

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Caracterização do lixo marinho ingerido por peixes da costa de
Peniche – contributo para a definição de espécies indicadoras
no âmbito da DQEM**

Cátia Vanessa Simões Alves

Mestrado em Ecologia Marinha

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Isabel Domingos
Professora Doutora Carla Nunes

2018



*“No one will protect what they don’t care about,
and no one will care about what they have never experienced.”*

Sir David Attenborough

Agradecimentos

Quero agradecer a todos que me acompanharam no decorrer deste trabalho:

Professora Isabel Domingos, por ter aceite criar um tema no qual estava interessada em trabalhar, por perceber quando algo não estava bem comigo e fazer-me crescer em vários aspetos durante este trabalho. Consigo aprendi imenso e o seu apoio foi fundamental para a concretização deste trabalho.

Professora Carla Nunes, por ter aceite ser minha coorientadora apesar de ser de outra área científica, pela sua tremenda disponibilidade e boa disposição mesmo quando as coisas pareciam não funcionar a nosso favor. Agradeço também pelo constante apoio e motivação, pois apesar de biólogos e químicos nem sempre falarem a mesma língua, com dedicação foi possível “casar” estas áreas neste presente trabalho, harmoniosamente.

Professor José Lino Costa e doutorando Rui Monteiro, pela vossa boa vontade em ajudar com certas dúvidas nas análises realizadas no decorrer deste trabalho.

Ao senhor José Paulino, da Docca Pesca de Peniche, por toda a sua boa disposição e vontade de ajudar esta “menina”.

Colegas com os quais tive o prazer de me cruzar no laboratório da professora Carla, eu sei que na química não estavam habituados à presença quer de órgãos de animais com o seu característico odor, quer da minha, tendo ficado marcada pelas conversas interessantes que tivemos e momentos de descontração, por toda a vossa paciência não ficaram esquecidos.

Cátia Santos, cuja palavra amiga tão bem a descreve, agradeço-te a companhia em todos os dias de trabalho, desde a licenciatura já lá vão alguns anos e ainda assim continuas a esperar por mim aqueles longos 5 minutos.

Aos meus grandes amigos que tive a sorte e o prazer de conhecer durante o mestrado, vocês foram como uma segunda família para mim, partilhar estes dois anos com vocês foi de verdade um privilégio.

João Santos, por teres sido sempre um querido, nunca antes vi alguém ficar tão feliz com a simples ideia de dissecar peixes! A tua boa disposição foi contagiante e trabalhar enquanto oiço música Rock sem ti, simplesmente deixa de ter o mesmo efeito.

Aos meus pais, que sempre me ensinaram a importância que os estudos têm na nossa vida, por me terem apoiado em seguir o que me apaixonou, mesmo quando eram de opiniões contrárias por se preocuparem comigo.

Ao meu namorado Afonso por todo o apoio durante todo este processo, por seres sempre um bom ouvinte por mais extenso que seja o meu monólogo e saberes sempre o que dizer durante os meus piores dias. Obrigada, por tudo.

A todos vocês os meus mais sinceros agradecimentos.

Resumo

Os mares e oceanos de todo o mundo mostram sinais crescentes de degradação ambiental, de entre os quais se destaca a presença de lixo marinho. De forma a aumentar o conhecimento acerca desta problemática e contribuir para a implementação da Diretiva Quadro Estratégia Marinha, realizou-se um estudo com o intuito de caracterizar o tipo e quantidade de lixo marinho presente no trato digestivo de espécies comerciais de peixe da costa de Peniche, duas espécies de peixes pelágicos (Carapau – *Trachurus trachurus* e Cavala – *Scomber colias*) e espécies de peixes demersais (Faneca – *Trisopterus luscus* e espécies da família Triglidae), ao longo de dois períodos de amostragem – verão e inverno. O conteúdo digestivo presente no trato gastrointestinal de 234 peixes foi digerido usando uma solução de 10% de hidróxido de potássio (KOH) para facilitar a extração / isolamento de detritos. Através de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) identificou-se o tipo de polímeros que compunham as partículas, tendo o resultado indicado que, a quase totalidade da amostra, era constituída por polímeros termoplásticos. A maioria dos detritos de lixo presentes nas amostras estudadas foram microplásticos (todos secundários). No total, foram encontradas 206 partículas em 42% e 52% dos peixes analisados no verão e inverno, respetivamente. A morfologia de 90% das partículas analisadas correspondeu a fragmentos de diversos plásticos, sendo as restantes fibras remanescentes de roupas e instrumentos de pesca. A coloração preta foi a cor predominante presente nas partículas encontradas. Em média, *S. colias* apresentou, no verão, $3,69 \pm 3,93$ (SD) de partículas de lixo por indivíduo, tendo este valor sido o mais elevado de entre as espécies analisadas, em ambas as épocas de amostragem. Entre os tipos de polímeros identificados, concluiu-se que o polimetil-metacrilato (PMMA) foi o polímero mais comum no conteúdo digestivo dos peixes. Foram ainda detetadas diferenças sazonais no consumo de partículas entre as espécies *T. luscus* e o grupo dos Triglídeos, e entre as espécies pelágicas e demersais.

Palavras-chave: Alimentação, FTIR, Microplásticos, Poluição, Polímero

Abstract

The seas and oceans around the world are showing increasing signs of environmental degradation, among which the presence of marine litter stands out. In order to increase knowledge on this subject and contribute to the implementation of the Marine Strategy Framework Directive, this study aimed to characterize the type and quantity of litter present in the digestive tract of commercial fish species on the coast of Peniche, two pelagic fish species (Atlantic Horse Mackerel - *Trachurus trachurus* and Atlantic Chub Mackerel - *Scomber colias*) and demersal fish species (Poutine - *Trisopterus luscus* and species of the family Triglidae), during two sampling periods – summer and winter. The digestive contents in the gastrointestinal tract of 234 fishes was digested using a 10% solution of potassium hydroxide (KOH) to facilitate the extraction/isolation of debris. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to identify the polymer type of the particles, and the result obtained indicated that almost all the samples were thermoplastic polymers. Most of the litter found in the gut contents was made up of microplastics (all secondary). In total, 206 particles were found in 42% and 52% of fish analyzed in summer and winter, respectively. The morphology of 90% of the particles analyzed matched different plastic fragments, the rest of the sample fibers being from clothes and fishing instruments. The black coloration was the main colour present on the particles found. On average, *S. colias* presented $3,69 \pm 3,93$ (SD) of litter particles per individual in summer, and this value was the highest among the species analysed in both seasons. Among the types of polymers identified, it was possible to conclude that polimetil-metacrilato (PMMA) was the most common polymer found in the gut contents of the fishes analyzed. Seasonal differences were also detected in the consumption of particles between the species *T. luscus* and Triglidae specimens, as well as between pelagic and demersal fish species.

Keywords: Feeding, FTIR, Microplastics, Pollution, Polymer

Índice

Agradecimentos.....	IV
Resumo.....	V
Abstract	VI
Lista de abreviaturas	VIII
Lista de figuras	IX
Lista de tabelas	X
Introdução	1
1.1 Enquadramento.....	2
1.2 Os plásticos	3
1.3 O lixo marinho em Portugal	4
1.4 A Diretiva Quadro Estratégia Marinha	4
1.5 Objetivos	6
Material e metodologia.....	7
2.1 Área de estudo.....	8
2.2. Amostragem dos peixes	9
2.3 Digestão e triagem das amostras	10
2.4 Identificação de polímeros	11
2.5 Análise de dados.....	17
Resultados	18
3.1. Abundância de partículas de lixo	19
3.2. Caracterização das partículas de lixo	20
3.3. Tipos de partículas de lixo	21
3.4.A influência da espécie e da época do ano na abundância de partículas.....	22
3.5. Tipologia dos polímeros.....	25
Discussão.....	30
Considerações finais.....	36
Referências bibliográficas	38
Anexo	XI

Lista de abreviaturas

- ABS** – Acrilonitrilo-butadieno-estireno
APA – Agência Portuguesa do Ambiente
CNUDM – Convenção das Nações Unidas sobre o Direito do Mar
DP – Desvio padrão
DQEM – Diretiva-Quadro Estratégia Marinha
DRIFT – Reflexão Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier
EEP – Estratégia Europeia para os Plásticos
ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais
EVA – Etil Vinil Acetato
FEP – Etileno Propileno Fluorado
FTIR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
H₀ – Hipótese nula
H₁ – Hipótese alternativa
INE – Instituto Nacional de Estatística
IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera
KOH – Hidróxido de Potássio
MARPOL – Convenção Internacional para a Prevenção Da Poluição por Navios
MP – Microplástico
PA – Poliamida
PE – Polietileno
PET - Polietileno tereftálico
POP – Poluentes persistentes orgânicos
PMMA – Acrílico ou Polimetil-metacrilato
PP – Polipropileno
PS – Poliestireno
NUTS – Nomenclatura das Unidades Territoriais para Fins Estatísticos
PTFE – Politetrafluoretileno ou Teflon
PC – Policarbonato
PU ou **PUR** – Poliuretano
PVC – Cloreto de polivinilo
RH – Região Hidrográfica
RPM – Rotações por minuto
UNEP – United Nations Environment Programme

Lista de figuras

Figura 1.1 – Exemplos de Lixo Marinho encontrados na costa litoral Oeste de Portugal continental, dominado por resíduos de plásticos de diferentes composições e origens.

Figura 2.1 – Local de amostragem em Peniche: coordenadas (A) 39°15'88.5''N, 009°28'61.01''W; (B) 39°11'11.9''N, 009°28'61.01''W. Fonte: Google Earth Pro.

Figura 2.2 - Exemplificação das medições realizadas nas partículas: 1) Comprimento (C) e Largura (L), em milímetros; 2) Área (A), em milímetros quadrados.

Figura 3.1 – Representação gráfica da quantidade de fibras e fragmentos de polímeros encontrados nas espécies estudadas. Cada par de Box-plots coloridos corresponde a uma espécie, sendo que à esquerda encontra-se a amostra de verão e à direita a amostra de inverno.

Figura 3.2 – Médias dos valores de comprimento (mm), largura (mm) e área (mm²) das partículas de lixo encontradas nos conteúdos digestivos das espécies de peixes analisadas no verão (A) e no inverno (B).

Figura 3.3 - Proporções de cores nas partículas encontradas nos conteúdos intestinais dos peixes: à esquerda partículas encontradas no verão; à direita partículas encontradas no inverno.

Figura 3.4 – Quantidade de fibras e fragmentos de lixo encontrados nos conteúdos gastrointestinais de peixes pelágicos e demersais, provenientes da costa de Peniche.

Figura 3.5 – Espectro de Reflexão Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier (DRIFT) de ABS, EVA, Látex, PVC, Nylon, PTFE ou FEP, PC, PMMA e PU. As letras representam as bandas de absorção características (cm⁻¹).

Figura 4.1 – Exemplificação da oxidação de uma partícula de borracha látex, o que pode originar dois produtos finais, o Poliestireno butanona e Poliestireno butaniona.

Figura A – Espectro de Reflexão Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier (DRIFT) de Nylon, PTFE ou FEP, PC, PMMA e PU. As letras representam as bandas de absorção características (cm⁻¹).

Lista de tabelas

Tabela 2.1 - Bandas de absorção (cm^{-1}) utilizadas para a identificação das ligações dos polímeros, através dos modos vibracionais característicos das ligações, encontrados nos tubos digestivos dos peixes.

Tabela 3.1 – Frequência de ocorrência de partículas de lixo nos conteúdos digestivos de espécies de peixes da costa de Peniche.

Tabela 3.2 – Resultado do teste G-de-independência realizado para comparar a morfologia das partículas consumidas por peixes pelágicos e demersais (GY - estatística G com a correção de Yates).

Tabela 3.3 - Resultado da análise PERMANOVA 1, efetuada para comparar o consumo de lixo entre as espécies de peixes em estudo (T. trachurus, S. colias, T. luscus e Triglídeos), e as duas épocas de amostragem (verão e inverno).

Tabela 3.4 - Resultados dos testes Pair-wise a posteriori entre a interação dos dois fatores "ÉpocaxEspécie" e o fator Época (PERMANOVA 1).

Tabela 3.5 - Resultados dos testes Pair-wise, a posteriori, entre a interação dos dois fatores "ÉpocaxEspécie" e o fator espécie (PERMANOVA 1).

Tabela 3.6 - Resultado da análise PERMANOVA 2, efetuada para comparar o consumo de lixo em espécies que habitam zonas diferentes na coluna de água, entre as duas épocas de amostragem (verão e inverno).

Tabela 3.7 - Resultados dos testes Pair-wise entre a interação dos dois fatores "ÉpocaxHabitat" e o fator Época – PERMANOVA 2.

Tabela 3.8 - Resultados dos testes Pair-wise entre a interação dos dois fatores "ÉpocaxHabitat" e o fator Habitat – PERMANOVA 2.

Tabela 3.9 - Percentagem de partículas identificadas e não identificadas, devido ao tamanho e ao seu nível de degradação, por época de amostragem.

Tabela 3.10 - Quantidade e tipologia dos polímeros encontrados e identificados nos tubos digestivos dos exemplares amostrados no verão e no inverno. Os valores à esquerda (coluna branca), na coluna das espécies, correspondem à amostragem realizada no verão e à direita (coluna cinzenta), correspondem à amostragem de inverno.

Introdução

1 - Introdução

1.1 Enquadramento

A poluição gerada pelo ser humano atingiu proporções desmesuradas, a ponto de ameaçar os últimos locais prístinos do planeta. Apesar de existirem diversas formas de poluição, o lixo marinho tornou-se uma das maiores preocupações na atualidade. Devido ao crescente aumento da população mundial e à sua concentração em centros urbanos, ao aumento da esperança média de vida, à crescente produção industrial e, ainda, à orientação das sociedades contemporâneas para valores consumistas (Allsopp, *et al.*, 2006), a produção de resíduos sólidos é cada vez maior. Considera-se lixo marinho, ‘qualquer material sólido persistente, manufaturado ou processado, que tenha sido deliberadamente descartado ou abandonado involuntariamente no meio marinho e zonas costeiras, incluindo os materiais transportados de terra para o ambiente marinho através de rios, sistemas de drenagem ou esgotos e ventos’ (Galgani *et al.*, 2010). Todos os anos, o ambiente marinho sofre um elevado impacto com a entrada de aproximadamente dez milhões de toneladas de lixo (European Commission, 2013), de composição variável, que pode incluir metal, vidro, papel, tecido, borrachas, madeira processada e plástico. Os impactos gerados pelo lixo marinho estendem-se além do seu local de origem, podendo afetar outras zonas a grandes distâncias, graças ao transporte pelos ventos e correntes oceânicas.

Cerca de 80% do lixo marinho, que se pode encontrar junto ao fundo, em suspensão na coluna de água ou a flutuar à superfície, tem a sua origem no meio terrestre (UNEP, 2016). A sua introdução no meio marinho advém de fontes pontuais e difusas, como o vento, efluentes de Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR), sistemas de drenagem e rios. Quando a sua origem se encontra ligada a atividades marítimas, o lixo marinho pode ser uma consequência do setor da pesca, turismo, transporte de mercadorias e aquicultura. A causa da poluição sob a forma de lixo consiste essencialmente numa gestão deficiente de resíduos, e por vezes do comportamento inadequado das populações, sendo este problema mais relevante nos países em desenvolvimento.

Em virtude de as atividades que ocorrem no meio terrestre terem uma elevada influência na quantidade de lixo marinho, esta temática é global e, por isso, requer abordagens integradas. Existem diversos estudos a demonstrar o impacto do lixo marinho em espécies de grande/ média dimensão, tais como mamíferos, tartarugas e aves, quer por ficarem emaranhadas em redes de pesca perdidas, quer pela ingestão (Azzarello e Van-Vleet, 1987; Gramentz, 1988; Fossi *et al.*, 2014) principalmente de microplásticos (MP). No caso dos peixes, embora se saiba que o consumo de lixo pode causar mortalidade devido a problemas associados à flutuabilidade, incorporação de substâncias tóxicas e sensação de saciedade que impede que estes se alimentem, a informação atualmente existente acerca da ingestão de lixo é bastante escassa (Neves *et al.*, 2015).

As consequências do lixo marinho não se restringem apenas aos organismos aquáticos, uma vez que, o ser humano também sofre impacto pela perda de serviços do ecossistema. Por um lado, é afetado pela presença direta de lixo nos oceanos e praias, que causa um impacto económico negativo no turismo, sobrecarregando os municípios com custos de limpeza, pela perda do valor intrínseco inerente à qualidade de vida das populações locais, ameaçando a saúde pública pela ingestão de organismos com partículas contaminadas com poluentes, entre outras. Por outro lado, é afetado indiretamente pela perda de espécies com valor comercial e conservacionista devido à pesca fantasma (UNEP, 2016).

