

MESTRADO

TOXICOLOGIA E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAIS

Contaminação por partículas suspeitas de serem plásticos e microplásticos e efeitos biológicos na população de *Phorcus lineatus* da costa noroeste de Portugal

Ana Patrícia Gomes

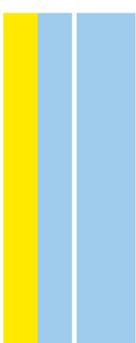
M

2021



Contaminação por partículas suspeitas de serem plásticos e microplásticos e efeitos biológicos na população de *Phorcus lineatus* da costa noroeste de Portugal

Ana Patrícia Pinto Gomes



Ana Patrícia Pinto Gomes

Contaminação por partículas suspeitas de serem plásticos e microplásticos e efeitos biológicos na população de *Phorcus lineatus* da costa noroeste de Portugal

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Toxicologia e Contaminação Ambientais submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Professora Doutora Lúcia Maria das Candeias Guilhermino

Categoria – Professora Catedrática

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto e Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental da Universidade do Porto

Coorientador – Professor Doutor Luís Gabriel Antão Barboza

Categoria – Investigador Júnior e Professor Auxiliar Convidado

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto e Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental da Universidade do Porto

O autor desta Dissertação de Mestrado agradece a oportunidade de participar nos projetos abaixo indicados e o financiamento das seguintes instituições:

- European project “*RESPONSE – Toward a risk-based assessment of microplastic pollution in marine ecosystems*”, JPI Oceans (2nd call on microplastics). The CIIMAR component of the project was funded by the “Fundação para a Ciência e a Tecnologia” (FCT), Portugal (MICROPLAST/0006/2018).
- Project “*ATLANTIDA - Platform for the monitoring of the North Atlantic Ocean and tools for the sustainable exploitation of the marine resources*”, (NORTE-01-0145-FEDER-000040), supported by the Norte Portugal Regional Operational Programme (NORTE 2020), under the PORTUGAL 2020 Partnership Agreement and through the European Regional Development Fund (ERDF).
- Project “*OCEAN3R - Reduce pressures, restore and regenerate the NW-Portuguese ocean and waters*” (project reference: NORTE-01-0145-FEDER-000064), supported by the Norte Portugal Regional Operational Programme (NORTE 2020), under the PORTUGAL 2020 Partnership Agreement and through the European Regional Development Fund (ERDF).
- Strategic projects UIDB/04423/2020 and UIDP/04423/2020, funded by FCT.
- Mestrado de Toxicologia e Contaminação Ambientais do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) e Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- ICBAS, Departamento de Estudos de Populações, Laboratório de Ecotoxicologia e Ecologia (ECOTOX).
- CIIMAR - Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Universidade do Porto, Equipa de Investigação em Ecotoxicologia, Ecologia do Stress e Saúde Ambiental (ECOTOX).



Agradecimentos

No decorrer do meu percurso acadêmico não podia deixar de agradecer a todos aqueles que me ajudaram e que estiveram presentes.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Doutora Lúcia Guilhermino por me ter dado a oportunidade de fazer parte deste projeto, por todos os seus ensinamentos, por toda a disponibilidade e paciência.

Ao Doutor Gabriel Barboza pela ajuda durante todo o procedimento experimental e pelos conhecimentos transmitidos. Um agradecimento muito grande aos restantes membros do laboratório de Ecotoxicologia e Ecologia pelo companheirismo.

Aos meus pais por serem um apoio fundamental durante todo o meu percurso acadêmico e por terem as palavras certas nos momentos certos. Ao meu irmão, à Sofia e ao meu sobrinho maravilhoso, que mesmo estando longe fisicamente, mantiveram-se por perto e foram um apoio enorme durante esta etapa. À minha madrinha por toda a ajuda e conselhos.

Ao Pedro por sempre me apoiar, por ser o abraço reconfortante nos dias mais difíceis e por sempre me lembrar de perseguir os meus sonhos, mesmo que por vezes pareça impossível.

Aos meus amigos Leonardo, Ana, Ricardo e David pela paciência que têm comigo e por serem sempre o meu escape.

Resumo

A contaminação do ambiente marinho e da sua componente biótica por detritos de plástico, incluindo partículas com dimensão inferior a 5 mm conhecidas como microplásticos, é um problema ecológico que tem vindo a aumentar. As zonas costeiras de regiões industriais e urbanizadas são particularmente vulneráveis à contaminação por plásticos uma vez que estão sob pressão antropogénica acrescida. A monitorização da contaminação destas zonas por plásticos é fundamental para entender a dimensão do problema e os efeitos que podem estar a ser exercidos nas comunidades biológicas.

