estuário do Mondego (Bessa *et al.*, 2018). Recentemente realizou-se um estudo em três espécies de peixes com interesse comercial (*Dicentrarchus labrax*, *Trachurus trachurus* e *Scomber colias*) do nordeste do Oceano Atlântico capturadas em Portugal (Barboza *et al.*, 2020), sendo analisados os tratos gastrointestinais, brânquias e músculos. Em 2020, foi ainda realizado um estudo em peixes pelágicos planctívoros (*Sardina pilchardus*, *Trachurus trachurus*, *Engraulis encrasicolus*, *Scomber colias*, *Scomber scombrus* e *Boops boops*) em águas Atlanto-ibéricas, em que analisaram os conteúdos estomacais de modo a investigar uma relação entre a ingestão de MPs e a composição das dietas dos peixes (Lopes *et al.*, 2020).

Apesar da existência destes estudos, a nível nacional e internacional a maioria dos estudos focam-se na existência de microplásticos nos tratos gastrointestinais dos organismos, mas pouco se sabe sobre a sua presença noutros tecidos e principalmente em tecidos consumidos pelo ser humano.

1.4. DQEM e descritor 10

A Diretiva 2008/56/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de junho de 2008, designada de Diretiva Quadro “Estratégia Marinha” (DQEM) estabelece um quadro de ação comunitária em que os Estados-Membros devem elaborar estratégias para as águas marinhas sob soberania ou jurisdição nacional e adotar as medidas necessárias de modo a obter ou manter um bom estado ambiental (BEA) do meio marinho até 2020.

A DQEM é considerada o pilar ambiental da política marítima integrada e tem como principais objetivos preservar, proteger e valorizar os ambientes marinhos, impedindo que estes sejam danificados e promover a recuperação, bem como prevenir e reduzir a poluição marinha.

No Anexo II da DQEM consta que a definição do conjunto de características correspondentes ao BEA das águas marinhas deve ter em consideração onze descritores qualitativos. Estes descritores estão relacionados com vários temas de conservação dos ecossistemas, biodiversidade, qualidade das águas marinhas e pressões e impactos no meio marinho e que definem o BEA em águas marinhas sob soberania e jurisdição dos Estados-Membros da EU.

O descritor 10 (D10 - As propriedades e quantidade de lixo marinho não prejudicam o meio costeiro e marinho) engloba a problemática do lixo marinho. A inclusão do D10 na DQEM reflete a preocupação global de que o lixo marinho acarreta consequências prejudiciais para os organismos, ambiente e para a saúde humana. Contudo, ainda existem inúmeros parâmetros e programas de monitorização que necessitam de ser melhorados, como a monitorização do lixo microscópico e dos fundos marinhos e águas de superfície. Ainda não existe uma uniformização metodológica bem definida que permita comparar o impacto do lixo marinho nos organismos e no ambiente, bem como a sua potencial toxicidade e impacto no ser humano.

Em 2017, a Decisão 2010/477/EU foi revogada e passou a entrar em vigor a Decisão (UE) 2017/848 da Comissão, de 17 de maio de 2017. Esta decisão estabelece novos critérios e normas metodológicas para avaliar o BEA das águas marinhas. Nesta última Decisão da Comissão foram adicionadas as normas metodológicas, especificações e métodos normalizados de monitorização e avaliação a utilizar pelos Estados-Membros. Nesta decisão destacam-se alguns critérios de avaliação como: o critério D10C2, em que foi definida a quantidade de lixo microscópico por categoria em número de elementos e peso em gramas (g) por quilómetro quadrado (km²) no caso de amostras da camada superficial da coluna de água e nos sedimentos do fundo do mar. Para o D10C3 “A quantidade de lixo e lixo microscópico ingerida pelos animais marinhos situa-se num nível que não afeta negativamente a saúde das espécies em causa” foi definida a quantidade de lixo/lixo microscópico em gramas (g) e número de elementos por indivíduo de cada uma das espécies em relação ao tamanho (peso ou comprimento, consoante os casos) do indivíduo amostrado. Por fim no D10C4 foi definido o número de indivíduos afetados (efeitos letais ou subletais) por espécie. Estes parâmetros e especificações foram tidos em consideração para a realização deste estudo de modo a selecionar a espécie mais adequada para monitorizar a presença de microplásticos na coluna de água.

Ainda no âmbito da DQEM, no 1º ciclo de implementação que decorreu entre 2012 e 2018 foram definidas metas para os descritores avaliados. Relativamente ao D10, uma dessas metas consistia em selecionar o indicador biológico mais adequado para avaliar o impacto do lixo marinho no biota para a subdivisão do Continente. No entanto a meta não foi totalmente atingida devido à inexistência de estudos e monitorização dirigidos aos indicadores. A escolha destes bioindicadores iriam permitir o estabelecimento de programas de monitorização de modo a acompanhar a evolução do D10 da DQEM. Atualmente encontra-se a decorrer o 2º ciclo de aplicação da diretiva (2018-2024) em que os relatórios iniciais para as quatro subdivisões nacionais (incluindo a subdivisão do Continente) encontram-se para consulta pública. Neste relatório, relativamente ao D10 foram propostas potenciais espécies indicadoras para a avaliação dos critérios D10C3 e D10C4 na subdivisão do Continente.

Um bioindicador é um organismo (ou comunidade de organismos) que contém informação acerca da qualidade do ambiente (Chovanec *et al.*, 2003). A utilização de organismos marinhos como bioindicadores da poluição causada pelos plásticos pode fornecer informações cruciais que melhor integrem a presença espacial e temporal de detritos plásticos no mar (Bonanno e Orlando-Bonaca, 2018). No Atlântico Nordeste a espécie de pardela-do-ártico (*Fulmarus glacialis*) é um

dos indicadores formais do lixo marinho na OSPAR (Convenção para a Proteção do Meio Marinho do Atlântico Nordeste) e na DQEM (OSPAR, 2008). No Mar Mediterrâneo, a espécie de tartaruga-marinha-comum (*Caretta caretta*) é ainda utilizada para monitorizar a presença de lixo marinho sob a Convenção UNEP-MED POL e o Descritor 10 da DQEM na UE.

As espécies acima descritas, não ocorrem em Portugal ou são espécies migratórias, inviabilizando a sua utilização como bioindicadores na subdivisão do Continente. Assim, é necessário que as metodologias que envolvam espécies específicas tenham em consideração a distribuição biogeográfica das mesmas. É necessário um conjunto de espécies para monitorizar o lixo marinho ingerido pelos organismos, uma vez que uma única espécie não permite cobrir todas as regiões da Europa (MSFD, 2013).

Os peixes são geralmente considerados excelentes bioindicadores de poluição, uma vez que são organismos no topo da cadeia alimentar aquática, vida longa, fáceis de amostrar e tamanhos ideais para análises (Chovanec *et al.*, 2003). A escolha de um bom bioindicador tem de ter em consideração as várias características das espécies. Recentemente, Fossi *et al.* (2018) definiram seis critérios para selecionar um bom bioindicador do lixo marinho, sendo necessária a existência de informações específicas das espécies. Os critérios de seleção necessitam de ter em consideração: **1)** Informação histórica das características taxonómicas, biológicas e ecológicas da espécie; **2)** Informação sobre o habitat e distribuição natural das espécies; **3)** Informações tróficas e do comportamento alimentar, como os mecanismos alimentares (ex. alimentação por filtração) e comportamentos de alimentação (ex: alimentação em cardume, alimentação bentónica, oportunista, etc.); **4)** Distribuição espacial de modo a permitir uma cobertura espacial adequada; **5)** Importância comercial e estatuto de conservação que pode permitir estimar a potencial transferência de plásticos associados aos recursos pesqueiros consumidos pelos humanos; **6)** Informação documentada sobre a ingestão de lixo marinho, através de estudos publicados e estatísticas.

Tendo em conta a falta de bioindicadores, em Portugal, para a avaliação dos critérios do D10 da DQEM, esta dissertação pretende responder à necessidade de selecionar e propor uma espécie de peixe que possua as características de bom indicador biológico. Os peixes da costa portuguesa que integram este estudo possuem uma ampla distribuição e têm uma elevada importância comercial o que os torna excelentes candidatos a bioindicadores na costa portuguesa.

1.5. Objetivos

Este estudo tem como objetivo principal selecionar a espécie e o tecido mais adequado para monitorizar a quantidade de microplásticos na coluna de água. A informação obtida será da maior importância para a aplicação do critério D10C3 (a quantidade de lixo e lixo macroscópico ingerido pelos animais marinhos situa-se num nível que não afeta negativamente a saúde das espécies em causa) do D10 da DQEM. Para alcançar o objetivo deste estudo, pretende-se:

- Avaliar a acumulação de microplásticos em três tecidos (brânquias, trato gastrointestinal e músculo) de três espécies de peixes: carapau (*Trachurus trachurus*, Linnaeus, 1758), sardinha (*Sardina pilchardus*, Walbaum, 1792) e biqueirão (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758);
- Comparar o N^o de MPs/ g de tecido entre os vários tecidos das espécies;
- Caracterizar e identificar os MPs encontrados nas espécies através da espectroscopia FTIR;
- Selecionar e propor um bom bioindicador para o D10 da DQEM para as águas marinhas portuguesas.

MATERIAL E MÉTODOS

2. Material e Métodos

2.1. Caracterização da área de estudo

As amostras de peixe foram recolhidas ao longo da plataforma continental portuguesa e do Golfo de Cádiz, nas estações assinaladas na Figura 2.1. Todas as amostras deste estudo foram recolhidas durante o dia, utilizando a técnica de arrasto, a bordo do NI Noruega durante a campanha Pelago 18, que decorreu entre abril e maio de 2018, iniciada em 26 de abril.

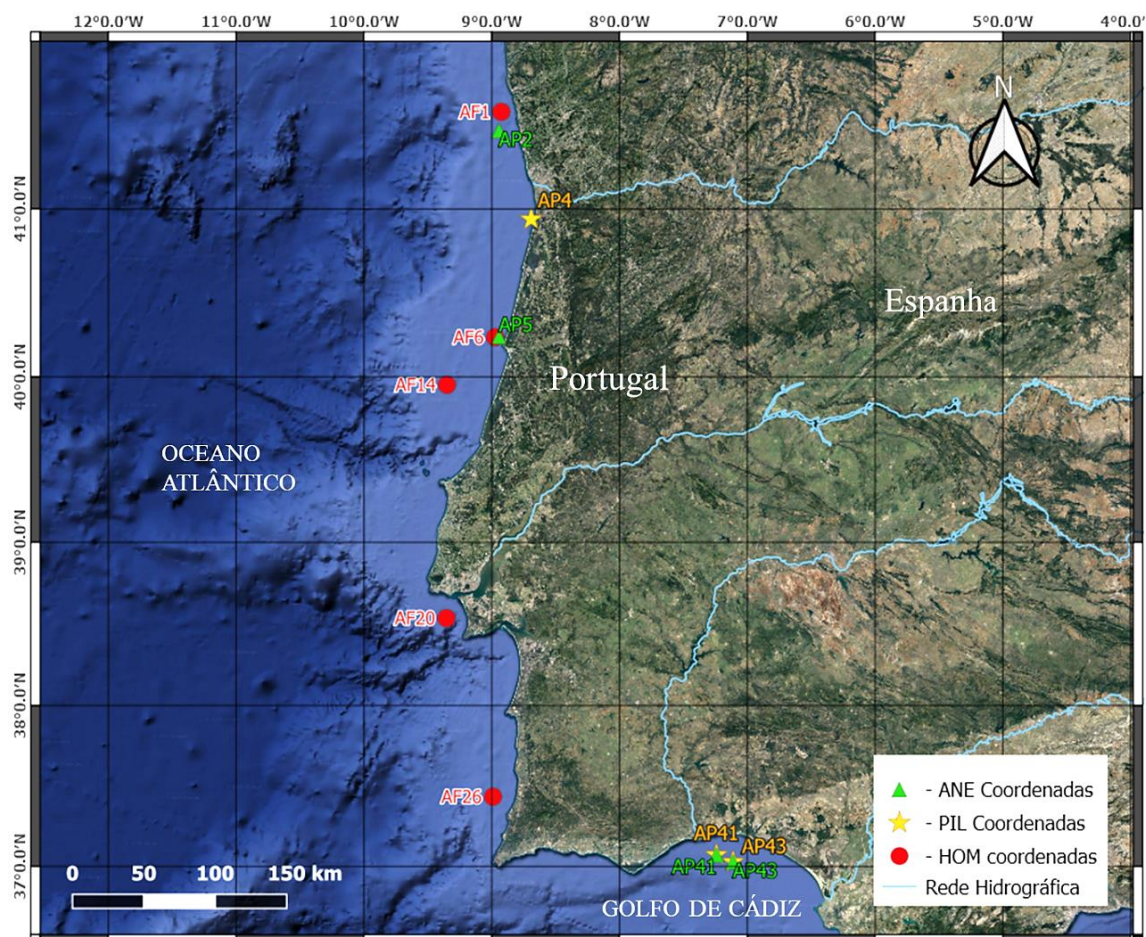


Figura 2.1- Plataforma continental portuguesa e Golfo de Cádiz com as estações de amostragem dos indivíduos capturados: de biqueirão (▲), sardinha (★) e carapau (●).

O *upwelling* costeiro nestas áreas ocorre principalmente ao longo da costa ocidental e norte da Península Ibérica durante os meses de primavera-verão (Botas *et al.*, 1990). Este fenómeno gera uma importante produção primária (Fiúza, 1984), que afeta a disponibilidade de alimento e a reprodução e recrutamento dos pequenos peixes pelágicos. Sabe-se, ainda, que estas áreas apresentam diferenças em termos de produtividade e características oceanográficas (Mason *et al.*, 2006), que mostraram anteriormente resultar em diferenças significativas na composição da dieta das populações de sardinha (Garrido *et al.*, 2008a). O número de espécies capturadas em cada local variou em cada arrasto, dependendo da disponibilidade de captura. As várias estações de amostragem e as respetivas espécies podem ser observadas na Figura 2.1.

2.2. Biologia e características das espécies estudadas

Para este estudo, foi escolhida uma espécie semi-pelágica, o carapau (*Trachurus trachurus*). Foram também escolhidas duas espécies pelágicas com um importante valor comercial: sardinha (*Sardina pilchardus*, Walbaum, 1792) e biqueirão (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758). Para a seleção das espécies a estudar foram tidos em consideração diversos fatores, nomeadamente, biológicos e socioeconómicos.

O carapau-branco (*Trachurus trachurus*) (código FAO: HOM) (figura 2.2 a) é uma espécie semi-pelágica (Rumolo *et al.*, 2017) e oceanódroma que habita a coluna de água e forma grandes cardumes em áreas costeiras de substratos arenosos (Wheeler e Du Heaume, 1969). Esta espécie possui uma ampla distribuição geográfica e é encontrada no oceano Atlântico nordeste, desde a Islândia até Cabo Verde, Mar Mediterrâneo e Mar Negro (Whitehead, 1984). Na costa portuguesa ocorre entre os 100 e os 200 m de profundidade, podendo atingir os 500 m (Whitehead, 1984). Tem um ciclo de vida longo, podendo atingir mais de 40 anos de idade (Abaunza *et al.*, 2003). A alimentação é composta por copépodes, decápodes, moluscos, ovos de peixe, larvas e cefalópodes (Olaso *et al.*, 1999). Segundo um estudo efetuado por Garrido *et al.* (2015), verificou-se uma ausência de presas com tamanhos pequenos (<200 μm) e números reduzidos de presas com tamanhos entre os 200-500 μm em estômagos de carapaus adultos e juvenis. O carapau é um recurso pesqueiro importante explorado em Portugal, sendo que em 2019 os volumes de capturas aumentaram (+68,9%) com 1 615 toneladas INE, 2019).

A sardinha europeia (*Sardina pilchardus*) (código FAO: PIL) (figura 2.2 b) é a principal espécie pelágica capturada em Portugal continental. É uma espécie marinha epipelágica e nerítica (Wuertz, 2010), migratória, da família *Clupeidae* e apresenta um ciclo de vida curto e crescimento rápido. A distribuição é restrita às águas costeiras da plataforma, principalmente a profundidades acima dos 150 m, formando cardumes durante o dia (Stratoudakis *et al.*, 2007). Em Portugal a distribuição geográfica desta espécie abrange todo o litoral, ilha da Madeira e dos Açores (Parrish *et al.*, 1989). A sardinha alimenta-se através de 2 modos, alternando os comportamentos dependendo do tamanho das presas. A alimentação por filtração (não seletiva) é utilizada na captura de presas com tamanhos $\leq 724 \mu\text{m}$, enquanto a alimentação raptorial ou particulada (seletiva) é utilizada para a captura de presas com tamanhos $\geq 780 \mu\text{m}$ (Garrido *et al.*, 2007). A alimentação é composta por micro e mesozoplâncton e fitoplâncton como dinoflagelados e diatomáceas e ovos de peixe (Garrido *et al.*, 2007), no entanto podem alimentar-se de nanoplâncton retendo partículas com tamanhos de 4 μm (Cunha *et al.*, 2005). Em Portugal este peixe possui uma elevada importância socioeconómica e está associada a tradições portuguesas (Teixeira *et al.*, 2015) e é consumida fresca, utilizada na indústria conserveira e para isco.

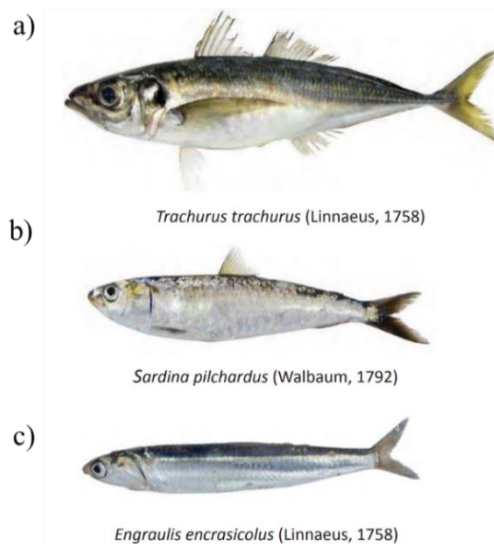


Figura 2.2- Espécies estudadas (a) Carapau-branco; (b) Sardinha europeia; (c) Biqueirão. (Adaptação de Martins e Carneiro, 2018).

O biqueirão (*Engraulis encrasicolus*) (código FAO: ANE) (figura 2.2 c) é um pequeno pelágico marinho e costeiro que forma cardumes de grandes dimensões (Leonart e Maynou, 2003). Tem uma distribuição no Mar Negro e Azov, no mediterrâneo e costa Atlântica da Europa (Whitehead, 1985). Nas populações do sul da Europa, existem divisões genéticas na área do Atlântico Ibérico (Caneco *et al.*, 2004). Atinge tamanhos médios entre os 12 e os 18 cm, e possui um ciclo de vida curto (Ribeiro *et al.*, 1996). Esta espécie alimenta-se através de alimentação por filtração ou alimentação raptorial (particulada) (O’Connell, 1972). Esta capacidade de alternar comportamentos alimentares torna o biqueirão um predador flexível e oportunista (Borme *et al.*, 2009). A sua dieta é composta por presas meso pelágicas e fitoplâncton (Bulgakova, 1996) com tamanhos relativamente pequenos com cerca de 720 µm (James *et al.*, 1989). Segundo o (INE, 2017) o biqueirão tem vindo a adquirir maior relevância. Em 2017, em Portugal foram transacionadas em lota 9021 toneladas de biqueirão, sendo esta a quantidade mais elevada desde que existem registos para esta espécie.

2.3. Tecidos analisados

Os tecidos escolhidos, trato gastrointestinal, brânquias e músculo, foram selecionados tendo em consideração a diferente informação que podem fornecer. A ingestão de microplásticos por várias espécies de peixes tem sido bem documentada desde o início da presente década (Boerger *et al.*, 2010; Davison e Asch, 2011) e a literatura e estudos sobre o tema têm progressivamente aumentado. Assim, o trato gastrointestinal foi escolhido dado que a análise dos conteúdos estomacais permite recolher informação acerca da ingestão de microplásticos por cada espécie.

As brânquias são um órgão multifuncional envolvido na troca de gases dos peixes. Em algumas espécies, como nos *Clupeiformes*, as branquispinhas adquiriram uma segunda função relacionada com a alimentação (Elsheikh, 2013). Os peixes que se alimentam por filtração, possuem branquispinhas numerosas e alongadas que são utilizadas como uma rede para extrair o alimento da água diretamente para o esófago (Collard *et al.*, 2017a). Assim, este tecido foi escolhido de modo a melhor representar a presença de MP na água e ainda relacionar com a sua dieta e comportamento alimentar.

Estudos recentes reportaram a existência de microplásticos em músculo de várias espécies de peixes (Abbasi *et al.*, 2018; Akhbarizadeh *et al.*, 2018; Barboza *et al.*, 2020). Embora as implicações da ingestão de microplásticos para a saúde humana ainda sejam desconhecidas, uma vez que Portugal é o maior consumidor de peixe por habitante na UE e o terceiro a nível mundial, consumindo em média cerca de 61,5 kg/*per capita*/ano (Guillen *et al.*, 2018) é importante avaliar a presença de microplásticos nos tecidos musculares dos peixes. Assim, o tecido muscular foi escolhido, pois são necessários mais estudos de modo a preencher as lacunas existentes.

2.4. Parâmetros biométricos e parametrização das unidades utilizadas

A tabela 2.1 resume por espécie, as classes de comprimento (cm), o peso total (g) e o número total de indivíduos capturados. Esta informação permite ter uma maior perceção das diferenças de tamanhos dentro da mesma espécie. Foram capturados mais indivíduos de carapau comparativamente às outras espécies. Os comprimentos de todos os indivíduos amostrados variaram entre os 8,0 cm (sardinha) e os 25,5 cm (carapau), sendo os maiores pesos registados nos indivíduos de carapau.

Tabela 2.1- Resumo das características biométricas dos exemplares das espécies *Trachurus trachurus* (HOM), *Sardina pilchardus* (PIL) e *Engraulis encrasicolus* (ANE) analisados: classes de comprimento (cm), peso total (g) e nº total de indivíduos capturados.

| Espécie | Classes de comprimento (cm) | Peso total (g) | Nº total de indivíduos |
|----------------|------------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| HOM | 12-25,5 | 14,8-148,7 | 84 |
| PIL | 8-18 | 3,65-60,4 | 68 |
| ANE | 9,5-12,5 | 6,6-13,0 | 44 |

Os dados foram apresentados tendo em consideração as unidades de medida para o D10C3 definidos na DQEM (Diretiva 2008/56/CE), que permite padronizar as metodologias para avaliar o BEA. Para a apresentação dos resultados utilizou-se o número de MPs encontrados por grama de tecido analisado (Nº MPs/g tecido). A utilização de uma normalização à grama permite a comparação de indivíduos com diferentes tamanhos e diferentes pesos de cada tecido. No entanto, a maioria dos estudos de microplásticos existentes apresentam os resultados em número de MPs encontrados em cada tecido, não tendo em consideração os pesos dos tecidos. De forma a ilustrar esta problemática, foi efetuada uma análise prévia utilizando as medianas do número de MPs e número de MPs/g nos tratos gastrointestinais (Tabela 2.2). Nessa tabela, podemos constatar que utilizando os mesmos dados, mas tratados de forma distinta, os resultados obtidos são diferentes. Analisando as medianas do número de MPs nos tratos gastrointestinais para todas as espécies constata-se que não existe diferenças na abundância de MPs entre as várias espécies. Contudo, ao tratar os mesmos dados tendo em consideração uma normalização à grama de tecido podemos verificar que a sardinha apresenta uma mediana superior às outras duas espécies. Estas análises permitem concluir que os mesmos dados tratados de formas diferentes conduzem a resultados distintos ao nível das medianas, levando a uma sobrevalorização ou subvalorização dos mesmos. Esta problemática evidencia a necessidade de uniformização ao nível do tratamento dos dados nos vários estudos de forma a serem comparáveis entre si.

Tabela 2.2- Medianas, mínimos e máximos do Nº de MPs e do Nº de MPs/g encontrados nos tratos gastrointestinais de *Trachurus trachurus* (HOM), *Sardina pilchardus* (PIL) e *Engraulis encrasicolus* (ANE), capturadas na costa portuguesa e Golfo de Cádiz.

| Nº de MPs no trato gastrointestinal | HOM | PIL | ANE |
|--|------------|------------|------------|
| Mediana | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Min-Máx | 0-14 | 0-10 | 0-3 |
| Nº de MPs/g de trato gastrointestinal | HOM | PIL | ANE |
| Mediana | 2,38 | 6,67 | 2,04 |
| Min-Máx | 0-33 | 0-50 | 0-50 |

2.5. Amostragem, preparação e digestão das amostras

Para este trabalho foi analisado um total de 196 peixes das três espécies selecionadas (588 amostras de tecidos). Após captura, as amostras foram imediatamente congeladas a bordo, a -20°C , para posterior dissecação no laboratório. No laboratório, os peixes foram descongelados à temperatura ambiente antes de serem pesados e medidos. Para cada indivíduo, foi registado o comprimento total (cm), utilizando um ictiómetro (precisão de 0,1 cm). Cada peixe foi dissecado utilizando um bisturi, tesoura e pinças e foram removidas amostras de brânquias, trato gastrointestinal e músculo, como se pode observar na figura 2.3. De modo a evitar contaminações, as amostras recolhidas foram guardadas em sacos individuais com fecho *zip*. Todas as amostras recolhidas foram armazenadas numa arca congeladora à temperatura de -20°C até posterior análise.



Figura 2.3- Dissecação de um exemplar de *Engraulis encrasicolus* para separação de tecidos.

A metodologia de digestão selecionada para todos os tecidos teve por base o estudo efetuado por Dehaut *et al.* (2016), tendo-se adicionado às amostras um volume de uma solução de hidróxido de potássio (KOH) a 10% pelo menos 3 vezes superior ao peso do material biológico. Esta metodologia é eficiente na digestão de material biológico, apresenta uma boa relação custo-benefício e não possui impacto na integridade dos polímeros de plástico (Karami *et al.*, 2017). Estudos recentes (Kühn *et al.*, 2017) confirmaram que a utilização de uma solução de hidróxido de potássio (KOH) para a extração de plásticos de organismos é um método válido e prático. As amostras de cada tecido foram descongeladas à temperatura ambiente e posteriormente pesadas numa balança analítica (KERN 510), (precisão de 0,01g) de modo a determinar o volume de solução de KOH a ser colocado. Por forma a facilitar a digestão das amostras, as vértebras e partes duras foram cortadas com uma tesoura antes de inserir no frasco (Dehaut *et al.*, 2016). Posteriormente, as amostras foram incubadas numa estufa (Memmert, VO400cool) durante 24 h a 60°C , até a matéria orgânica estar totalmente digerida. As amostras foram agitadas manualmente ao longo da digestão, de modo a facilitar a degradação da matéria orgânica. Após digestão, as amostras foram filtradas através de um filtro de 20 μm de policarbonato (Whatman® Nuclepore) utilizando uma bomba de vácuo Millipore (Modelo wp6111560). Os filtros foram transferidos para caixas de Petri identificadas, que foram seguidamente colocadas numa estufa a 40°C de modo a secarem antes de serem visualizados à lupa.

2.6. Caracterização e deteção de microplásticos

Os filtros de cada amostra foram visualmente inspecionados de modo a detetar a presença de microplásticos. Todos os potenciais microplásticos encontrados foram recolhidos e registados com recurso a uma lupa estereoscópica binocular (Leica S9 D, ampliação de até 55x e zoom de 9: 1). A deteção visual dos microplásticos teve em consideração a cor dos itens encontrados, a sua rigidez e deformação caso fossem pressionados com uma ponta de metal rígida quente. Para a caracterização do tamanho dos MPs foi considerada a definição de Arthur *et al.* (2009) e Frias e Nash (2019) que definem os MPs como partículas $<5\text{ mm}$ (5000 μm). As partículas que não se

enquadravam nesta definição de tamanho foram desconsideradas para a caracterização e análises estatísticas.

Os potenciais microplásticos encontrados foram contabilizados por indivíduo e separados de acordo com a sua forma (fibra, filamento, fragmento, esfera, grupo de fibras e outro), cor (transparente, azul, preto, verde, vermelho, branco, multicolor, outras) e classe de comprimento (2-5 mm, 1-2 mm, 0,5-1mm, 0,3-0,5 mm, <0,3 mm). Considerou-se o tamanho 0,009mm como sendo o valor limite de detecção, uma vez que foi o tamanho de MPs mais reduzido encontrado neste estudo.

As várias tipologias e cores de MPs foram selecionadas tendo em conta as tipologias de MPs mais encontrados em publicações e os protocolos de monitorização existentes (Frias *et al.*, 2018; Bessa *et al.*, 2019). Na figura 2.4 encontram-se representadas as principais formas de MPs identificadas neste estudo.

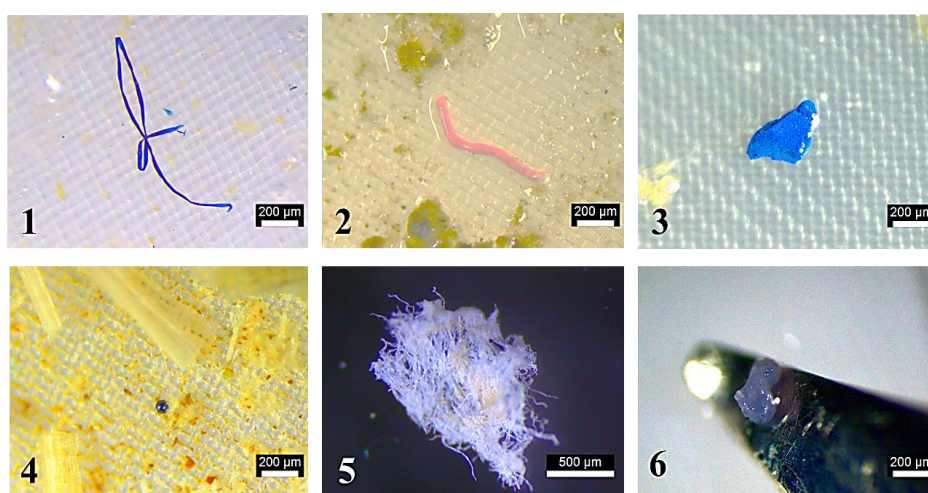


Figura 2.4- Principais formas de MPs identificados: 1) fibras; 2) filamento; 3) fragmento; 4) esfera; 5) grupo de fibras; 6) outros (esponjas e borrachas).