1.2 Os plásticos

A grande maioria do lixo marinho é constituída por plásticos (figura 1.1), que se destacam por serem os resíduos mais persistentes, uma vez que podem demorar centenas de anos a decompor-se. O seu uso e produção em larga escala remonta ao ano de 1950, embora os primeiros plásticos sintéticos tenham surgido no início do século XX, no entanto o uso generalizado de plásticos fora das forças militares só ocorreu apenas após a Segunda Grande Guerra Mundial (Geyer *et al.*, 2017). Devido à sua durabilidade e leveza, rapidamente foram substituídos vários materiais na indústria e tornou-se, por isso, numa parte quase indispensável do quotidiano dos cidadãos. Os plásticos são uma classe de polímeros semissintéticos ou sintéticos, de cadeia extremamente longa, obtidos geralmente a partir do petróleo e constituídos pela repetição de monómeros idênticos ou conjugações de monómeros e sequências diferentes (GESAMP, 2015). Para atingir algumas características desejadas nos produtos feitos de plástico, são adicionados aditivos como estabilizantes, corantes, retardantes de chama, plastificantes e muitos outros. Existem duas categorias de plásticos, os termoplásticos e os termofixos. Os termoplásticos são uma família de polímeros lineares ou pouco ramificados, também conhecidos como plásticos reversíveis, ou seja, pelo processo de aquecimento e arrefecimento, podem adquirir diferentes formas mantendo a sua estrutura química inicial. Os termofixos são outra família de polímeros (espumas ou revestimentos), que sofrem uma alteração química através do aquecimento, dando origem a ligações cruzadas entre as cadeias do polímero, impedindo que possam ser moldados através de um novo aquecimento (PlasticsEurope, 2017). Por definição, polímeros são compostos químicos de elevada massa molecular, sendo formados por reações de polimerização. A raiz da palavra “polímero” provém do Grego, onde poli significa “muitos/as” e meros significa “partes”. Os polímeros são macromoléculas formadas a partir de unidades estruturais denominadas monómeros, e ao número de unidades estruturais repetidas numa macromolécula dá-se o nome de grau de polimerização.

Na indústria são utilizados vários tipos de polímeros, os mais comuns representam cerca de 90% da produção mundial, sendo estes o Polietileno (PE), o Polipropileno (PP), o Cloreto de polivinilo (PVC), o Poliuretano (PU), o Poliestireno (PS) e a Poliamida (PA) (APA, 2018). Através da identificação dos polímeros e da distinção entre tipos de MP é possível deduzir quais serão as potenciais fontes de introdução destas partículas no meio marinho e a identificação de medidas de mitigação para as mesmas (GESAMP, 2015).

Os MP subdividem-se em dois tipos, os primários, uma vez que são produzidos diretamente para a introdução em produtos, como por exemplo as esferas utilizadas na indústria da cosmética, e os secundários (fragmentos e fibras), que se originam durante o processo de decomposição de objetos de plásticos de maiores dimensões, quando se encontram expostos aos elementos da natureza, fragmentando-se em pedaços mais pequenos (Bessa *et al.*, 2018). Ao contrário dos mesoplásticos que podem medir entre 5 e 25 milímetros, os MP são partículas que possuam, no máximo, 5 milímetros no seu maior eixo de comprimento (Hanke *et al.*, 2013). Os MP, devido ao seu diminuto tamanho e flutuabilidade, são mais facilmente ingeridos pelos peixes, entrando assim na cadeia trófica (Foekema *et al.*, 2013). A ameaça por parte deste tipo de poluente torna-se preocupante, pela sua capacidade de adsorver contaminantes. O grau de contaminação aumenta com o aumento da idade/estado de degradação da partícula (Frias *et al.*, 2010; Ogata *et al.*, 2015), podendo ser encontrado assim nos tecidos do(s) animal(is) que ingeriram a(s) partícula(s).



Figura 1.1 – Lixo Marinho encontrado na costa litoral Oeste de Portugal continental, dominado por resíduos de plásticos de diferentes composições e origens.

1.3 O lixo marinho em Portugal

Em Portugal, as tendências relativamente à composição do lixo marinho têm-se mantido nos últimos anos, tendo os plásticos, tipo de lixo marinho predominante, representado 73% dos itens encontrados na monitorização das praias durante o ano de 2017 (APA, 2017). No âmbito desta monitorização, foram ainda encontrados outros dois tipos de lixo: o papel e cartão (17%) e artigos sanitários (6%), devido à abundância de beatas de cigarros e cotonetes no areal. Estes resultados foram obtidos através da monitorização das praias, que é realizada anualmente, desde 2013, ao abrigo da Convenção OSPAR. A monitorização do lixo marinho em praias baseia-se numa contagem e identificação no local, segundo as diretrizes estabelecidas no Guia para a monitorização do lixo nas praias na região OSPAR (OSPAR, 2010), que contém um guia fotográfico para identificação visual e classificação dos itens de lixo encontrados. Com base na identificação visual dos objetos encontrados, realiza-se uma possível correspondência com o setor económico ou atividade humana, que deu origem aos resíduos, permitindo estabelecer medidas prioritárias no combate ao lixo marinho. Devido à abundância de MP e outros resíduos não identificáveis, cerca de 65% do lixo reportado nas praias portuguesas não é atribuído a uma fonte (APA, 2017), carecendo de estudos mais aprofundados para o caracterizar.

Atualmente, a informação acerca da presença de plásticos no meio marinho português ainda é diminuta; em dois dos estudos, realizados até à data, relacionados com a temática e os objetivos da presente dissertação, apresentam algumas diferenças na metodologia seguida neste trabalho. O primeiro trabalho (Neves *et al.*, 2015) não se focou num local de amostragem ou janela temporal em específico, tendo dado um maior ênfase aos resultados relacionados com a diversidade de espécies, em detrimento da quantidade de exemplares amostrados, devido à obtenção de amostras oportunistas. O segundo estudo (Bessa *et al.*, 2018), por sua vez, foi realizado no ano de 2018, diferindo no local onde foi realizado, num estuário na zona Norte do país, com recurso a três espécies de peixes durante maioritariamente o verão, e por isso, obtendo resultados acerca dos MP que se acumulam junto da costa. As diferentes abordagens nos trabalhos práticos levaram a resultados diferentes e não permitem que se efetue uma comparação direta entre os dois estudos descritos.

1.4 A Diretiva Quadro Estratégia Marinha

Devido à degradação ambiental cada vez mais evidente nos mares e oceanos da Europa, e à crescente pressão antropogénica resultante da exploração para a obtenção de alguns dos serviços ecossistémicos, a Comissão Europeia criou, a 17 de junho de 2008, a Diretiva 2008/56/CE, designada Diretiva Quadro

Estratégia Marinha (DQEM). Esta diretiva, que constitui o pilar ambiental da política marítima integrada, determina que os Estados-Membros devem elaborar e implementar estratégias para as águas marinhas sob soberania ou jurisdição nacional, de modo a alcançar o Bom Estado Ambiental do meio marinho até ao ano de 2020. Assim, para se avaliar o Bom Estado Ambiental das águas marinhas da UE é necessário considerar os onze descritores enumerados no anexo I da DQEM, e que estão relacionados com a conservação da biodiversidade, a qualidade das águas marinhas, a estrutura e funcionamento dos ecossistemas e as pressões e impactos no meio marinho (DGRM, 2018). Um dos descritores de Bom Estado Ambiental, o descritor Lixo Marinho (D10), deve ser avaliado com base em dois critérios: Critério 10.1. Características de lixo presente no meio marinho e costeiro (quantidade e tipo de lixo) e Critério 10.2. Impacto do lixo na vida marinha. No âmbito da implementação da Diretiva é necessário definir programas de monitorização, para serem desenvolvidas medidas em função dos resultados obtidos sobre o estado ambiental das águas. Para tal, é necessário definir indicadores de monitorização para cada um dos descritores.

No caso do Descritor 10 e no âmbito da Convenção OSPAR foi implementado um programa para monitorizar a quantidade de plásticos nos estômagos de aves, como indicador comum para o Mar do Norte, tendo-se selecionado o fulmar, para o critério 10.2. A seleção de espécies indicadoras para monitorizar as tendências de lixo no meio marinho e do seu impacto na vida marinha deve, no entanto, ser feita pelos vários Estados-Membros. No caso português, a inexistência de dados relativos a este descritor, reportada no relatório inicial de implementação da DQEM, entregue em 2012, impediu que se analisasse o estado ambiental associado a este descritor.

Com o objetivo de suprimir as lacunas na informação sobre o descritor e avaliar a sua evolução ao longo do tempo, foram incluídos três projetos no Programa de Monitorização (artigo 11.º, DQEM) e Programa de Medidas no relatório de implementação da DQEM em Portugal continental, (artigo 13.º da DQEM): 1) o projeto Limar (2015 – 2016), cujo objetivo seria determinar bioindicadores para o lixo marinho; 2) o projeto Delixomar (2015 – 2020), com vista à obtenção de informação acerca das propriedades e distribuição espacial do lixo marinho e impactes na vida marinha; 3) o projeto BDLixLit (2015 – 2020), em que se pretendia desenvolver uma base de dados sobre lixo marinho no litoral (DGRM, 2018). Contudo, apesar de já ter passado a data de término estipulada na calendarização do primeiro projeto “Limar”, a falta de financiamento impediu a sua concretização, pelo que subsiste a necessidade de selecionar espécies de peixes adequadas à monitorização do D10 em Portugal.

Alguns autores definem espécies indicadoras como seres vivos facilmente monitorizáveis e cujo estado seja um reflexo da condição do ambiente onde são encontradas (Landres et al., 1988; Cairns and Pratt, 1993; Bartell, 2006; Burger, 2006; Siddig et al., 2016). O grupo dos peixes é um forte candidato para selecionar espécies indicadoras adequadas à monitorização do D10, no que diz respeito ao Critério 10.2. - Impacto do lixo na vida marinha - principalmente porque ocupam diversos habitats fornecendo informação sobre o que se passa em diferentes locais do meio marinho. Além disso, existem outras características, referidas por Leticia e Gerardo (2008), que lhes conferem vantagem como espécies indicadoras, caso cumpram os seguintes requisitos: fácil identificação; fáceis de capturar e suficientemente abundantes para serem usadas como indicadores; não estarem ao abrigo de um estatuto de proteção; possuírem distribuição alargada pelo território marinho nacional; e o facto de não serem migradores, o que permite a sua captura ao longo de todo o ano.

O conceito de espécie indicadora recai sobre um conjunto de espécies que possuem características vantajosas para a monitorização. A diversidade de hábitos alimentares e a própria mobilidade das diferentes espécies de peixes, que vivem e se alimentam ativamente no substrato ou na sua proximidade,

como no caso das espécies demersais, e as que se alimentam passiva ou ativamente, nas camadas superiores da coluna de água, como as espécies pelágicas, poderiam considerar-se desvantagens, à luz do que se considera uma boa espécie indicadora. No entanto, estes dois grupos funcionais, por apresentarem características distintas, poderão fornecer informação sobre o tipo e quantidade de lixo que se encontra em suspensão na coluna de água e o que se encontra depositado no fundo.

1.5 Objetivos

É neste contexto que surge a presente dissertação de mestrado cujo objetivo é analisar a ocorrência, abundância e composição de lixo marinho presente nos conteúdos digestivos de espécies de peixes demersais e pelágicos, da costa de Peniche. Este trabalho foi desenvolvido tendo em vista a necessidade de selecionar indicadores para o estabelecimento de programas de monitorização, nomeadamente do D10 da DQEM. Assim, os objetivos específicos subjacentes à realização do presente trabalho incluem: 1) Determinar se a presença de lixo nos conteúdos digestivos das espécies de peixes selecionadas varia em função da época do ano, pela avaliação do efeito indireto da chuva e subsequente aumento do caudal dos rios na quantidade de lixo ingerido pelos peixes; 2) Determinar se existem diferenças no tipo de lixo presente na coluna de água e fundo marinho, pela comparação de espécies pelágicas e demersais.

Material e metodologia

2 – Material e metodologia

2.1 Área de estudo

A área de estudo deste trabalho encontra-se situada na costa litoral Oeste de Portugal continental, em Peniche (figura 2.1), ao longo das coordenadas dos pontos A ($39^{\circ}15'88.5''N$, $009^{\circ}28'61.01''W$) e B ($39^{\circ}11'11.9''N$, $009^{\circ}28'61.01''W$). A morfologia característica desta zona oeste consiste em intertidal rochoso, ladeado por escarpas acidentadas interrompidas por diversas praias e sistemas dunares. Peniche possui, desde a sua origem, uma grande ligação ao mar, com comunidades piscatórias bastante enraizadas. Recentemente, esta localidade tornou-se num popular destino turístico, muito apreciado pelos praticantes de *surf*, devido às suas praias de elevada qualidade e clima temperado mediterrânico de tipo oceânico, com influência atlântica. Por estes motivos, sobretudo durante o verão, Peniche é alvo de intensa pressão turística com subsequentes impactos ambientais sendo um dos mais importantes o aumento do lixo marinho. Na costa Oeste da Península Ibérica, durante o verão e inverno, os ventos dominantes são de norte para sul e de sul para oeste, respetivamente (Dias, 2015). A circulação do vento influencia a direção das correntes superficiais, que transportam detritos de um local para o outro. Os meses de verão e início de outono do ano de 2017 foram extremamente secos, tendo-se constatado que todo o território de Portugal continental se encontrava em situação de seca severa ou até mesmo extrema. Em contraste, os meses de primavera do ano de 2018 foram marcados por precipitação intensa, tendo o mês de maio apresentado valores inferiores de precipitação e abril valores superiores ao normal (IPMA, 2018).

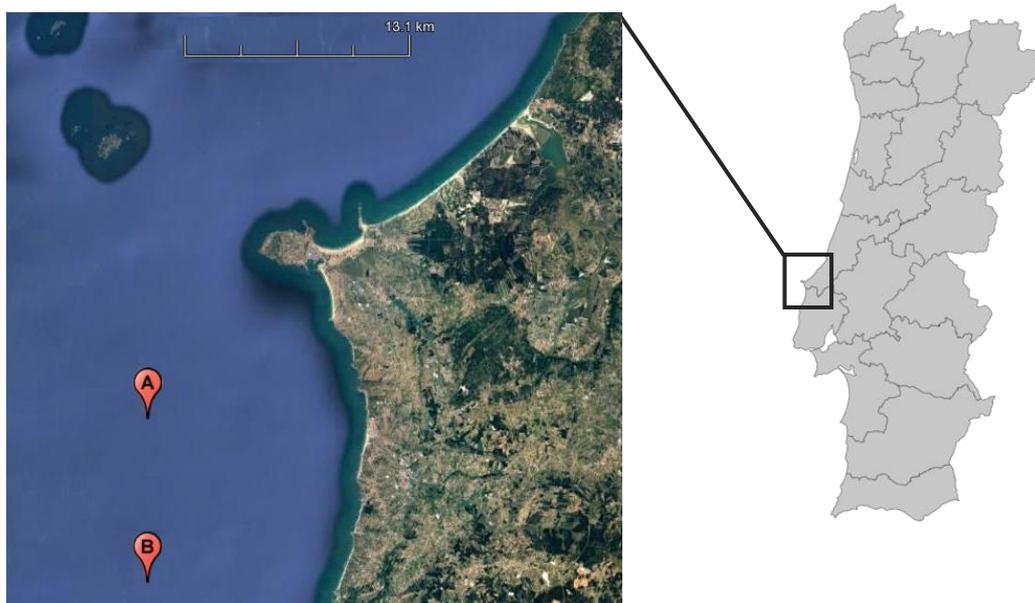


Figura 2.1. Local de amostragem em Peniche: coordenadas (A) $39^{\circ}15'88.5''N$, $009^{\circ}28'61.01''W$; (B) $39^{\circ}11'11.9''N$, $009^{\circ}28'61.01''W$. Fonte: Google Earth Pro.

O concelho de Peniche faz parte da região Oeste (NUTS III), pertencendo ao distrito de Leiria e abrangendo quatro freguesias: Atouguia da Baleia, Peniche, Ferrel e Serra D'El-Rei. Em 2011, o concelho apresentava uma densidade populacional de cerca de $357,9 \text{ hab/km}^2$ (INE, 2013). Nesse mesmo ano, a freguesia de Atouguia da Baleia possuía 8954 habitantes e Peniche 14.794. A fração da rede hidrográfica de Peniche, em contacto direto com a zona de amostragem, integra a bacia da Ribeira São Domingos (Administração da Região Hidrográfica do Tejo I. P., 2011).

2.2. Amostragem dos peixes

A amostragem de indivíduos realizou-se em duas épocas distintas, tendo a primeira sido efetuada no final do verão e a segunda, no final do inverno/início da primavera. A primeira amostragem ocorreu nos dias 27 de setembro e 9 de outubro do ano de 2017; a segunda amostragem realizou-se nos dias 16 de abril e 9 de maio do ano de 2018.