Os objetivos da presente dissertação foram avaliar a contaminação de moluscos gastrópodes (*Phorcus lineatus*) da zona costeira noroeste de Portugal por partículas suspeitas de serem plásticos (PS-PL) e potenciais efeitos biológicos. Esta espécie foi escolhida como bioindicador principalmente por ser abundante em povoamentos de substrato rochoso desta zona costeira e de outras zonas costeiras do nordeste do Oceano Atlântico, por ter sido utilizado como bioindicador da poluição e dos seus efeitos em estudos anteriores e por a contaminação de populações desta espécie por plásticos ser ainda pouco conhecida.

Em novembro de 2020, foram recolhidos exemplares de *Phorcus lineatus* em seis locais de amostragem, doravante indicados por locais, localizados em praias da zona costeira do noroeste de Portugal, nomeadamente: Vila Praia de Âncora, Praia do Cabedelo, São Bartolomeu do Mar, Cabo do Mundo, Homem do Leme e São Félix da Marinha. Foram recolhidos 55 organismos em cada local, tendo também sido registados alguns parâmetros abióticos (temperatura, salinidade, pH e turbidez da água do mar). No laboratório, todos os organismos foram medidos e pesados individualmente. De 25 organismos foram isolados a glândula digestiva, as brânquias e o pé. Posteriormente as amostras foram utilizadas para a determinação de biomarcadores, nomeadamente, a atividade das enzimas colinesterases (ChE), isocitrato desidrogenase (IDH), octopina desidrogenase (ODH), glutathione S-transferases (GST), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT), e os níveis de peroxidação lipídica (LPO). Os restantes 30 organismos foram imediatamente conservados para posterior isolamento e caracterização de PS-PL. No dia em que se procedeu à extração das partículas, a glândula digestiva foi isolada separadamente das brânquias e do pé. As amostras foram pesadas. De seguida, foi feita a digestão, a filtração e a secagem das amostras. Cada filtro foi observado à lupa e as PS-PL registadas foram caracterizadas de acordo com o seu tamanho, forma e cor, quantificadas e guardadas para posterior caracterização química.

Foram encontradas algumas diferenças nos parâmetros abióticos da água do mar e nas dimensões dos exemplares recolhidos entre locais.

No total, foram recolhidas 712 PS-PL dos organismos analisados. Destas, 99,6% tinham dimensão inferior a 5 mm, sendo suspeitas de serem microplásticos. As PS-PL tinham dimensões variadas, sendo as classes de tamanho 101 – 500 μm , 501 – 1000 μm e 1001 – 2500 μm as mais registadas. As PS-PL eram na sua maioria fibras (87%), tendo ainda sido encontrados fragmentos (6%), filmes (5%) e *pellets* (1%). As cores encontradas foram: branco/esbranquiçado (36%), azul/azulado (28%), preto (17%), vermelho/avermelhado (15%) e amarelo (4%). Do número total (N = 180) de gastrópodes analisados, 94% tinham PS-PL. A percentagem de gastrópodes com PS-PL por local foi: 97% em Vila Praia de Âncora, 100% em Praia do Cabedelo, 97% em São Bartolomeu do Mar, 97% em Cabo do Mundo, 93% em Homem do Leme e 80% em São Félix da Marinha. O número total de PS-PL nos organismos recolhidos por local foi: 118 em Vila Praia de Âncora, 107 em Praia do Cabedelo, 99 em São Bartolomeu do Mar, 177 em Cabo do Mundo, 152 em Homem do Leme e 59 em São Félix da Marinha. A média e o desvio padrão (DP) do número de PS-PL por gastrópode e local foi: 4 (\pm 2) em Vila Praia de Âncora, 4 (\pm 3) em Praia do Cabedelo, 3 (\pm 3) em São Bartolomeu do Mar, 6 (\pm 3) em Cabo do Mundo, 5 (\pm 3) em Homem do Leme e 2 (\pm 2) em São Félix da Marinha. A média (\pm DP) do número de PS-PL expressa por peso da amostra de tecido analisado por local foi: 6 (\pm 3) em Vila Praia de Âncora, 8 (\pm 8) em Praia do Cabedelo, 6 (\pm 5) em São Bartolomeu do Mar, 11 (\pm 6) em Cabo do Mundo, 7 (\pm 4) em Homem do Leme e 4 (\pm 4) em São Félix da Marinha. Encontraram-se diferenças significativas no número de PS-PL por gastrópode e número de PS-PL por peso da amostra de tecido analisado entre locais.

Considerando o número total de gastrópodes recolhidos, a média (\pm DP) de cada um dos biomarcadores foi: 81 (\pm 30) para a atividade das ChE, 2 (\pm 1) para a atividade da IDH, 171 (\pm 51) para a atividade da ODH, 16 (\pm 11) para a atividade das GST nas brânquias e 117 (\pm 44) na glândula digestiva, 15 (\pm 4) para a atividade da GR, 0,5 (\pm 0,3) para a atividade da GPx, 81 (\pm 31) para a atividade da CAT e 0,7 (\pm 0,4) para os níveis de LPO. Encontraram-se diferenças significativas nos biomarcadores entre locais. A comparação entre locais, em termos gerais, permite salientar as seguintes diferenças: os gastrópodes recolhidos no Cabo do Mundo tinham menor atividade das ChE e da IDH e maior atividade das GST (brânquias) e ODH relativamente a exemplares de outros locais; os gastrópodes de Homem do Leme tinham menor atividade da IDH, maior atividade das GST (brânquias), ODH, GR e CAT e níveis de LPO mais elevados do que alguns organismos provenientes de outros locais; os gastrópodes de São Bartolomeu do Mar tinham maior atividade das GST (glândula digestiva), GR e CAT e níveis aumentados de LPO relativamente a alguns gastrópodes de outros locais.