Todas as potenciais partículas de plástico foram isoladas e fotografadas de modo a elaborar uma base de dados fotográfica para a posterior confirmação dos grupos funcionais de polímeros utilizando a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Para a medição dos microplásticos foi utilizado o *software* ImageJ (v1.48, National Institutes of Health, U.S.A.; download efetuado a partir site <http://imagej.nih.gov>).

2.7. Minimização de contaminações

Dada a ubiquidade das microfibras nos ecossistemas marinhos (Phuong *et al.*, 2016), na precipitação atmosférica (Dris *et al.*, 2015) e no ambiente quotidiano humano, as microfibras podem ser facilmente transportadas pelo ar. De modo a diminuir as potenciais contaminações aéreas de microplásticos e microfibras no ambiente interior (Gasperi *et al.*, 2018), foram tomadas diversas medidas durante todo o procedimento laboratorial. Para todo o processo de dissecação e manipulação das amostras, foram utilizadas batas 100 % de algodão e luvas de latex de uso único. A bancada de trabalho e todos os utensílios de dissecação foram limpos com etanol, de modo a minimizar contaminações. Durante todo o processo laboratorial, foram utilizados materiais

limpos e as amostras foram armazenadas em recipientes limpos. Foram, ainda, utilizados materiais preferencialmente de vidro, aço inoxidável e metal, previamente desinfetados com Extran alcalino (Extran® AP 12) e lavados com água Milli-Q (Millipore, Milli-Q Gradient A10, ZMQS6V0T1). O sistema de purificação de água Milli-Q permite a obtenção de água ultrapura utilizando uma membrana filtradora de 0,22 μm . Entre a manipulação de cada amostra, os utensílios foram limpos com água Milli-Q. Sempre que as amostras e soluções não eram utilizadas, foram cobertas por uma película vedante de Parafilm M®. A preparação de soluções e filtrações foram efetuadas numa hotte (Indlab ENS – Industrial laborum REF: 105-0011) de modo a minimizar contaminações. Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q em frascos previamente limpos. Foram utilizados três brancos (controlo do processo de digestão) e dois controlos (controlo do processo de identificação e extração dos microplásticos). Os brancos foram processados conjuntamente com as amostras utilizando os mesmos reagentes e observados à lupa para identificação de potencial contaminação com o lote correspondente de amostras. O processamento e análise destes brancos foram efetuados no início, a meio e no fim do processamento das amostras. Os dois filtros controlo foram colocados de cada lado da lupa durante



Figura 2.5- Imagens de cúpula aberta e fechada, utilizada durante as observações à lupa de modo a diminuir contaminações.

o processo de observação dos microplásticos. Os controlos foram visualizados regularmente, utilizando uma lupa binocular, de modo a identificar contaminações. Todos os dias, foi efetuado um registo da cor das roupas utilizadas pelo operador durante o processamento e observação das amostras. De modo a diminuir as contaminações por microfibras durante o processamento das amostras à lupa foi ainda utilizado uma metodologia semelhante à apresentada no estudo de Torre *et al.* (2016). Este método foi utilizado neste estudo (figura 2.5), observando-se uma diminuição do número de microfibras observadas nos filtros controlo. Assim, durante as observações à lupa, foi utilizada uma cúpula de plástico em redor da lupa, de modo a isolar a área de contaminações aéreas por microfibras.

2.8. Análise Estatística

Os dados recolhidos foram analisados através dos métodos estatísticos considerados mais apropriados, em função das suas características e dos objetivos a atingir. As análises estatísticas foram realizadas através do *software* STATISTICA (Statsoft, 2008) e os gráficos a partir do *software* SPSS 23.0 (SPSS, Chicago, IL).

Para testar a normalidade das variáveis foi efetuado o teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors. Uma vez que se concluiu que os dados recolhidos não seguiam uma distribuição normal, optou-se por utilizar testes não-paramétricos. Assim, para efetuar comparações múltiplas entre os vários tecidos das espécies foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis H (KW-H). Para comparar amostras de dois grupos independentes, par a par (*pairwise*) utilizou-se

o teste não paramétrico de Mann-Whitney (U). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$ (indicado através do símbolo “**”).

2.9. Identificação de Polímeros

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica usada para obter um espectro de infravermelho e é utilizada para a caracterização de partículas de plástico. Esta técnica permite identificar o material em estudo através da interação das moléculas do mesmo com os infravermelhos. Os infravermelhos medem a interação entre as moléculas, e como cada material é constituído por conjugações diferentes de moléculas, cada material tem uma vibração característica (Käppler *et al.*, 2015; Tagg *et al.*, 2015). Os microplásticos encontrados foram identificados a partir de um micro-FTIR Spotlight 200i da Perkin Elmer (Perkin Elmer, USA). Este equipamento é um FTIR com um microscópio acoplado e um detetor de telureto de mercúrio e cádmio (MCT) arrefecido com azoto líquido, capaz de operar por transmissão, refletância e refletância total atenuada (ATR). Os espectros foram obtidos por refletância, com uma resolução de 4 cm^{-1} , entre os 4000 e os 600 cm^{-1} e com um número mínimo de 10 *scans*. A leitura através da espectroscopia de refletância permite obter um espectro sem entrar em contacto com a amostra. Os espectros serão apresentados em transmitância (T%) por números de onda (cm^{-1}), como se pode observar na figura 2.6. Os espectros foram analisados usando o *software* PerkinElmer Spectrum IR (versão 10.6.1) e não sofreram qualquer correção ou manipulação, exceto para a remoção da absorção de CO_2 . Os espectros obtidos foram comparados com vários espectros de referência de diferentes bases de dados (PolyATR, AR Polymer Introductory, NDFIBS, RP, CRIME, FIBERS 3, POLY1, POLYADD1 da PerkinElmer). Foi estabelecido um nível de aceitação dos espetros dos polímeros utilizando um limiar para a identificação dos espetros de 60% de semelhança ao comparar o espetro da amostra com os espetros da base de dados espectrais de referência. A figura 2.6 ilustra um exemplo da identificação de um polímero e a sua comparação com o espetro da biblioteca de dados spectral. Do total dos potenciais MPs encontrados foram analisados 35% através da técnica do FTIR. A escolha da análise deste valor percentual foi baseada nos valores habituais de referência utilizados na literatura (Alomar *et al.*, 2017; Bessa *et al.*, 2018; Barboza *et al.*, 2020; Lopes *et al.*, 2020).

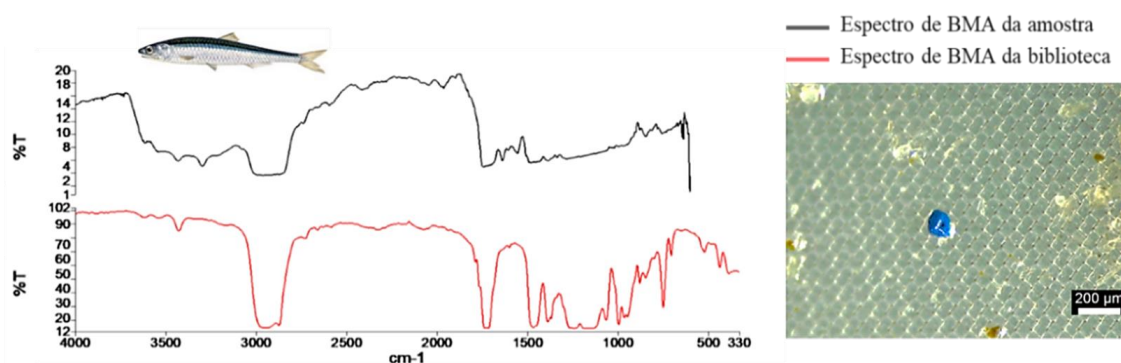


Figura 2.6- Espectro de acrilato (Butil metacrilato- BMA) obtido a partir de uma amostra de um fragmento azul encontrado em biqueirão. Em cima, a preto figura o espectro da amostra, em baixo, a vermelho encontra-se ilustrado o espectro de BMA da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm^{-1}).

RESULTADOS

3. Resultados

3.1. Microplásticos totais nas espécies

Num total de 196 peixes capturados foram detetados 757 potenciais microplásticos (MPs). No total de todos os microplásticos encontrados nas espécies e em todos os tecidos, a cor predominante foi a azul (66,8%), seguida da cor vermelha (9,6%), transparente (7,3%) e verde (6,2%). Foram ainda encontradas outras cores com percentagens inferiores como se pode observar na figura 3.1. a). As fibras foram a forma mais comum (76,8%), seguida dos fragmentos (15,6%), e filamentos (5,3%) (figura 3.1. b). Este padrão foi semelhante ao encontrado nos tratos gastrointestinais (fibras - 83,6%, fragmentos - (8,5%), e filamentos - 7,4%), nas brânquias (fibras - 58%, fragmentos - 32% e filamentos - 3%) e no músculo (fibras - 85,9%, fragmentos - 10,2% e filamentos - 3,4%).

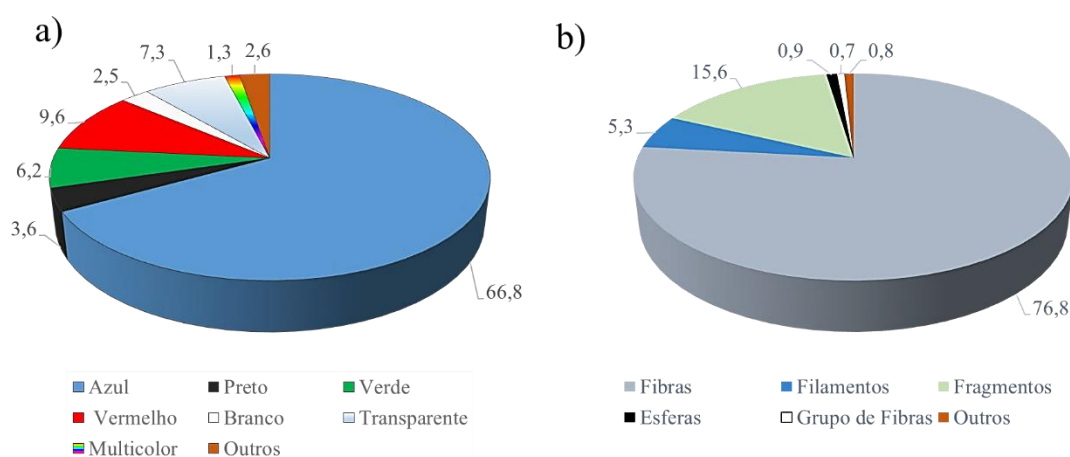


Figura 3.1- Percentagem (%) de cores (a) e formas (b) de MPs totais encontrados nos peixes estudados.

A tabela 3.1 apresenta o número total de indivíduos estudados e a % que apresentou MPs nas brânquias, nos tratos gastrointestinais e nos músculos, em cada espécie. A percentagem de indivíduos com MPs no trato gastrointestinal foi superior no carapau (81%), seguido da sardinha (72%) e por último, do biqueirão (52%). A percentagem de indivíduos com MPs nas brânquias foi semelhante em todas as espécies (carapau e biqueirão, 55% e 52% na sardinha). O carapau foi a espécie em que se observou uma maior percentagem de indivíduos com MPs no músculo (67%), seguido da sardinha (46%) e por fim, do biqueirão (43%). É de realçar que para o carapau e para a sardinha, o trato gastrointestinal foi o tecido onde se observou uma maior ocorrência de indivíduos com MPs, contrariamente ao biqueirão em que o mesmo se verificou para as brânquias.

Tabela 3.1- Número total de indivíduos (ind.) e percentagem (%) de indivíduos com MPs nas brânquias, nos tratos gastrointestinais e nos músculos das espécies *Trachurus trachurus* (HOM), *Sardina pilchardus* (PIL) e *Engraulis encrasicolus* (ANE) capturadas na costa portuguesa e Golfo de Cádiz.

| | Nº total ind. | % ind. com MPs Brânquias | % ind. com MPs Tratos gastrointestinais | % ind. com MPs Músculos |
|-----|---------------|--------------------------|---|-------------------------|
| HOM | 84 | 54,8 | 81,0 | 66,7 |
| PIL | 68 | 51,5 | 72,1 | 45,6 |
| ANE | 44 | 54,5 | 52,3 | 43,2 |

No total foram encontrados 780 potenciais detritos plásticos, sendo que 757 apresentaram dimensões entre 0,009 mm e 4,8 mm (Tabela 3.2) e 23 apresentaram, tamanhos superiores variando entre os 5,1 e os 15,5 mm. Estes últimos 23 não foram considerados nas análises estatísticas, uma vez que não se enquadram na definição do tamanho dos MPs seguida na metodologia.

Os MPs identificados nos músculos de todas as espécies (tabela 3.2) possuíam tamanhos mais pequenos, que variaram entre os 0,033-0,069 mm. Os MPs encontrados nos músculos de biqueirão registaram tamanhos reduzidos de MPs (0,033 mm) seguido do carapau (0,069 mm) e da sardinha (0,13 mm). Nas brânquias de sardinha foram observados os MPs de tamanho mais reduzido (0,009 mm). Nos tratos gastrointestinais das espécies as variações de tamanhos de MPs foram relativamente semelhantes nas espécies.

Tabela 3.2- Variação de tamanho (mm) mínimo e máximo (min-máx) dos MPs encontrados nos diferentes tecidos, brânquias, trato gastrointestinal e músculo de *Trachurus trachurus* (HOM), *Sardina pilchardus* (PIL) e *Engraulis encrasicolus* (ANE) capturadas na costa portuguesa e Golfo de Cádiz.

| | Variação de tamanho dos MPs (mm) por tecido | | |
|------------|---|------------------------|-------------|
| | Brânquias | Trato gastrointestinal | Músculo |
| HOM | 0,029- 4,8 | 0,054 - 4,8 | 0,069- 3,8 |
| PIL | 0,009 - 4,8 | 0,019- 4,6 | 0,13 - 2,7 |
| ANE | 0,052 - 4,6 | 0,053 - 4,8 | 0,033 - 2,3 |

Dos 757 MPs recolhidos das três espécies, foram isolados 215 nas brânquias (28,4%), 365 MPs nos tratos gastrointestinais (48,2%) e 177 nos músculos (23,4%).

Do total de MPs registados nas brânquias, 92 MPs foram observados no carapau, 70 na sardinha e 53 no biqueirão. Nos tratos gastrointestinais (tabela 3.3), 200 foram encontradas no carapau, 124 na sardinha e 41 no biqueirão. No tecido muscular, a distribuição pelas espécies foi a seguinte: 111 no carapau, 45 na sardinha e 21 no biqueirão.

Tabela 3.3- Número total de MPs nos vários tecidos das espécies: *Trachurus trachurus* (HOM), *Sardina pilchardus* (PIL) e *Engraulis encrasicolus* (ANE).

| | Nº total de MPs | | | |
|------------|-----------------|------------------------|----------|-------|
| | Brânquias | Trato gastrointestinal | Músculos | Total |
| HOM | 92 | 200 | 111 | 403 |
| PIL | 70 | 124 | 45 | 239 |
| ANE | 53 | 41 | 21 | 115 |

Nas brânquias, 50% dos MPs encontrados eram de cor azul, a que se seguiram a cor verde (15%), vermelha (11%) e preta (6%). Considerando os tratos gastrointestinais de todas as espécies, a cor mais frequente foi o azul (70%), seguido da transparente (10%), vermelha (9%) e preta (3%). Nos músculos a cor azul foi a mais comum (80%), seguido da vermelha (9%) e verde (4%).

3.2. Abundância e caracterização de MPs no carapau

Da análise dos 84 indivíduos de carapau, 94% continham MPs em pelo menos um dos tecidos analisados, tendo-se observado 403 MPs no total dos tecidos. Dos 403 MPs totais encontrados no carapau, a cor mais abundante foi o azul (74,4%), seguida das cores vermelho (8,7%), transparente (6%), preto (4,2%) e verde (3%). A cor multicolor e branca obtiveram a mesma percentagem com 1,5%, como se pode verificar na figura 3.2 a). As fibras foram a forma de MPs mais abundante, representando 81,4% do total encontrado no carapau, seguido dos fragmentos (8,7%), filamentos (7,4%), outros (1,2%), grupos de fibras (0,7%) e esferas (0,5%) (Figura 3.2 b). As classes de tamanho de MPs (Figura 3.2 c) mais comuns encontradas no carapau foram: a classe entre os 1-2mm (26%), 0,5-1mm (24,6%) e 2-5mm (20,7%). Nesta espécie as classes de tamanho com dimensões mais reduzidas foram as menos abundantes. A classe de tamanho <0,3mm registou a percentagem de 16,6%, sendo a classe entre os 0,3-0,5mm a classe de tamanho menos comum no carapau (11,9%).

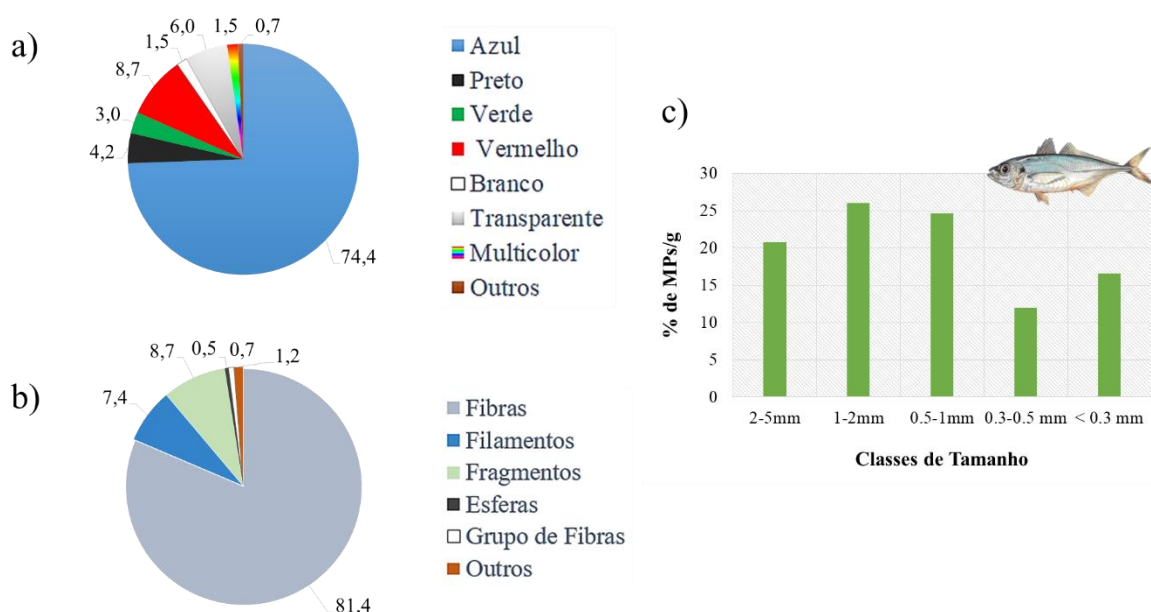


Figura 3.2 – Proporção, em percentagem (%), das cores (a), formas (b) e classes de tamanho (c) do total de MPs encontrados na espécie *Trachurus trachurus*, capturada na costa portuguesa e Golfo de Cádiz.

Nas 84 amostras de brânquias de carapau foram observados 92 MPs, representando um valor mediano de 0,31 MP/g de tecido. Nos tratos gastrointestinais foram encontrados 200 MPs, registando-se uma mediana de 2,4 MP/g de tecido (trato gastrointestinal), como se pode observar na tabela 3.4. Nos músculos de carapau foram identificadas 111 MPs, representando um valor mediano de 0,15 MPs/g de tecido.

Tabela 3.4 - Número (Nº) total de MPs e respetivas percentagens (%) de indivíduos com MPs, mediana, mínimo e máximo de MPs/g nos vários tecidos de *Trachurus trachurus* (N =84) na costa portuguesa e Golfo de Cádiz.

| | Brânquias | Tratos gastrointestinais | Músculos |
|--------------------------|-----------|--------------------------|----------|
| Nº total de MPs | 92 | 200 | 111 |
| % de ind. com MPs | 54,8 | 81,0 | 66,7 |
| Mediana (MPs/g) | 0,31 | 2,4 | 0,15 |
| Min-Máx (MPs/g) | 0-15 | 0-33 | 0-2,9 |

Em termos de cores dos MPs encontrados nas brânquias de carapau (figura 3.3 a), estas foram diversas, mas a cor predominante foi o azul (54,3%), seguido do vermelho (13%) e transparente (7,6%). A cor verde, preta e branca representaram a mesma percentagem com 6,5% como ilustra a figura 3.3 a). A cor mais frequente de MPs encontrada nos tratos gastrointestinais do carapau foi a cor azul (76,5%), seguida da vermelha (8,5%) e transparente (8,5%), como se pode observar na figura 3.4 b). Estas cores coincidiram com as encontradas nas brânquias. No músculo do carapau a cor predominante manteve-se a cor azul (88,3%), seguido da cor vermelha (5,4%), figura 3.3 c). Estas cores coincidiram com as outras cores mais frequentes encontradas nos outros tecidos do carapau. É de salientar a elevada diversidade de cores nas brânquias comparativamente aos outros tecidos, em que existe uma diminuição da variedade de cores ao longo dos tecidos.

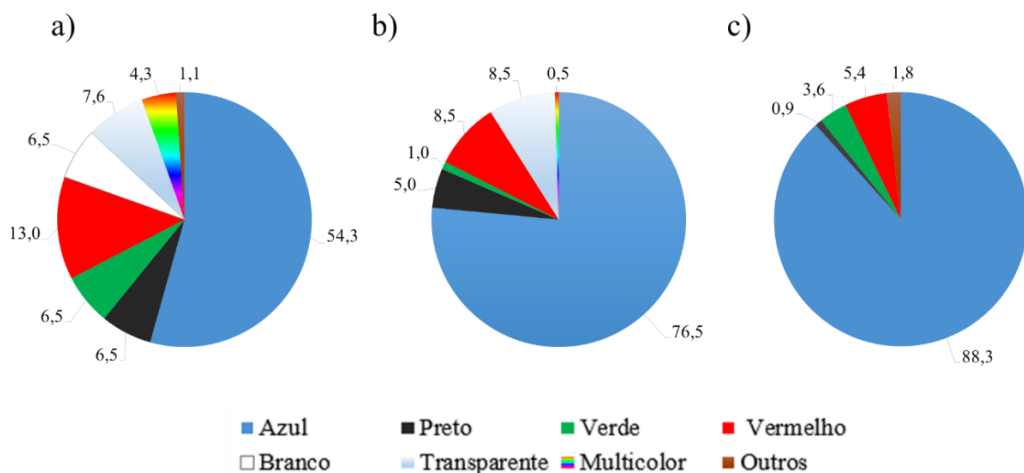


Figura 3.3- Proporção, em percentagem (%), das cores de MPs encontrados nos vários tecidos de carapau: (a) brânquias, (b) tratos gastrointestinais e (c) músculo.

Na figura 3.4 são apresentadas as percentagens das diferentes formas de MPs observados nos vários tecidos de carapau. A forma de MPs mais encontrada nas brânquias (figura 3.4 a) foi as fibras (67,4%), seguido dos fragmentos (16,3%), dos filamentos (6,5%) e outras formas (4,3%). A variedade de formas de MPs encontradas nos tratos gastrointestinais de carapau foi menor quando comparada com a observada nas brânquias. No entanto, a forma predominante manteve-se nas fibras, como se pode observar na figura 3.4 b) (85%), seguido dos filamentos (9%) e dos fragmentos (6%).

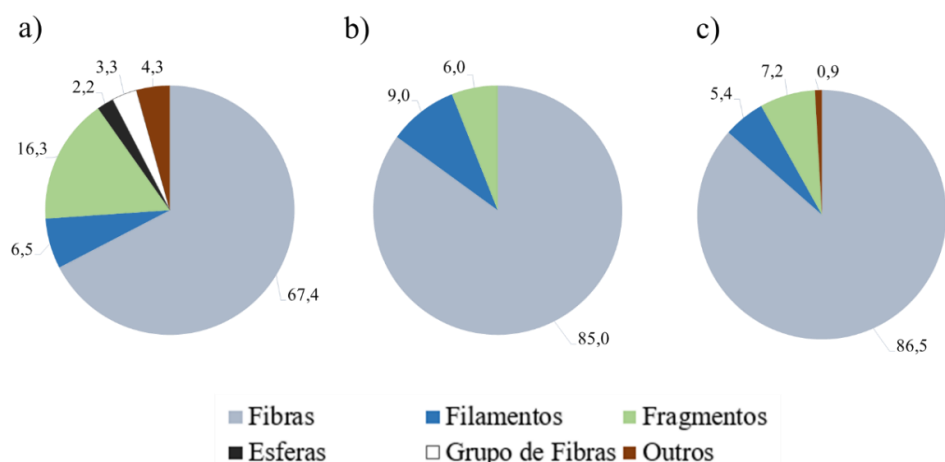


Figura 3.4- Proporção, em percentagem (%), das formas de MPs encontrados nos vários tecidos de carapau: (a) brânquias, (b) tratos gastrointestinais e (c) músculo.

No músculo (figura 3.4 c), as fibras continuaram a ser a forma predominante (86,5%), à semelhança do que aconteceu nas brânquias e nos tratos gastrointestinais. A percentagem de fragmentos foi relativamente semelhante (7,2%) à encontrada nos tratos gastrointestinais desta espécie. Destaca-se, tal como nas cores, uma maior diversidade de formas de MPs nas brânquias, em relação aos dos tratos gastrointestinais e músculos.

Na figura 3.5, apresentam-se diversas cores e formas de MPs encontrados nas brânquias (a), tratos gastrointestinais (b) e músculo (c) da espécie *Trachurus trachurus*.

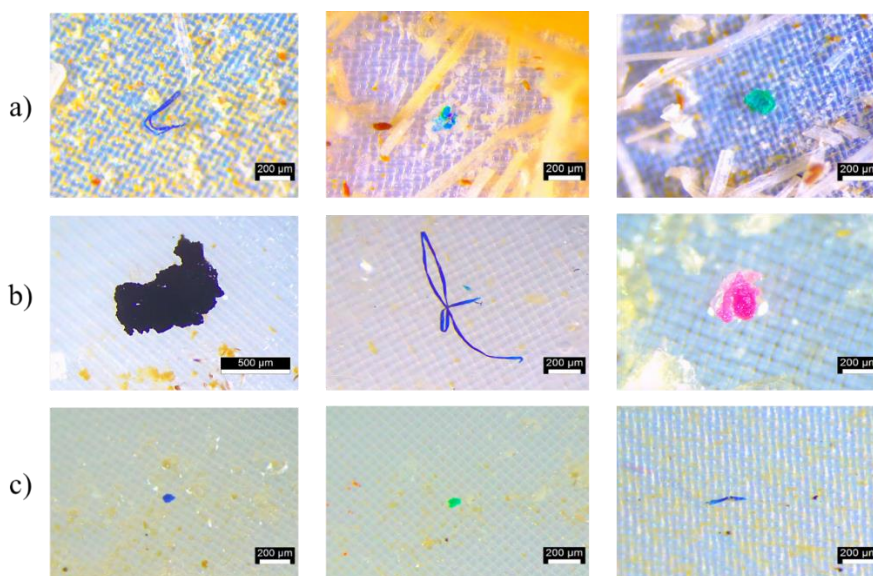


Figura 3.5 - Diversidade de cores e formas de MPs encontrados nos diferentes tecidos do carapau: (a) brânquias, (b) tratos gastrointestinais e (c) músculo.

As classes de tamanho de MPs encontrados no carapau variaram consoante o tipo de tecido analisado (Figura 3.6). As classes de tamanhos mais abundantes nas brânquias foram a classe <0,3 mm (27,3%) e a classe entre os 2-5 mm (26,4%). As classes entre os 0,5-1 mm (19,4%) e entre 1-2 mm (18,3%) obtiveram percentagens relativamente semelhantes. A classe com menor expressão nas brânquias de carapau foi a classe entre os 0,3-0,5mm (8,6%).

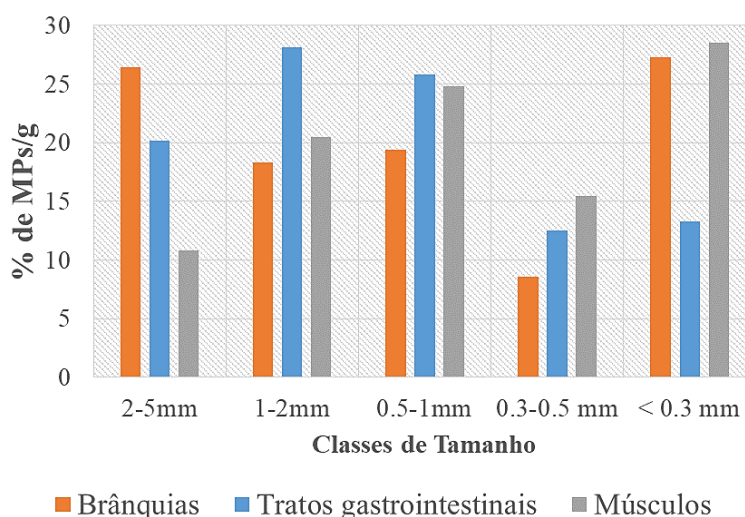


Figura 3.6 - Proporção, em percentagem (%), de MPs/g por classe de tamanho dos MPs encontrados nos diferentes tecidos de *Trachurus trachurus* da costa portuguesa e Golfo de Cádiz.