Os peixes, pescados na costa de Peniche, foram obtidos na lota da Doca Pesca em Peniche, tendo sido adquiridos exemplares de espécies de peixes pelágicos (carapau -*Trachurus trachurus* e cavala -*Scomber colias*) e de peixes demersais (faneca -*Trisopterus luscus* e espécies da família Triglidae). A existência de diversas espécies de peixes da família Triglidae no presente estudo, resultou do facto de os pescadores não possuírem o hábito de separar as diferentes espécies durante o leilão na lota, em virtude de o seu valor no mercado ser extremamente baixo, independentemente da espécie em causa. As espécies de Triglídeos identificadas durante as amostragens foram: *Aspitrygla cuculus*, *Aspitrygla obscurus*, *Eutrigla gurnardus*, *Lepidotrigla cavillone*, *Trigla lucerna* e *Trigla lyra*.

A seleção das espécies de peixes foi feita com base na sua disponibilidade na lota de Peniche, durante todo o período de amostra, a elevada abundância dos stocks e o baixo valor económico. Foram adquiridos 60 indivíduos de cada espécie, ou seja 30 por amostragem, embora tal não tenha sido possível para todas as espécies. As exceções foram a cavala e exemplares das espécies de Triglídeos que, na segunda amostragem, i.e., no final do inverno/início da primavera, apenas somaram 27 indivíduos para cada um dos grupos (cavalas e ruivos). Assim, a amostra final consistiu num total de 234 exemplares, que foram analisados no presente estudo.

Os peixes amostrados foram processados no próprio dia da compra ou, sempre que tal se revelou impossível, congelados para serem dissecados posteriormente. Para todos os exemplares, foram realizadas medições com o auxílio de um ictiómetro para obtenção do comprimento total (precisão de 1 mm) e pesagem para registo do peso total, utilizando uma balança Kern 470 (precisão de 0,01g). Após registo dos parâmetros biométricos, procedeu-se à dissecação dos exemplares, iniciada com um corte longitudinal ventralmente, ao qual se seguiu um corte ao nível do esófago e do ânus de forma a remover o trato digestivo, à semelhança dos procedimentos descritos por outros autores em estudos anteriores (e.g. Lusher *et al.*, 2013). Durante o processamento dos indivíduos foram tidos em conta certos cuidados para evitar contaminação das amostras, por exemplo por microfibras, o que envolvia a lavagem do material utilizado, entre cada disseção, e inclusive, lavagem do exterior do indivíduo com água corrente, uma vez que outros autores já mencionaram no passado medidas para evitar contaminações por partículas externas ao tubo digestivo (e.g. Lusher *et al.*, 2016). Os tubos digestivos removidos foram congelados até posterior análise e processamento laboratorial.

O peso (0,01g) e comprimento médio total (cm) das espécies utilizadas foram de, respetivamente: (110,27 ± 18,47) g e (24,98 ± 1,66) cm, para *T. trachurus*; (262,80 ± 57,08) g e (28,68 ± 2,64) cm, para *S. colias*; (136,58 ± 55,53) g e (22,49 ± 2,80) cm, para *T. luscus*; (197,82 ± 51,57) g e (28,34 ± 2,50) cm, para Triglídeos.

Dado que na lota todos os peixes vendidos são previamente selecionados de modo a possuírem um tamanho e peso semelhantes em cada caixa, não existiram variações significativas nestes dois parâmetros biométricos que permitissem uma análise para testar possíveis influências do tamanho dos indivíduos no consumo de partículas de lixo marinho.

2.3 Digestão e triagem das amostras

Com o objetivo de otimizar a procura das partículas de lixo nos conteúdos digestivos dos peixes, procedeu-se à digestão de todo o trato gastrointestinal dos mesmos. A metodologia da digestão encontra-se descrita em alguns trabalhos, tendo sido demonstrado o aumento da taxa de recuperação de microplásticos (MP) através da realização deste procedimento (Avio *et al.*, 2015). Assim, após o descongelamento dos conteúdos intestinais e estomacais por exposição à temperatura ambiente ou em frigorífico, realizou-se a digestão através do tratamento com uma solução de Hidróxido de Potássio (KOH) a 10% (Hanke *et al.*, 2013), tendo para o efeito sido utilizado um volume de solução, em mililitros, equivalente a três vezes a massa, em gramas, dos conteúdos a digerir, como descrito na literatura (*e.g.* Tanaka e Tanada, 2016). Todas as amostras, aquando da digestão, foram cobertas com parafilm (para evitar evaporação e contaminação das amostras em estudo). A digestão foi realizada durante 24 horas à temperatura de 55°C e sob agitação a uma velocidade de 250 rpm, usando uma placa de agitação e aquecimento. De forma a manter-se a temperatura sempre constante e uniforme ao longo do tempo, foi usado um banho de areia e um *termopar* para o controlo de temperatura. Estas condições permitiram obter uma mistura homogénea. As digestões foram realizadas em *goblets* de plástico para evitar possíveis contaminações das amostras em estudo, tendo em conta que o KOH poderá retirar partículas de sílica do vidro.

Após a digestão, efetuou-se uma centrifugação a 5000 rpm durante 15 min à temperatura de 15 °C, a cada amostra foi adicionada água destilada, de modo a obter-se uma separação mais eficiente das fases. No final, os pellets foram guardados para posterior observação à lupa binocular e o sobrenadante foi filtrado.

A filtração foi realizada através de um ou mais filtros (no caso do primeiro filtro sofrer colmatação) de acetato de celulose, com um poro de 43 – 48 µm da marca FILTER-LAB (referência 1300/80) tendo sido usada uma bomba de vácuo para auxiliar no processo de filtração. A digestão e filtração foram realizadas dentro de uma hotte, para prevenir possíveis contaminações. Para evitar contaminações durante a preparação da digestão, filtração e triagem, todo o material utilizado foi limpo com água destilada previamente à sua utilização, e foi colocado na bancada um papel de filtro junto das amostras cujo objetivo era o controlo de qualquer tipo de partículas, que surgissem neste filtro fossem descartadas na análise das amostras reais.

A triagem, que incluiu identificação da morfologia e cor; descarte de pedaços de sílica e osso não digerido, e a respetiva medição de largura, comprimento e área (figura 2.2) dos vários itens presentes nos conteúdos digestivos, foi realizada usando uma lupa binocular Leica M60. Para cada amostra foi realizado um registo fotográfico através do software Leica Application Suite (LAS) incorporado na câmara da lupa.

As partículas foram consideradas microplásticos ($x < 5 \text{ mm}$) ou mesoplásticos ($5\text{mm} < x < 25\text{mm}$) consoante o tamanho do maior eixo (x), que iria corresponder ao comprimento (Hanke *et al.*, 2013).

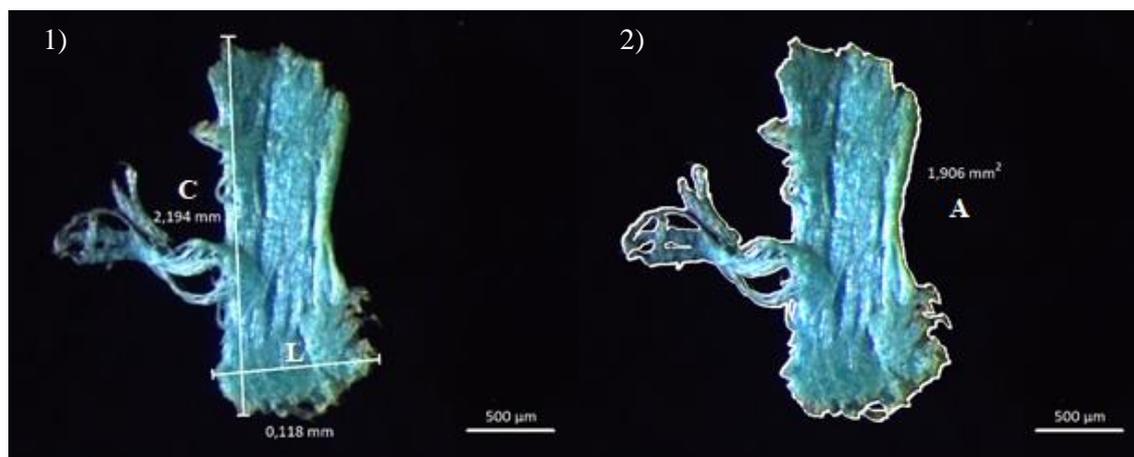


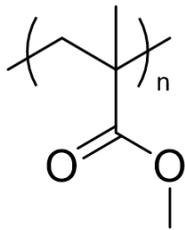
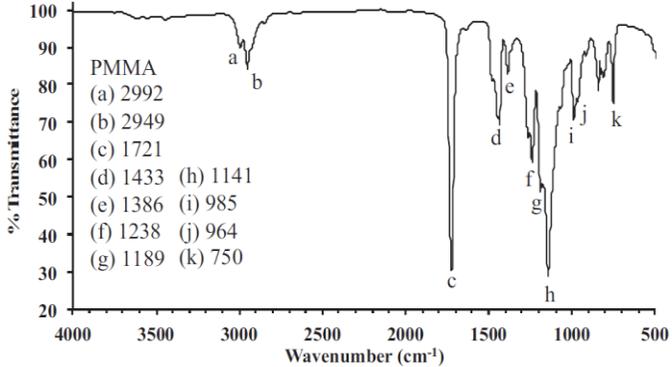
Figura 2.2. Medições realizadas nas partículas: 1) Comprimento (C) e Largura (L), em milímetros; 2) Área (A), em milímetros quadrados.

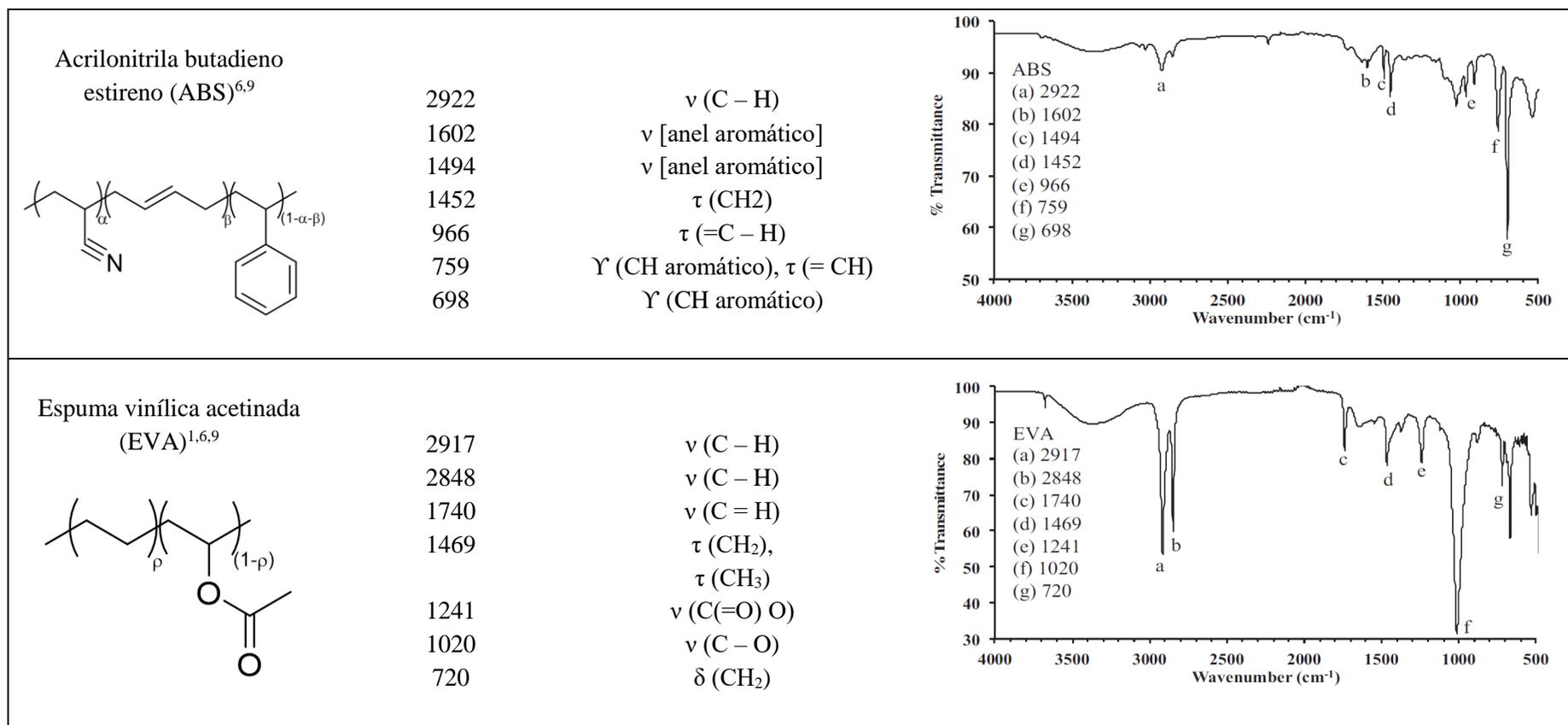
2.4 Identificação de polímeros

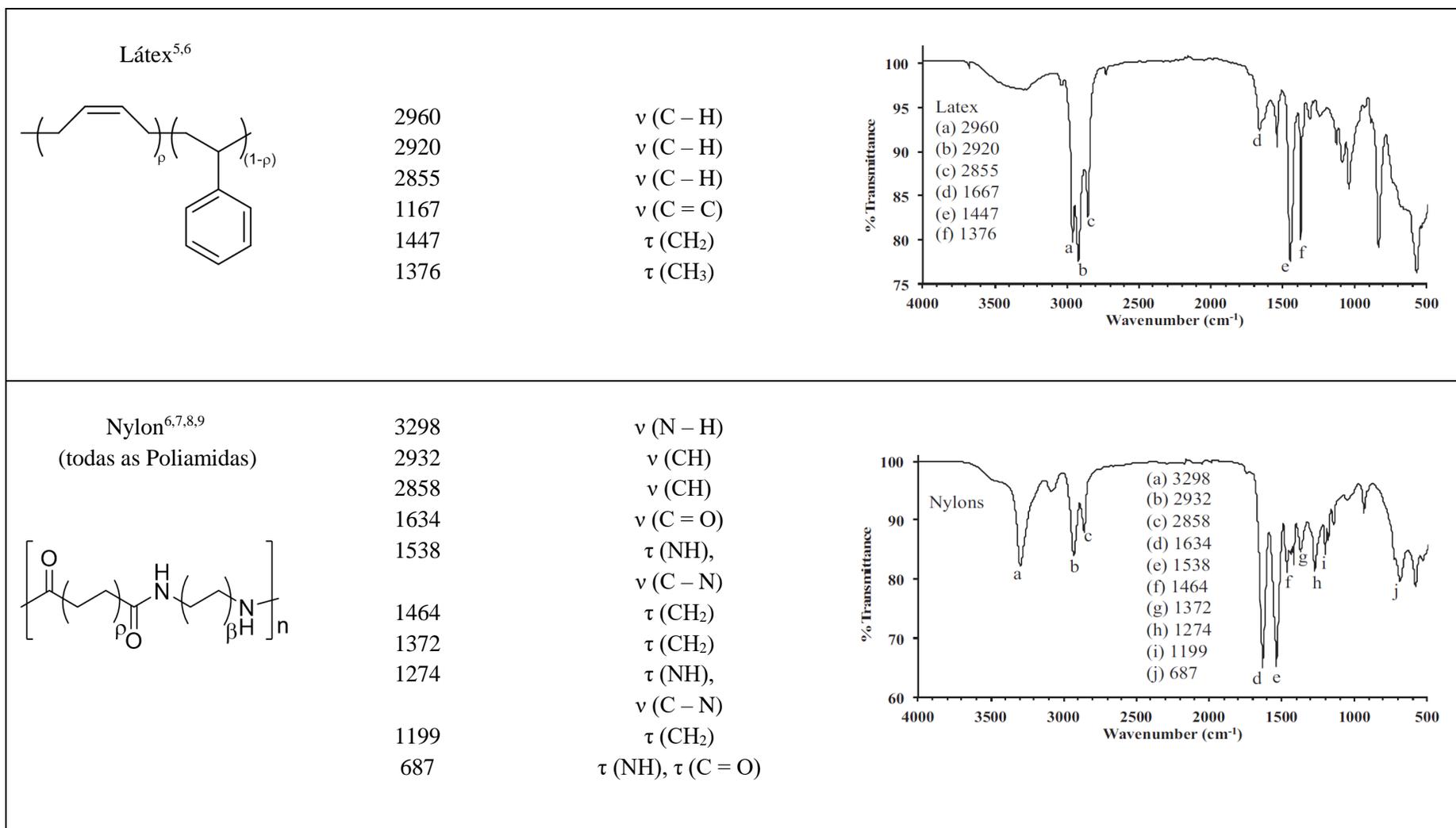
A identificação dos polímeros que compunham os itens encontrados nas amostras foi realizada através do uso de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizando o aparelho FTIR Thermo Nicolet 6700. Para a realização dos espectros utilizou-se o acessório de Refletância Total Atenuada (ATR), com cristal de ZnSe, ângulo de incidência da radiação de 45°, uma resolução de espectro de 4 cm⁻¹, e 256 e 128 acumulações por espectro, para as partículas a identificar e para a linha de base (*baseline*), respetivamente. A correção da linha de base foi efetuada automaticamente pelo software OMNIC. Previamente à análise das amostras foi realizada uma limpeza/purga através da circulação de azoto no compartimento da amostra do aparelho, de modo a eliminar eventuais contaminações de outros compostos.

Esta técnica permitiu a caracterização molecular das partículas devido à interação da radiação infravermelha com a amostra, de modo a proceder-se à identificação e distinção dos diferentes tipos de materiais em estudo. Após o traçado do espectro de cada partícula, foi realizada uma comparação com os espectros de referência, (tabela 2.1), tendo sido possível identificar, em cada amostra, o material que a compunha, através da identificação das bandas características de cada polímero. A representação da fórmula da estrutura de cada polímero devidamente identificado, foi realizada recorrendo ao software *ChemDraw*.

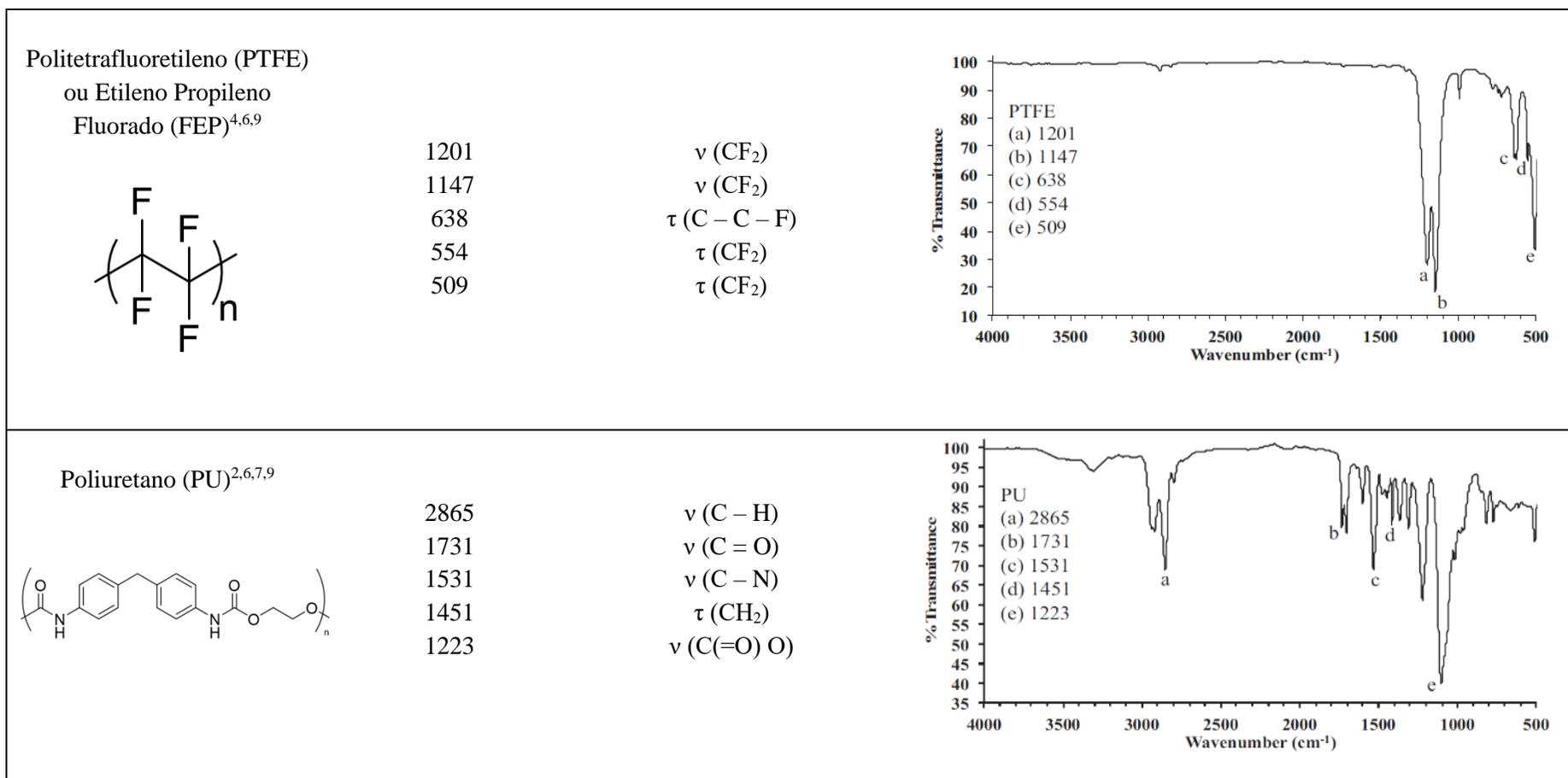
Tabela 2.1. Bandas de absorção (cm^{-1}) e respetivos espectros de infravermelho utilizados para a identificação das ligações de cada polímero, através dos modos vibracionais característicos das ligações, encontrados nos tubos digestivos dos peixes

Polímero	Bandas de absorção (cm^{-1}) características	Modos vibracionais	Espectro de referência ⁶
Acrílico ou polimetilmetacrilato (PMMA) ^{6,9} 	2992	ν (C – H)	
	2949	ν (C – H)	
	1721	ν (C=O)	
	1433	τ (CH ₂)	
	1386	τ (CH ₃)	
	1238	ν (C – O)	
	1189	δ (CH ₃)	
	1141	ν (C – O)	
	985	δ (CH ₃)	
	964	τ (C – H)	
	750	δ (CH ₂), τ (C=O)	





<p>Policarbonato (PC)^{6,7,8,9}</p>	2966	ν (CH)	
	1768	ν (C = O)	
	1503	ν [anel aromático]	
	1409	ν [anel aromático]	
	1364	τ (CH ₃)	
	1186	ν (C - O)	
	1158	ν (C - O)	
	1013	τ (CH aromático)	
	828	Υ (CH aromático)	
<p>Policloreto de polivinila (PVC)^{3,6,7,9}</p>	1427	τ (CH ₂)	
	1331	τ (CH)	
	1255	τ (CH)	
	1099	ν (C - C)	
	966	δ (CH ₂)	
	616	ν (C - Cl)	



Referências: 1 - Ascensio *et al.*, 2009; 2 - Asefnejad *et al.*, 2011; 3 - Beltran and Marcilla, 1997; 4 - Coates, 2000; 5 - Guidelli *et al.*, 2011; 6 - Jung *et al.*, 2018; 7 - Noda *et al.*, 2007; 8 - Rotter and Ishida, 1992; 9 - Verleye *et al.*, 2001.

Terminologia: γ – dobramento angular fora-do-plano; δ - rotação; τ – dobramento angular; ν – estiramento.

2.5 Análise de dados

De modo a facilitar a compreensão de todos os dados, foi utilizada estatística descritiva e obtidos diversas visualizações, nomeadamente *Box-plot*, gráficos de barras e gráficos circulares.

Para efetuar a escolha dos testes de hipóteses a aplicar aos dados, foi necessário testar se os pressupostos - normalidade da distribuição da amostra e a homocedastidade das médias - eram cumpridos, por forma a ser possível a aplicação de testes estatísticos paramétricos. A normalidade da distribuição da amostra foi testada através do teste de Shapiro-Wilks, tendo-se provado que todos os dados a analisar não seguiam uma distribuição normal, pelo que todos os testes a aplicar teriam de ser de natureza não paramétrica. E, não tendo sido cumprido um dos pressupostos obrigatórios, não houve necessidade de se testar o segundo pressuposto.

Para analisar se a proporção de fibras e fragmentos consumidos diferia significativamente entre peixes pelágicos e demersais, foi aplicado o teste G-de-Independência com a correção de Yates (Hitchcock, 2009).

Com o intuito de analisar o padrão de consumo de lixo pelas espécies de peixes analisados no presente estudo, foram realizadas duas análises PERMANOVA (“Permutational Multivariate Analysis of Variance”) (Anderson, 2001), que permitiram inferir acerca de múltiplas comparações: 1) interespecie; 2) intraespecie nos dois períodos de amostragem; 3) entre verão e inverno; 4) entre pelágicos e demersais. Este teste estatístico de análise de variância multivariada, enquadra-se dentro dos testes não paramétricos e requer a construção, *a priori*, de uma matriz de semelhança. Esta matriz foi calculada através do método das distâncias euclidianas em detrimento do método de Bray-Curtis, pois somente o primeiro método consegue operar com múltiplos zeros presentes na amostra. Desta forma, os dados da amostra foram transformados com recurso a uma função logarítmica (1), de modo a minimizar os erros durante a análise.

$$(1) \text{Log}(x + 1)$$

A primeira PERMANOVA foi realizada com dois fatores, “Época” (2 níveis: Verão e Inverno) e “Espécie” (4 níveis: Carapau, Cavala, Faneca e Ruivo); a segunda com os fatores “Época” (2 níveis: Verão e Inverno) e “Habitat” (2 níveis: Pelágico e Demersal). *A posteriori*, foram realizados testes pareados – *Pair-Wise* –, entre a interação dos fatores utilizados em ambas as análises PERMANOVA.

Todos os gráficos obtidos neste estudo foram criados com recurso ao software Microsoft Office Excel 2016, à exceção dos espectros das partículas que, à semelhança dos testes de hipóteses de Shapiro-Wilks e G-de-Independência, foram obtidos através do software R 2017 (versão 3.3.4), com o auxílio dos packages smoother (Hamilton, 2015), FSA (Ogle, 2018) e DescTools (Signorell, 2018). As análises PERMANOVA foram realizadas com recurso ao software PRIMER v6.0 e à respetiva extensão PERMANOVA (Anderson *et al.*, 2008). Em todas as análises estatísticas efetuadas considerou-se um nível de significância de 0,05.

Resultados

3 – Resultados

3.1. Abundância de partículas de lixo

A frequência de ocorrência das partículas de lixo variou bastante entre espécies e entre épocas de amostragem (tabela 3.1), tendo a espécie *S. colias* sido a única que apresentou um consumo semelhante ao longo do ano. As espécies demersais continham poucas partículas no período de verão, o que contrastou com o consumo registado por quase metade dos indivíduos analisados na amostragem de inverno. Quanto às variações sazonais, o número médio de partículas, por indivíduo, foi superior nas espécies pelágicas, durante o verão, contrariamente às espécies demersais que apresentaram valores superiores no inverno. As espécies pelágicas apresentaram um número de partículas por indivíduo mais elevado, sendo superior à quantidade de partículas encontradas nas espécies demersais durante o verão, revelando assim uma maior vulnerabilidade à sua ingestão.

Tabela 3.1 – Frequência de ocorrência de partículas de lixo nos conteúdos digestivos de espécies de peixes da costa de Peniche

Espécies	Ocorrência de partículas (%)		Nº médio de partículas por indivíduo ± (DP)		Nº máximo de partículas por indivíduo	
	verão	inverno	verão	inverno	verão	inverno
<i>S. colias</i>	43,33	36,67	3,69 ± 3,93	1,73 ± 0,86	15	4
<i>T. trachurus</i>	60,00	26,67	2,94 ± 3,21	1,75 ± 0,83	14	3
<i>T. luscus</i>	6,67	43,33	1,00	3,23 ± 2,12	1	7
Triglidae	6,67	46,67	1,00	1,86 ± 1,46	1	6

As caixas de bigodes (*box-plots*) (figura 3.1) permitem uma visualização gráfica da distribuição das quantidades de partículas ingeridas pelas espécies pelágicas e demersais, ao longo do período de estudo.

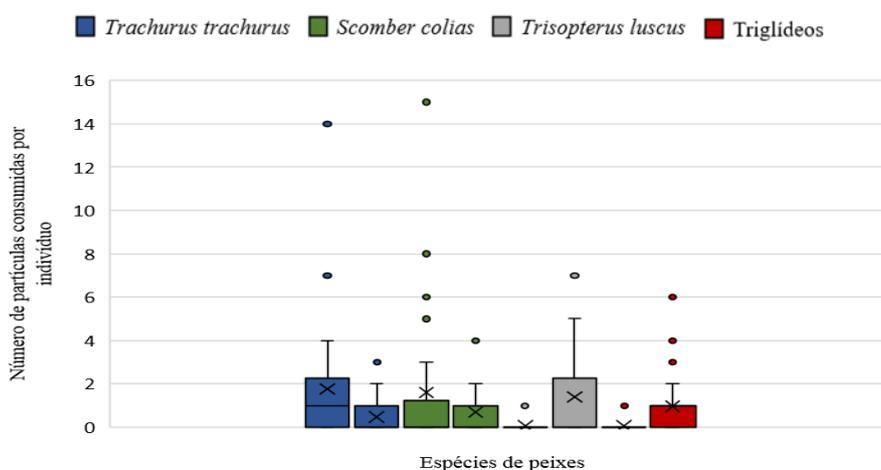


Figura 3.1 – Representação gráfica da quantidade de partículas encontradas nos conteúdos digestivos das espécies estudadas. Cada par de *Box-plots* com a mesma cor corresponde a uma espécie. À esquerda encontra-se a amostra de verão e à direita a amostra de inverno.

3.2. Caracterização das partículas de lixo

Relativamente ao tamanho das partículas encontradas nos conteúdos gastrointestinais dos peixes analisados (figura 3.2), verificou-se que não existiu muita variação quer entre indivíduos da mesma espécie quer interespecies. A espécie *T. luscus* destaca-se por apresentar no verão maiores dimensões das partículas, no entanto e à semelhança dos Triglídeos (espécimes da família Triglidae), o número de partículas encontradas na amostragem de verão foi reduzido (n=2).

Existiu uma clara predominância no aparecimento de microplásticos (98%) (< 5mm) nas amostras de verão e inverno, tendo ocorrido apenas 3 mesoplásticos (2%) (5mm<x<25mm) neste estudo.

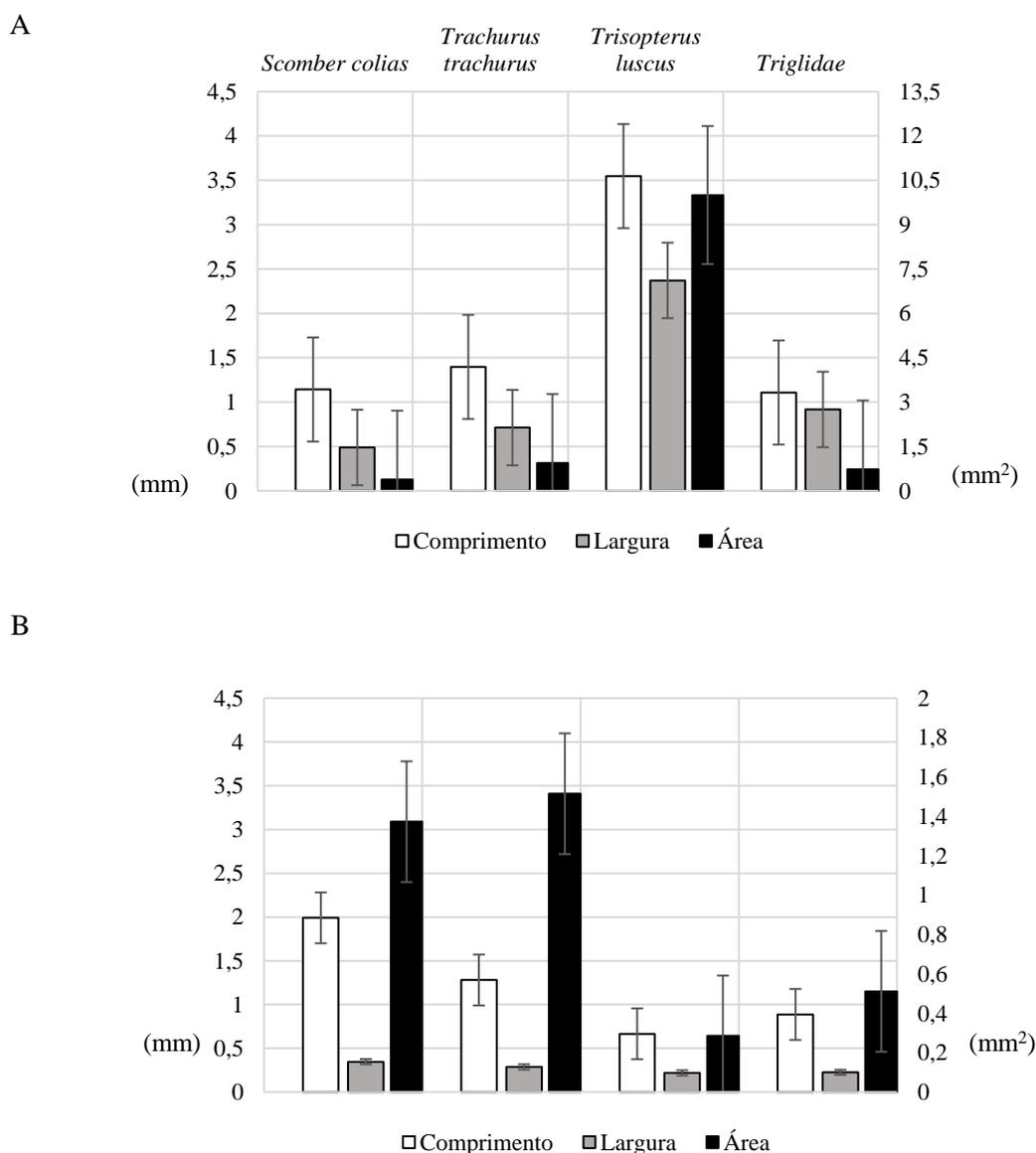


Figura 3.2 – Valores médios de comprimento (mm), largura (mm) e área (mm²) das partículas de lixo encontradas no conteúdo digestivo das espécies de peixes analisadas no verão (A) e no inverno (B).