Nos tratos gastrointestinais as classes de tamanho mais comuns foram as classes: entre os 1-2mm (28%) os 0,5-1 mm (25,8%) e entre 2-5 mm (20%). As classes de tamanhos mais reduzidos foram as menos frequentes nos tratos gastrointestinais de carapau, tendo-se registado percentagens de 13% (<0,3 mm) e de 13% (0,3-0,5 mm). Nos músculos de carapau a classe de tamanho <0,3 mm obteve a maior percentagem de MPs neste tecido (28,5%). As classes 0,5-1 mm e 1-2 mm registaram percentagens de 24,8% e de 20,5%, respetivamente. As classes entre os 0,3-0,5 mm (15,4%) e entre 2-5 mm (10,8%) foram as menos frequentes neste tecido.

3.2.1. Comparação da abundância de MPs entre tecidos do carapau

Com a aplicação do teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis, verificou-se que existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todos os tecidos do carapau (tratos gastrointestinais, brânquias e músculos) para o número de MPs/g de tecido (figura 3.7). Para comparações emparelhadas, efetuou-se um teste U de Mann-Whitney entre os vários tecidos, par a par (TG-B; TG-M; B-M). Concluiu-se que existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratos gastrointestinais e as brânquias e os tratos gastrointestinais e os músculos de carapau ($p < 0,05$). Não se observaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as brânquias e o músculo, logo a acumulação nestes tecidos é supostamente semelhante. Tendo em consideração as medianas do N° de MPs/g de tecido nos vários tecidos (tabela 3.5) e com base nos resultados é possível supor que os tratos gastrointestinais apresentam maior N° de MPs/g de tecido comparativamente com os outros tecidos que são relativamente semelhantes ao nível de acumulação de MPs.

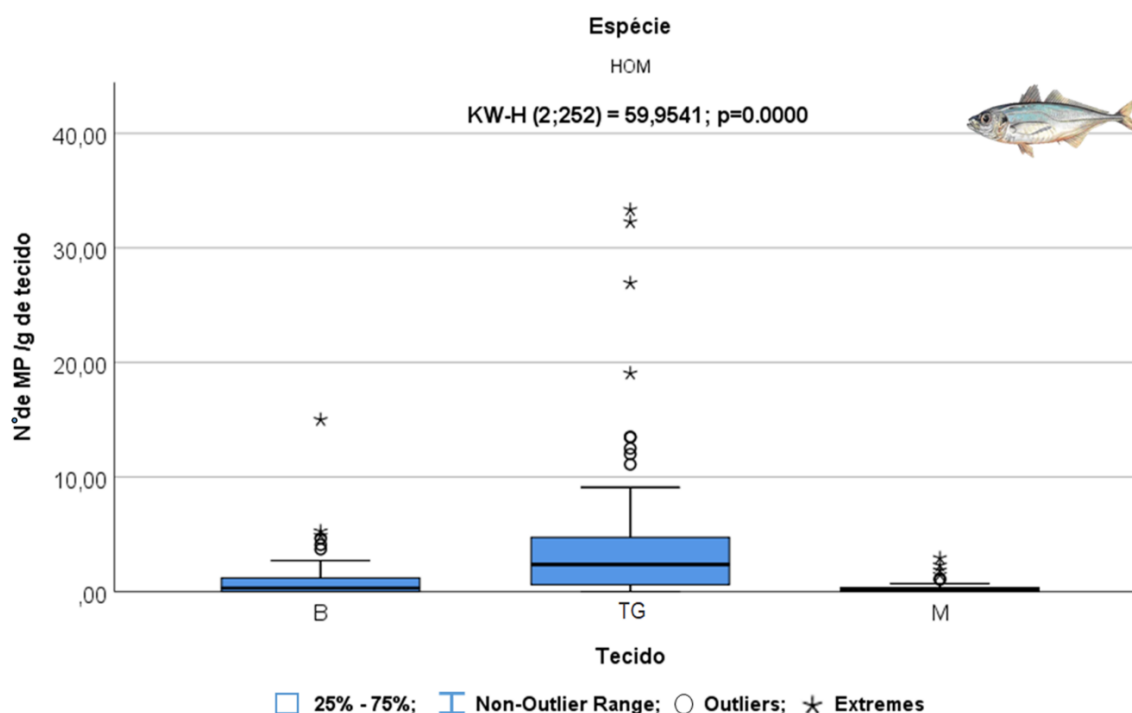


Figura 3.7- Mediana, mínimo e máximo e percentis 25 e 75 do número de microplásticos (N° de MP/g tecido) obtidos nas brânquias (B), tratos gastrointestinais (TG) e músculo (M) de *Trachurus trachurus* capturado na costa portuguesa e Golfo de Cádiz.

A tabela 3.5 resume as medianas e os mínimos e máximos do N° de MPs/g de tecido nos vários tecidos do carapau.

Tabela 3.5 - Mediana, mínimo e máximo do N° MPs/g de tecido nos vários tecidos de *Trachurus trachurus*.

| N° de MPs/g de Tecido | Mediana | Min-Máx |
|---------------------------------|---------|---------|
| Tratos gastrointestinais | 2,3 | 0-33 |
| Brânquias | 0,31 | 0-15 |
| Músculo | 0,15 | 0-2,9 |

3.3. Abundância e caracterização de MPs na sardinha

No total de 68 sardinhas analisadas foram encontrados 239 MPs. A percentagem de indivíduos que apresentava MPs nos tecidos foi de 93%.

A cor mais abundante de MPs encontrados na sardinha foi a cor azul (60,8%) (figura 3.8 a), seguido da cor vermelha (12,9%), verde (7,9%) e transparente (7,5%). Foram ainda identificados MPs de coloração preta (4,2%), outras cores (2,9%), branca (2,5%) e multicolor (1,3%). Na figura 3.8 b) observam-se as formas mais abundantes na sardinha, sendo as fibras a forma predominante (77,8%), seguido dos fragmentos (15,1%) e filamentos (4,2%). Foram ainda identificadas outras formas menos abundantes, como as esferas (2,1%) e os grupos de fibras (0,8%).

Na sardinha as classes de tamanhos mais comuns (figura 3.8 c) foram a classe entre os 0,5-1mm (31,2%) e a classe <0,3mm (27,3%). As classes entre os 2-5mm (15,2%) e 1-2mm (13,9%) foram relativamente semelhantes. A classe entre 0,3-0,5mm foi a que obteve menor percentagem de MPs/g como se encontra no gráfico da figura 3.8 c).

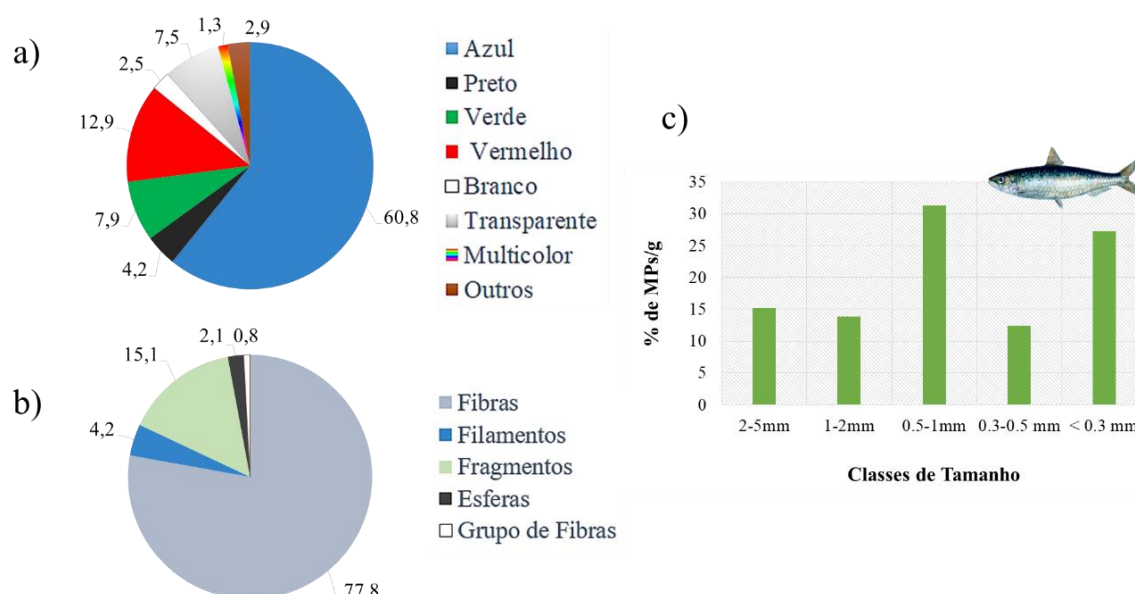


Figura 3.8 – Proporção, em percentagem (%), das cores (a), formas (b) e classes de tamanho (c) do total de MPs encontrados na espécie *Sardina pilchardus*, capturada na costa portuguesa e Golfo de Cádiz.

Das 68 brânquias dissecadas das sardinhas, foram observados 70 MPs, tendo-se obtido uma mediana de 1,16 MPs/g de tecido (tabela 3.6). Do total dos 68 tratos gastrointestinais recolhidos das sardinhas, foram observados 124 MPs, registando uma mediana de 6,67 MPs/g de trato gastrointestinal. Nos músculos foram observados 45 MPs encontrando-se em 46% dos indivíduos de sardinha estudados. A mediana de MPs/g de músculo foi baixa, 0 MPs/g (tabela 3.6).

Tabela 3.6 – Número (Nº) total de MPs e respetivas percentagens (%) de indivíduos com MPs, mediana, mínimo e máximo de MPs/g nos vários tecidos de *Sardina pilchardus* (N =68) na costa portuguesa e Golfo de Cádiz.

| | Brânquias | Tratos gastrointestinais | Músculos |
|-------------------|-----------|--------------------------|----------|
| Nº total de MPs | 70 | 124 | 45 |
| % de ind. com MPs | 51 | 72 | 46 |
| Mediana (MPs/g) | 1,16 | 6,67 | 0 |
| Min-Máx (MPs/g) | 0-41,7 | 0-50 | 0-6,8 |

As cores de MPs observados nas brânquias de sardinha (figura 3.9 a), tal como no carapau, foram mais diversificadas em relação aos tratos gastrointestinais e músculos da espécie. A cor predominante foi a cor azul (47,1%), sendo a percentagem desta cor inferior à registada no carapau. Nas brânquias foram ainda encontradas a cor verde (20%), vermelha (11,4%) e preta (10%). A cor branca e outras cores obtiveram a mesma percentagem nas brânquias (4,3%). Nos tratos gastrointestinais (figura 3.9 b) a percentagem de cor azul foi a predominante (64,5%) que foi superior à encontrada nas brânquias. A cor transparente (12,1%) e vermelha (11,3%) foram as segundas mais frequentes, seguidas do verde (4%), outras cores e branco (2,4%). No que se refere aos músculos, tal como observado no carapau, na sardinha (figura 3.9 c) as cores mais encontradas foram o azul (71,1%) e o vermelho (20%). As cores mais frequentes de MPs encontrados nos músculos são semelhantes às encontradas nos tratos gastrointestinais e brânquias na mesma espécie. Verifica-se uma redução da variedade de cores nos MPs encontrados nos músculos quando comparada com os encontrados nas brânquias e nos tratos gastrointestinais.

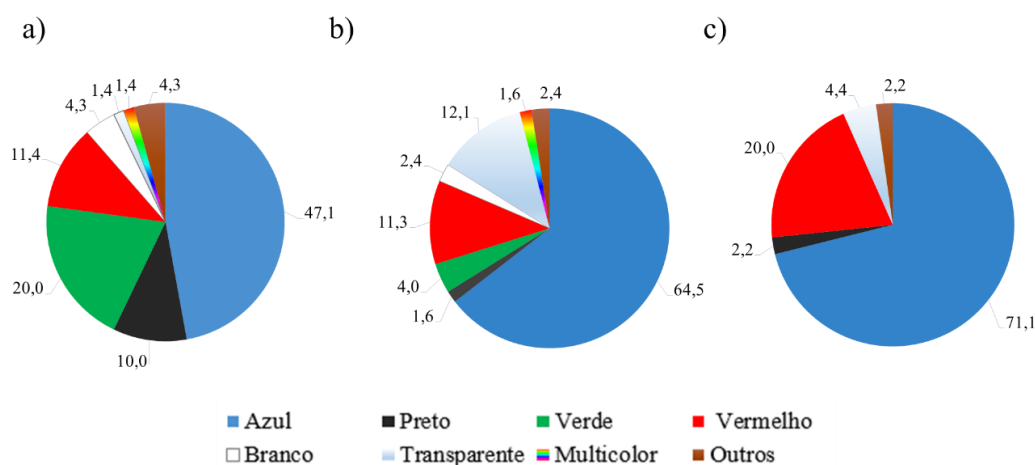


Figura 3.9- Proporção, em percentagem (%), das cores de MPs encontrados nos vários tecidos de sardinha: (a) brânquias, (b) tratos gastrointestinais e (c) músculo.

Na figura 3.10 a) é possível encontrar as percentagens das formas de MPs registadas nos três tecidos de sardinha. Nas brânquias (figura 3.10 a) a forma principal encontrada foram as fibras (54,3%), no entanto foram ainda registadas elevadas percentagens de fragmentos (35,7%) nas brânquias da sardinha, sendo superior ao registado no carapau. Foram ainda encontradas esferas (7,1%) e percentagens reduzidas de filamentos e grupos de fibras (1,4%). Nos tratos gastrointestinais (figura 3.10 b) registou-se uma percentagem elevada de fibras (83,9%), seguido dos fragmentos (8,1%) e filamentos (7,3%). Nos músculos de sardinha (figura 3.10 c) apenas foram registados dois tipos de formas: as fibras (97,8%) e os fragmentos (2,2%). Tal como constatado nas cores dos MPs encontrados nos tecidos de sardinha, verificou-se uma maior diversidade de formas nas brânquias e nos tratos gastrointestinais, face aos músculos.

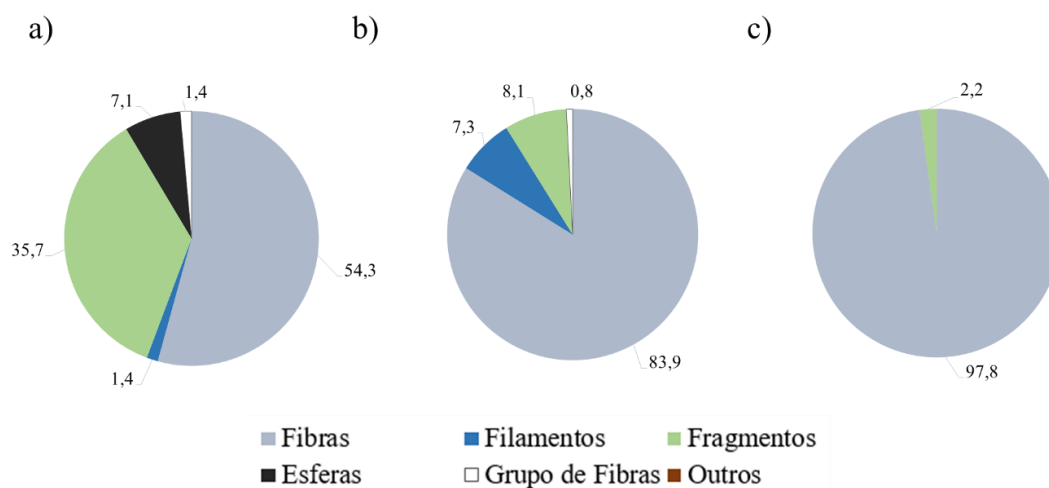


Figura 3.10- Proporção, em percentagem (%), das formas de MPs encontrados nos vários tecidos de sardinha: (a) brânquias, (b) tratos gastrointestinais e (c) músculo.

Na figura 3.11, é possível observar a elevada variedade de cores e formas nas brânquias (a), tratos gastrointestinais (b) e músculos (c) encontrados na espécie *Sardina pilchardus*.

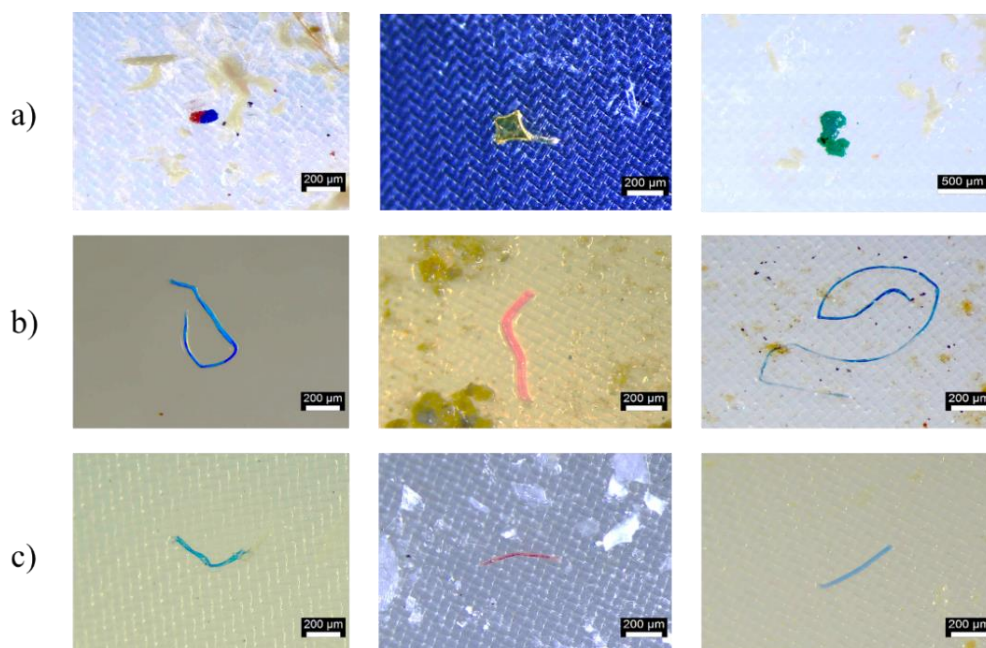


Figura 3.11- Diversidade de cores e formas de MPs encontrados nos diferentes tecidos da sardinha: (a) brânquias, (b) tratos gastrointestinais e (c) músculo.

A figura 3.12 representa as principais classes de tamanho de MPs/g encontrados nos vários tecidos de sardinha. Nas brânquias da sardinha as classes de MPs mais abundantes foram as de tamanhos inferiores, sendo a classe <0,3 mm (37,2%) a que tem maior percentagem, seguido da classe entre os 0,5-1 mm (24,4%) e 0,3-0,5 mm (18,43%). As classes de maiores dimensões como entre os 1-2 mm (10,1%) e 2-5 mm (9,8%) foram as que obtiveram menor percentagem de microplásticos nas brânquias de sardinha. Nos tratos gastrointestinais de sardinha a classe entre os 0,5-1 mm (34,9%) e a classe <0,3 mm (22,7%) foram as classes mais comuns. As classes entre os 2-5 mm (18,9%) e 1-2 mm (16,3%) obtiveram percentagens relativamente semelhantes. A classe que obteve a menor percentagem de MPs nos tratos gastrointestinais foi entre 0,3-0,5 mm (7,2%). A classe entre os 0,3-0,5 mm (39,9%) foi a classe que obteve maior percentagem de MPs nos músculos de sardinha, seguida da classe 0,5-1 mm (27,2%) e <0,3 mm (23%). As classes de maior tamanho como entre 1-2 mm (6,7%) e 2-5 mm (3,2%) foram as menos encontradas neste tecido.

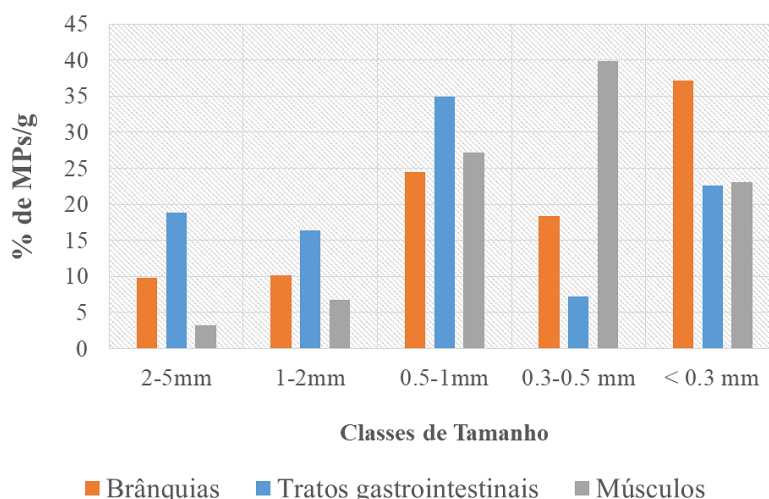


Figura 3.12- Proporção, em percentagem (%), de MPs/g por classe de tamanho dos MPs encontrados nos diferentes tecidos de *Sardina pilchardus* da costa portuguesa e Golfo de Cádiz.

3.3.1. Comparação da abundância de MPs entre tecidos da sardinha

Em termos estatísticos (figura 3.13), observou-se que existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todos os tecidos da sardinha (tratos gastrointestinais, brânquias e músculos) para o número de MPs/g de tecido. Para comparações emparelhadas, efetuou-se um teste U de Mann-Whitney entre os vários tecidos, par a par (TG-B; TG-M; B-M). Concluiu-se que existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratos gastrointestinais e as brânquias, entre os tratos gastrointestinais e os músculos, bem como entre as brânquias e os músculos. Face aos resultados deste teste e observando as medianas (tabela 3.7) para o número de MPs por grama de tecido, é possível supor que a ordem de acumulação nesta espécie será que os tratos gastrointestinais possuem maior número de MPs/g de tecido que as brânquias e os músculos.

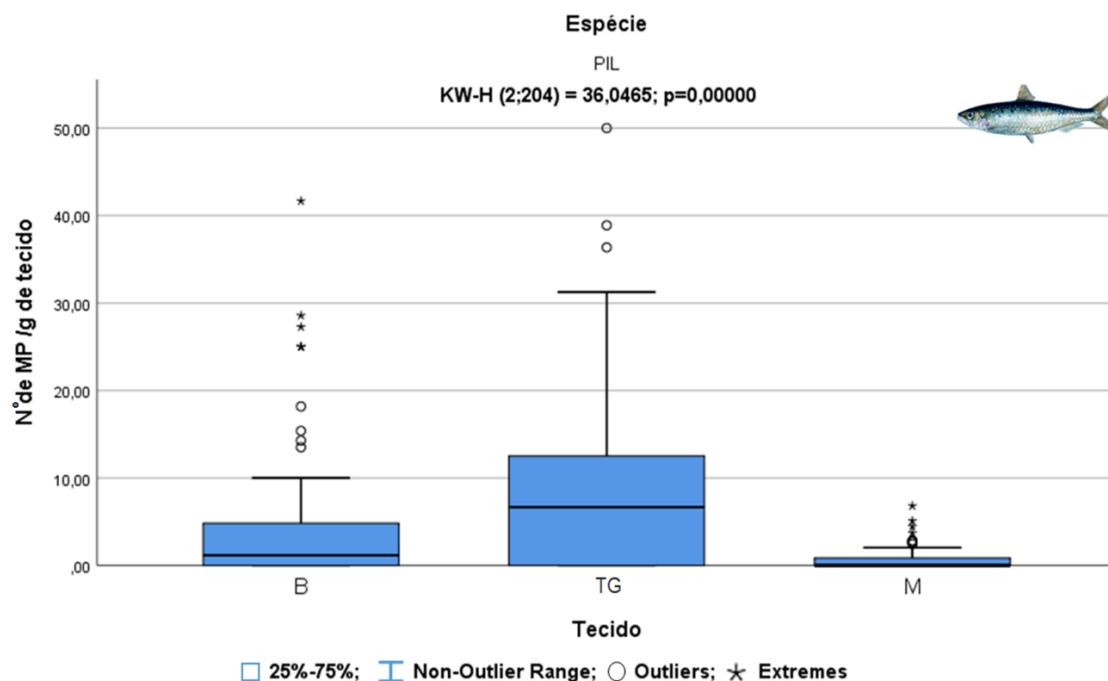


Figura 3.13- Mediana, mínimo e máximo e percentis 25 e 75 do número de microplásticos (Nº de MP/g tecido) obtidos nas brânquias (B), tratos gastrointestinais (TG) e músculo (M) de *Sardina pilchardus* capturado na costa portuguesa e Golfo de Cádiz.

Tabela 3.7- Mediana, mínimo e máximo do Nº MPs/g de tecido nos vários tecidos de *Sardina pilchardus*.

| Nº de MPs/g de Tecido | Mediana | Min-Máx |
|--------------------------|---------|---------|
| Tratos gastrointestinais | 6,66 | 0-50 |
| Brânquias | 1,16 | 0-41 |
| Músculos | 0,00 | 0-6,8 |

3.4. Abundância e caracterização de MPs no Biqueirão

Do total de 44 exemplares de biqueirão foram observados 115 MPs, sendo que 91% dos indivíduos continham MPs em pelo menos um dos tecidos analisados.

A cor predominante de MPs encontrados no biqueirão foi a cor azul (52,6%) (figura 3.14 a), seguido da cor verde (14%), transparente (11,4%) e outras cores (8,8%). As cores de MPs vermelhos e brancos obtiveram a mesma percentagem (6,1%). As fibras (figura 3.14 b) foram a forma predominante no biqueirão (58,3%) seguido dos fragmentos (40,9%), sendo estas percentagens relativamente semelhantes. O biqueirão obteve a maior percentagem de fragmentos registada nas espécies estudadas. No biqueirão (figura 3.14 c), a classe de tamanho <0,3mm (26,6%) foi a classe mais abundante, seguido da classe entre os 1-2mm (25,8%) e 0,5-1mm (21,3%). A classe de tamanho entre os 0,3-0,5mm (16,4%) e entre os 2-5mm (9,9%) foram as classes de MPs menos comuns no biqueirão.

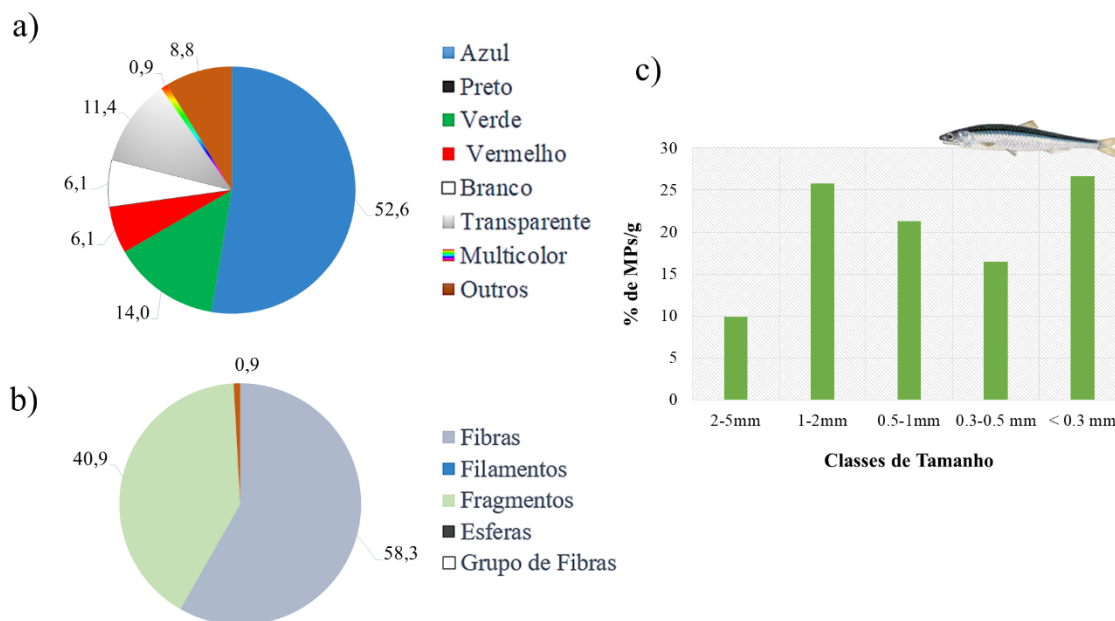


Figura 3.14 – Proporção, em percentagem (%), das cores (a), formas (b) e classes de tamanho (c) do total de MPs encontrados na espécie *Engraulis encrasicolus*, capturada na costa portuguesa e Golfo de Cádiz.

Nas brânquias de biqueirão encontraram-se 53 MPs, com um valor mediano de 3,7 MPs/g de brânquias (tabela 3.8). Os tratos gastrointestinais registaram 41 MPs totais e uma mediana de 2 MPs/g de trato gastrointestinal. Nos músculos de biqueirão foram observados 21 MPs, sendo que 43% dos indivíduos continham MPs neste tecido.