A visualização da figura 3.3, referente à análise das cores das partículas, revela que a maioria das cores se repete nos diferentes meses de amostragem, ainda que com pouca representatividade. As duas cores predominantes, em ambos os períodos de amostragem, são o branco e o preto. No verão, a proporção de partículas de cor preta e branca é sensivelmente igual (36% e 30% respetivamente), contrariamente ao inverno, em que a cor preta se destaca por apresentar um valor quase triplo da percentagem registada para as partículas de cor branca.

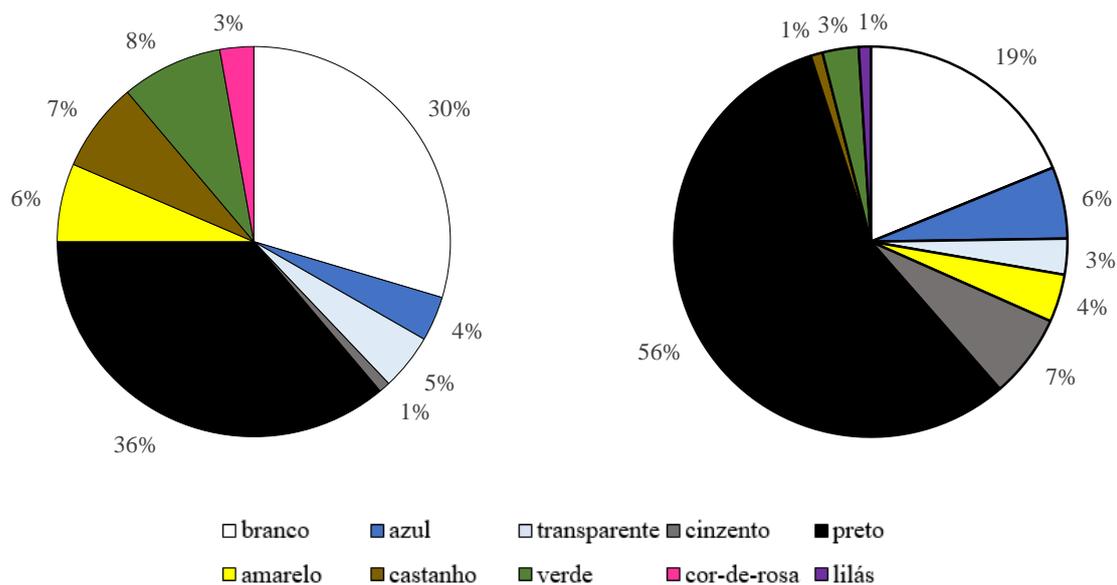


Figura 3.3 – Proporção de cores das partículas encontradas nos conteúdos gastrointestinais dos peixes: à esquerda partículas encontradas no verão; à direita partículas encontradas no inverno.

3.3. Tipos de partículas de lixo

A morfologia da generalidade das partículas de lixo encontradas designou-se como fragmentos (90%) (figura 3.4), tendo-se mantido esta tendência tanto para os peixes pelágicos (91%) como para os demersais (86%). As restantes partículas foram classificadas como fibras, assim todos os MP encontrados foram classificados como secundários. Constatou-se também que os peixes pelágicos consumiram cerca do dobro dos fragmentos em comparação com os peixes demersais.

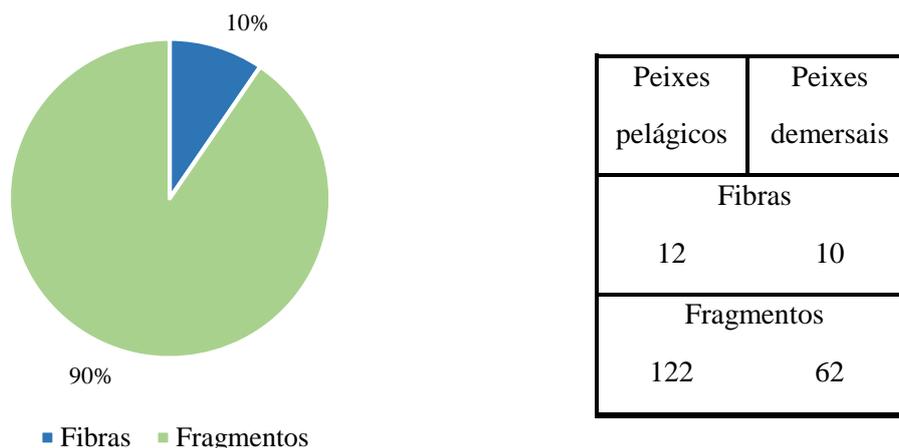


Figura 3.4 - Quantidade de fibras e fragmentos de lixo encontrados nos conteúdos gastrointestinais de peixes pelágicos e demersais, provenientes da costa de Peniche.

Os resultados do teste G-de-independência revelaram que existem diferenças significativas no consumo de fibras e fragmentos, para ambos os grupos de peixes (tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Resultado do teste G-de-independência realizado para comparar a morfologia das partículas consumidas por peixes pelágicos e demersais (GY - estatística G com a correção de Yates)

Fibras - Fragmentos	Teste G-de-independência		
	GY	gl	<i>p-value</i>
Peixes pelágicos	72,182	1	$2,2 \times 10^{-15}$ *
Peixes demersais	27,358	1	$1,69 \times 10^{-6}$ *

gl – graus de liberdade; “*” ($p < 0,05$)

3.4.A influência da espécie e da época do ano na abundância de partículas

A comparação do consumo de partículas, realizada por meio de uma PERMANOVA com dois fatores (Época e Espécie), indicou que não existiam diferenças entre eles, mas registaram-se diferenças significativas quando se considerou a interação entre os fatores época e espécie (tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Resultado da análise PERMANOVA 1, efetuada para comparar o consumo de lixo entre as espécies de peixes em estudo (*T. trachurus*, *S. colias*, *T. luscus* e Triglídeos), e as duas épocas de amostragem (verão e inverno)

Fatores	gl	Pseudo-F	P(perm)
Época	1	1,434	0,218
Espécie	3	2,1904	0,089
ÉpocaxEspécie	3	10,247	0,001*

gl – graus de liberdade; “*” ($p < 0,05$)

Com a realização dos testes *pair-wise, a posteriori*, (tabela 3.4) foram também observadas diferenças no consumo de lixo intraespécie para *T. luscus* e Triglídeos, quando comparadas as amostras de verão e inverno, uma vez que as diferenças estatisticamente significativas apenas se observam na comparação entre estas espécies.

Tabela 3.4 - Resultados dos testes *Pair-wise a posteriori* entre a interação dos dois fatores "ÉpocaxEspécie" e o fator Época (PERMANOVA 1)

Espécie	Verão - Inverno	
	t	P(perm)
<i>T. trachurus</i>	2,8339	0,006
<i>S. colias</i>	0,93102	0,356
<i>T. luscus</i>	4,1171	0,001*
Triglídeos	3,7463	0,001*

gl – graus de liberdade; “*” ($p < 0,05$)

Os testes *pair-wise* feitos *a posteriori* (tabela 3.5) revelam que as espécies demersais (*T. luscus* e espécies da família Triglididae) são aquelas em que a quantidade de lixo ingerido difere estatisticamente, provocando as diferenças obtidas na análise PERMANOVA 1 (ver tabela 3.3), uma vez que as diferenças estatisticamente significativas apenas se encontram na comparação entre estas e as espécies pelágicas (*T. trachurus* e *S. colias*). Estas diferenças apenas são significativas no verão, época em que a quantidade de detritos ingerido pelas espécies demersais é mais reduzida (ver tabela 3.1).

Tabela 3.5 - Resultados dos testes Pair-wise, *a posteriori*, entre a interação dos dois fatores "ÉpocaxEspécie" e o fator espécie (PERMANOVA 1)

Espécie	Verão		Inverno	
	t	P(perm)	t	P(perm)
<i>T. trachurus</i> - <i>S. colias</i>	0,7594	0,44	1,031	0,328
<i>S. colias</i> - Triglídeo	3,4623	0,002*	0,70471	0,476
<i>S. colias</i> - <i>T. luscus</i>	3,4623	0,003*	1,0402	0,312
<i>T. trachurus</i> - Triglídeo	4,7869	0,001*	1,7373	0,074
<i>T. trachurus</i> - <i>T. luscus</i>	4,7869	0,001*	1,948	0,055
Triglídeo - <i>T. luscus</i>	1,0674x10 ⁻⁷	1	0,41991	0,657

gl – graus de liberdade; “*” ($p < 0,05$)

O efeito da sazonalidade e do tipo de habitat no consumo de partículas, avaliado por uma segunda PERMANOVA, a dois fatores (Época e Habitat), pode observar-se na tabela 3.6. Esta análise revelou a existência de diferenças significativas para o fator Habitat e para a interação entre fatores (Época vs Habitat).

Tabela 3.6 - Resultado da análise PERMANOVA 2, efetuada para comparar o consumo de lixo em espécies que habitam zonas diferentes na coluna de água, entre as duas épocas de amostragem (verão e inverno)

Fatores	gl	Pseudo-F	P(perm)
Época	1	1,4231	0,243
Habitat	1	6,3397	0,011*
ÉpocaxHabitat	1	29,122	0,001*

gl – graus de liberdade; “*” ($p < 0,05$)

Os testes pareados, elaborados *a posteriori*, sugerem que os peixes que ocupam o habitat demersal apresentam diferenças significativas no consumo de partículas (tabela 3.7), e a comparação entre pelágicos e demersais (tabela 3.8), permite verificar que é nos demersais que a quantidade de partículas ingeridas difere estatisticamente, causando as diferenças verificadas na análise PERMANOVA (ver tabela 3.6).

Tabela 3.7 - Resultados dos testes *Pair-wise* entre a interação dos dois fatores “ÉpocaxHabitat” e o fator Época – PERMANOVA 2

Habitat	Verão - Inverno	
	t	P(perm)
Demersal	5,5131	0,001*
Pelágico	2,6214	0,008

gl – graus de liberdade; “*” ($p < 0,05$)

Tabela 3.8 - Resultados dos testes *Pair-wise* entre a interação dos dois fatores “ÉpocaxHabitat” e o fator Habitat – PERMANOVA 2

Habitat	Pelágico - Demersal	
	t	P(perm)
Verão	5,8206	0,001*
Inverno	1,9577	0,054

gl – graus de liberdade; “*” ($p < 0,05$)

3.5. Tipologia dos polímeros

De entre as 206 partículas retiradas dos tubos digestivos dos peixes, 105 e 101 foram encontradas nos exemplares capturados no verão e inverno (tabela 2.9), respetivamente. Apesar de o objetivo ser a realização da análise espectral em todas as partículas encontradas, tal não foi possível por dois motivos: 1) o reduzido tamanho de cerca de metade das partículas não permitiu a realização da análise espectral de FTIR no equipamento que se encontrava à nossa disposição – a menor partícula encontrada, que pôde ser lida pelo aparelho FTIR, possuía uma área de 0,078 mm²; 2) devido ao nível de degradação das partículas, não foi possível identificar o polímero que as constituía, uma vez que o espectro obtido não apresentava uma resolução suficientemente boa que permitisse a identificação do polímero com um elevado grau de confiança.

Tabela 3.9 – Percentagem de partículas identificadas e não identificadas, devido ao tamanho e ao seu nível de degradação, por época de amostragem

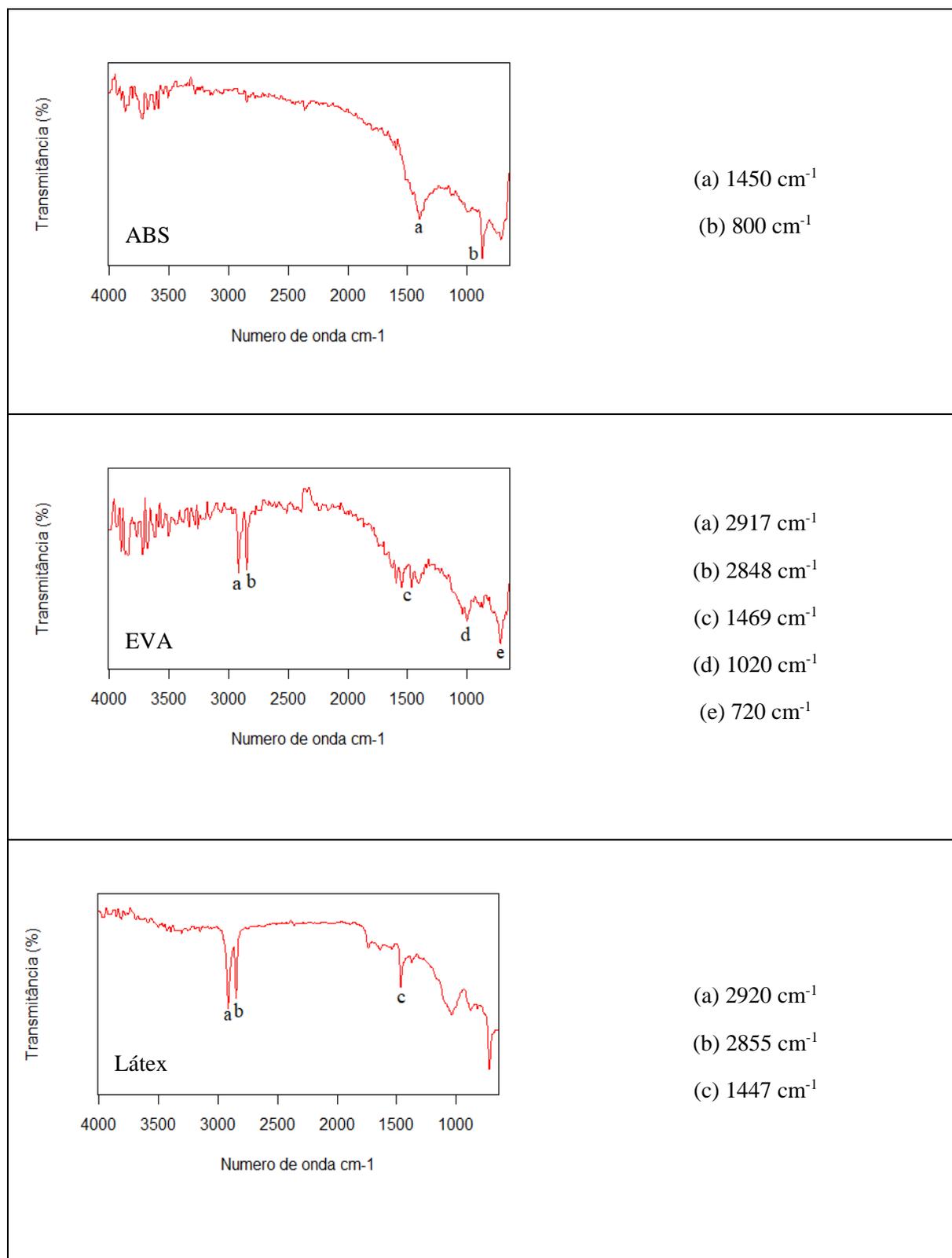
Partículas identificadas		Partículas não identificadas	
		Partículas de pequenas dimensões	Partículas com elevado nível de degradação
verão	inverno		
31,4%	27,7%	54,4%	16,0%

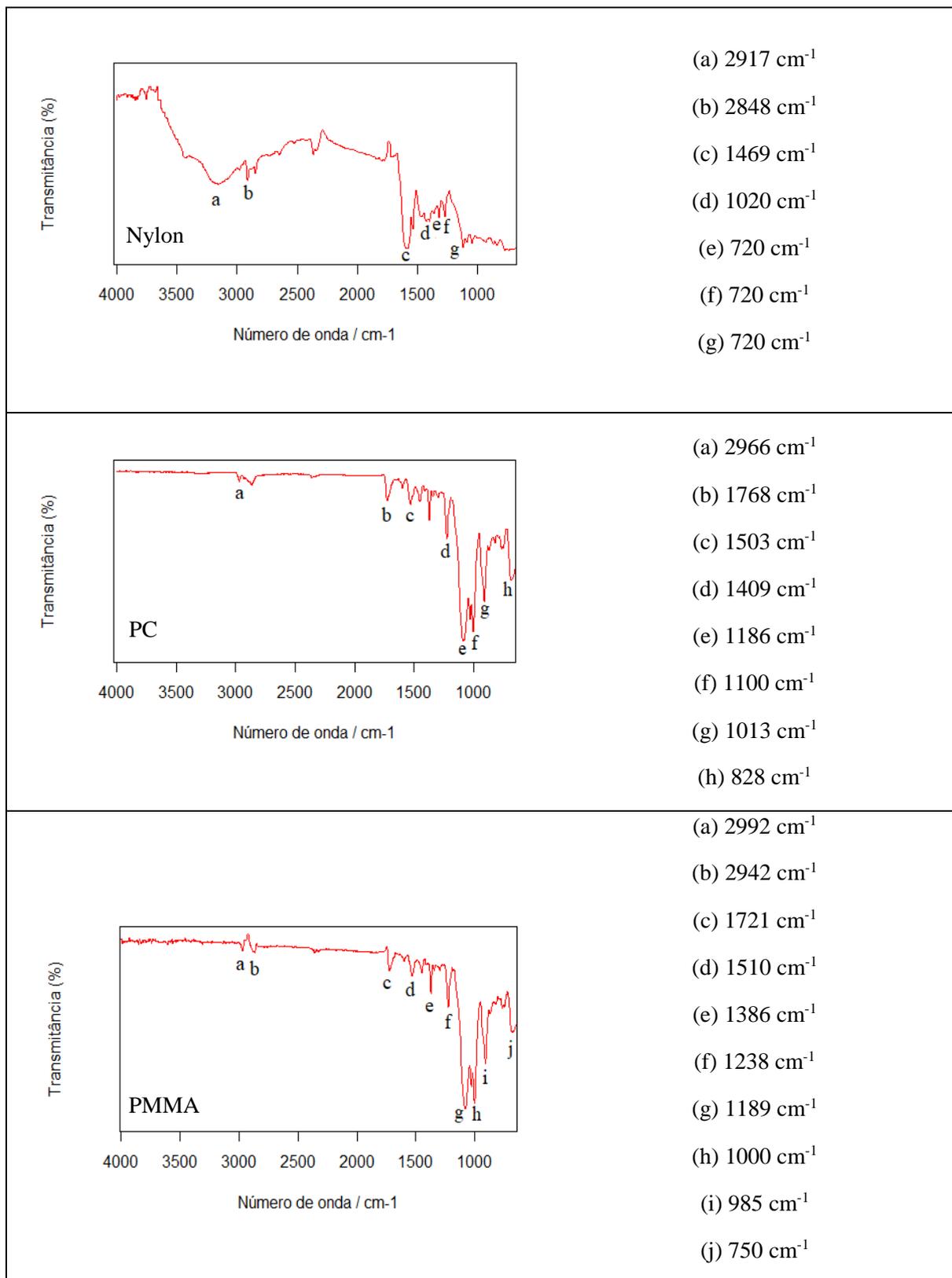
Nas partículas em que foi possível a identificação, foram identificados um total de 9 polímeros. De salientar que existe uma tendência para uma maior variedade de polímeros no verão, sendo de destacar a presença de partículas do polímero polimetil-metacrilato (PMMA) como as mais abundantes, tendo surgido nos conteúdos gastrointestinais de todas as espécies e em ambas as épocas de amostragem (tabela 3.10). Em contraste, no inverno existiu uma distribuição mais equilibrada dos polímeros encontrados. Tal como referido por outros autores (e.g. Jung *et al.*, 2018), não foi possível distinguir se as partículas eram compostas por FEP ou PTFE, uma vez que as bandas características destes polímeros situam-se nos mesmos números de onda das bandas dos compostos de degradação destes polímeros.

Tabela 3.10 – Quantidade e tipologia dos polímeros encontrados e identificados nos tubos digestivos dos exemplares amostrados no verão e no inverno. Os valores à esquerda (coluna branca), na coluna das espécies, correspondem à amostragem realizada no verão e à direita (coluna cinzenta), correspondem à amostragem de inverno

Polímeros	Espécies									
	<i>S. colias</i>	<i>T. trachurus</i>	<i>T. luscus</i>	Triglidae				Total		
Acrlonitrilo-butadieno-estireno (ABS)	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Cloreto de polivinilo (PVC)	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Etil Vinil Acetato (EVA)	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Látex	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Nylon	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0
Polimetil-metacrilato (PMMA)	9	2	12	3	2	5	1	4	24	14
Policarbonato (PC)	0	3	2	3	0	1	1	0	3	7
Politetrafluoretileno (PTFE) ou Etileno Propileno Fluorado (FEP)	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2
Poliuretano (PU)	0	3	0	0	0	1	0	1	0	5

Todos os espectros de FTIR da figura 3.5 exibem algumas das bandas características dos polímeros descritos na literatura, permitindo assim a sua identificação. Além da comparação das bandas, observando a forma dos espectros pode-se observar que apresentam inclusive uma elevada semelhança com os espectros descritos na literatura. Foram obtidos outros espectros FTIR, (apresentados na figura A do Anexo), com pequenas variações dos que se encontram na figura 3.5.





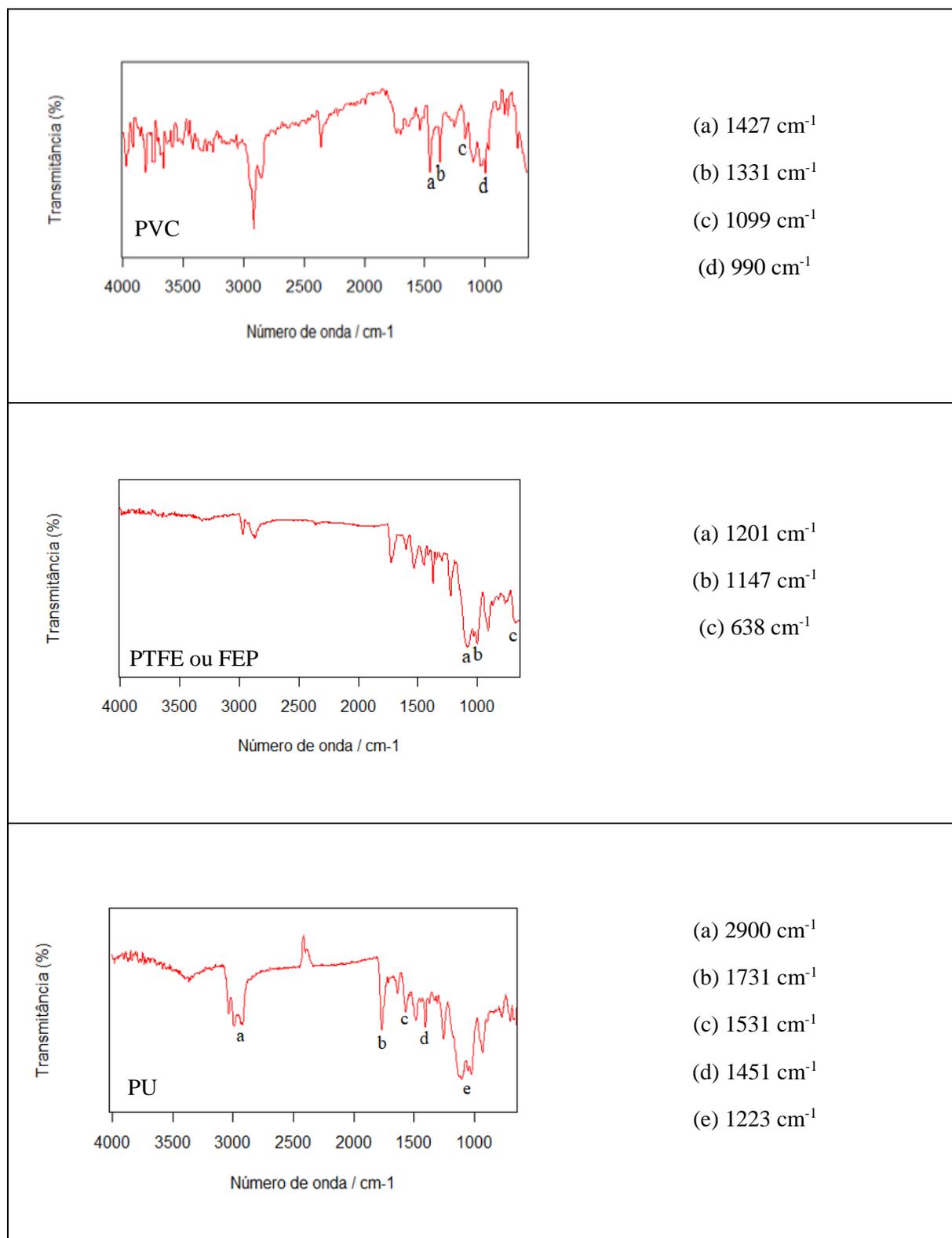


Figura 3.5 – Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de ABS, EVA, Látex, PVC, Nylon, PTFE ou FEP, PC, PMMA e PU. As letras representam as bandas de absorção características (cm⁻¹).

Discussão

4 – Discussão

Na atualidade, não existe um protocolo estabelecido pela comunidade científica para realizar a digestão de conteúdos digestivos de peixes, com o objetivo de facilitar a procura de partículas de lixo ingeridas. Neste trabalho, optou-se pela utilização de KOH para a digestão, (Bessa *et al.*, 2018; Tanaka e Tanada, 2016) quer pela sua eficácia, quer pelo facto de não destruir os materiais descritos usualmente como lixo marinho. Para ser possível obter-se os diversos tipos de lixo, decidiu-se analisar não só o filtrado do sobrenadante da digestão, como descrito na literatura, mas também os *pellet*. Apesar do uso desta medida, após a finalização do trabalho laboratorial, chegou-se à conclusão que todas as 206 partículas encontradas possuíam uma aparência correspondente a pedaços de objetos de plástico, tendo este facto sido corroborado posteriormente com a análise dos espectros, com uma única exceção, referente a uma partícula de borracha látex. O facto de outros tipos de lixo marinho não terem surgido nos tubos digestivos dos peixes, não implica que não estejam presentes no meio marinho de Peniche. No entanto, a sua abundância poderá ser inferior às dos materiais plásticos ou serem menos suscetíveis de ser ingeridos pelas espécies que habitam os dois tipos de habitat. Por exemplo, o vidro não flutua por possuir uma elevada densidade, acabando por se depositar possivelmente sem despertar a atenção dos peixes; a madeira processada, por possuir uma baixa densidade, facilmente flutua mas possui dimensões demasiado grandes para ser ingerida pelos peixes filtradores; o papel devido ao facto de se degradar rapidamente, quer pela ação do sol quer pela ação da água do mar, não seria um candidato a presa, pois não seria fácil a sua deteção.

A dieta de ambas as espécies pelágicas (carapau e cavala) analisadas no presente estudo é maioritariamente composta por zooplâncton, contrariamente à alimentação das espécies demersais (faneca e triglídeos), em que as presas são dominadas por organismos bentónicos, de maiores dimensões, como poliquetas, crustáceos e moluscos. Atendendo a que as cores dos microplásticos podem corresponder às cores das presas naturais dos peixes, certos autores (Boerger *et al.*, 2010; Ory *et al.*, 2017) defendem que existe consumo dirigido às partículas de plástico. No entanto, esta opinião não é consensual existindo outros autores que sugerem ser mais provável que o consumo de plástico seja accidental, quer pela ingestão direta de partículas de lixo, quer indireta, resultante da ingestão de presas que contenham plástico no seu trato digestivo (Lusher *et al.*, 2013; Foekema *et al.*, 2013). No presente estudo, considerou-se mais provável a hipótese do consumo accidental, pois, apesar de não existir informação acerca das características das partículas de lixo presentes no mar de Peniche, as duas cores mais frequentes nas partículas encontradas – preto e branco – não correspondem às das presas naturais das espécies analisadas. No caso dos peixes pelágicos, apesar do tamanho de algumas partículas ser semelhante ao das suas presas habituais, a diferença no consumo quando comparado com os demersais não foi tão acentuada, sugerindo que os peixes não as podem ter confundido com presas. Relativamente aos peixes demersais, verificou-se que os itens encontrados foram, na maioria dos casos, mais pequenos que as suas presas naturais, sugerindo que, à semelhança das espécies pelágicas, a sua ingestão teria sido igualmente accidental.

Nos estudos sobre microplásticos ingeridos por peixes provenientes da orla costeira de Portugal continental, a morfologia mais comum das partículas tende a ser a de microfibras, originadas durante o ciclo de lavagem das roupas e provenientes de instrumentos de pesca (Bessa *et al.*, 2018; Neves *et al.*, 2015). Num outro estudo realizado com espécies de raias, pescadas junto à costa da Ericeira, verificou-se que em 36 partículas ingeridas, a proporção de fibras e fragmentos foi semelhante (Alves, não publicado). Certos autores sugerem que a proximidade de um curso de água doce ao local de amostragem

no mar, pode influenciar o aparecimento de uma maior quantidade de MP primários (esferas) e fibras, nos conteúdos digestivos de peixes, sendo a causa deste fenómeno a presença de efluentes das ETARs (Jabeen *et al.*, 2017; Kalčíkova, 2018). Esta variação da morfologia das partículas, com base na distância à costa, pode explicar o facto de todos os MP encontrados neste estudo serem secundários e a maioria das partículas serem fragmentos (90%), uma vez que os peixes foram capturados num local afastado da costa.

Várias espécies de peixes que se alimentam de plâncton possuem a capacidade de ingerir partícula a partícula ou através da filtração da água pelos filamentos dos arcos branquiais (Pepin *et al.*, 1988). Ambas as espécies pelágicas utilizadas neste estudo incluem-se neste grupo de peixes filtradores, o que pode ter contribuído para a maior frequência de ocorrência de partículas de lixo (tabela 3.1) registada na espécie *T. trachurus* (60%) e para a ocorrência constante de partículas em *S. colias* ao longo do ano. No caso particular de *S. colias* este resultado coincide com os resultados obtidos por outros autores (Neves *et al.*, 2015; Rummel *et al.*, 2016), que reportaram um consumo elevado de microplásticos. As espécies de peixes demersais utilizadas no presente estudo, ao contrário das espécies pelágicas, não exibiram um consumo constante de partículas de lixo ao longo do ano, tendo o verão sido a época com menor número de partículas.

Durante os meses de verão, em particular de julho a setembro, dá-se um fenómeno de afloramento costeiro, comumente conhecido por *upwelling* (Fiúza *et al.*, 1982). Este provoca o afloramento de águas mais profundas à superfície do oceano, podendo esta agitação na coluna de água ressuspender as partículas que se encontravam junto ao fundo do mar, afastando-as da zona onde os peixes demersais se alimentam mais frequentemente. Este facto sugere que a baixa frequência de ocorrência de partículas de lixo no verão (inferior a 10%) em *T. luscus* e nos triglídeos comparativamente ao inverno possa ser, em parte, atribuível a uma diminuição das partículas no habitat onde se alimentam – o fundo marinho. Além da diferença na localização das partículas, também a quantidade de MP presentes no meio marinho pode variar de acordo com a estação do ano.

Reconhece-se que a precipitação causa uma maior abundância de MP na água, resultante da introdução de partículas transportadas pelos cursos de água e provenientes de escorrência superficial (Rodrigues *et al.*, 2018). A segunda época de amostragem, realizada durante o inverno, caracterizou-se por precipitação intensa, o que pode, em conjunto com a ressuspensão das partículas no verão, contribuir para explicar os resultados obtidos com a análise PERMANOVA 1, que revelou a existência de diferenças sazonais significativas no consumo de lixo dentro da própria espécie em *T. luscus* e o grupo dos Triglídeos.

Na atualidade não existe ainda um consenso sobre a comparação do consumo de partículas de lixo entre espécies de peixes pelágicas e demersais, existindo estudos que defendem a inexistência de diferenças entre as duas classes de peixes (Lusher *et al.*, 2013), enquanto outros estudos apresentam diferenças, mas não existe acordo sobre se os pelágicos consomem mais (Rummel *et al.*, 2016) ou, se pelo contrário, são os peixes demersais (Jabeen *et al.*, 2017). Esta questão foi assim também abordada na análise PERMANOVA 2 e, devido às acentuadas diferenças entre o número de partículas de lixo encontradas por indivíduo com diferentes usos do habitat (entre as espécies analisadas no verão), seria evidente que o teste classificaria como diferentes a comparação entre espécies pelágicas e demersais. E assim, embora se tenha confirmado a diferença no verão, o mesmo não se verificou no inverno, pelo que a hipótese formulada inicialmente foi rejeitada, verificando-se neste estudo a possível existência de uma diferença sazonal entre pelágicos e demersais.