Tabela 3.8 – Número (Nº) total de MPs e respetivas percentagens (%) de indivíduos com MPs, mediana, mínimo e máximo de MPs/g nos vários tecidos de *Engraulis encrasicolus* (N =44) na costa portuguesa e Golfo de Cádiz.

| | Brânquias | Tratos gastrointestinais | Músculos |
|--------------------------|-----------|--------------------------|----------|
| Nº total de MPs | 53 | 41 | 21 |
| % de ind. com MPs | 54 | 52 | 43 |
| Mediana (MPs/g) | 3,7 | 2,0 | 0 |
| Min-Máx (MPs/g) | 0-20 | 0-50 | 0-1,1 |

Nas brânquias de biqueirão (figura 3.15 a), foram observadas a maior diversidade de cores de MPs, sendo a cor azul (47,2%) e verde (24,5%) as cores mais frequentes. Obtiveram-se ainda percentagens inferiores de cor transparente e outras cores (9,4%) e vermelha (5,7%). Nos tratos gastrointestinais de biqueirão (figura 3.15 b) a cor azul foi a mais frequente (56,1%) sendo superior à percentagem encontradas nas brânquias da mesma espécie. A cor transparente e branca obtiveram o mesmo valor percentual (14,6%). O mesmo sucedeu para as outras cores e a cor vermelha de MPs (7,3%). Os músculos de biqueirão (figura 3.15 c) a cor mais frequente manteve-se a azul (57,1%) seguida da cor verde (14,3%). As outras cores e transparente obtiveram percentagens iguais (9,5%) neste tecido.

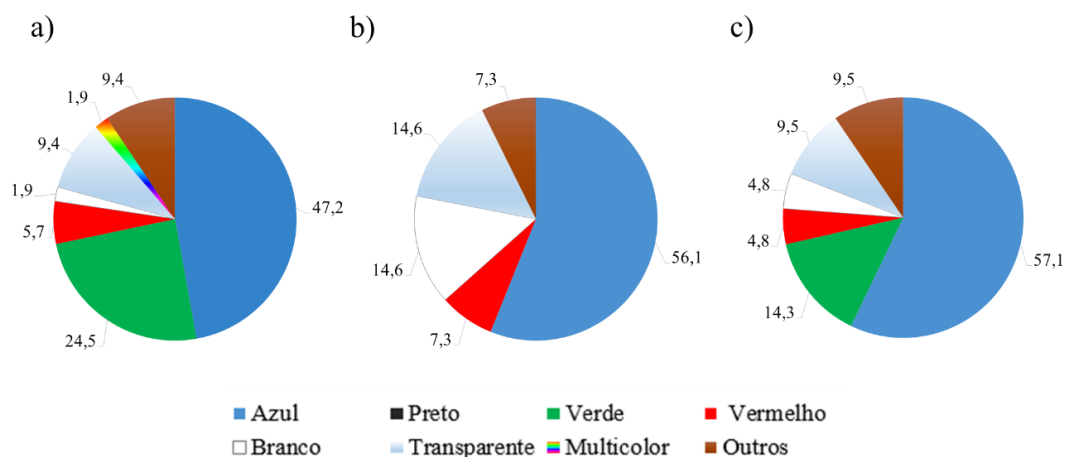


Figura 3.15- Proporção, em percentagem (%), das cores de MPs encontrados nos vários tecidos de biqueirão: (a) brânquias, (b) tratos gastrointestinais e (c) músculo.

Na figura 3.16 estão representadas as formas de MPs encontradas nos tecidos do biqueirão. Nas brânquias (figura 3.16 a), ao contrário do observado nas outras espécies, os fragmentos foram a forma predominante (54,7%) seguido das fibras (45,3%). É de realçar ainda o facto de o biqueirão ter apresentado a menor diversidade de formas de MPs em relação à sardinha e ao biqueirão. Nos tratos gastrointestinais (figura 3.16 b) as fibras foram as formas mais observadas (75,6%), seguido dos fragmentos (22%) e outras formas (2,4%). Os músculos do biqueirão (figura 3.16 c) também apresentaram maior percentagem de fibras (57,1%) seguido dos fragmentos (42,9%). É ainda de destacar o facto de o biqueirão ser a espécie com maior número de fragmentos nos tecidos musculares em comparação com as outras duas espécies em estudo.

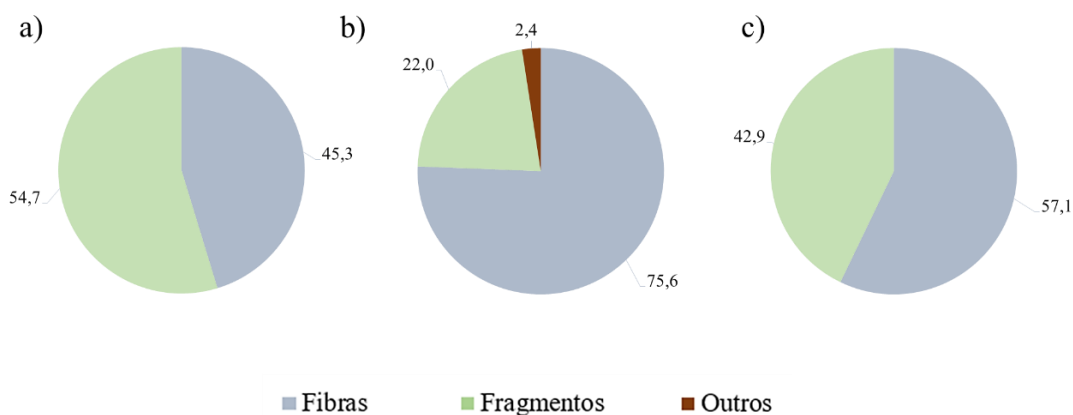


Figura 3.16- Proporção, em percentagem (%), das formas de MPs encontrados nos vários tecidos de biqueirão: (a) brânquias, (b) tratos gastrointestinais e (c) músculo.

A figura 3.17 mostra a diversidade de cores e formas encontrados nas brânquias (a), tratos gastrointestinais (b) e músculos encontrados na espécie *Engraulis encrasicolus*.

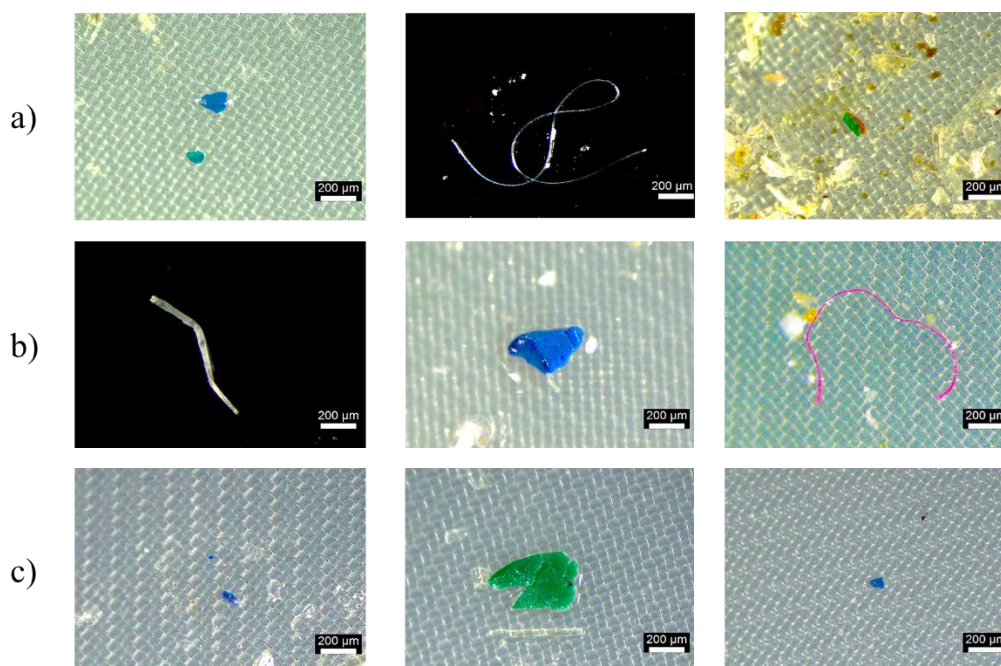


Figura 3.17- Diversidade de cores e formas de MPs encontrados nos diferentes tecidos do biqueirão: (a) brânquias, (b) tratos gastrointestinais e (c) músculo.

As várias classes de tamanhos de MPs observados no biqueirão podem ser visualizados no gráfico da figura 3.18. Nas brânquias, a classe <0,3 mm (45,3%) foi a classe mais observada neste tecido, seguido da classe entre os 0,5-1mm (18,1%) e 0,3-0,5mm (13,5%). As classes entre os 1-2mm (11,5%) e 2-5mm (11,4%) apresentaram percentagens de MPs/g semelhantes.

Nos tratos gastrointestinais as classes mais comuns foram: entre 1-2mm (33,5%), 0,5-1mm (22,4%) e 0,3-0,5mm (18,2%). A

classe de tamanho entre os 2-5mm (9,3%) obteve a menor percentagem de MPs. Nos músculos de biqueirão as classes de tamanho que obtiveram as maiores percentagens foram a classe <0,3 (46,7%) e entre 0,5-1mm (37,7%). As classes entre os 0,3-0,5mm (3,9%) e entre 2-5mm (3,3%) foram semelhantes e as que obtiveram menor percentagem de MPs por grama nos músculos.

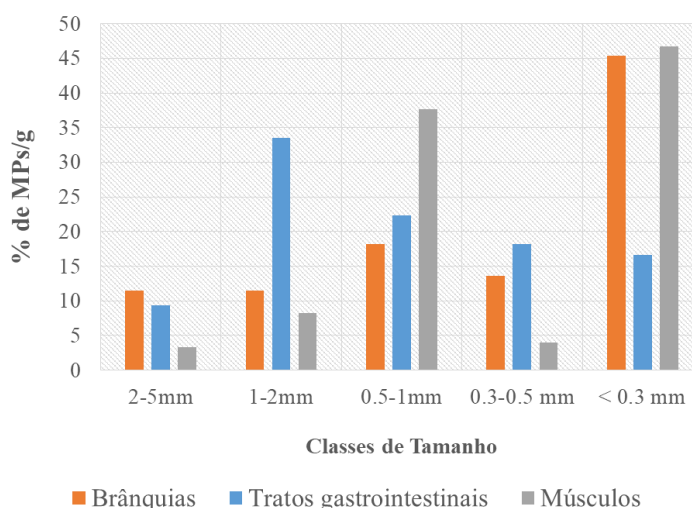


Figura 3.18- Proporção, em percentagem (%), de MPs/g por classe de tamanho dos MPs encontrados nos diferentes tecidos de *Engraulis encrasicolus* da costa portuguesa e Golfo de Cádiz.

3.4.1 Comparação da abundância de MPs entre tecidos do biqueirão

Efetuada o teste H de Kruskal-Wallis (figura 3.19), foi possível concluir que existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todos os tecidos do biqueirão (tratos gastrointestinais, brânquias e músculos) para o número de MPs por grama de tecido. Para comparações emparelhadas, efetuou-se um teste U de Mann-Whitney entre os vários tecidos, par a par (TG-B; TG-M; B-M). Concluiu-se que existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratos gastrointestinais e músculos, bem como entre as brânquias e os músculos desta espécie. No entanto, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratos gastrointestinais e as brânquias, pelo que a acumulação nestes tecidos é supostamente semelhante. Observando as medianas para o N° de MPs /g de tecido (tabela 3.9) e tendo em consideração os testes efetuados é possível supor, que a possível ordem de acumulação dos MPs nesta espécie, é equivalente nas brânquias e nos tratos gastrointestinais e que é inferior nos músculos.

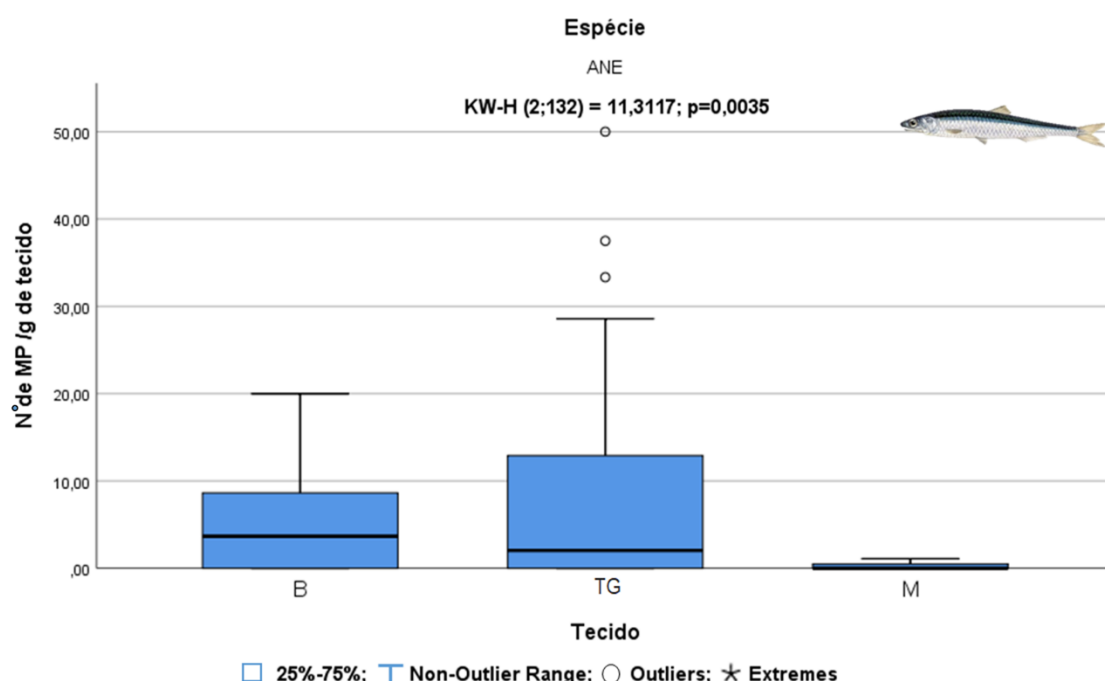


Figura 3.19- Mediana, mínimo e máximo e percentis 25 e 75 do número de microplásticos (N° de MP/g tecido) obtidos nas brânquias (B), tratos gastrointestinais (TG) e músculo (M) de *Engraulis encrasicolus* capturado na costa portuguesa e Golfo de Cádiz.

Tabela 3.9- Mediana, mínimo e máximo do N° MPs/g de tecido nos vários tecidos de *Engraulis encrasicolus*.

| N° de MPs/g de tecido | Mediana | Min-Máx |
|---------------------------------|---------|---------|
| Tratos gastrointestinais | 2,04 | 0-50 |
| Brânquias | 3,67 | 0-20 |
| Músculos | 0,00 | 0-1,09 |

3.5. Comparações interespecíficas

De modo a averiguar a existência de diferenças significativas entre os vários tecidos das três espécies estudadas foi efetuado um teste H de Kruskal-Wallis. Comparando as brânquias das três espécies para o N° de MPs/g de tecido, foi possível concluir que existem diferenças significativas ($p < 0,05$). Efetuando o mesmo teste entre os tratos gastrointestinais, obtiveram-se também diferenças significativas ($p < 0,05$). Por fim, concluiu-se a ausência de diferenças significativas entre os músculos das espécies estudadas ($p > 0,05$). No gráfico de boxplots da figura 3.20, encontram-se representados o N° de MPs/g nos tecidos das três espécies analisadas.

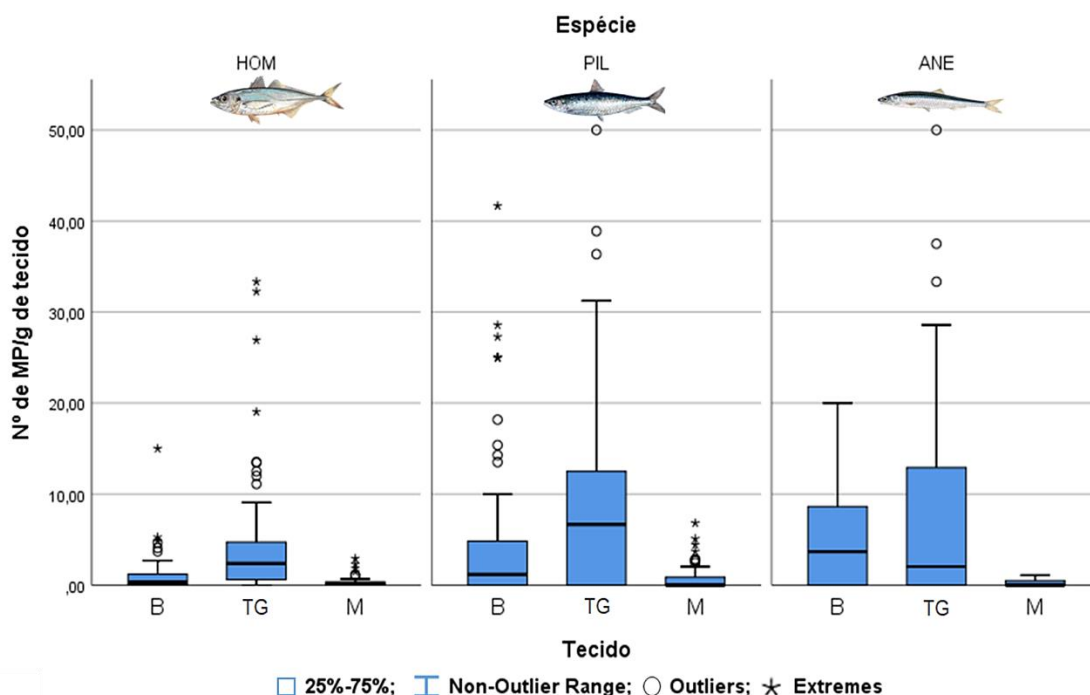


Figura 3.20 - Gráfico de *Boxplots* com o N° de MPs/ g de tecido nas brânquias (B), trato gastrointestinal (TG) e músculo (M) de *Trachurus trachurus* (HOM), *Sardina pilchardus* (PIL) e *Engraulis encrasicolus* (ANE).

Para a comparação de duas amostras emparelhadas, utilizou-se um teste U de Mann-Whitney, onde foi possível identificar a existência de algumas diferenças significativas entre os vários tecidos das três espécies (tabela 3.10).

Tabela 3.10 – Valores de p calculados através de um teste U de Mann-Whitney entre os tecidos entre espécies. (*) Diferença estatisticamente significativa.

| | p-value | | |
|----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------|
| | Brânquias | Tratos gastrointestinais | Músculos |
| HOM-PIL | $p > 0,05$ | $p < 0,05^*$ | $p > 0,05$ |
| HOM-ANE | $p < 0,05^*$ | $p > 0,05$ | $p > 0,05$ |
| PIL-ANE | $p > 0,05$ | $p > 0,05$ | $p > 0,05$ |

Foi possível concluir que existem diferenças significativas entre as brânquias de carapau e biqueirão ($p < 0,05$). Tendo em consideração as medianas do N° de MPs/g neste tecido no carapau ($\bar{x} = 0,31$) e no biqueirão ($\bar{x} = 3,7$) é possível supor que as brânquias do biqueirão apresentam maior N° de MPs / g de tecido comparativamente com o carapau. Utilizando o mesmo teste, para os tratos gastrointestinais de carapau e sardinha também foram registadas diferenças significativas ($p < 0,05$). Observando as medianas para o N° de MPs/g para o carapau ($\bar{x} = 2,4$) e sardinha ($\bar{x} = 6,67$) é possível considerar que a sardinha apresenta maior N° de MPs/g nos tratos gastrointestinais em comparação com o carapau.

3.6. Resultados da Identificação FTIR

De entre os 757 potenciais microplásticos encontrados, foram analisadas 265 partículas. Este valor representa 35% de todos os potenciais MPs. A escolha da análise deste valor percentual foi baseada nos valores habituais de referência utilizados na literatura. Contudo, dos 265 potenciais MPs apenas foi possível identificar com precisão 201 partículas devido ao nível de degradação das mesmas e do reduzido tamanho, que impossibilitou a análise através desta técnica de espectroscopia FTIR.

Da análise das 201 partículas, 4 deles produziram espectros inconclusivos (2%) e 8 partículas eram de origem natural. Destas partículas de origem natural, 2 delas eram de origem quitinosa (1%), 1 partícula composta por cálcio (0,5%) e outras partículas de matéria orgânica (ex: cartilagem) (2,5%) (Figura 3.21).

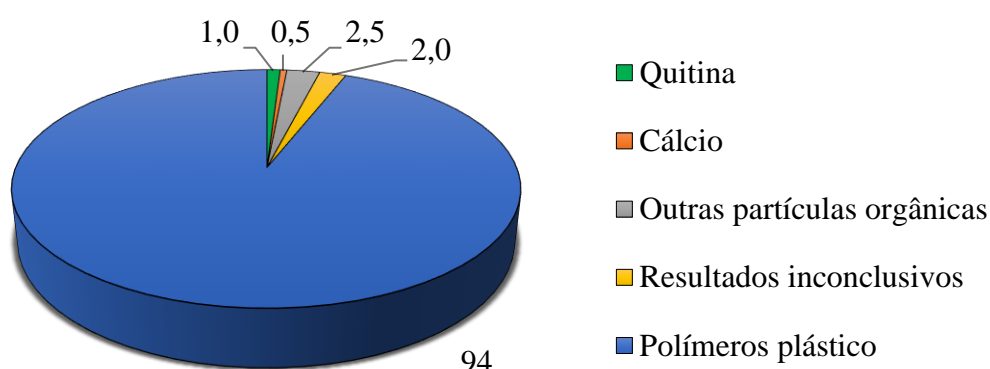


Figura 3.21- Percentagens (%) dos vários tipos de partículas identificadas pelo FTIR.

As restantes 189 partículas foram identificadas como polímeros sintéticos e semi-sintéticos pelo FTIR. Este número corresponde a 94% das partículas totais analisadas através desta técnica. Na tabela A1 do anexo A encontram-se as contagens dos polímeros por tipos e categoriais. Na tabela A2 do anexo A encontram-se as percentagens de polímeros identificados em cada espécie.

Os polímeros mais frequentes (Anexo A- figura A3) em todos os peixes foram: a celulose (rayon) (40,2%), poliéster (PES) (11,1%), acrílico (PMMA) (8,5%), acrilato (BMA) (7,4%), PEI (6,9%), PE (5,8%) e acrílico (poliacrilato) (4,2%). Foram ainda encontradas percentagens menores de outros polímeros como o PP, PET, PS com valores percentuais de 3,2%. Na figura 3.22, encontra-se um exemplo de um espectro de rayon obtido a partir de uma fibra azul, encontrada num indivíduo da espécie *Sardina pilchardus*.

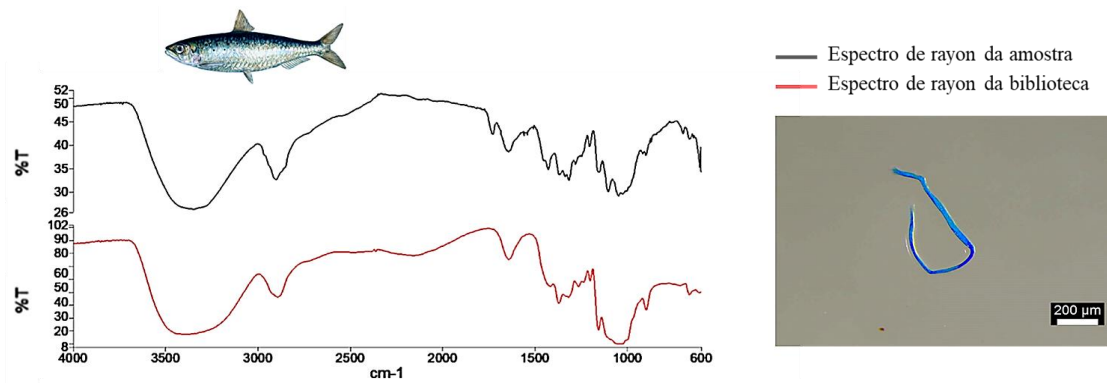


Figura 3.22- Espectro de celulose-rayon obtido a partir de uma amostra de uma fibra azul encontrada em sardinha. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a vermelho encontra-se ilustrado o espectro de rayon da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm^{-1}).

O tipo de polímero identificado variou de espécie para espécie, sendo que alguns só foram identificados numa única espécie, são exemplos o PU e PSU no biqueirão (ANE), a poliacrilamida, HPMC e borracha no carapau (HOM) e EP na sardinha (PIL) - (figura 3.23).

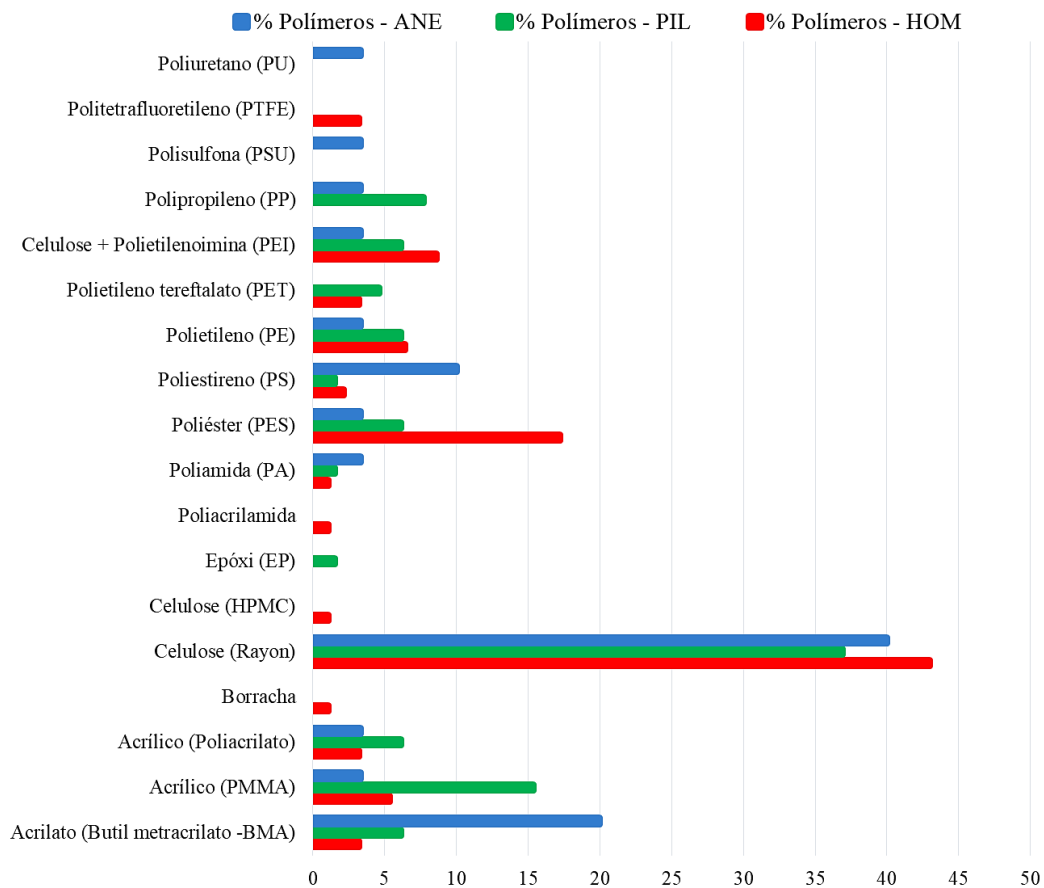


Figura 3.23 - Percentagem (%) dos vários polímeros encontrados em cada uma das espécies estudadas, *Trachurus trachurus* (HOM), *Sardina pilchardus* (PIL) e *Engraulis encrasicolus* (ANE).

São apresentados ainda os números de polímeros e percentagens encontrados em cada espécie e tecidos (Anexo A – tabela A1 e A2). No anexo B, as figuras B1 até B11 representam exemplos ilustrativos dos vários tipos de espectros de polímeros identificados através da técnica FTIR e respetivas fotografias dos diferentes MPs encontrados nas espécies (Anexo A -Figura A5 até A13).

DISCUSSÃO

4. Discussão

Os MPs estiveram presentes em todas as espécies e tecidos analisados, perfazendo um total de 757 potenciais MPs com dimensões entre 0,009 mm e 4,8 mm. A maioria dos MPs encontrados nos peixes estudados foram as fibras (76,8%) (figura 3.1 b), estando em conformidade com o valor encontrado nas amostras de água (77%) recolhidas na mesma campanha (Lopes *et al.*, 2019) e com outros estudos (Barboza *et al.*, 2020; Lopes *et al.*, 2020) efetuados na costa portuguesa. Uma das hipóteses para a elevada percentagem de fibras encontrada poderá ser a sua emissão durante as lavagens de roupa e pelo facto das ETAR não possuírem filtros adequados à sua retenção. Após entrarem no ambiente aquático as fibras atingem concentrações até aos milhares de partículas por metro cúbico, ficando disponíveis para serem ingeridas pelos organismos aquáticos (Cesa *et al.*, 2017).

Os MPs de cor azul são os mais representativos (66,8%) das partículas encontradas em todos os peixes (figura 3.1 a), tal como os resultados obtidos em peixes do estuário do Mondego (47%) (Bessa *et al.*, 2018), em sardinhas do mediterrâneo (45,8%) (Compa *et al.*, 2018), em espécies de peixes capturados em águas costeiras portuguesas (54%) (Barboza *et al.*, 2020) e em peixes pelágicos planctívoros em águas Atlântico-ibéricas (44%) (Lopes *et al.*, 2020). Embora estudos anteriores tenham sugerido que a coloração azul dos MPs pode mimetizar a coloração do alimento natural dos peixes que os ingerem por equívoco (Boerger *et al.*, 2010; Ory *et al.*, 2017), é ainda necessário ter em consideração que a disponibilidade destas partículas azuis pode ser maior no seu ambiente natural.

Relativamente às percentagens de MPs encontradas nos vários tecidos de todas as espécies, os resultados obtidos foram semelhantes aos registados por Barboza *et al.* (2020). Nesse trabalho, nos tratos gastrointestinais das espécies estudadas foram registados 48% (175 MPs) sendo que no presente estudo se registaram 48,2% (365 MPs). As percentagens foram igualmente semelhantes nas brânquias, em que Barboza *et al.* (2020) obteve valores de 30% (112 MPs) e neste estudo cerca de 28,4% (215 MPs). A percentagem de MPs encontrados nos músculos também é semelhante ao estudo de Barboza *et al.* (2020) que obteve 22% (81 MPs), sendo que neste estudo foram encontrados 23,4% (177 MPs). Apesar de o número de MPs encontrados em cada tecido variar nas duas investigações e de as espécies estudadas em cada estudo possuírem habitats e modos de alimentação díspares, a semelhança destas percentagens não se afigura uma coincidência. No entanto, as investigações que certamente se realizarão no futuro permitirão averiguar estes resultados em várias espécies e tecidos, compreender como ocorre a acumulação dos MPs em cada espécie, bem como a transferência das partículas de uns tecidos para os outros.