A zona de Peniche é reconhecida como um dos principais destinos balneares em Portugal e pela forte tradição piscatória. Graças à popularidade das suas ondas, esta região sofre uma elevada pressão turística no verão. Com a utilização recorrente de objetos associados aos banhistas, à prática de desportos aquáticos e à utilização e reparação de embarcações, torna-se inevitável que estas atividades sejam algumas das fontes diretas mais prováveis de lixo encontrado no meio marinho. Assim, tendo em conta a elevada pressão turística, pode-se afirmar que poderá ser a razão pela qual no período de amostragem de verão surgiu uma maior variedade de polímeros e, dado que na época da amostragem o país se encontrava em período de seca, as causas mais prováveis da introdução deste lixo no meio marinho terão sido através da ação do vento e pelo contacto direto com objetos utilizados em atividades marítimas, como por exemplo o *surf*. Os polímeros PMMA e PC foram os mais abundantes nos conteúdos digestivos das espécies analisadas no presente estudo. Dado que estes polímeros são usados em pranchas de *surf* e peças de barcos, é normal que existam em grandes quantidades em Peniche, durante todo o ano, causando assim o seu surgimento em ambas as épocas de amostragem. Além das múltiplas embarcações de pesca e de recreio, existem também várias empresas especializadas na construção e reparação naval sediadas em Peniche, o que pode ter contribuído para que o polímero mais abundante detetado tenha sido o PMMA. Este polímero encontra-se listado como um dos 12 termoplásticos mais comuns no mercado no fabrico de vários objetos (PlasticsEurope, 2017). Os restantes polímeros encontrados provêm de diversas fontes como por exemplo: embalagens de protetores solares (ABS); pranchas e fatos de surf (EVA, látex e PC); fatos de banho, redes e cabos de pesca (nylon); botas de pescadores e tubos de plástico (PVC); roldanas de barcos (PTFE); calçado desportivo e isolamento dos barcos (PU) (Plastics Europe, 2017).

Em 2016 surgiu uma maior procura de termoplásticos em prol de termofixos na Europa (PlasticsEurope, 2017) e, sendo essa a indústria dos plásticos dominante, seria expectável que este desequilíbrio se refletisse no tipo de partículas encontradas nos conteúdos digestivos dos peixes analisados. Na realidade, verificou-se que dos 8 tipos de polímeros de plásticos encontrados neste estudo, apenas 1 foi classificado como termofixo – o Poliuretano (PU). A tendência para a existência de um maior número de termoplásticos no meio marinho é preocupante devido ao facto de, contrariamente aos termofixos, serem resistentes à biodegradação e originarem detritos mais persistentes, o que resulta numa maior acumulação de resíduos de plásticos no meio marinho (Zheng *et al.*, 2005).

A densidade dos resíduos de plástico condiciona a sua presença e percurso no meio marinho, sendo expectável encontrar os resíduos mais densos que a água salgada junto ao fundo e os menos densos, a flutuar nos oceanos. Todavia, a flutuabilidade dos resíduos não depende apenas da sua densidade, sendo também afetada pela agitação da coluna de água e a incorporação de matérias químicas e orgânicas (Kalčíkova, 2018). Todos os polímeros identificados no presente estudo, à exceção de EVA, Látex e PU, possuem uma densidade superior à da água salgada ($\rho \approx 1,03 \text{ g/cm}^3$), pelo que não apresentam uma elevada flutuabilidade, precipitando mais facilmente no fundo do mar. É possível, no entanto, que a ressuspensão das partículas depositadas no fundo seja facilitada pelas correntes e ondas, que originam a mistura da coluna de água, o que permite compreender como poderiam os peixes pelágicos ter tido acesso às partículas compostas por estes polímeros mais densos. Por outro lado, também os peixes demersais consumiram partículas compostas por polímeros menos densos que a água salgada. Este resultado pode ser justificado pelo facto de, ao longo da degradação da partícula, esta poder adsorver químicos e ser colonizada por organismos, aumentando o seu peso e, por conseguinte, perdendo a flutuabilidade neutra ou positiva.

Durante o fabrico do material de plástico são adicionados alguns aditivos aos polímeros, com o objetivo de obter certas características desejadas no produto final. Apesar de alguns aditivos, como os que

conferem a cor ao material, ocorrerem em concentrações diminutas, contêm quantidades suficientes para influenciar a análise espectral desse material (Kalčíkova, 2018). Além dos aditivos, a degradação da partícula por exposição à radiação ultravioleta do sol, que origina foto-oxidação dos polímeros (figura 4.1), e o seu contacto com os ácidos gástricos presentes no tubo digestivo, também contribuem para a alteração da sua composição química. Assim, com o decorrer do tempo, através da conjugação destes fenómenos tornam-se mais acentuadas as alterações no espectro final das partículas. É por isso que, no decorrer deste trabalho, não foi possível uma correspondência total das bandas de vibração dos polímeros analisados com os espectros de referência, tendo sido obtidas algumas variações nos espectros obtidos para cada tipo de polímero (e.g. figura A, anexo). Cerca de 16% das partículas encontradas nos conteúdos digestivos dos peixes encontrava-se num estado avançado de degradação, não tendo sido possível identificar o polímero original, utilizado no seu fabrico. Desta forma, é possível que estivessem presentes na amostra outros tipos de polímeros, embora não tenha sido possível reconhecer a sua composição.

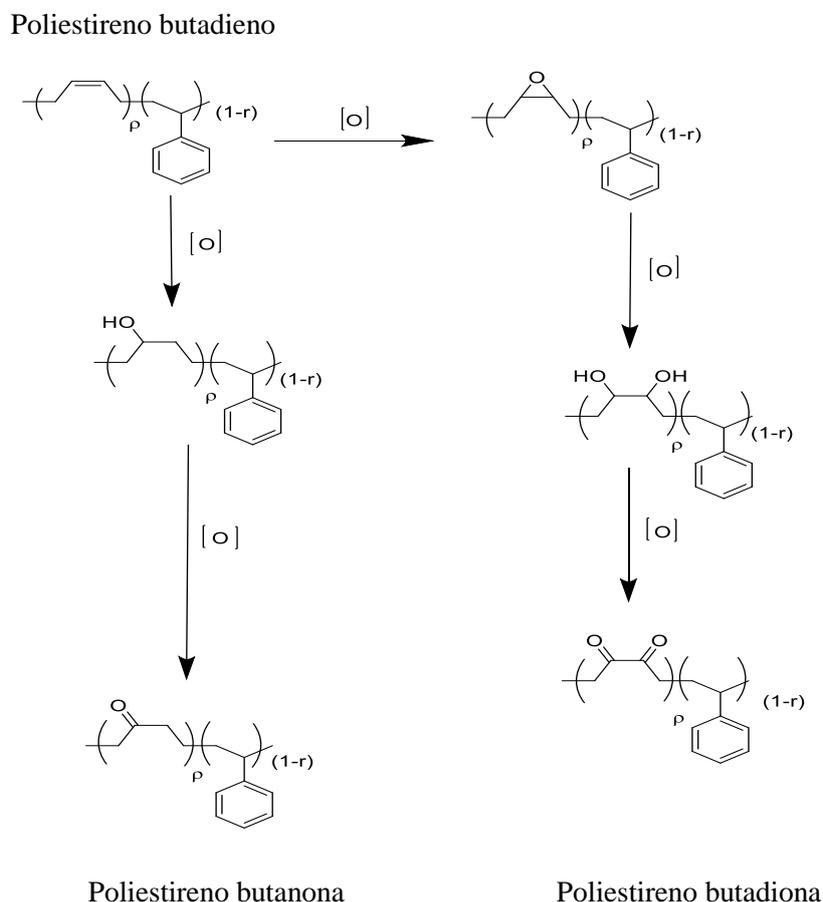


Figura 4.1 - Processo de oxidação de uma partícula de borracha látex, que pode originar dois produtos finais, o Poliestireno butanona e Poliestireno butadiona.

Os polímeros geralmente utilizados como MP primários nos produtos de cosmética e higiene são o PE (Polietileno) e o PP (Polipropileno) que, cobrindo 49,1% da procura europeia de polímeros, são os mais utilizados pela indústria (PlasticsEurope, 2017) e, como tal, passíveis de ocorrer no meio marinho. Neste

estudo, a sua presença não foi, todavia, registada possivelmente devido à distância entre as zonas de amostragem e a principal fonte de introdução destes poluentes, eventualmente as ETARs. Outro polímero que não ocorreu no presente estudo, mas que por vezes surge em estudos de alimentação de peixes (*e.g.* Lusher *et al.*, 2013) é o PET (Polietileno tereftálico), conhecido pelo seu intenso uso em produtos descartáveis como as garrafas de água, uma vez que é bastante utilizado no setor das embalagens. Supõe-se que pela abrasão mecânica possam existir milhões destas partículas na água, que não são passíveis de ser analisadas devido ao seu reduzido tamanho, pois fragmentam-se com uma elevada facilidade (Kalčíkova, 2018), o que pode ter levado à ausência de PET neste estudo. Não se pode descartar a hipótese de, à semelhança do PET, outros polímeros eventualmente presentes no ambiente não terem sido identificados neste estudo em virtude de não ter sido possível realizar o espectro de FTIR a 54,4% das partículas encontradas, devido à sua reduzida dimensão.

Considerações finais

5 – Considerações finais

No presente estudo foi feita a caracterização da quantidade e tipo de lixo presente nos conteúdos gastrointestinais de espécies de peixes pelágicos e demersais da zona de Peniche. A utilização de espécies que habitam diferentes zonas da coluna de água (pelágicas e demersais) permitiu a deteção de uma maior variedade de polímeros presentes no meio marinho. Os resultados indicaram que as espécies de peixes da costa de Peniche estão suscetíveis à contaminação por microplásticos, sobretudo os secundários, sob a forma de fragmentos.

Atendendo ao facto de ter sido verificada a existência de diferenças sazonais significativas, se apenas for possível realizar a monitorização do D10 em peixes numa única época de amostragem, entre o verão e o inverno, a época invernal será aquela que poderá garantir melhores resultados, pois foi nesta época onde se obteve um maior número de partículas distribuída de forma semelhante pelas diferentes espécies pelágicas e demersais.

O tipo de polímeros identificados, com clara predominância de PMMA, permitiu inferir sobre a provável origem dos mesmos, o que é um dos objetivos da monitorização no âmbito do descritor, já que a implementação da DQEM preconiza a adoção de medidas visando manter ou alcançar o bom estado ambiental das águas marinhas sob soberania ou jurisdição nacional.

É necessário no futuro a elaboração de um protocolo padrão, que possa ser aplicado em estudos relacionados com a procura de microplásticos em conteúdos digestivos de peixes, permitindo assim uma melhor monitorização a nível nacional e a realização de comparações entre estudos dos diversos países onde é implementada a DQEM.

A elevada ocorrência de microplásticos nos peixes analisados, em conjunto com a escassez de estudos sobre esta problemática em Portugal, reforçam a necessidade de realizar mais investigação de forma a combater as lacunas existentes no conhecimento atual e permitindo, por sua vez, a criação de medidas mitigadoras desta forma de poluição.

As espécies selecionadas no presente estudo cumprem os requisitos de boas espécies indicadoras: 1) possuem uma ampla distribuição geográfica; 2) estão presentes ao longo de todo o ano; 3) possuem quantidades abundantes de lixo nos conteúdos digestivos; 4) fornecem informação clara sobre a melhor época de amostragem. No entanto, o desenho experimental adotado não permite verificar se as espécies refletem de forma correta, a quantidade de lixo presente no meio ambiente. Como tal, estudos futuros, devem incidir sobre a quantidade de lixo presente no meio marinho pelo que se deve repetir o estudo realizando, em simultâneo: 1) arrastos com redes de plâncton, no caso dos peixes pelágicos; e 2) recolha de detritos de lixo depositados no fundo, junto às áreas onde se pretende amostrar os peixes no caso das espécies demersais. Só assim será possível verificar se as espécies selecionadas são capazes de refletir a quantidade de lixo presente no meio marinho de Peniche.

Referências bibliográficas

6. Referências bibliográficas

- Administração da Região Hidrográfica do Tejo I. P., 2011. PLANO DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DAS RIBEIRAS DO OESTE. Disponível em: https://www.apambiente.pt/_zdata/Políticas/Agua/ParticipacaoPublica/Documentos/ARHTejo/PBHRO/10_AAE_RelatorioAmbiental.pdf.
- Allsopp, M., Walters, A., Santillo, D., Johnston, P., 2006. Plastic Debris in the World's Oceans. Greenpeace, Amsterdam, Netherlands, 43p.
- Anderson M.J. (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26: 32–46.
- Anderson M.J., Gorley R.N. e Clarke K.R. 2008. PERMANOVA for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods. PRIMER-E, Plymouth, UK.
- APA, 2017. Programa de Monitorização do Lixo Marinho em praias. Amadora, 27p.
- APA, 2018. Monitorização do Lixo Marinho. Consultado em 25 de agosto de 2018. Disponível em: <https://www.apambiente.pt/index.php?ref=17&subref=1249>.
- Asefnejad, A., Khorasani, M.T., Behnamghader, A., Farsadzadeh, B., Bonakdar, S., 2011. Manufacturing of biodegradable polyurethane scaffolds based on polycaprolactone using a phase separation method: physical properties and in vitro assay. *International Journal of Nanomedicine* 6: 2375.
- Asensio, R.C., Moya, M.S.A., de la Roja, J.M., Gómez, M., 2009. Analytical characterization of polymers used in conservation and restoration by ATR-FTIR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395: 2081–2096.
- 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.
- Azzarello, M.Y., Van-Vleet, E.S., 1987. Marine birds and plastic pollution. *Marine Ecology Progress Series*, 37: 295–303.
- Bartell, S.M., 2006. Biomarkers, bioindicators and ecological risk assessment - a brief review and evaluation. *Environmental Bioindicators*, 1: 39–52.
- Beltran, M., Marcilla, A., 1997. Fourier transform infrared spectroscopy applied to the study of PVC decomposition. *European Polymer Journal*, 33: 1135–1142.
- Burger, J., 2006. Bioindicators: Types, Development, and Use in Ecological Assessment and Research. *Environmental Bioindicators*, 1: 22–39.
- Cairns, Jr.J. and Pratt, J.R., 1993. A History of Biological Monitoring Using Benthic Macroinvertebrates. In: Rosenberg, D.M. and Resh, V.H., Eds., *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*, Chapman & Hall, New York, 10–27.
- Coates, J., 2000. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In: Meyers, R.A. (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, pp. 10815 – 10837.