4.1. Microplásticos totais nas espécies

A espécie que apresentou a maior percentagem de MPs de cor azul no conjunto dos seus tecidos foi o carapau (74,4%), seguido da sardinha (60,8%) e do biqueirão (52,6%). Estas percentagens foram semelhantes às encontradas por outras investigações (Alomar *et al.*, 2017; Barboza *et al.*, 2020; Bessa *et al.*, 2018; Compa *et al.*, 2018). O vermelho foi a segunda cor mais encontrada em todos os tecidos de sardinha (12,9%) e carapau (8,7%). A dieta preferencial da sardinha inclui presas de fitoplâncton e zooplâncton, sendo diversificada e composta por: copépodes, decápodes, anfípodes, diatomáceas e ovos de crustáceos e peixes (Hickling 1945; Garrido *et al.*, 2008; Garrido *et al.*, 2015). Os crustáceos (especialmente da ordem Copepoda, Euphausiacea e Mysidacea) são importantes na dieta do carapau (Bayhan e Sever, 2009). As presas típicas da sardinha e do carapau possuem normalmente estruturas transparentes com pigmentos vermelhos em redor da cavidade gastrointestinal, epiderme, ovários, ovos e fluídos corporais (Ringelberg,

1980). Assim, é possível supor que a percentagem de MPs vermelhos nestas espécies esteja relacionada com o facto de estes confundirem os MPs com o seu alimento natural.

O biqueirão foi a espécie com maior percentagem de MPs de coloração verde (14%) no conjunto dos tecidos, seguido da sardinha (7,9%). A existência de partículas verdes pode estar associada ao tipo de alimentação destas espécies. O biqueirão tal como a sardinha possui a capacidade de alternar entre dois modos de alimentação, a filtração para presas de menores dimensões e a raptorial para presas de dimensões maiores (van der Lingen, 1994; Bulgakova, 1996; van der Lingen *et al.*, 2006). A capacidade de alternar entre dois modos de alimentação torna estas espécies altamente oportunistas sendo capazes de maximizar a sua energia dependendo do alimento disponível. Para além disso, a dieta do biqueirão é composta por mesozooplâncton e partículas de células fitoplanctónicas (Bulgakova, 1996). Durante a ontogenia o biqueirão torna-se progressivamente fitoplactívoro ingerindo particularmente diatomáceas (King e Macleod, 1976) e microfítolâncton em adulto (Bulgakova, 1996). Anteriormente, MPs de coloração verde (12,3%) foram detetados em *Engraulis japonicus* (Tanaka *et al.*, 2016). Assim, as preferências alimentares destas espécies por organismos fitoplanctónicos pode explicar a elevada percentagem de MPs verdes.

Tal como expectável, as fibras foram a forma mais comum de MPs encontrada nos tecidos dos peixes. Contudo o carapau registou a maior percentagem de fibras (81,4%). Esta percentagem foi ligeiramente superior à obtida por Lopes *et al.* (2020) (76%) para carapaus recolhidos a sul e a oeste da costa ibérica. A sardinha obteve maior percentagem de fibras (77,8%) e o biqueirão (58,3%). Resultados semelhantes foram obtidos por Collard *et al.* 2017a, em que as sardinhas obtiveram mais fibras do que os biqueirões, o que pode estar relacionado com a eficiência do aparelho branquial (Collard *et al.*, 2017a). Em relação aos fragmentos, o biqueirão registou a maior percentagem (40,9%), seguido da sardinha (15,1%), o que pode ser explicado pelo facto do biqueirão possuir branquispinhas curtas e espaçadas retendo partículas de maiores dimensões do que a sardinha (Collard *et al.*, 2017a e Rykaczewski, 2009).

Em relação às classes de tamanho de MPs mais frequentes nos vários tecidos não foi possível estabelecer uma associação entre as três espécies. No entanto, foram encontradas associações relacionadas com as especificidades individuais de cada espécie, como o tamanho preferencial das presas (Garrido *et al.*, 2015) e adaptações morfológicas das brânquias (Collard *et al.*, 2017a).

No que diz respeito às classes de tamanho dos MPs ingeridos pelo carapau (figura A1, anexo A), apesar de se verificarem tamanhos <0,3 mm e entre os 0,3-0,5 mm nos tratos gastrointestinais, as percentagens foram muito inferiores relativamente às classes de tamanhos superiores. Estes resultados estão de acordo com os tamanhos de presas observados no estudo em ecologia trófica de peixes pelágicos (Garrido *et al.*, 2015), onde se verificou uma ausência de presas com tamanhos pequenos (<0,2 mm) e números reduzidos de presas com tamanhos entre os 0,2-0,5 mm em carapaus adultos e juvenis. As classes de tamanho de MPs mais frequente ingeridas pelo carapau situaram-se entre os 1-2 mm (28%) e entre os 0,5-1 mm (25,8%) (figura 3.6). Resultados semelhantes foram verificados por Lopes *et al.* (2020) que constataram que esta espécie ingeriu grande número de MPs principalmente <1 mm (Lopes *et al.*, 2020) e a classe modal do tamanho das presas foi entre os 1-2 mm.

As classes de tamanhos de MPs mais comuns ingeridos pela sardinha (figura A1, anexo A) foram as classes entre os 0,5-1 mm (35%) e a classe <0,3 mm (23%). Estes tamanhos correspondem aos tamanhos das presas mais comuns desta espécie, sendo a filtração utilizada na captura de presas com tamanhos $\leq 0,724$ mm e a alimentação raptorial a responsável pela captura de presas com

tamanhos $\geq 0,78$ mm (Garrido *et al.*, 2007). Nas brânquias de sardinha foi encontrado o microplástico com as dimensões mais reduzidas, de apenas 0,009 mm, coincidindo com a sua elevada vulnerabilidade aos MPs e à eficiência do aparelho de filtração (Collard *et al.*, 2017a).

No biqueirão as classes de tamanho mais comuns nas brânquias e nos músculos foram idênticas, sendo a classe entre os 0,5-1mm e $<0,3$ mm as mais comuns. Pode estabelecer-se uma associação entre estes dados e os obtidos no estudo de Collard *et al.* (2017a) com 3 espécies de peixes planctívoros, demonstrando a sua vulnerabilidade às partículas antropogénicas. No referido estudo, foi calculado o diâmetro mínimo e máximo das partículas que a sardinha, biqueirão e anchova conseguem reter nas branquispinhas e nos denticulos. Em relação ao biqueirão os diâmetros das partículas variaram entre 0,216-0,290 mm, que são semelhantes às classes de tamanho dos MPs mais comuns encontradas nas brânquias neste estudo ($<0,3$ mm.). Para além disso, as presas preferenciais do biqueirão possuem tamanhos que rondam os 0,72 mm (James e Friedland, 1984; Garrido *et al.*, 2007) que se encontra numa das classes de tamanho mais frequente nos tratos gastrointestinais (0,5-1mm) (como se pode observar no gráfico da figura A1, anexo A).

4.2. Comparação entre os tecidos das espécies

No que se refere ao N^o de MPs/g de tecido foram encontradas diferenças significativas nos três tecidos de cada uma das espécies. Os tratos gastrointestinais dos peixes apresentaram maior concentração de MPs, seguido das brânquias e dos músculos. A maior concentração de MPs nos tratos gastrointestinais dos peixes era expectável, uma vez que estes são responsáveis por inúmeras funções de armazenamento de alimento, processos de digestão e absorção de nutrientes (Wilson e Castro, 2011). A capacidade de armazenamento do sistema digestivo permite aos peixes a ingestão de várias presas, podendo ocorrer a ingestão acidental de MPs de forma intencional, confundindo-os com as presas, ou involuntariamente através da ingestão de alimento contendo MPs (Jovanović, 2017). Apesar das brânquias serem um órgão multifuncional envolvido nas trocas gasosas e na filtração de alimento (Elsheikh, 2013), estas apenas refletem uma pequena janela temporal em que os MPs podem fixar-se temporariamente na superfície das brânquias (Su *et al.*, 2018). Nos que diz respeito aos músculos, pouco se sabe acerca dos fenómenos de translocação para os tecidos musculares mas tem sido sugerido que a principal entrada de MPs ocorre nas brânquias e nos tratos gastrointestinais, seguindo para os sistemas linfáticos e/ou vasculares (Zeytin *et al.*, 2020).

Nas brânquias de todas as espécies estudadas as cores dos MPs foram mais diversificadas em comparação com os outros tecidos, sendo a cor azul a mais predominante. A elevada diversidade de cores e formas nas brânquias, pode ser explicado pelo facto de estas serem a primeira barreira que se encontra exposta aos MPs durante a respiração e alimentação o que aumenta a probabilidade destes ficarem presos nos filamentos branquiais (Elsheikh, 2013). A cor verde foi a segunda cor mais comum no biqueirão (24,5%) e na sardinha (20%), o que não ocorreu no carapau (6,5%). Esta ocorrência pode estar associada à preferência destas duas espécies por organismos fitoplactónicos (Bulgakova, 1996; Garrido *et al.*, 2015).

No que diz respeito às formas mais encontradas nas brânquias das espécies, o carapau obteve a maior percentagem de fibras (67,4%) nas brânquias, seguido da sardinha (54,3%) e do biqueirão (45,3%). Os resultados do presente estudo, foram semelhantes aos de Barboza *et al.* (2020), em que a predominância de fibras nas brânquias da maioria dos peixes sugere que as fibras sejam mais abundantes na coluna de água. É de realçar que o biqueirão foi a espécie com maior percentagem de fragmentos nas brânquias (54,7%), seguido da sardinha (35,7%) e do carapau

(16,3%). Estas percentagens podem estar associadas às diferentes morfologias branquiais de cada espécie. O estudo de Collard *et al.* (2017a) investigou a retenção de MPs nos aparelhos branquiais de duas espécies exclusivamente pelágicas (sardinha e biqueirão), concluindo que as sardinhas ingeriram fragmentos mais pequenos e uma maior quantidade de fibras do que os biqueirões. Apesar de ambos serem peixes pelágicos e pertencerem à ordem dos *Clupeiformes*, possuem aparelhos branquiais distintos. Na sardinha, nos arcos branquiais, as branquispinhas que retêm o alimento são finas e alongadas e com poucos espaços entre elas, enquanto no biqueirão são curtas e mais espaçadas (Collard *et al.*, 2017a). Para além disso, cada branquispinha possui dentículos que retêm partículas da água, que na sardinha são numerosos mas curtos e no biqueirão são mais alongados mas com espaços maiores entre dentículos (Collard *et al.*, 2017a). Assim, a elevada percentagem de fragmentos nas brânquias do biqueirão pode ser explicada devido à eficiência do aparelho branquial, retendo partículas grandes (Rykaczewski, 2009), enquanto a sardinha retém partículas fibrosas e mais pequenas.

A percentagem de indivíduos que apresentaram MPs nas brânquias foi similar entre espécies, contudo foram encontradas diferenças significativas na concentração de MPs entre duas delas o que pode estar relacionado com as diferentes morfologias branquiais e comportamentos alimentares. Foram encontradas diferenças significativas na concentração de MPs nas brânquias de carapau e biqueirão onde as brânquias do biqueirão registaram maior concentração de MPs do que o carapau. Para explicar estas diferenças é necessário ter em ponderação os diferentes comportamentos alimentares de cada espécie, morfologia das brânquias (Collard *et al.*, 2017a) e fenómenos de absorção passiva e ativa de MPs em peixes. Ao contrário da sardinha e do biqueirão que são ambos capazes de realizar comportamentos alimentares de filtração e raptorial (particulada) (O'Connell, 1972; Garrido *et al.*, 2007), o carapau realiza uma alimentação essencialmente raptorial (Plounevez e Champalbert, 2000; Mapukata, 2002; D'Elia *et al.*, 2014). A alimentação raptorial (seletiva) é caracterizada pela deteção visual e seleção individualizada de presas. Por outro lado, a alimentação por filtração (não seletiva) é caracterizada pelos peixes manterem a boca aberta enquanto nadam ou utilizarem sucções rítmicas para capturar presas (Ganias, 2014). As espécies filtradoras (sardinha e biqueirão) não empregam orientação visual com as partículas da água e a estratégia de alimentação é projetada para ingerir várias partículas ao mesmo tempo (Collard *et al.*, 2017a). Assim, tendo em consideração os diferentes comportamentos alimentares, a maior concentração de MPs nos biqueirões pode estar associada à flexibilidade de modos de alimentação e às características oportunistas desta espécie, enquanto o carapau emprega um modo de alimentação mais seletivo. Para além da diversidade de comportamentos alimentares do biqueirão, é necessário considerar os mecanismos de entrada de MPs em peixes. A entrada de MPs nos peixes pode ocorrer através de fenómenos de “*active uptake*” e “*passive uptake*” (Anexo A- figura A4). Durante o “*active uptake*”, os peixes podem deliberadamente ingerir MPs, confundindo-os com o seu alimento que se assemelham visualmente às suas presas (Mizraji *et al.*, 2017; Ory *et al.*, 2017; Roch *et al.*, 2020). No “*passive uptake*” os MPs podem ser ingeridos de forma accidental ou passiva durante a procura de alimento ou pela ingestão de alimento contaminado por MPs (Jovanović, 2017; Roch *et al.*, 2020). O biqueirão possui comportamentos alimentares mais diversificados (filtração e raptorial) e consequentemente podem ocorrer fenómenos de “*active uptake*” e “*passive uptake*”, enquanto o carapau que apresenta uma alimentação essencialmente particulada (Plounevez e Champalbert, 2000; Mapukata, 2002; D'Elia *et al.*, 2014) onde a entrada de MPs pode ocorrer através de “*active uptake*”. A diversidade de comportamentos alimentares, eficiência do aparelho branquial e a conjugação com a possibilidade de existirem fenómenos de absorção ativa e passiva, pode explicar a maior concentração de MPs nas brânquias do biqueirão em comparação com o carapau.

Em relação aos tratos gastrointestinais, verificou-se que o carapau obteve uma maior percentagem de ingestão de MPs (81%), comparativamente à sardinha e biqueirão (72,1% e 52,3%, respetivamente). A elevada percentagem de MPs no carapau pode estar associada ao tipo de habitat que esta espécie ocupa ao longo da sua ontogenia. Ao longo da costa portuguesa, esta espécie semi-pelágica é normalmente encontrada entre os 0 e os 200 m. Os indivíduos juvenis de carapau (entre os 2-3 anos) habitam áreas perto da costa e profundidades mais baixas, enquanto entre os indivíduos adultos (≥ 6 anos) encontram-se *offshore* a profundidades abaixo dos 100 m de profundidade (Cabral e Murta, 2002; Murta *et al.*, 2008). Neste estudo, foram analisados indivíduos adultos e juvenis de carapau o que associado à flexibilidade das suas dietas e ao tipo de habitat pode explicar a elevada percentagem de microplásticos detetados nos tratos gastrointestinais desta espécie. Contrariamente, a sardinha e o biqueirão são espécies exclusivamente pelágicas e possuem histórias de vida e alimentação diferentes do carapau, mas semelhantes entre si (Checkley *et al.*, 2017). Os resultados foram concordantes com o estudo de Lopes *et al.* (2020), que verificou que o carapau ingeriu mais MPs de várias cores e formas que outras espécies pelágicas, como a sardinha e o biqueirão. Alguns estudos sugerem que os peixes demersais são mais propensos a ingerir plásticos que os peixes pelágicos (Bessa *et al.*, 2018; Kühn *et al.*, 2019).

Nos tratos gastrointestinais das espécies, verificou-se uma diminuição da variedade de cores dos MPs em relação às brânquias. No entanto, a cor azul manteve-se predominante em todas as espécies, tal como observado por Lopes *et al.* (2020) (sardinha, biqueirão e carapau) e Barboza *et al.* (2020) (carapau). A elevada percentagem de MPs de coloração azulada pode ser explicada devido ao facto de os peixes serem predadores visuais e de a visão ser o sentido dominante em peixes teleósteos (Blaxter, 1980). A maioria dos peixes possuem olhos bem desenvolvidos (Blaxter, 1980) onde a visão a cores (Neumeyer, 2003) é útil em ambientes com uma maior gama de comprimentos de onda disponíveis, como por exemplo perto da superfície (Einfalt *et al.*, 2012). A intensidade de luz diminui exponencialmente com a profundidade resultando na absorção e refração de luz. Assim, diferentes cores do espectro não são igualmente absorvidos pela água. Comprimentos de onda mais longos (cores vermelhas) são absorvidos a profundidades mais baixas do que comprimentos de onda mais curtos (cores azuis), que penetram a uma profundidade maior (Emde *et al.*, 2004). Assim, supõem-se que a intensidade de luz e os diferentes comprimentos de onda a várias profundidades podem afetar o modo como os MPs e as presas são percecionados pelos peixes.

As fibras foram a forma mais encontrada nos tratos gastrointestinais das espécies à semelhança de outros estudos (Neves *et al.*, 2015; Lopes *et al.*, 2020). O biqueirão e a sardinha apresentaram mais fragmentos nos tratos gastrointestinais (22% e 8,1%, respetivamente) quando comparados com o carapau (6%). Este resultado não coincidiu com o relatado por Barboza *et al.* (2020) em que o carapau obteve maior percentagem de fragmentos (76%) e apenas (22%) de fibras. Tal como verificado nas brânquias, a sardinha e o biqueirão possuem comportamentos alimentares semelhantes (filtração e raptorial) (Garrido *et al.*, 2007; Ganas, 2014) e podendo ingerir MPs de forma passiva e ativa o que pode explicar a maior percentagem de fragmentos nos tratos gastrointestinais.

O teste estatístico realizado entre os tratos gastrointestinais das espécies demonstrou que existiram diferenças significativas entre o carapau e a sardinha, pois a sardinha obteve maior concentração de MPs que o carapau. Uma possível explicação para a existência de maior concentração de MPs nas sardinhas pode estar relacionada com os seus comportamentos alimentares. Os adultos e juvenis de sardinhas alternam entre alimentação por filtração (presas menores dimensões) e

alimentação raptorial (para itens de maiores dimensões), empregando o melhor modo de alimentação mais eficiente em termos de gasto de energia em relação à ingestão de presas (Ganias, 2014). A flexibilidade de comportamentos alimentares e o facto de poderem ocorrer fenómenos de “*active uptake*” e “*passive uptake*” (Anexo A – figura A4) com ingestão acidental e passiva tornam a sardinha mais versátil face ao carapau, justificando assim a maior concentração de MPs nos tratos gastrointestinais. A sardinha possui ainda um aparelho de filtração muito eficiente com elevada área de filtração e branquispinhas mais estreitas (Collard *et al.*, 2017a). Uma vez que o aparelho branquial está associado à respiração e alimentação por filtração estas adaptações tornam esta espécie uma das mais vulneráveis à ingestão de MPs (Rykaczewski, 2009; Collard *et al.*, 2017a).

O resultado acima descrito foi diferente ao observado por Lopes *et al.* (2020) que analisou os conteúdos estomacais de peixes pelágicos na costa portuguesa em que a sardinha obteve menor concentração de MPs do que o carapau. Estes resultados díspares podem dever-se ao facto das diferentes unidades utilizadas em cada estudo, sendo que Lopes *et al.* (2020) utilizou o N° de MPs por estômago em vez de N° de MPs/g como considerado neste estudo. Como é possível observar no gráfico da figura 3.20 e na figura A2 do anexo A, ao comparar o N° de MPs/g de trato gastrointestinal das espécies a análise dos resultados normalizados à grama de tecido poderá ter influenciado os resultados obtidos. É necessário ter presente que indivíduos de sardinha continham um tamanho e peso dos órgãos reduzido, o que influenciou os resultados sendo possível observar visualmente esse ajustamento no tamanho das caixas de *boxplots*. Por outro lado, apesar do carapau ser a espécie com maior número de MPs nos tratos gastrointestinais e com a percentagem mais elevada, ao ser efetuada uma normalização à grama é possível observar que nas *boxplots* apresenta valores inferiores ao da sardinha. Assim, os resultados distintos nos dois estudos evidenciam a necessidade urgente da uniformização entre as várias investigações para que os seus resultados sejam comparáveis entre si.

Em relação aos MPs encontrados nos músculos das três espécies, verificou-se uma homogeneidade de cores em todas elas, sendo a cor azul a mais frequente, enquanto as principais cores secundárias (verde e vermelho) foram superiores na sardinha e biqueirão. A presença da coloração azul nos tecidos musculares está em conformidade com outros estudos como o de Akhbarizadeh *et al.* (2018), em que a cor azul foi uma das principais nos músculos em peixes do nordeste do Golfo Pérsico e com o estudo de Barboza *et al.* (2020) relativo a peixes de águas costeiras portuguesas.

As fibras foram a forma mais comum de MPs encontrados nos músculos de carapau (86,5%) e sardinha (97,8%). No entanto, apesar de o biqueirão ter apresentado maior percentagem de fibras nos músculos (57,1%) os fragmentos apresentaram percentagens superiores nesta espécie (42,9%). A elevada percentagem de fragmentos nos músculos de biqueirão está em conformidade com as percentagens obtidas para *Dicentrachus labrax* (35%), *Trachurus trachurus* (45%), *Scomber colias* (49%) em tecidos musculares (Barboza *et al.*, 2020). Ao contrário dos outros tecidos, não se observaram diferenças significativas entre o N de MPs/g de tecido nos músculos das várias espécies estudadas. A ausência de diferenças nos músculos pode indicar que as barreiras internas dos organismos sejam semelhantes, ao contrário das brânquias e tratos gastrointestinais, que refletem as diferentes adaptações morfológicas e preferências alimentares das espécies.

Anteriormente, outras investigações (Abbasi *et al.*, 2018; Akhbarizadeh *et al.*, 2018) reportaram a presença de MPs em músculos de peixes com interesse comercial e em órgãos e carne

esviscerada de várias espécies de peixes (Karami *et al.*, 2018). Foram ainda detetados MPs em subprodutos à base de pescado e destinados ao consumo humano como em conservas de sardinha e arenques (Karami *et al.*, 2018). Recentemente, Barboza *et al.* (2020), detetaram MPs em músculos de *D. labrax*, *T. trachurus* e *S. colias*, sendo que a percentagem de MPs obtidos nos músculos destas espécies (22%) foi relativamente semelhante ao encontrado no presente estudo (23%). Apesar de se terem vindo a realizar mais estudos ao longo dos anos, os mecanismos de passagem e acumulação dos MPs nos tecidos musculares ainda são desconhecidos e as suas implicações levantam preocupações para os consumidores humanos. Alguns estudos têm especulado que a deteção de MPs nos músculos podem resultar da absorção digestiva de partículas microscópicas através de processos de pinocitose e fagocitose vesicular (Browne *et al.*, 2008). Estudos médicos em roedores e humanos revelaram que partículas de PS (Volkheimer, 1975) e de PVC (Hussain *et al.*, 2001) inferiores a 150 µm podem ser translocadas da cavidade intestinal para os sistemas linfáticos e circulatórios.

A classe de tamanho mais abundante encontrado nos músculos das espécies foi a classe <0,3 mm sendo os MPs de menores dimensões encontrados neste tecido com tamanhos de 0,033 mm (33 µm) no biqueirão, 0,069 mm no carapau e 0,13mm na sardinha. Recentemente, fragmentos de grandes dimensões (0,49 mm) e fibras (2,4 mm) foram encontrados no músculo dorsal de peixes da costa portuguesa (Barboza *et al.*, 2020). Investigações de Abbasi *et al.* (2018) e Akhbarizadeh *et al.* (2018) observaram ainda MPs de grandes dimensões nomeadamente > 1 mm e > 5 mm em tecidos musculares. Contudo os mecanismos de internalização para os músculos ainda são desconhecidos e a existência de investigações nestas temáticas são escassas. É ainda de realçar que outras condicionantes externas podem levar à entrada de MPs nos organismos. Durante a captura, os peixes podem sofrer vários tipos de lesões e perfurações na pele e escamas causadas pela pressão das redes (Davis e Ottmar, 2006; Veldhuizen *et al.*, 2018), sendo mais frequentes em redes de arrasto, cerco e emalhar (Mephram, 2000). Assim, é possível supor que a entrada de MPs nos peixes pode ocorrer através da perfuração e lesões da pele, que pode explicar o aparecimento de MPs de maiores dimensões nos tecidos e músculos.

Em resumo, os mecanismos de transferência dos MPs através dos tecidos ainda são desconhecidos e são necessárias investigações futuras para entender estes processos e quais as implicações que representam para a saúde humana.

4.3. Identificação de Polímeros

Dos potenciais microplásticos analisados (35%), foi obtida uma grande variedade de polímeros termofixos e termoplásticos. Os polímeros identificados possuem inúmeras utilizações como as fibras para têxteis (ex: poliéster, rayon, PE), garrafas (ex: poliéster, PET, PE), tintas e revestimentos (ex: acrílico, PMMA), material de pesca e redes (ex: PA- nylon 66, PE, PES, PU) (Radhalekshmy e Nayar, 1973) (Anexo A – tabela A3). Os resultados encontrados coincidem com os principais tipos de polímeros utilizados na Europa em 2018, o PP (19,3%), PE (17,5%), PET (7,4%) e PS (6,6%) (PlasticsEurope, 2018), e com os registados por Lusher *et al.* (2013) em peixes pelágicos e demersais do Canal Inglês, celulose rayon (57,8%), poliamidas (35,6%), e poliéster (5,1%).

Um estudo realizado no estuário do Mondego (Bessa *et al.*, 2018) também apresentou elevadas percentagens de PES (31%), rayon (30%), PP (14%), PE (6%) e PA (5%). Contudo, os resultados deste estudo são diferentes dos obtidos por Barboza *et al.* (2020), em três espécies de peixes, robalo (*Dicentrarchus labrax*), carapau (*Trachurus trachurus*) e cavala (*Scomber colias*), em que os plásticos mais encontrados foram o PE (80%), poliéster (19%) e rayon (1%). Os dois tipos de

polímeros mais frequentes deste estudo (PP- 19,3%; PE- 17,5%) coincidiram ainda com o estudo de Lopes *et al.* (2020) em peixes pelágicos planctívoros em águas Atlanto-ibéricas que obteve percentagens de 21% de PP e 16% de PE. A maioria dos polímeros identificados correspondem a materiais utilizados na indústria têxtil como as fibras, que se relaciona com a forma mais encontrada de plásticos em todos os peixes.

No que diz respeito aos polímeros observados em cada espécie de peixe, estes foram diversificados e dependeram das suas preferências alimentares. O carapau foi a espécie onde foi encontrada a maior variedade de plásticos com 14 polímeros identificados, enquanto na sardinha e no biqueirão foram encontradas apenas 12 variedades de polímeros diferentes. Este facto pode ser explicado através dos habitats ocupados e das migrações verticais realizadas na coluna de água. A maioria dos *Clupeiformes* adultos e outras espécies pequenas de peixes pelágicos realizam migrações verticais em direção à superfície durante a noite (Zwolinski *et al.*, 2007), como é o caso dos indivíduos do género *Sardina* e *Engraulis* (Krutzikowsky e Emmett, 2005). A sardinha forma cardumes, normalmente a profundidades entre os 25-55 m durante o dia e sobe dos 10 até aos 37 m à noite (Santos *et al.*, 2006). O carapau possui um tipo de habitat mais amplo, onde os adultos e juvenis sobem do fundo para águas intermédias durante o pôr-do-sol, retornando ao fundo ao amanhecer (Barange *et al.*, 2005). Esta espécie habita na costa portuguesa normalmente entre os 100-200 m de profundidade, podendo atingir os 500 m (Whitehead, 1985). Os adultos de biqueirão são normalmente encontrados entre os 70 m e 200 m de profundidade (Kucas, 1986).

O rayon foi o polímero comum em todas as espécies e foi o que registou a maior percentagem: no carapau (43,1%), no biqueirão (40%), na sardinha (36,9%), sendo este polímero o mais encontrado em peixes demersais e pelágicos do Canal Inglês (57,8%) (Lusher *et al.*, 2013). Os polímeros mais comuns no carapau foram o rayon (43%), PES (17,2%), PEI (8,6%) e PE (6,5%). Estes polímeros têm uma elevada densidade (rayon -1,53 g/cm³, PES - 1,40 g/cm³, PEI - 1,27 g/cm³) e, por esse facto, normalmente afundam e encontram-se nos fundos marinhos (Andrady, 2011), refletindo a elevada flexibilidade e amplitude de profundidades que esta espécie semi-pelágica pode habitar.