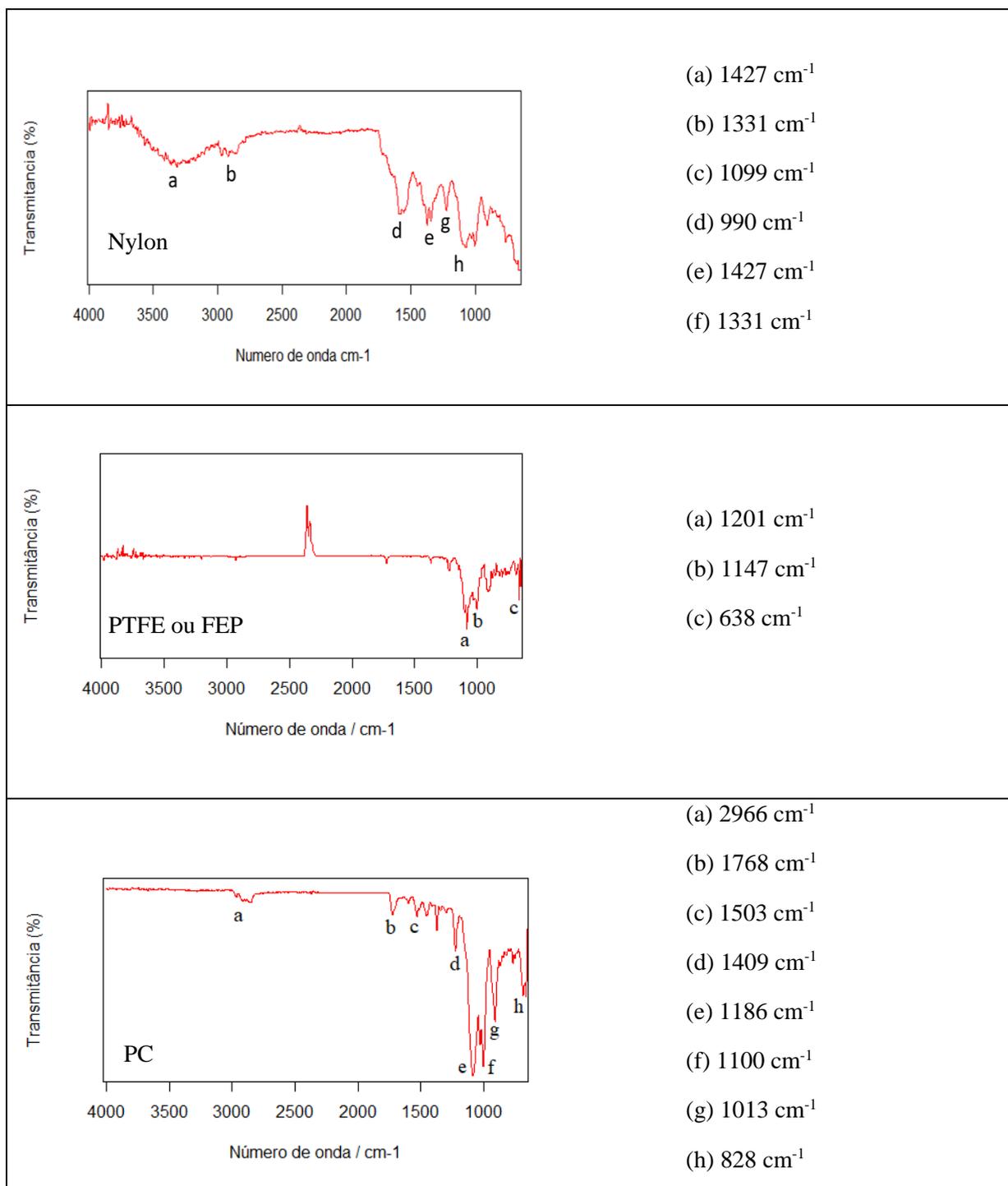
- Derraik, J.G.B., 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 842-852.
- DGRM, 2018. Diretiva Quadro Estratégia Marinha. Consultado em 2 de setembro de 2018. Disponível em: <https://www.dgrm.mm.gov.pt/web/guest/as-pem-diretiva-quadro-estrategia-marinha>.
- Dias, E.C., 2015. A circulação oceânica costeira de Portugal. Dissertação de mestrado (para obtenção do grau de Mestre em Ciências Militares Navais, na especialidade de Marinha). Escola Naval, Alfeite.
- European Commission, 2013. Environment: What should we do about plastic waste? New Green Paper opens EU-wide reflection [Press release]. Disponível em: http://europa.eu/rapid/press-release_IP-13-201_en.htm.
- Fiúza, A., Macedo, M. E., Guerreiro, M. R., 1982. Climatological space and time variation of the Portuguese coastal upwelling. *Oceanologica Acta*, 5: 31-40.
- Foekema, E.M., Gruijter, C. D., Mergia, M. T., Franeker, J. A. V., Murk, A. J., Koelmans, A. A., 2013. Plastic in North Sea Fish. *Environmental Science & Technology*, 47: 8818–8824.
- Fossi, M.C., Coppola, D., Bains, M., Giannetti, M., Guerranti, C., Marsili, L., Panti, C., Sabata, E., Clò, S., 2014. Large filter feeding marine organisms as indicators of microplastic in the pelagic environment: the case studies of the Mediterranean basking shark (*Cetorhinus maximus*) and fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Marine Environmental Research*, 100: 17–24.
- Frias, J.P.G.L., Sobral, P., Ferreira, A. M., 2010. Organic pollutants in microplastics from two beaches of the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin*, 60: 1988–1992.
- Frias, J.P.G.L., 2015. Effects of the presence of microplastic particles in Portuguese coastal waters and marine mussels. Universidade Nova de Lisboa, Portugal.
- Galgani, F., Zampoukas, N., Fleet, D., Franeker, J. v., Katsanevakis, S., Maes, T., Mouat, J., Oosterbaan, L., Poitou, I. & Hanke, G., 2010. Marine Strategy Framework Directive: Task Group 10 Report Marine Litter. Office for Official Publications of the European Communities.
- GESAMP, 2015. Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment. *International Maritime Organization*, 90: 96.
- Geyer R., Jambeck J.R., Law K.L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3: e1700782.
- Gramentz, D., 1988. Involvement of loggerhead turtle with the plastic, metal, and hydrocarbon pollution in the central Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin* 19: 11–13.
- Guidelli, E.J., Ramos, A.P., Zaniquelli, M.E.D., Baffa, O., 2011. Green synthesis of colloidal silver nanoparticles using natural rubber latex extracted from *Hevea brasiliensis*. *Spectrochimica Acta A Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 82: 140–145.
- Hamilton, N., 2015. Functions Relating to the Smoothing of Numerical Data. R package smoother. CRAN repository.
- Hanke, G., Galgani, F., Werner, S., Oosterbaan, L., Nilsson, P., Fleet, D., Kinsey S., Thompson, R., Franeker, V. J.A., Vlachogianni, T., Palatinus, A., Scoullou, M., Veiga, J.M., Matiddi, M., Alcaro, L., Maes, T., Korpinen, S., Budziak, A., Leslie, H., Gago, J., Liebezeit, G., 2013. Guidance on

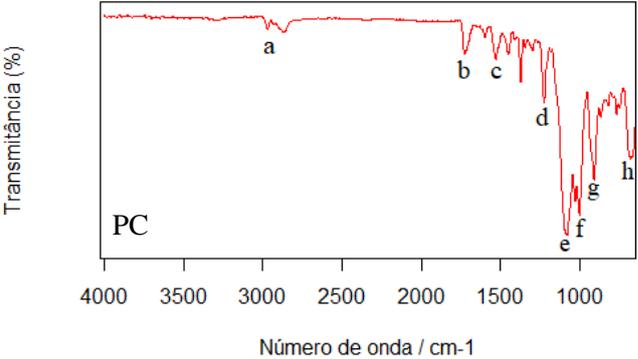
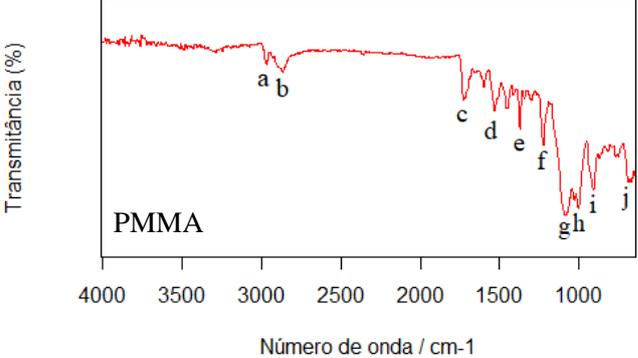
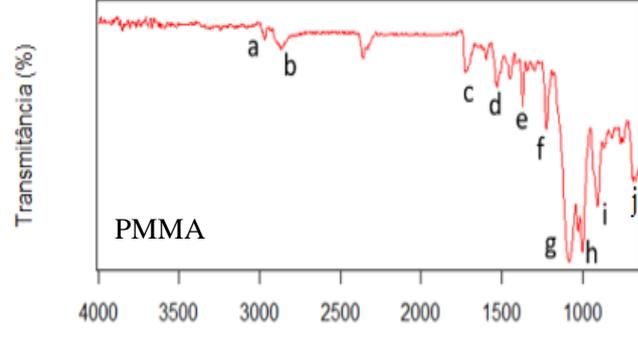
- Monitoring of Marine Litter in European Seas. European Commission. Disponível em: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC83985>.
- Hitchcock, D., B., 2009. Yates and Contingency Tables: 75 Years Later. *Journ@l Electronique d’Histoire des Probabilités et de la Statistique*, 5: 1-14.
- Instituto Hidrográfico. Consultado em 28 de julho de 2018. Disponível em: <http://www.hidrografico.pt>
- Instituto Nacional de Estatística - INE (2013). Censos 2011 - População residente por freguesia, CAOP.
- IPMA. Boletins Climatológicos. Consultado em 30 de julho de 2018. Disponível em: <http://www.ipma.pt/pt/publicacoes/boletins.jsp?cmbDep=cli&cmbTema=pcl&idDep=cli&idTema=pcl&curAno=-1>
- Jabeen, K., Su, L., Li, J., Yang, D., Tong, C., Mu, J., Shi, H., 2017. Microplastics and mesoplastics in fish from coastal and fresh waters of China. *Environmental Pollution*, 221: 141–149.
- Jung, M., R., Horgen, F., D., Orski, S., D., Rodriguez, V., C., Beers, K., L., Balazs, G., H., Jones, T., T., Work, T., M., Brignac, K., C., Royer, S., Hyrenbach, K., D., Jensen, B., A., Lynch, J., M., 2017. Validation of ATR FT-IR to identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 127: 704–716.
- Kalčíková, G., Alič, B., Skalar, T., Bundschuh, M., Gotvajn, A.Ž., 2017. Wastewater treatment plant effluents as source of cosmetic polyethylene microbeads to freshwater. *Chemosphere*, 188: 25–31.
- Kalčíkova, Gabriela, 2018. Microplastics. Seminário do Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 26 de setembro de 2018.
- Landres, P.B., Verner, J., THOMAS, J.W., 1988. Ecological Uses of Vertebrate Indicator Species: A Critique. *Conservation Biology*, 2: 316–328.
- Leticia, A.G, Gerardo, G.B., 2008. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71: 787–797.
- Lusher, A.L., McHugh, A.L., Thompson, R.C., 2013. Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine Pollution Bulletin*, 67: 94–99.
- Neves, D., Sobral, P., Ferreira, J.L., Pereira, T., 2015. Ingestion of microplastics by commercial fish off the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin*. 101: 119–126.
- Noda, I., Dowrey, A.E., Haynes, J.L., Marcott, C., 2007. Group frequency assignments for major infrared bands observed in common synthetic polymers. Mark, J.E. (Ed.), *Physical Properties of Polymers Handbook*. Springer Science Business Media, LLC, New York, pp. 395–406.
- Ogata, Y., Takada, H., Mizukawa, K., Hirai, H., Iwasa, S., Endo, S., Mato, Y., Saha, M., Okuda, K., Nakashima, A., Murakami, M., Zurcher, N., Booyatumanondo, R., Zakaria, M.P., Dung, L.Q., Gordon, M., Miguez, C., Suzuki, S., Moore, C., Karapanagioti, H.K., Weets, S., McClurg, T., Smith, W., Velkenburg, M.V., Lang, J.S., Lang, R.C., Laursen, D., Danner, B., Stewardson, N., Thompson, R.C., 2009. International pellet watch: global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs. *Marine Pollution Bulletin*, 58: 1437–1446.

- Ogle, D., 2018. Simple Fisheries Stock Assessment Methods. R package FSA. CRAN repository.
- OSPAR Commission. 2010. Guideline for Monitoring Marine Litter on the Beaches in the OSPAR Maritime Area. London. 84 pp.
- Pepin, P., Koslopw, J.A., Pearre, Jr.S., 1988. Foraging of Atlantic mackerel, *Scomber scombrus*, on Natural Zooplankton Assemblages. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45: 879–887.
- PlasticsEurope, 2017. Plastics - The Facts 2017: An analysis of European plastics production, demand and waste data, pp. 1–44.
- Rodrigues, M.O., Abrantes, N., Gonçalves, F.J.M., Nogueira, H., Marques, J.C., Gonçalves, A.M.M., 2018. Spatial and temporal distribution of microplastics in water and sediments of a freshwater system (Antuã River, Portugal). *Science of the Total. Environmental*, 633: 1549–1559.
- Rotter, G., Ishida, H., 1992. FTIR separation of nylon6 chain conformations: clarification of the mesomorphous and γ crystalline phases. *Journal Polymer Science Part B – Polymer Physics*, 30: 489–495.
- Rummel, C.D., Löder, M.G.J., Fricke, N.F., Lang, T., Griebeler, E.M., Janke, M., Gerdt, G., 2016. Plastic ingestion by pelagic and demersal fish from the North Sea and Baltic sea. *Marine Pollution Bulletin*, 102: 134–141.
- Savoca, M.S., Tyson, C.W., McGill, M., Slager, C.J., 2017. Odours from marine plastic debris induce food search behaviours in a forage fish. *Proceedings of the Royal Society B*, 284: 20171000.
- Siddig, A.A., Ellison, A.M., Ochs, A., Villar-Leeman, C., Lau, M.K., 2016. How do ecologists select and use indicator species to monitor ecological change? Insights from 14 years of publication in Ecological Indicators. *Ecological Indicators*, 60: 223–230.
- Signorell, A., 2018. Tools for Descriptive Statistics. R package DescTools. CRAN repository.
- Tanaka, K., Takada, H., 2016. Microplastic fragments and microbeads in digestive tracts of planktivorous fish from urban coastal waters. *Scientific Reports*, 6: 34351.
- UNEP, 2016. Marine Plastic Debris and Microplastics – Global Lessons and Research to Inspire Action and Guide Policy Change. United Nations Environment Programme, Nairobi. Disponível em: http://ec.europa.eu/environment/marine/good-environmental-status/descriptor-10/pdf/Marine_plastic_debris_and_microplastic_technical_report_advance_copy.pdf
- Verleye, G.A., Roeges, N.P., De Moor, M.O., 2001. Easy Identification of Plastics and Rubbers. Shropshire: *Rapra Technology Limited*, pp. 174.
- Zheng, Y., Yanful, E. K., Bassi, A. S., 2005. A Review of Plastic Waste Biodegradation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25: 243–250.

Anexo

Anexo



 <p>PC</p>	<p>(a) 2966 cm^{-1} (b) 1768 cm^{-1} (c) 1503 cm^{-1} (d) 1409 cm^{-1} (e) 1186 cm^{-1} (f) 1100 cm^{-1} (g) 1013 cm^{-1} (h) 828 cm^{-1}</p>
 <p>PMMA</p>	<p>(a) 2992 cm^{-1} (b) 2942 cm^{-1} (c) 1721 cm^{-1} (d) 1510 cm^{-1} (e) 1386 cm^{-1} (f) 1238 cm^{-1} (g) 1189 cm^{-1} (h) 1000 cm^{-1} (i) 985 cm^{-1} (j) 750 cm^{-1}</p>
 <p>PMMA</p>	<p>(a) 2992 cm^{-1} (b) 2942 cm^{-1} (c) 1721 cm^{-1} (d) 1510 cm^{-1} (e) 1386 cm^{-1} (f) 1238 cm^{-1} (g) 1189 cm^{-1} (h) 1010 cm^{-1} (i) 985 cm^{-1} (j) 750 cm^{-1}</p>

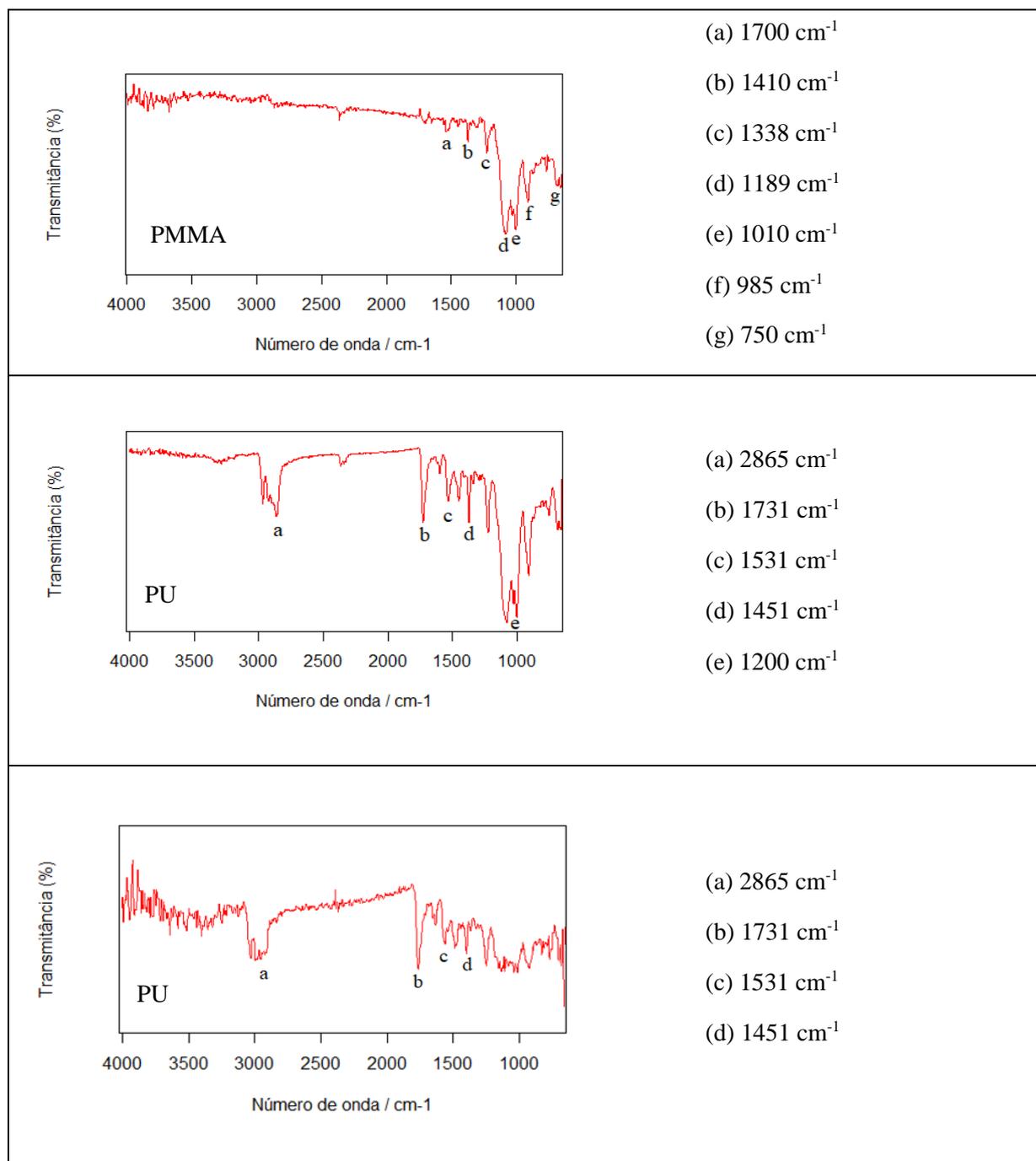


Figura A – Espectro de refletância difusa no infravermelho com transformada de Fourier (DRIFT) de Nylon, PTFE ou FEP, PC, PMMA e PU. As letras representam as bandas de absorção características (cm⁻¹).