Os polímeros encontrados refletem ainda as formas mais observadas, sendo que o carapau obteve a maior percentagem de fibras e conseqüentemente polímeros que entram na composição de fibras têxteis como o rayon, PES, PEI e PE. Estes polímeros entram ainda na composição de embalagens, resinas, indústria automóvel, têxtil e bens domésticos. No carapau, foi ainda encontrado o polímero de maior densidade PTFE (2,2 g/cm³), registado neste estudo. As densidades dos polímeros identificados neste estudo podem ser encontrados na tabela A3 do anexo A. A sardinha que habita baixas profundidades, obteve maior percentagem de polímeros como o PMMA (15,4%), PP (7,7%) e BMA (6,15%). Estes polímeros apresentam densidades mais reduzidas, (PMMA - 1,19 g/cm³, PP - 0,90 g/cm³, BMA - 0,89 g/cm³) e encontram-se normalmente em camadas superiores da coluna de água. Estes polímeros são utilizados em revestimentos, tintas, resinas, embalagens, peças de carros e equipamentos médicos e sanitários. Contudo, a sardinha também registou maiores percentagens, em relação às outras espécies, de acrílico PMMA (15,4%) e de poliácrlato (6,2%) e foi a única espécie a apresentar o polímero de epóxi (1,5%). Em relação ao biqueirão, este apresentou polímeros com uma grande variedade de densidades como o BMA (20%), PS (10%) e PU, PSU, PP PEI, PE, PES (3,33%). Os polímeros são utilizados em tintas, adesivos, embalagens, equipamentos médicos e sanitários, redes de pesca e indústria naval. O biqueirão registou a maior percentagem de BMA (20%), PA (3,33%) e PS (10%) comparativamente às outras duas espécies. Este facto pode estar relacionado com a elevada

ocorrência de fragmentos nas brânquias e nos músculos desta espécie comparativamente ao carapau e à sardinha. Esta espécie foi a única a registar polímeros de PU e PSU, embora em percentagem reduzida (3,3%).

4.4. Seleção do Bioindicador

As três espécies de peixes analisadas podem ser consideradas potenciais indicadoras da presença de microplásticos para a avaliação do D10 da DQEM devido às suas características biológicas, ampla distribuição geográfica e importância socioeconómica que representam para os portugueses. Os pequenos peixes pelágicos como a sardinha e biqueirão podem ser ponderados como bioindicadores viáveis devido à sua flexibilidade de comportamentos alimentares, aparelhos branquiais eficientes e vulnerabilidade aos MPs. Estas espécies podem ainda refletir as quantidades de MPs na coluna de água e habitats costeiros (Digka *et al.*, 2018). No presente estudo, a sardinha e o biqueirão obtiveram maior concentração de MPs nos tratos gastrointestinais e nas brânquias face ao carapau. Este resultado foi contrário ao observado por Lopes *et al.* (2020), o que pode dever-se às diferentes unidades utilizadas em cada estudo. Assim, a seleção do bioindicador teve em ponderação as elevadas percentagens de MPs encontradas nos tecidos e as percentagens de ingestão. Acresce ainda o facto, de nos últimos anos os *stocks* de sardinha em Portugal terem vindo a sofrer um declínio acentuado. Para além do estado dos *stocks* foi também considerado o seu estatuto de conservação como “quase ameaçada” (NT- “*Near threatened*”) pela Lista Vermelha da IUCN. Estes factos foram ponderados, declinando a proposta desta espécie como um bioindicador viável para a avaliação do D10 da DQEM.

Assim, o presente estudo sugere que o carapau seja o bioindicador mais adequado para a avaliação dos critérios do D10 da DQEM relativamente aos microplásticos. A seleção ponderou as elevadas percentagens de MPs verificadas nos tecidos desta espécie e as elevadas percentagens de ingestão. Para além dos resultados obtidos apoiarem a seleção desta espécie, existe informação histórica relevante sobre os *stocks* (Murta, 2000; Murta *et al.*, 2008), e sobre as suas características taxonómicas (Bektas e Belduz, 2009), biológicas e ecológicas (Abaunza *et al.*, 2003; Macer, 2006; Garrido *et al.*, 2008b; Garrido e Murta, 2011). Ao contrário da sardinha e do biqueirão, o carapau é uma espécie semi-pelágica (Carbonara *et al.*, 2019) possui um habitat amplo formando grandes cardumes em áreas costeiras (Wheeler e Du Heaume, 1969). Devido à grande variedade de habitats e amplitudes de profundidades que esta espécie alcança, o carapau permite quantificar e traçar um perfil dos MPs existentes na coluna de água e nos fundos. Ao contrário do biqueirão e da sardinha que possuem ciclos de vida curtos, o ciclo do carapau é longo podendo atingir os 40 anos de idade (Abaunza *et al.*, 2003). A longevidade do carapau representa uma vantagem na seleção de um bom bioindicador, sendo que tal como outros predadores de topo são suscetíveis à acumulação de contaminantes e plásticos ao longo do seu ciclo de vida (Nelms *et al.*, 2019). Existem ainda informações tróficas e acerca dos comportamentos alimentares desta espécie e incluindo os tamanhos preferenciais (Bayhan e Sever, 2009; Garrido e Murta, 2011; Garrido *et al.*, 2015). A gestão pesqueira desta espécie está bem estabelecida e o estado de exploração deste *stock* é avaliado anualmente pelo Conselho Internacional para a Exploração do Mar, CIEM/ICES (ICES, 2019).

Segundo o Conselho Europeu de Agricultura e Pescas, Portugal pôde capturar mais de 131 mil toneladas de peixe em 2019, para além disso foram definidos os totais admissíveis de captura (TAC) ou quotas para as águas europeias. Segundo os dados divulgados, o carapau é um recurso pesqueiro importante explorado em Portugal, sendo que a quota para a pesca desta espécie aumentou 69% em 2019 face a 2018 (INE, 2019). Para além do aumento das quotas observadas

nos últimos anos (INE, 2019), o carapau possui um estatuto de conservação pouco preocupante (LC- "*Least concern*") pela Lista Vermelha da IUCN das espécies ameaçadas (Di Natale *et al.*, 2011) sendo uma espécie muito abundante nas águas portuguesas. A importância comercial e o estatuto de conservação do carapau são características favoráveis à proposta desta espécie como sendo um bom bioindicador para a avaliação dos critérios do D10 da DQEM.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. Considerações Finais

O presente estudo sugere que o carapau seja o bioindicador mais adequado para a avaliação dos critérios do D10 relativamente aos microplásticos.

Em relação aos tecidos-alvo mais adequados, é de salientar a necessidade urgente de analisar não só os conteúdos estomacais, mas abranger vários tecidos do mesmo organismo nomeadamente as brânquias e os músculos. Só assim será possível determinar a extensão das contaminações por MPs e quais as implicações futuras que estes terão para o ser humano.

Em termos de limitações, destaca-se a falta de uniformização na apresentação dos resultados nos vários estudos de MPs em organismos marinhos, o que provoca interpretações ambíguas dependendo do tratamento dos dados. É recomendável para estudos futuros a inclusão de um maior número de indivíduos adultos e juvenis, uma vez que as suas dietas variam ao longo da sua ontogenia alterando a acumulação de MPs. É ainda de realçar a necessidade de reforçar o número de indivíduos amostrados, incluir variações sazonais e temporais e averiguar a existência de diferenças entre áreas geográficas. Futuramente, seria ainda benéfico a inclusão de outras espécies da comunidade pelágica e demersal.

Atualmente, ainda são escassos os estudos de MPs em organismos marinhos na costa portuguesa, focando-se apenas na presença de MPs nos tratos gastrointestinais não tendo em consideração os seus aspetos biológicos, comportamentais e preferências alimentares. Apesar de algumas limitações, este estudo representa uma tentativa útil de preencher o reduzido número de investigações de MPs em vários tecidos e peixes da costa portuguesa. Dada a presença de MPs em tecidos edíveis dos peixes (músculos) e devido à elevada importância cultural e económica que estes recursos representam em Portugal é incentivada a realização de investigações futuras. Só assim, será possível a determinação dos riscos que os MPs representam para os consumidores humanos e a adoção de medidas de adaptação e mitigação num oceano em constante mudança.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas

- Abaunza, P., Gordo, L., Karlou-Riga, C., Murta, A., Eltink, A. T. G. W., Santamaría, M. T., Gallo, E. (2003). Growth and reproduction of horse mackerel, *Trachurus trachurus* (Carangidae). Reviews in *Fish Biology and Fisheries*, 13, 27–61. <https://doi.org/10.1023/A:1026334532390>
- Abbasi, S., Soltani, N., Keshavarzi, B., Moore, F., Turner, A., & Hassanaghaei, M. (2018). Microplastics in different tissues of fish and prawn from the Musa Estuary, Persian Gulf. *Chemosphere*, 205, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.076>
- Akhbarizadeh, R., Moore, F., & Keshavarzi, B. (2018). Investigating a probable relationship between microplastics and potentially toxic elements in fish muscles from northeast of Persian Gulf. *Environmental Pollution*, 232, 154 – 163. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.028>
- Alomar, C., Sureda, A., Capó, X., Guijarro, B., Tejada, S., & Deudero, S. (2017). Microplastic ingestion by *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758 fish and its potential for causing oxidative stress. *Environmental Research*, 159(June), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.07.043>
- Andrady, A.L. (2003). *Plastics and the environment* (Anthony L. Andrady, Ed.). New Jersey: *John Wiley and Sons*.
- Andrady, Anthony L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1596–1605. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>
- Antunes, J., Frias, J., & Sobral, P. (2018). Microplastics on the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin*, 131, 294–302. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.025>
- Arthur, Courtney, Baker, J., & Bamford, H. (2009). Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris. *National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Memorandum*, (January), 530.
- Avio, C. G., Gorbi, S., & Regoli, F. (2015). Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: First observations in commercial species from Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*, 111, 18–26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.014>
- Barange, M., Pillar, S. C., Huse, I., & Hutchings, L. (2005). Vertical migration, catchability and acoustic assessment of semi-pelagic Cape horse mackerel *Trachurus trachurus capensis* in the southern Benguela. *African Journal of Marine Science*, 27(2), 459–469. <https://doi.org/10.2989/18142320509504104>
- Barboza, L. G. A., Lopes, C., Oliveira, P., Bessa, F., Otero, V., Henriques, B., Guilhermino, L. (2020). Microplastics in wild fish from North East Atlantic Ocean and its potential for causing neurotoxic effects, lipid oxidative damage, and human health risks associated with ingestion exposure. *Science of The Total Environment*, 717, 134625. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134625>
- Barbuzano, J. (2019). Rivers Are a Highway for Microplastics into the Ocean. *Eos*, 100. <https://doi.org/10.1029/2019EO130375>
- Bayhan, B., & Sever, T. (2009). Food and feeding habits of the Atlantic Horse Mackerel, *Trachurus trachurus*, from the Aegean Sea (Osteichthyes: Carangidae). *Zoology in the Middle East*, 46, 47–54. <https://doi.org/10.1080/09397140.2009.10638327>

- Bektas, Y., & Belduz, A. (2009). Morphological Variation among Atlantic Horse Mackerel, *Trachurus trachurus* Populations from Turkish Coastal Waters. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8, 511–517.
- Bessa, F., Barría, P., Neto, J. M., Frias, J. P. G. L., Otero, V., Sobral, P., & Marques, J. C. (2018). Occurrence of microplastics in commercial fish from a natural estuarine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 128, 575–584. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.01.044>
- Bessa, F., Kogel, T., Frias, J., & Lusher, A. (2019). Harmonized protocol for monitoring microplastics in biota. *JPI-Oceans BASEMAN Project*, (April), 1–30. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.28588.72321/1>
- Blaxter, J. H. S. (1980). Vision and feeding of fishes. In International Center for Living Aquatic Resources Management (Ed.), Bardach, J.E., Magnuson, J.J., May, R.C., Reinhart, J.M. Fish Behavior and Its Use in the Capture and Culture of Fishes (pp. 32–43). Manila, Philippines: ICLARM 1980.
- Boerger, C. M., Lattin, G. L., Moore, S. L., & Moore, C. J. (2010). Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre. *Marine Pollution Bulletin*, 60(12), 2275–2278. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.08.007>
- Bonanno, G., & Orlando-Bonaca, M. (2018). Perspectives on using marine species as bioindicators of plastic pollution. *Marine Pollution Bulletin*, 137, 209–221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.018>
- Borme, D., Tirelli, V., Brandt, S. B., Umani, S. F., Arneri, E., Nazionale, I. (2009). Diet of *Engraulis encrasicolus* in the northern Adriatic Sea (Mediterranean): ontogenetic changes and feeding selectivity. *Marine Ecology Progress Series*, 392, 193–209. <https://doi.org/10.3354/meps08214>
- Botas, J. A., Fernandez, E., Bode, A., & Anadon, R. (1990). A persistent upwelling off the Central Cantabrian Coast (Bay of Biscay). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 30(2), 185–199. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0272-7714\(90\)90063-W](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0272-7714(90)90063-W)
- Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., & Thompson, R. C. (2008). Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L). *Environmental Science & Technology*, 42(13), 5026–5031.
- Budnichenko, E. V, Firulina, A. V, & Bulgakova, Y. V. (1999). Feeding conditions of Azov Sea anchovy *Engraulis encrasicolus maeoticus* during summer-fall 1995–1996. *Journal of Ichthyology*, 39, 248–255.
- Bulgakova, Y. V. (1996). Feeding in the Black Sea anchovy: Diet composition, feeding behaviour, feeding periodicity and daily rations. *Scientia Marina*. 60, 283–284.
- Cabral, H. N., & Murta, A. G. (2002). The diet of blue whiting, hake, horse mackerel and mackerel off Portugal. *Journal of Applied Ichthyology*, 18(1), 14–23. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2002.00297.x>
- Caneco, B., Silva, A., & Morais, A. (2004). Morphometric variation among anchovy (*Engraulis encrasicolus*, L.) populations from the Bay of Biscay and Iberian waters. *ICES Journal of Marine Science*, 60.

- Cannon, S. M. E., Lavers, J. L., & Figueiredo, B. F. (2016). Plastic ingestion by fish in the Southern Hemisphere: A baseline study and review of methods. *Marine Pollution Bulletin*, 107(1), 286–291.
- Carbonara, P., Folessa, M. C. (2019). Handbook on fish age determination: a Mediterranean experience. *Studies and Reviews*. (98), 192.
- Carpenter, E. J., & S. J. Anderson, G. R. Harvet, H. P. Miklas, B. B. P. (1972). Polystyrene Spherules in Coastal Waters. *Science*, 178(4062), 749–750.
- Cesa, F. S., Turra, A., & Baruque-Ramos, J. (2017). Synthetic fibers as microplastics in the marine environment: A review from textile perspective with a focus on domestic washings. *Science of the Total Environment*, 598, 1116–1129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.172>
- Checkley, D. M., Asch, R. G., & Rykaczewski, R. R. (2017). Climate, Anchovy, and Sardine. *Annual Review of Marine Science*, 9, 469–493.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 62(12), 2588–2597. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., & Galloway, T. S. (2013). Microplastic Ingestion by Zooplankton. *Environmental Science & Technology*, 47, 6646–6655. <https://doi.org/10.1021/es400663f>
- Collard, F., Gilbert, B., Eppe, G., Roos, L., Compère, P., Das, K., & Parmentier, E. (2017a). Morphology of the filtration apparatus of three planktivorous fishes and relation with ingested anthropogenic particles. *Marine Pollution Bulletin*, 116(1–2), 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.067>
- Collard, F., Gilbert, B., Compère, P., Eppe, G., Das, K., Jauniaux, T., & Parmentier, E. (2017b). Microplastics in livers of European anchovies (*Engraulis encrasicolus*, L.). *Environmental Pollution*, 229, 1000–1005. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.089>
- Compa, M., Ventero, A., Iglesias, M., & Deudero, S. (2018). Ingestion of microplastics and natural fibres in *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) and *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) along the Spanish Mediterranean coast. *Marine Pollution Bulletin*, 128(January), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.01.009>
- Cózar, A., Echevarría, F., González-Gordillo, J. I., Irigoien, X., Ubeda, B., Hernández-León, S., Duarte, C. M. (2014). Plastic debris in the open ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(28), 10239–10244. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314705111>
- Cózar, A., Marti, E., Duarte, C. M., Garcia-de-Lomas, J., van Sebille, E., Ballatore, T. J., Irigoien, X. (2017). The Arctic Ocean as a dead end for floating plastics in the North Atlantic branch of the Thermohaline Circulation. *Science Advances*, 3(4). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600582>
- Cunha, M. E., Garrido, S., & Pissarra, J. (2005). The use of stomach fullness and colour indices to assess *Sardina pilchardus* feeding. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85(2), 425–431. <https://doi.org/10.1017/S0025315405011367h>

- Davis, M., & Ottmar, M. L. (2006). Wounding and reflex impairment may be predictors for mortality in discarded or escaped fish. *Fisheries Research*, 82, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2006.09.004>
- Davison, P., & Asch, R. G. (2011). Plastic ingestion by mesopelagic fishes in the North Pacific Subtropical Gyre. *Marine Ecology Progress Series*, 432, 173–180. <https://doi.org/10.3354/meps09142>
- Dehaut, A., Cassone, A. L., Frère, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., Paul-Pont, I. (2016). Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environmental Pollution*, 215, 223–233. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.018>
- D'Elia, M., Patti, B., Bonanno, A., Fontana, I., Giacalone, G., Basilone, G., & Fernandes, P. (2014). Analysis of backscatter properties and application of classification procedures for the identification of small pelagic fish species in the Central Mediterranean. *Fisheries Research*, 149, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2013.08.006>
- Di Natale, A., Bariche, M., Bizsel, C. & Massuti, E. (2011). *Trachurus trachurus*. Retrieved January 19, 2020, from The IUCN Red List of Threatened Species 2011 website: <https://www.iucnredlist.org/species/198647/9066421>
- Digka, N., Tsangaris, C., Torre, M., Anastasopoulou, A., & Zeri, C. (2018). Microplastics in mussels and fish from the Northern Ionian Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 135(February), 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.06.063>
- Dris, R., Gasperi, J., Rocher, V., Mohamed, S., & Tassin, B. (2015). Microplastic contamination in an urban area: A case study in Greater Paris. *Environmental Chemistry*, 12. <https://doi.org/10.1071/EN14167>
- Dris, R., Gasperi, J., Mirande, C., Mandin, C., Guerrouache, M., Langlois, V., & Tassin, B. (2016). A first overview of textile fibers, including microplastics, in indoor and outdoor environments. *Environmental Pollution*, 221. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.12.013>
- Einfalt, L. M., Grace, E. J. and Wahl, D. H. (2012) 'Effects of simulated light intensity, habitat complexity and forage type on predator–prey interactions in walleye Sander vitreus', *Ecology of Freshwater Fish*, 21(4), pp. 560–569. doi: 10.1111/j.1600-0633.2012.00576.x.
- Elsheikh, E. H. (2013). Scanning electron microscopic studies of gill arches and rakers in relation to feeding habits of some fresh water fishes. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 66(3), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2013.07.005>
- Emde, G., Mogdans, J., & Kapoor, B. G. (2004). *The Senses of Fishes: Adaptations for the Reception of Natural Stimuli*. (Narosa Pub; B. G. K. Emde, Gerhard Von der Emde, Joachim Mogdans, Ed.). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1060-3>
- EU. (2016). Report for European Commission DG Environment. Study to support the development of measures to combat a range of marine litter sources Incentivising Waste Disposal at Ports. (January). Retrieved from http://ec.europa.eu/environment/marine/good-environmental-status/descriptor-10/pdf/MSFD_Measures_to_Combat_Marine_Litter.pdf
- Filella, M. (2015). Questions of size and numbers in environmental research on microplastics: Methodological and conceptual aspects. *Environmental Chemistry*, 12 (5), 527 – 538. <https://doi.org/10.1071/EN15012>
- Fiúza, A. F. (1984). *Hidrologia e dinâmica das águas costeiras de Portugal (Hydrology and dynamics of the Portuguese coastal water)*. University of Lisboa, Lisboa.

- Foley, C. J., Feiner, Z. S., Malinich, T. D., & Höök, T. O. (2018). A meta-analysis of the effects of exposure to microplastics on fish and aquatic invertebrates. *Science of the Total Environment*, 631–632, 550–559. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.046>
- Frias, J. P. G. L., Otero, V., & Sobral, P. (2014). Evidence of microplastics in samples of zooplankton from Portuguese coastal waters. *Marine Environmental Research*, 95, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.01.001>
- Frias, J., Pagter, E., Nash, R., O'Connor, I., Carretero, O., Filgueiras, A., Gerdt, G. (2018). Standardised protocol for monitoring microplastics in sediments. *JPI-Oceans BASEMAN Project*, 23. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.36256.89601/1>
- Frias, J. P. G. L., & Nash, R. (2019). Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Marine Pollution Bulletin*, 138 (September 2018), 145–147. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.11.022>
- Friedland K.D, Haas L.W, M. J. (1984) 'Filtering rates of the juvenile Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus* (Pisces: Clupeidae), with consideration of the effects of detritus and swimming speed', *Marine Biology*, 84(2), pp. 109–117.
- Galloway, T. S. (2015). Micro- and Nano-plastics and Human Health. In M. Bergmann, L. Gutow, & M. Klages (Eds.), *Marine Anthropogenic Litter* (pp. 343–366). https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_13
- Ganias, K. (2014). Biology and Ecology of Sardines and Anchovies. In Konstantinos Ganias (Ed.), *Biology and Ecology of Sardines and Anchovies* (1st Edition, pp. 122–164). <https://doi.org/10.1201/b16682>
- Garrido, Susana, Marçalo, A., Zwolinski, J., & Van Der Lingen, C. D. (2007). Laboratory investigations on the effect of prey size and concentration on the feeding behaviour of *Sardina pilchardus*. *Marine Ecology Progress Series*, 330, 189–199. <https://doi.org/10.3354/meps330189>
- Garrido, Susana, Ben-Hamadou, R., Oliveira, P. B., Cunha, M. E., Chícharo, M. A., & Van Der Lingen, C. D. (2008a). Diet and feeding intensity of sardine *Sardina pilchardus*: Correlation with satellite-derived chlorophyll data. *Marine Ecology Progress Series*, 354, 245 – 256. <https://doi.org/10.3354/meps07201>
- Garrido, Susana, Murta, A., Moreira, A., Ferreira, M., & Angelico, M. (2008b). Horse mackerel (*Trachurus trachurus*) stomach fullness off Portugal: Index calibration and spatio-temporal variations in feeding intensity. *ICES Journal of Marine Science*, 65. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsn169>
- Garrido, Susana, & Murta, A. (2011). Horse mackerel (*Trachurus trachurus*) feeding off Portugal: inter-decadal and spatial variations of diet composition. *Journal of Fish Biology*, 79, 2034 – 2042.
- Garrido, S., Silva, A., Pastor, J., Dominguez, R., Silva, A. V., & Santos, A. M. (2015). Trophic ecology of pelagic fish species off the Iberian coast: Diet overlap, cannibalism and intraguild predation. *Marine Ecology Progress Series*, 539 (Ices 2014), 271 – 286. <https://doi.org/10.3354/meps11506>
- Garrido, Susana, Silva, A., Marques, V., Figueiredo, I., Bryère, P., Mangin, A., & Santos, A. M. P. (2017). Temperature and food-mediated variability of European Atlantic sardine recruitment. *Progress in Oceanography*, 159 (September 2016), 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2017.10.006>

- Gasperi, J., Wright, S. L., Dris, R., Collard, F., Mandin, C., Guerrouache, M., Tassin, B. (2018). Microplastics in air: Are we breathing it in? *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 1, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2017.10.002>
- Gerking, S. D. (1994). Chapter 8 - Filter Feeding. In S. D. Gerking (Ed.), *Feeding Ecology of Fish* (pp. 171–200). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-280780-0.50013-X>
- GESAMP (2016). Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: part 2 of a global assessment. (IMO, FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP). In: Kershaw, P.J. (Ed.), *Reports and Studies GESAMP*, No. 93, 96 p.
- Gregory, M. (2009). Environmental implications of plastic debris in marine settings—Entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364, 2013–2025. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0265>
- Gregory, N. G. (1998). *Animal Welfare and Meat Science* (Meat Science, Ed.). [https://doi.org/DOI:10.1016/s0309-1740\(00\)00009-7](https://doi.org/DOI:10.1016/s0309-1740(00)00009-7)
- Guillen, J., Natale, F., Carvalho, N., Casey, J., Hofherr, J., Druon, J. N., Martinsohn, J. T. (2018). Global seafood consumption footprint. *Ambio*, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13280-018-1060-9>
- Hartline, N. L., Bruce, N. J., Karba, S. N., Ru, E. O., Sonar, S. U., & Holden, P. A. (2016). Microfiber masses recovered from conventional machine washing of new or aged garments. *Environmental Science & Technology*, 50, 11532–11538. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03045>
- Henry, B., Laitala, K., & Klepp, I. G. (2019). Microfibres from apparel and home textiles: Prospects for including microplastics in environmental sustainability assessment. *Science of the Total Environment*, 652, 483–494. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.166>
- Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R. C., & Thiel, M. (2012). Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. *Environmental Science & Technology*, 46(6), 3060–3075. <https://doi.org/10.1021/es2031505>
- Hohenblum P., Liebmann B., L. M. (2015). *Plastic and microplastic in the environment* (2nd edition). Retrieved from <http://www.umweltbundesamt.at/fileadmin/site/publikationen/REP0551.pdf>
- Hussain, N., Jaitley, V., & Florence, A. (2001). Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50, 107–142. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00152-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00152-1)
- ICES. (2019). Working Group on Southern Horse Mackerel, Anchovy and Sardine (WGHANSA). *ICES Scientific Reports*, 1(34), 653. <https://doi.org/http://doi.org/10.17895/ices.pub.4983>
- INE. (2017). *Estatísticas da Pesca 2017* (2018th ed.; INE, Ed.). Retrieved from https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_bo ui=320384843&PUBLICACOESmodo=2
- INE. (2019). *Boletim Mensal da Agricultura e Pescas* (2019th ed.). Retrieved from https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_bo ui=369849534&PUBLICACOESmodo=2

- Isobe, A., Uchiyama-Matsumoto, K., Uchida, K., & Tokai, T. (2017). Microplastics in the Southern Ocean. *Marine Pollution Bulletin*, 114(1), 623–626. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.09.037>
- James, A.G. & Findlay, K. P. (1989). Effect of particle size and concentration on feeding behaviour, selectivity and rates of food ingestion by the Cape anchovy *Engraulis capensis*. *Marine Ecology Progress Series*, 50, 275–294. <https://doi.org/10.3354/meps050275>
- Käppler, A., Windrich, F., Löder, M., Malanin, M., Fischer, D., Labrenz, M., Voit, B. (2015). Identification of microplastics by FTIR and Raman microscopy: a novel silicon filter substrate opens the important spectral range below 1300 cm⁻¹ for FTIR transmission measurements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8850-8>
- Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C. K., Romano, N., Ho, Y. Bin, & Salamatinia, B. (2017). A high-performance protocol for extraction of microplastics in fish. *Science of the Total Environment*, 578(December 2017), 485–494. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.213>
- Karami, A., Golieskardi, A., Ho, Y. Bin, Larat, V., & Salamatinia, B. (2017). Microplastics in eviscerated flesh and excised organs of dried fish. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05828-6>
- Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C. K., Larat, V., Karbalaei, S., & Salamatinia, B. (2018). Microplastic and mesoplastic contamination in canned sardines and sprats. *Science of the Total Environment*, 612, 1380–1386. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.005>
- Kazmiruk, T. N., Kazmiruk, V. D., & Bendell, L. I. (2018). Abundance and distribution of microplastics within surface sediments of a key shellfish growing region of Canada. *PLOS ONE*, 13(5), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196005>
- King, D. P. F., & Macleod, P. R. (1976). Comparison of the food and the filtering mechanism of pilchard *Sardinops ocellata* and anchovy *Engraulis capensis* of South West Africa, 1971-1972. In Invest.Rep.Sea Fish.Brch S.Afr. (Vol. 111). Dept. of Industries.
- Krutzikowsky, G. K., & Emmett, R. L. (2005). Diel differences in surface trawl fish catches off Oregon and Washington. *Fisheries Research*, 71(3), 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2004.08.037>
- Kucas, S. T. (1986). Species Profiles: Life Histories and Environmental Requirements of Coastal Fishes and Invertebrates (Pacific Southwest): Northern anchovy. *United States Fish and Wildlife Service*, 11(82), 21.
- Kühn, S., van Werven, B., van Oyen, A., Meijboom, A., Bravo Rebolledo, E. L., & van Franeker, J. A. (2017). The use of potassium hydroxide (KOH) solution as a suitable approach to isolate plastics ingested by marine organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 115(1–2), 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.11.034>
- Kühn, S., van Franeker, J. A., O'Donoghue, A. M., Swiers, A., Starkenburg, M., van Werven, B., Lindeboom, H. (2019). Details of plastic ingestion and fibre contamination in North Sea fishes. *Environmental Pollution*, 113569. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113569>
- Leonart, J., & Maynou, F. (2003). Fish stock assessments in the Mediterranean : state of the art *. *Scientia Marina*, 67, 37 – 49. <https://doi.org/10.3989/scimar.2003.67s137>
- Lopes, C., Garrido, S., Angélico, M.M., Caetano, M., Raimundo, J. (2019). Microplásticos nas águas da costa portuguesa. Workshop de Investigação Sobre Microplásticos. 2ª Conferência

Portuguesa Sobre Lixo Marinho e Workshop de Investigação em Microplásticos. Setúbal, Portugal, 19 – 21 de setembro de 2019

Lopes, C., Raimundo, J., Caetano, M., & Garrido, S. (2020). Microplastic ingestion and diet composition of planktivorous fish. *Limnology and Oceanography Letters*, 5(1), 103–112. <https://doi.org/10.1002/lol2.10144>

Lusher, A. L., McHugh, M., & Thompson, R. C. (2013). Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine Pollution Bulletin*, 67(1–2), 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.028>

Lusher, Amy L., Tirelli, V., O'Connor, I., & Officer, R. (2015). Microplastics in Arctic polar waters: The first reported values of particles in surface and sub-surface samples. *Scientific Reports*, 5(June), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep14947>

Macer, C. (2006). Some aspects of the biology of the horse mackerel [*Trachurus trachurus* (L.)] in waters around Britain. *Journal of Fish Biology*, 10, 51–62. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1977.tb04041.x>

Mapukata, T. (2002). Laboratory studies on the feeding behaviour of juvenile Cape horse mackerel, *Trachurus trachurus capensis*. University of Cape Town (UCT).

Martins, J., & Sobral, P. (2011). Plastic marine debris on the Portuguese coastline: A matter of size? *Marine Pollution Bulletin*, 62(12), 2649–2653. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.028>

Mason, E., S, C., & Oliveira, P. (2006). An overview of the literature concerning the oceanography of the eastern North Atlantic region. *Relatórios Científicos e Técnicos IPIMAR Serie Digital*, 33.

Mephram, B. (2000). Animal Welfare and Meat Science N.G. Gregory, 1998, Wallingford: CABI Publishing. *Meat Science*, 56 1, 101.

Moore, C. J. (2008). Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. *Environmental Research*, 108(2), 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.07.025>

MSFD. (2013). Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas. *Publications Office of the European Union*, 124. <https://doi.org/DOI: 10.2788/99816>

Murta, A. G. (2000). Morphological variation of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Iberian and North African Atlantic: Implications for stock identification. *ICES Journal of Marine Science*, 57(4), 1240–1248. <https://doi.org/10.1006/jmsc.2000.0810>

Murta, A. G., Lu, A., & Abaunza, P. (2008). Stock identification of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) through the analysis of body shape. *Fisheries Research*, 89, 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2007.09.026>

Nadal, M. A., Alomar, C., & Deudero, S. (2016). High levels of microplastic ingestion by the semipelagic fish bogue *Boops boops* (L.) around the Balearic Islands. *Environmental Pollution*, 214, 517–523. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.054>

Nelms, S., Barnett, J., Brownlow, A., Davison, N., Deaville, R., Galloway, T., Godley, B. (2019). Microplastics in marine mammals stranded around the British coast: ubiquitous but transitory? *Scientific Reports*, 9, 1075. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37428-3>

- Neumeyer, C. (2003) 'Color Vision in Fishes and Its Neural Basis', in Collin S.P., M. N. J. (ed.) *Sensory Processing in Aquatic Environments*. New York: Springer, pp. 223–235. doi: 10.1007/978-0-387-22628-6_11.
- Neves, D., Sobral, P., Ferreira, J. L., & Pereira, T. (2015a). Ingestion of microplastics by commercial fish off the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin*, 101(1), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.11.008>
- O'Connell, C. P. (1972). The Interrelation of Biting and Filtering in the Feeding Activity of the Northern Anchovy (*Engraulis mordax*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 285–293.
- Obbard, R., Sadri, S., Wong, Y.-Q., Khitun, A., Baker, I., & C. Thompson, R. (2014). Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice. *Earth's Future*, 2, 315–320. <https://doi.org/10.1002/2014EF000240>
- Olaso, I., Cendrero, O., and Abaunza, P. (1999). The diet of the horse mackerel, *Trachurus trachurus* (Linnaeus 1758), in the Cantabrian Sea (north of Spain). *Journal of Applied Ichthyology*, 15, 193–198.
- Ory, N. C., Sobral, P., Ferreira, J. L., & Thiel, M. (2017). Amberstripe scad *Decapterus muroadsi* (Carangidae) fish ingest blue microplastics resembling their copepod prey along the coast of Rapa Nui (Easter Island) in the South Pacific subtropical gyre. *Science of the Total Environment*, 586, 430–437. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.175>
- Ory, N., Chagnon, C., Felix, F., Fernández, C., Ferreira, J. L., Gallardo, C., Thiel, M. (2018). Low prevalence of microplastic contamination in planktivorous fish species from the southeast Pacific Ocean. *Marine Pollution Bulletin*, 127, 211–216. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.12.016>
- OSPAR Commission. (2008). CEMP Assessment Manual Co-ordinated Environmental Monitoring Programme Assessment Manual for contaminants in sediment and biota.
- Panel, E., & Chain, F. (2016). Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *EFSA Journal*, 14(6). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4501>
- Parrish, R., Serra, R., & Grant, W. (1989). The Monotypic Sardines, *Sardina* and *Sardinops* : Their Taxonomy, Distribution, Stock Structure, and Zoogeography. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46, 2019–2036. <https://doi.org/10.1139/f89-251>
- Phuong, N. N., Zalouk-Vergnoux, A., Poirier, L., Kamari, A., Châtel, A., Mouneyrac, C., & Lagarde, F. (2016). Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments? *Environmental Pollution*, 211, 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.035>
- PlasticsEurope. (2018). Annual Review 2017-2018. Association of Plastics Manufacturers, 15, 44. Retrieved from https://www.plasticseurope.org/download_file/force/1830/181
- Plounevez, S., & Champalbert, G. (2000). Diet, feeding behaviour and trophic activity of the anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) in the Gulf of Lions (Mediterranean Sea). *Oceanologica Acta*, 23, 175 – 192. [https://doi.org/10.1016/S0399-1784\(00\)00120-1](https://doi.org/10.1016/S0399-1784(00)00120-1)
- Procter, J., Hopkins, F. E., Fileman, E. S., & Lindeque, P. K. (2019). Smells good enough to eat: Dimethyl sulfide (DMS) enhances copepod ingestion of microplastics. *Marine Pollution Bulletin*, 138, 1–6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.11.014>

- Radhalekshmy, K., & Gopalan Nayar, S. (1973). Synthetic fibres for fishing gear. *Fishery Technology*, 10(2), 142–165.
- Ribeiro, R., Reis, J., Santos, C., Gonçalves, F., & Soares, A. M. V. M. (1996). Spawning of Anchovy *Engraulis encrasicolus* in the Mondego Estuary, Portugal. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 42(4), 467–482. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/ecss.1996.0030>
- Ringelberg, J. (1980). Aspects of Red Pigmentation in Zooplankton, especially Copepods. In *University Press of New England* (Ed.), *Evolution and ecology of zooplankton communities* (W.C.Kerfoo, pp. 91–97). Hanover, N.H.
- Rumolo, P., Basilone, G., Fanelli, E., Barra, M., Calabrò, M., Genovese, S., Bonanno, A. (2017). Linking spatial distribution and feeding behavior of Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Strait of Sicily (Central Mediterranean Sea). *Journal of Sea Research*, 121, 47–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seares.2017.01.002>
- Ryan, P., Moore, C., Van Franeker, J., & Moloney, C. (2009). Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364, 1999–2012. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0207>
- Rykaczewski, R. R. (2009). Influence of Oceanographic Variability on the Planktonic Prey and Growth of Sardine and Anchovy in the California Current Ecosystem. Retrieved from <https://escholarship.org/uc/item/307453xf>
- Santos, A. M. P., Re, P., Dos Santos, A., & Peliz, Á. (2006). Vertical distribution of the European sardine (*Sardina pilchardus*) larvae and its implications for their survival. *Journal of Plankton Research*, 28(5), 523–532. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbi137>
- Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., & Lehtiniemi, M. (2014). Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environmental Pollution*, 185, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.013>
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), 246–265. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>
- Statsoft, I. (2008). STATISTICA 8. Tulsa, U.S.A: Statsoft, Inc. 2008.
- Stratoudakis, Y., Coombs, S., De Lanzós, A. L., Halliday, N., Costas, G., Caneco, B., Bernal, M. (2007). Sardine (*Sardina pilchardus*) spawning seasonality in European waters of the northeast Atlantic. *Marine Biology*, 152(1), 201–212. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0674-4>
- Su, L., Deng, H., Li, B., Chen, Q., Pettigrove, V., Wu, C., & Shi, H. (2018). The occurrence of microplastic in specific organs in commercially caught fishes from coast and estuary area of east China. *Journal of Hazardous Materials*, 365.
- Tagg, A., Sapp, M., Harrison, J., & Ojeda, J. (2015). Identification and Quantification of Microplastics in Wastewater Using Focal Plane Array-Based Reflectance Micro-FT-IR Imaging. *Analytical Chemistry*, 87, 6032–6040. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00495>
- Tanaka, K., & Takada, H. (2016). Microplastic fragments and microbeads in digestive tracts of planktivorous fish from urban coastal waters. *Scientific Reports*, 6 (September), 1 – 8. <https://doi.org/10.1038/srep34351>

- Teixeira, C., Gamito, R., Leitão, F., Murta, A., Cabral, H., Erzini, K., & Costa, M. (2015). Environmental influence on commercial fishery landings of small pelagic fish in Portugal. *Regional Environmental Change*. <https://doi.org/10.1007/s10113-015-0786-1>
- Teuten, E. L., Saquing, J. M., Knappe, D. R. U., Barlaz, M. A., Jonsson, S., Björn, A., Takada, H. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences*, 364(1526), 2027–2045. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0284>
- Torre, M., Digka, N., Anastasopoulou, A., Tsangaris, C., & Mytilineou, C. (2016). Anthropogenic microfibres pollution in marine biota. A new and simple methodology to minimize airborne contamination. *Marine Pollution Bulletin*, 113(1–2), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.07.050>
- van der Lingen, C. (1994). Effect of particle size and concentration on the feeding behaviour of adult pilchard *Sardinops sagax*. *Marine Ecology-Progress Series*, 109, 1–13. <https://doi.org/10.3354/meps109001>
- van der Lingen, C. D., Hutchings, L., & Field, J. G. (2006). Comparative trophodynamics of anchovy *Engraulis encrasicolus* and sardine *Sardinops sagax* in the southern Benguela: are species alternations between small pelagic fish trophodynamically mediated? *African Journal of Marine Science*, 28(3–4), 465–477. <https://doi.org/10.2989/18142320609504199>
- Veldhuizen, L. J. L., Berentsen, P. B. M., Boer, I. J. M. De, Vis, J. W. Van De, & Bokkers, E. A. M. (2018). Fish welfare in capture fisheries: A review of injuries and mortality. *Fisheries Research*, 204 (July 2017), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2018.02.001>
- Volkheimer, G. (1975). Hematogenous Dissemination of Ingested. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1 Toxicity (246), 164–171. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1749-6632.1975.tb51092.x>
- Wheeler, A. C., Du Heume, V. (1969). *The fishes of the British Isles and North-West Europe*. London: Macmillan.
- Whitehead, P. James Palmer. (1984). *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean* (Unesco, 19; P.J.P. Whitehead, Ed.). Paris.
- Whitehead, P.J.P. (1985). Clupeoid fishes of the world. An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, anchovies and wolfherrings. Part 1 - Chirocentridae, Clupeidae and Pristigasteridae. In *FAO species catalogue*. (pp. 55–56). Rome, Italy: FAO.
- Wright, S. L., Thompson, R. C., & Galloway, T. S. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. *Environmental Pollution* (Barking, Essex : 1987), 178, 483–492. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.031>
- Wuertz, M. (2010). Mediterranean pelagic habitat: oceanographic and biological processes, an overview. Spain: IUCN, Gland, Switzerland and Malaga, Spain.
- Ziccardi, L. M., Edgington, A., Hentz, K., Kulacki, K. J., & Kane Driscoll, S. (2016). Microplastics as vectors for bioaccumulation of hydrophobic organic chemicals in the marine environment: A state-of-the-science review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(7), 1667–1676. <https://doi.org/10.1002/etc.3461>
- Zitko, V., & Hanlon, M. (1991). Another Source of Pollution by Plastics: Skin Cleaners with Plastic Scrubbers Pesticide Residues in Sediments from the West Coast of India. *Marine Pollution*

Bulletin, 22(1), 41–42. Retrieved from <http://newswatch.nationalgeographic.com/2013/04/12/new-concerns-about-plastic-pollution-in-great-lakes-garbage-patch/>

Zwolinski, J., Morais, A., Marques, V., Stratoudakis, Y., & Fernandes, P. G. (2007). Diel variation in the vertical distribution and schooling behaviour of sardine (*Sardina pilchardus*) off Portugal. *ICES Journal of Marine Science*, 64(5), 963–972. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsm075>

ANEXOS

7. ANEXOS

Anexo A - Gráficos, tabelas e fotografias adicionais

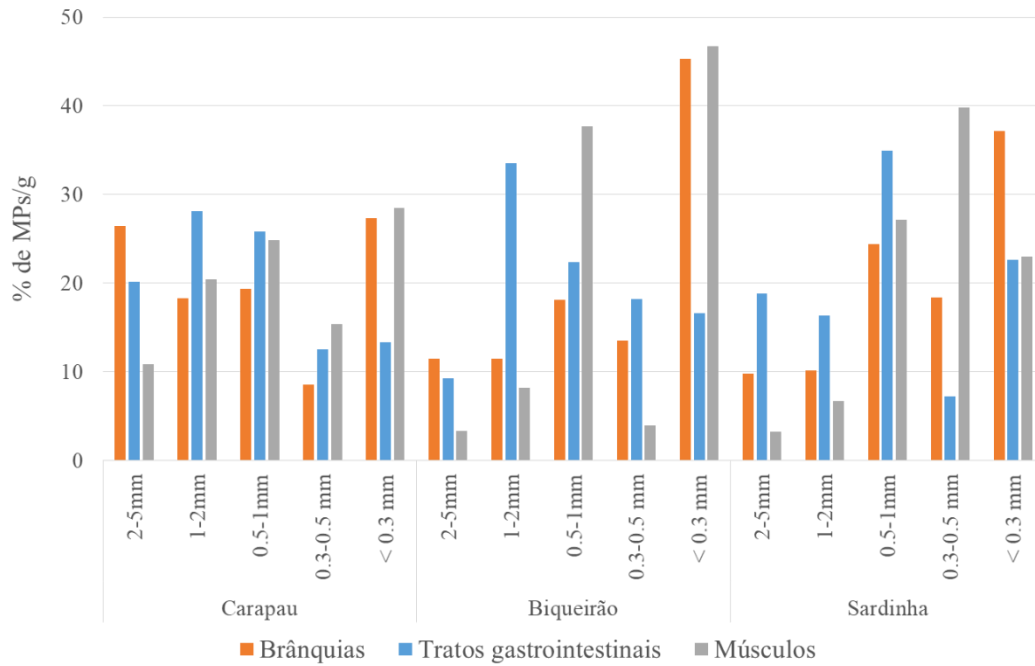


Figura A1- Gráfico com as principais classes de tamanhos mais encontrados em cada tecido e nas várias espécies em estudo em função da percentagem de MPs/g.

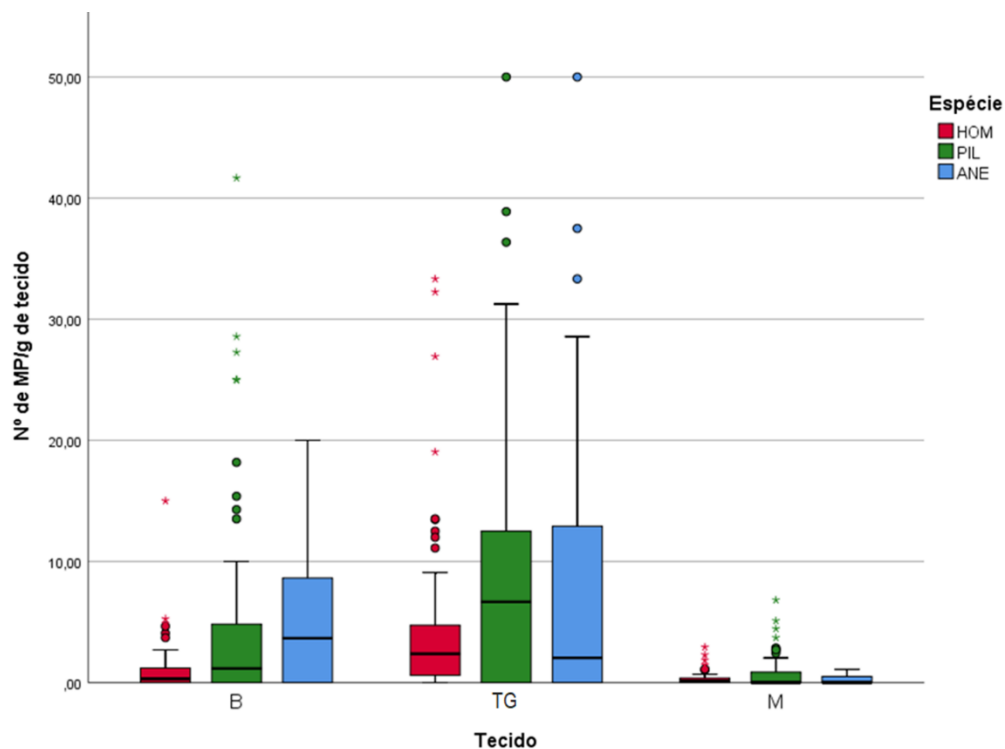


Figura A2- Gráfico de Boxplots com o N° de MPs/ g de tecido nos vários tecidos nas três espécies estudadas: *Trachurus trachurus* (HOM), *Sardina pilchardus* (PIL) e *Engraulis encrasicolus* (ANE).

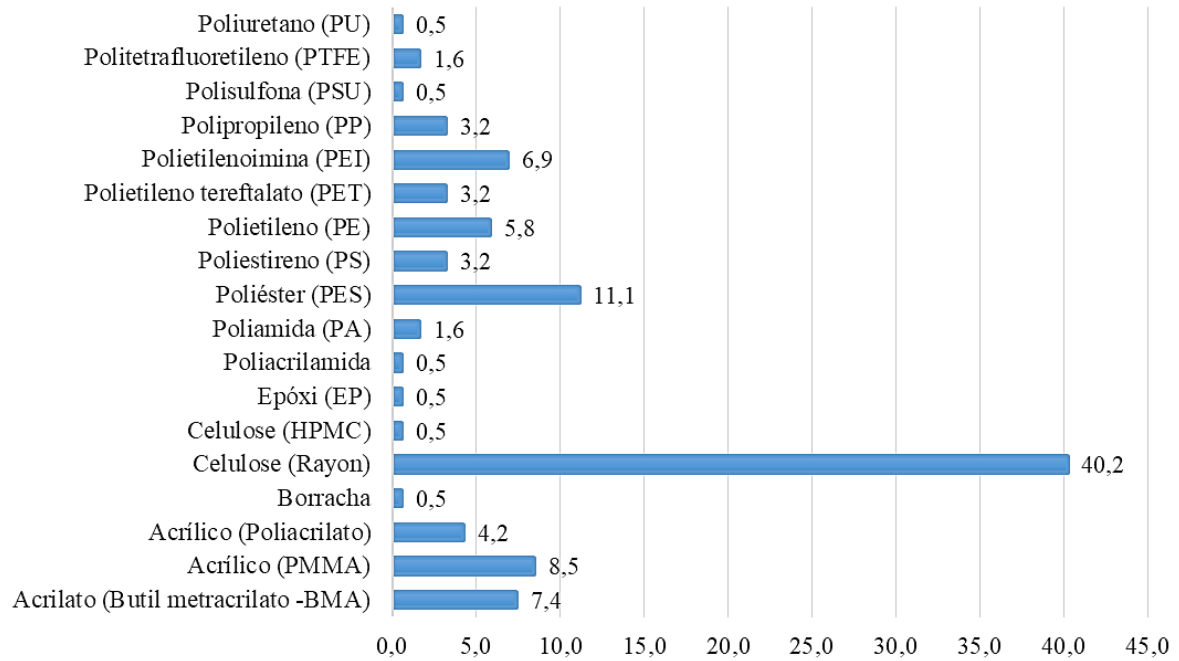


Figura A3- Percentagens (%) dos vários polímeros dos MPs encontrados nos peixes estudados.

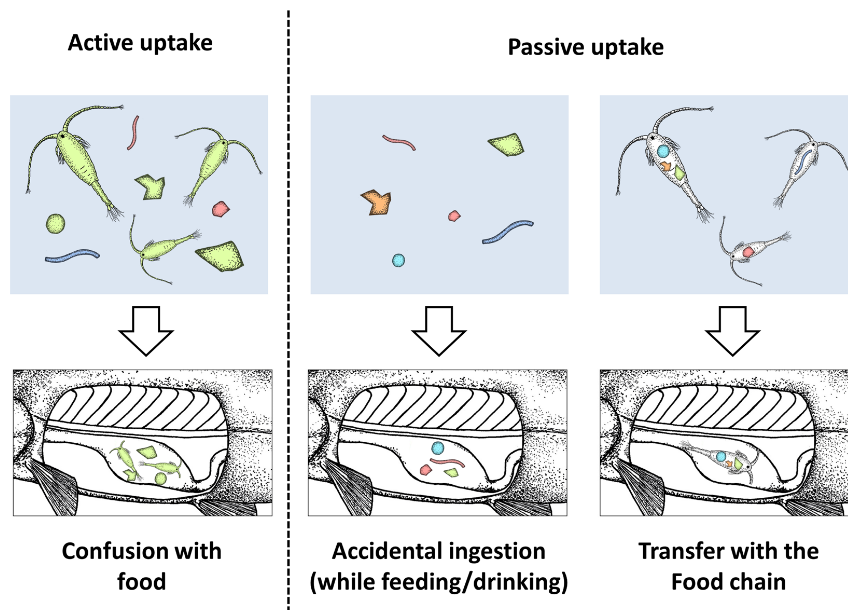


Figura A4- Principais mecanismos de assimilação de MPs em peixes (Reproduzido de Roch *et al.*, 2020).

Tabela A3- Principais tipos polímeros encontrados nas espécies com as suas respectivas densidades (g/cm³) e as suas utilizações (adaptado de Mark. E, James., 2007).

| Polímero | Densidade (g/cm³) | Principais Utilizações |
|----------------------------|-------------------------------------|---|
| Celulose - HPMC | 0,48 | Adesivos, indústria farmacêutica, tintas e revestimentos, comida, cosméticos, detergentes, produtos de limpeza, lentes de contacto. |
| PE | 0,87 | Embalagens, garrafas, fibras e têxteis, redes e equipamentos de pesca, tubos e conexões, equipamentos médicos. |
| Acrilato-BMA | 0,89 | Tintas, compostos de revestimento, adesivos, resinas, solventes, produtos odontológicos, emulsões têxteis. |
| PP | 0,90 | Embalagens, garrafas, sacos, têxteis, filme, peças de carros, equipamentos médicos e sanitários. |
| PU | 1,05 | Espumas e almofadas, revestimentos, adesivos, selantes, isolamentos de construção, pneus. |
| Borracha | 1,07 | Pneus e indústria automóvel, tubos e mangueiras, adesivos, selantes, isolamentos, tintas, equipamentos de desporto. |
| PS | 1,07 | Embalagens, aparelhos eletrónicos, espumas, isolamento, equipamentos médicos. |
| PA (Nylon 6) | 1,18 | Fibras têxteis, cabos, redes e equipamentos de pesca. |
| PMMA | 1,19 | Revestimentos, adesivos, selantes, cimentos ósseos cirúrgicos, aplicações de embalagem, revestimento de vinil e outros materiais de construção. |
| Poliacrilamida -PAM | 1,20 | Revestimentos de barcos e material náutico, reforço de cimentos, indústria têxtil. |
| PSU | 1,22 | Membranas, peças de máquinas e ocas, válvulas, reforços de fibras de vidro, equipamentos médicos, tratamentos de águas residuais. |
| EP | 1,26 | Peças de automóveis, tanques, adesivos, equipamentos médicos. |
| PEI | 1,27 | Indústria automóvel e eletrónica, equipamentos médicos, bens domésticos, |
| PET | 1,38 | Garrafas, embalagens, filtros e fibras, indústria automóvel, material náutico, indústria têxtil e isolamentos. |
| PES | 1,40 | Resinas, barcos, indústria têxtil, fibras, garrafas, embalagens, filmes, aplicações eletrónicas e industriais. |
| Celulose - Rayon | 1,53 | Indústria têxtil, fibras, revestimentos, produtos de higiene. |
| PTFE - Teflon | 2,17 | Revestimentos antiaderentes, tintas, adesivos, cosmética, revestimento industrial, indústria automóvel e química. |

Figura A5- Exemplos de Microplásticos encontrados nas brânquias de carapau.

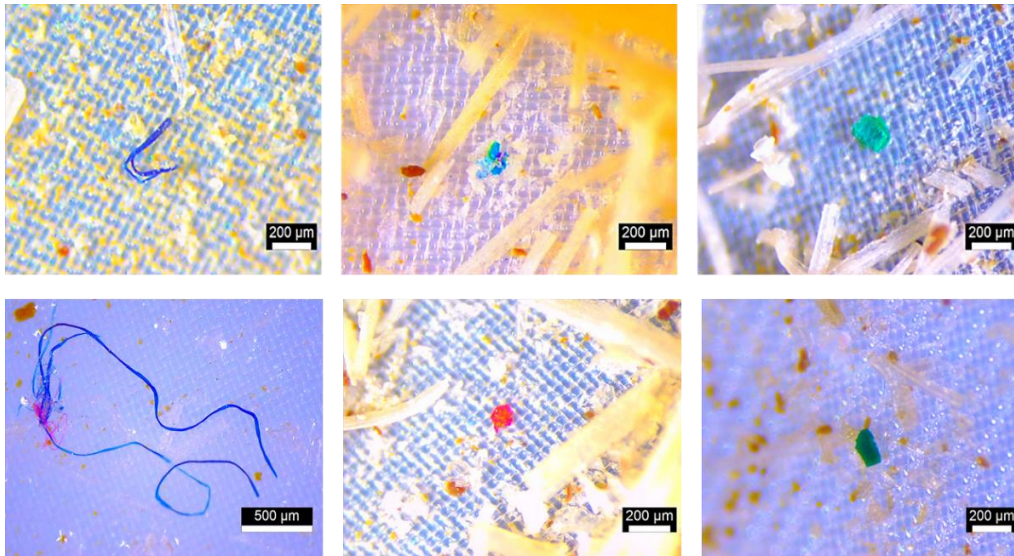


Figura A6- Exemplos de Microplásticos encontrados nos tratores gastrointestinais de carapau.

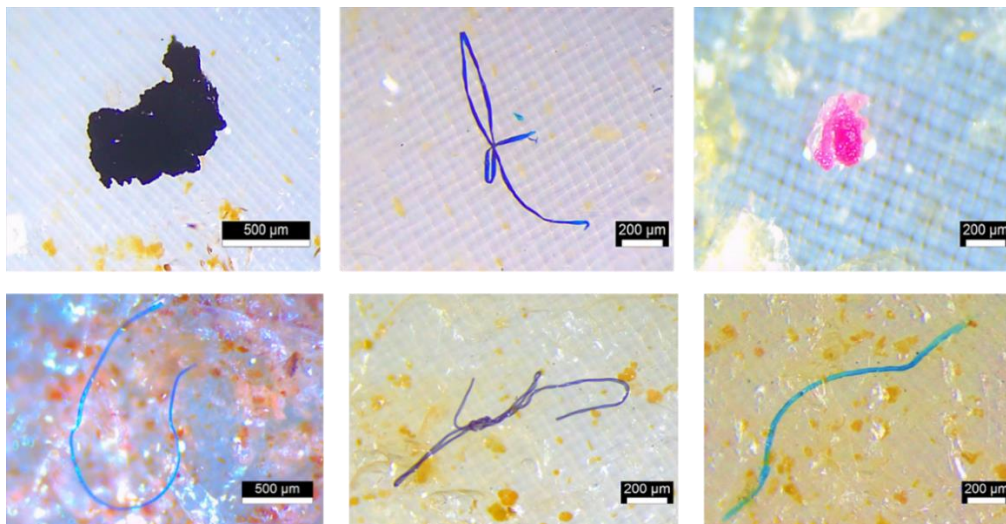


Figura A7- Exemplos de Microplásticos encontrados nos músculos de carapau.

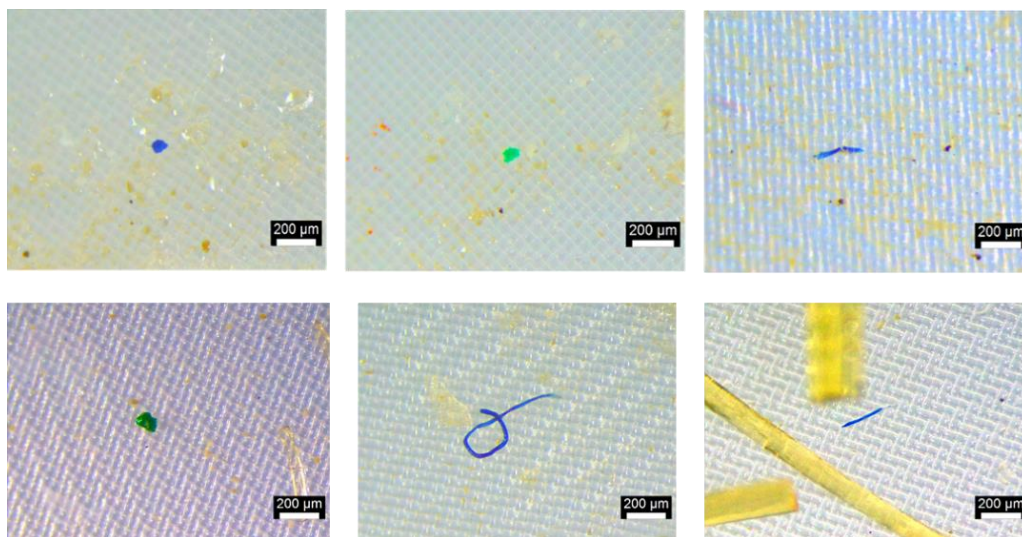


Figura A8- Exemplos de Microplásticos encontrados nas brânquias de sardinha.

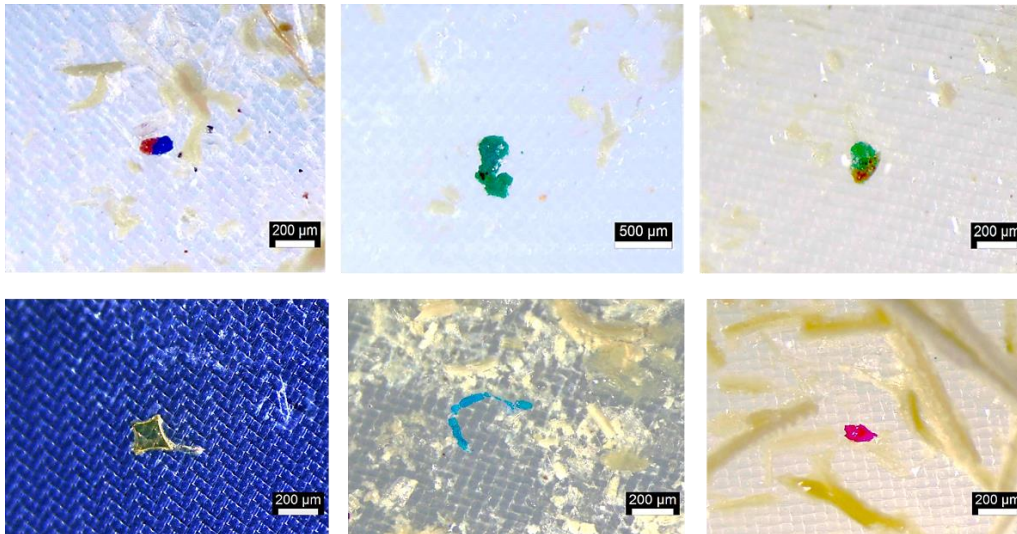


Figura A9- Exemplos de Microplásticos encontrados nos tratos gastrointestinais de sardinha.

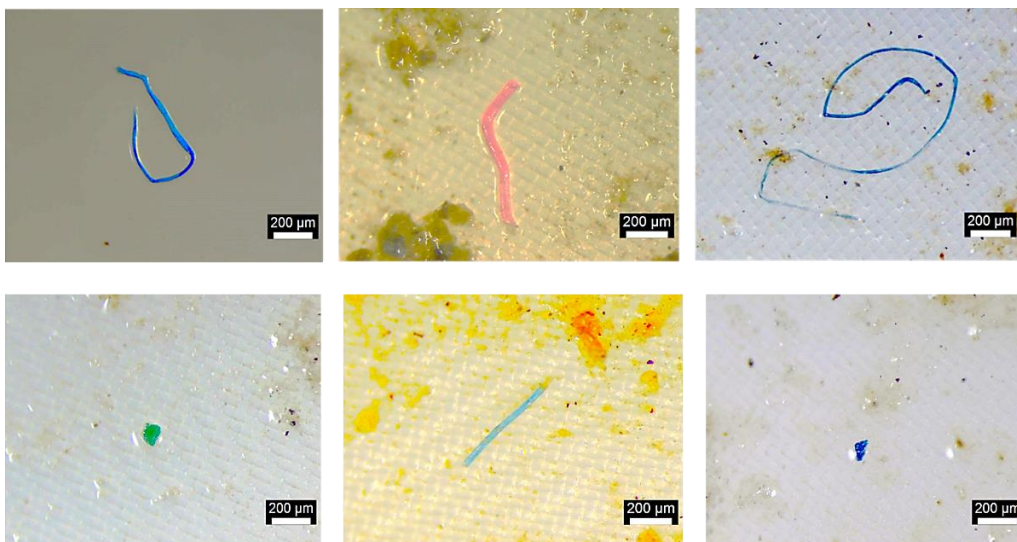


Figura A10- Exemplos de Microplásticos encontrados nos músculos de sardinha.

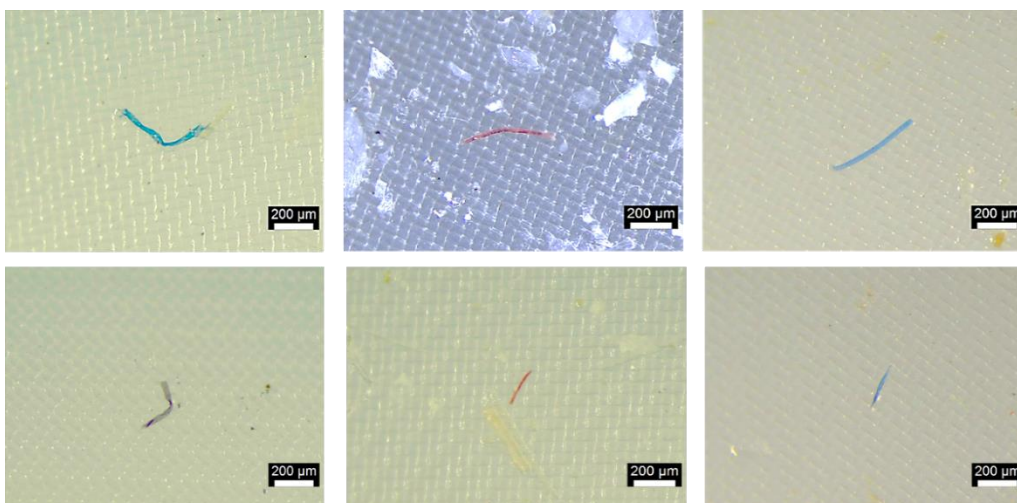


Figura A11- Exemplos de Microplásticos encontrados nas brânquias de biqueirão.

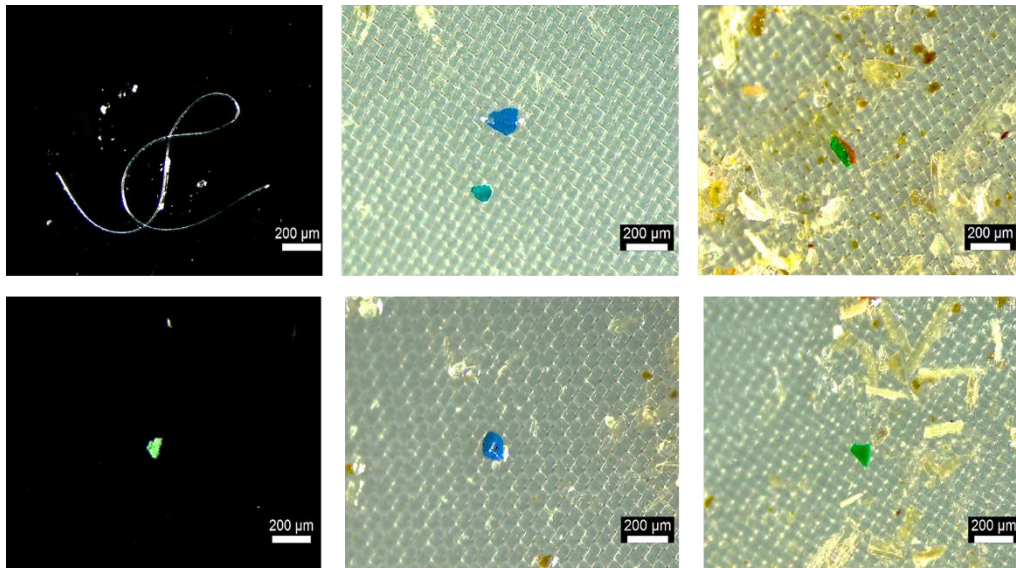


Figura A12- Exemplos de Microplásticos encontrados nos tratos gastrointestinais de biqueirão.

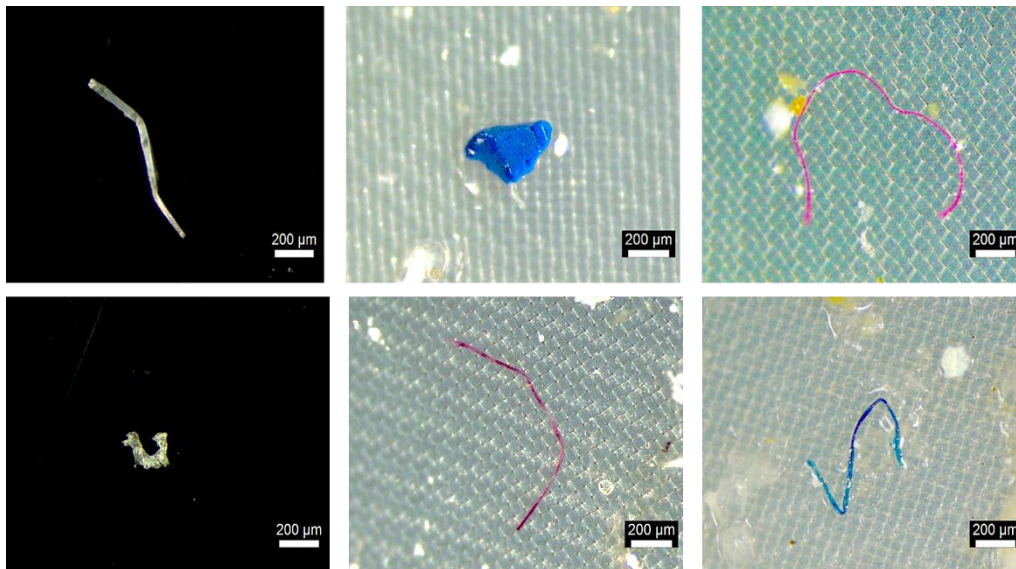
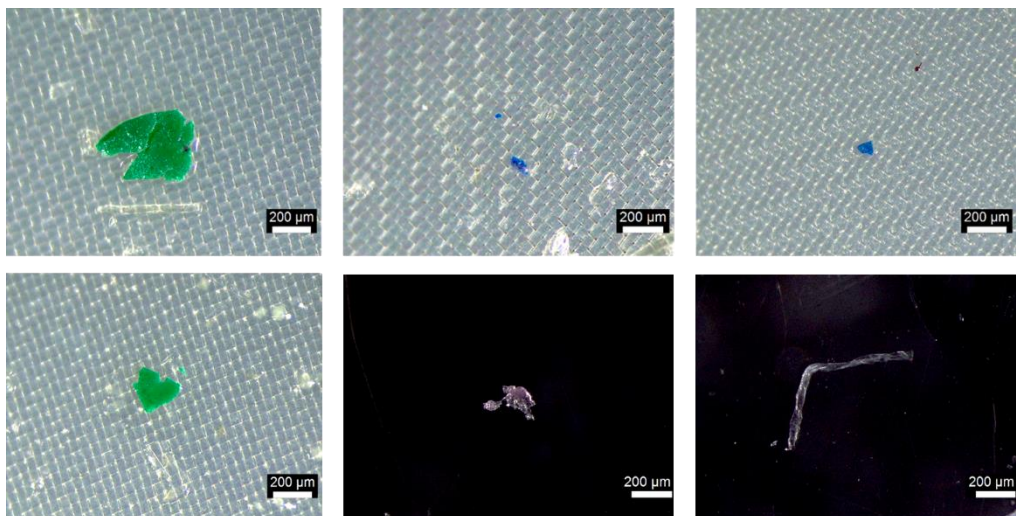


Figura A13- Exemplos de Microplásticos encontrados nos músculos de biqueirão.



Anexo B- Exemplos de espectros FTIR dos principais polímeros encontrados

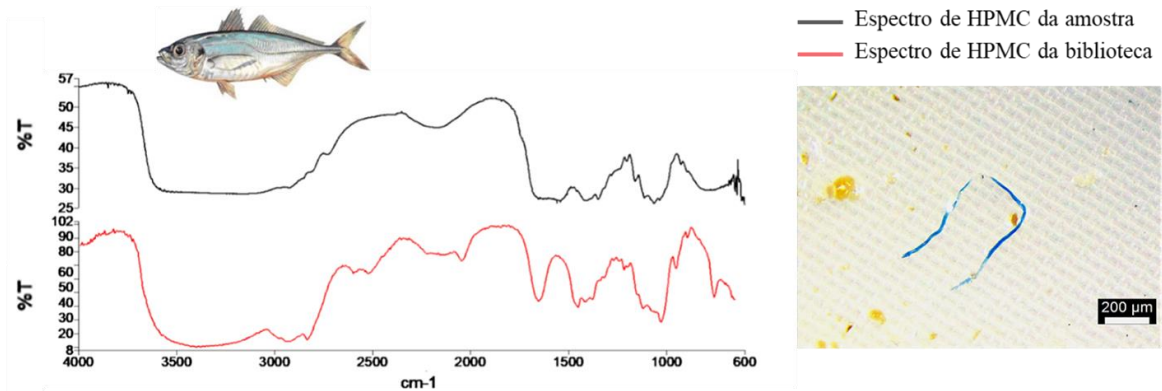


Figura B1- Espectro de Celulose-HPMC obtido a partir de uma amostra de uma fibra azul encontrada em carapau. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a vermelho encontra-se ilustrado o espectro de HPMC da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm^{-1}).

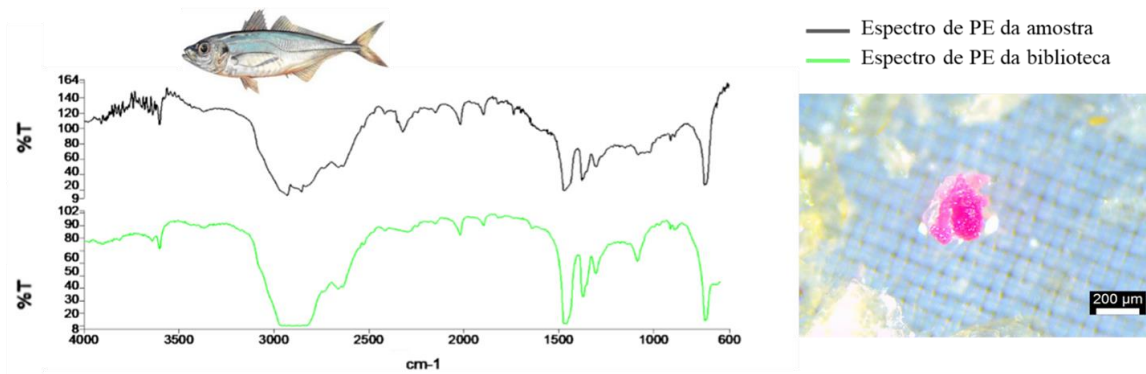


Figura B2- Espectro de PE (polietileno) obtido a partir de uma amostra de um fragmento rosa encontrado em carapau. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a verde encontra-se ilustrado o espectro de PE da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm^{-1}).

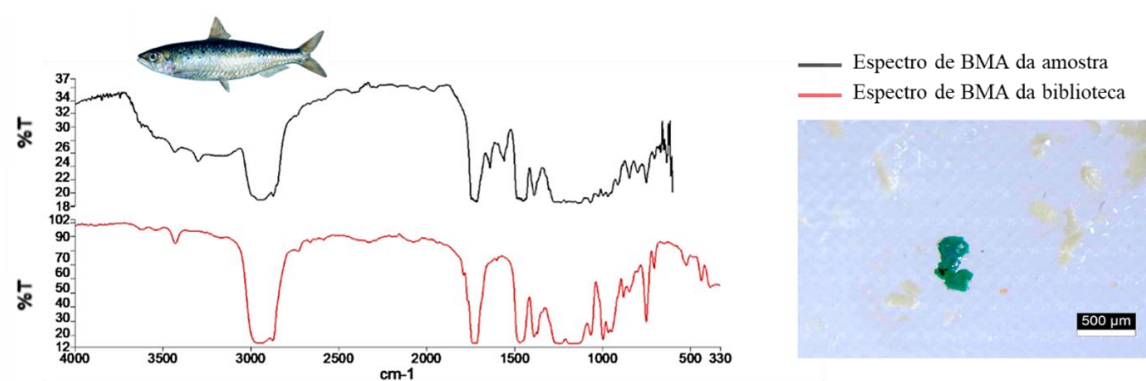


Figura B3- Espectro de acrilato (Butil metacrilato- BMA) obtido a partir de uma amostra de um fragmento verde encontrado em sardinha. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a vermelho encontra-se ilustrado o espectro de BMA da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm^{-1}).

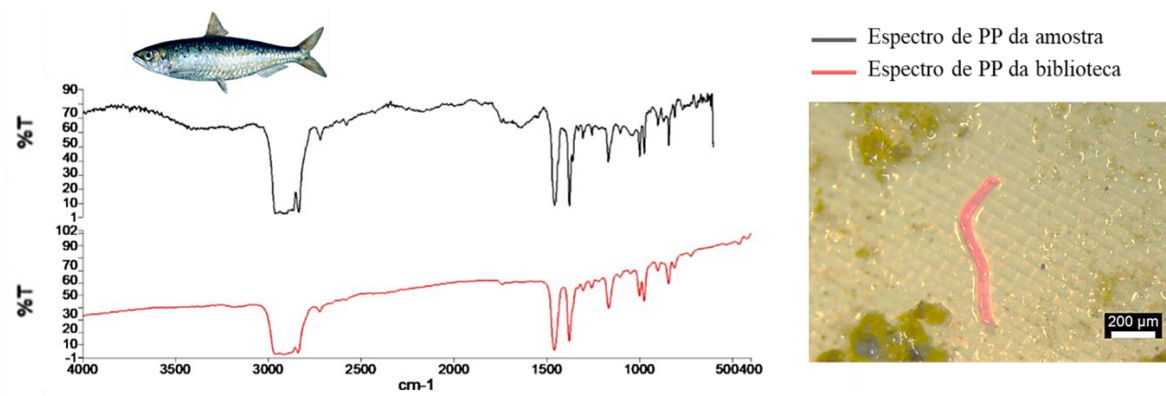


Figura B4- Espectro de PP (polipropileno) obtido a partir de uma amostra de um filamento vermelho encontrado em sardinha. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a vermelho encontra-se ilustrado o espectro de PP da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm^{-1}).

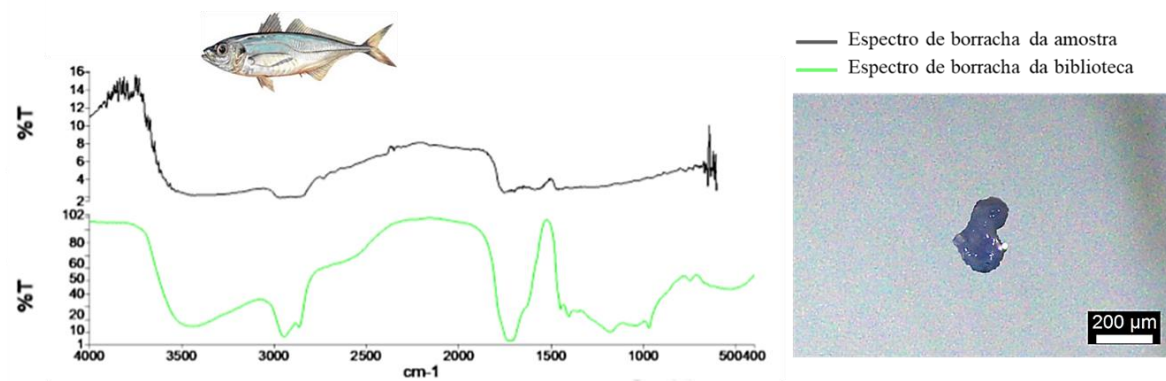


Figura B5- Espectro de borracha obtido a partir de uma amostra de um fragmento azulado encontrado em carapau. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a verde encontra-se ilustrado o espectro de borracha da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm^{-1}).

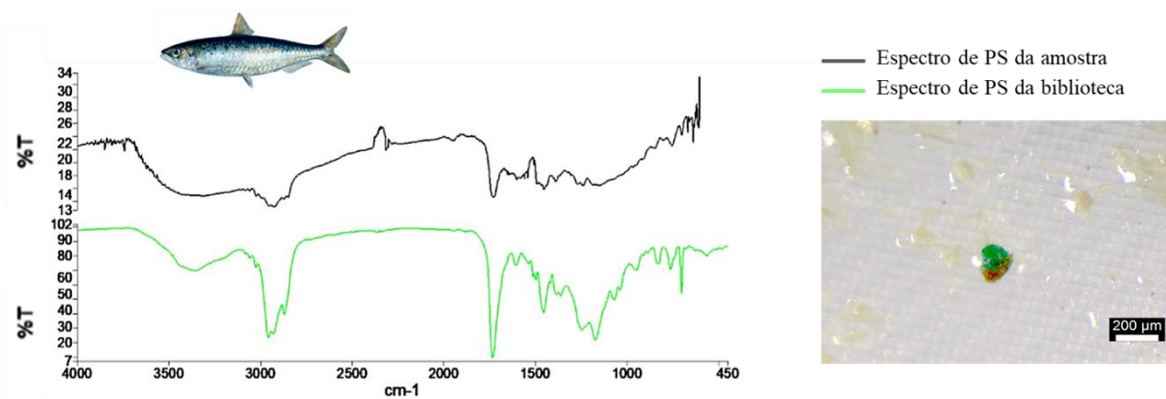


Figura B6- Espectro de PS (poliestireno) obtido a partir de uma amostra de um fragmento verde encontrado em sardinha. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a verde encontra-se ilustrado o espectro de PS da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm^{-1}).

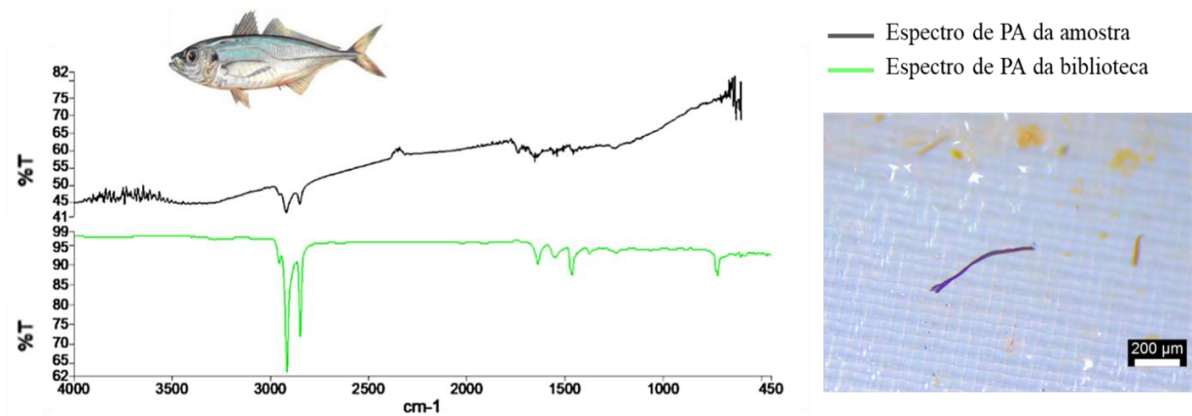


Figura B7- Espectro de PA (poliamida- nylon 6) obtido a partir de uma amostra de uma fibra azul encontrada em carapau. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a verde encontra-se ilustrado o espectro de PA da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm^{-1}).

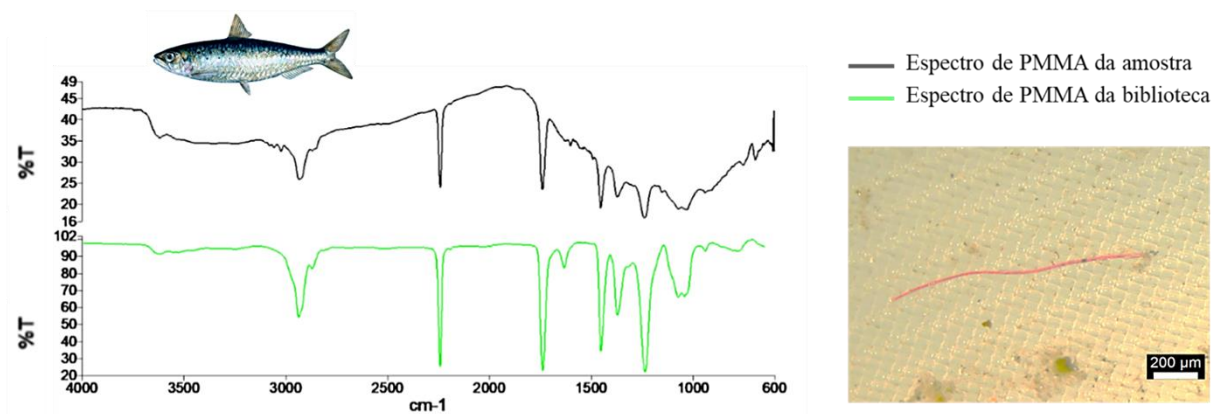


Figura B8- Espectro de PMMA (acrílico) obtido a partir de uma amostra de uma fibra vermelha encontrada em sardinha. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a verde encontra-se ilustrado o espectro de PMMA da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm^{-1}).

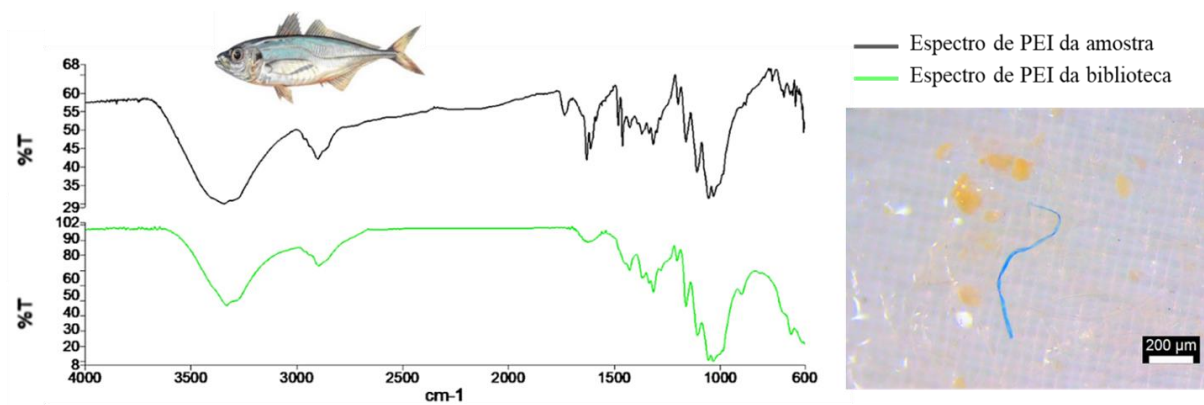


Figura B9- Espectro de PEI (celulose + polietilenoimina) obtido a partir de uma amostra de uma fibra azul encontrada em carapau. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a verde encontra-se ilustrado o espectro de PEI da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm^{-1}).

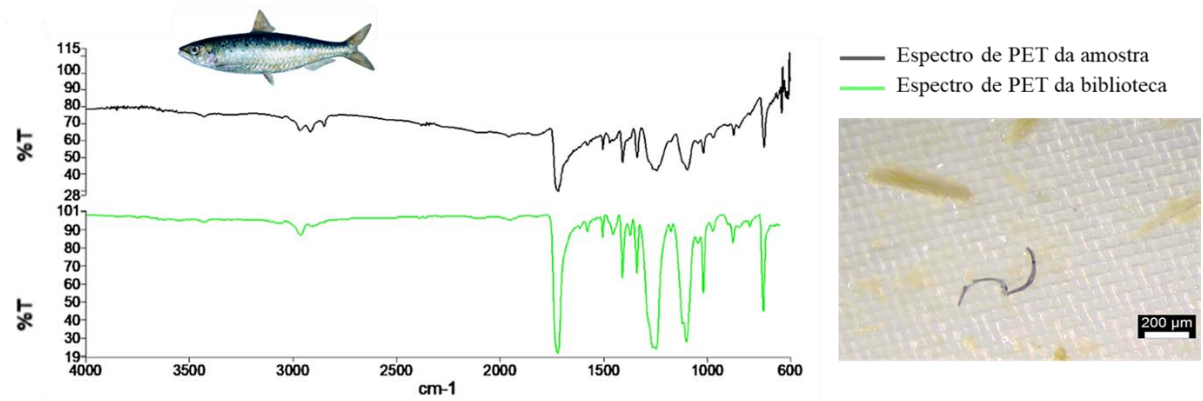


Figura B10- Espectro de PET (polietileno tereftalato) obtido a partir de uma amostra de uma fibra preta encontrada em sardinha. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a verde encontra-se ilustrado o espectro de PET da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm^{-1}).

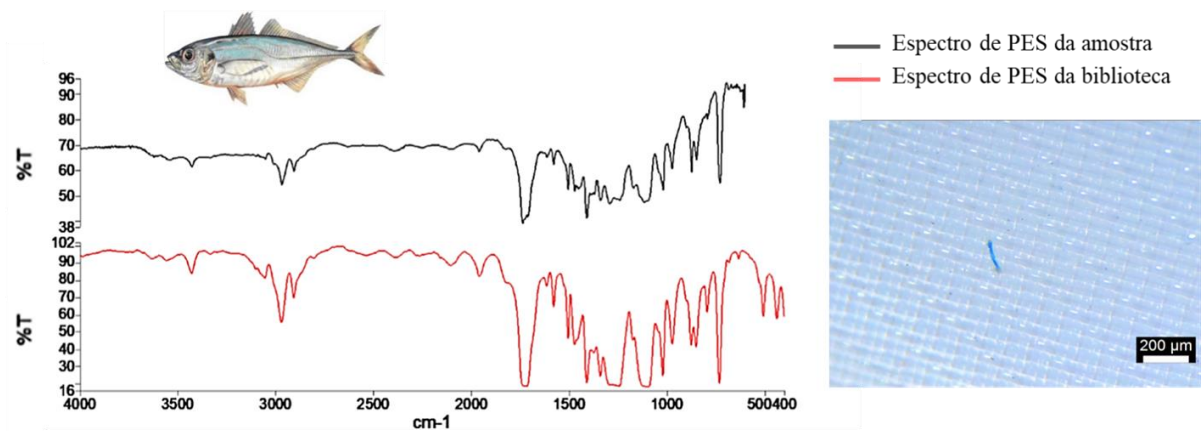


Figura B11- Espectro de PES (poliéster) obtido a partir de uma amostra de uma fibra azul encontrada em carapau. Em cima, a preto figura o espectro da amostra. Em baixo, a vermelho encontra-se ilustrado o espectro de PES da biblioteca de espectros utilizado para a comparação com a amostra. O eixo do y corresponde à percentagem de transmitância (T%) e o eixo do x aos números de onda (cm^{-1}).