Os resultados obtidos indicam que os organismos de *P. lineatus* da zona costeira do noroeste de Portugal apresentam considerável contaminação por uma grande diversidade

de PS-PL, principalmente por fibras e partículas suspeitas de serem microplásticos. As PS-PL, assim como outros contaminantes que se sabem estarem presentes nos locais de amostragem estudados, poderão estar a exercer efeitos adversos, tais como neurotoxicidade (Cabo do Mundo), alterações no metabolismo energético (Cabo do Mundo, Homem do Leme) e na biotransformação de xenobióticos (Cabo do Mundo, Homem do Leme e São Bartolomeu do Mar) e danos lipídicos (Homem do Leme e São Bartolomeu do Mar). A espécie investigada, *P. lineatus*, demonstrou ser adequada para a monitorização da contaminação por PS-PL e microplásticos em zonas costeiras em que seja abundante, bem como dos seus potenciais efeitos biológicos.

Na sequência deste estudo e de outros que têm vindo a ser desenvolvidos, recomenda-se a continuação e intensificação da monitorização a longo prazo em populações selvagens das águas marinhas sob jurisdição Portuguesa, de modo a aumentar o conhecimento sobre a sua contaminação por plásticos e os seus potenciais efeitos biológicos, o qual é necessário para suportar medidas de mitigação adequadas.

Palavras-chave: gastrópode marinho; *Phorcus lineatus*; população selvagem; lixo marinho; plásticos; microplásticos; biomarcadores.

Abstract

The contamination of the marine environment and its biota by plastic debris, including particles smaller than 5 mm known as microplastics, is an increasing ecological problem. Coastal areas of industrial and urbanized regions are particularly vulnerable to this type of environmental contamination as they are under increased anthropogenic pressure. Monitoring the plastic contamination in these areas is essential to understand the magnitude of the problem and its potential biological effects.

The objectives of this Master Thesis were to evaluate the contamination of molluscs gastropods (*Phorcus lineatus*) from the Northwest Atlantic coast of Portugal by particles suspected of being plastics (PS-PL) and potential biological effects. This species was selected as a bioindicator mainly because it is abundant in the rocky shore of this coastal area and other coastal areas of the Northeast Atlantic Ocean, has been used as a bioindicator of pollution in other studies and the knowledge on the contamination of populations of this species by plastics and its potential effects is still limited.

In November 2020, *Phorcus lineatus* specimens were collected at six sampling sites, hereinafter indicated as sites, in beaches of the Northwest Atlantic coast of Portugal, namely: Vila Praia de Âncora, Praia do Cabedelo, São Bartolomeu do Mar, Cabo do Mundo, Homem do Leme and São Félix da Marinha. Fifty-five organisms were collected at each site, and some abiotic parameters (temperature, salinity, pH, and turbidity of sea water) were also recorded. In the laboratory, all the organisms were weighed and measured. From 25 organisms, the digestive gland, gills, and foot were isolated. Subsequently, the samples were used for the determination of biomarkers, namely, the enzymatic activity of cholinesterase (ChE), isocitrate dehydrogenase (IDH), octopine dehydrogenase (ODH), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) and lipid peroxidation levels (LPO). The remaining 30 organisms were immediately preserved for further isolation and characterization of PS-PL. On the day of particle extraction, the digestive gland was isolated separately from the gills and foot, and all samples were weighed. Afterwards, the samples were digested, filtered, and dried according to procedures previously described in the literature. Each filter was observed with a magnifier, and each PS-PL was characterized according to its size, shape, and colour. All the PS-PL were stored for characterization of their chemical composition.

Some differences in seawater abiotic variables and in morphological parameters of the specimens among sites were found.

In total, 712 PS-PL were recovered from the analysed organisms. Of these, 99.6% were smaller than 5 mm, therefore suspected of being microplastics. PS-PL had varied dimensions, with the 101 – 500 µm, 501 – 1000 µm, and 1001 – 2500 µm size classes being particularly abundant. The PS-PL were mostly fibres (87%), and fragments (6%), films (5%)

and pellets (1%) were also found. The colours found were: white/whitish (36%), blue/bluish (28%), black (17%), red/reddish (15%) and yellow (4%). Of the total number (N = 180) of gastropods analysed, 94% had PS-PL. The percentage of gastropods with PS-PL per site was: 97% in Vila Praia de Âncora, 100% in Praia do Cabedelo, 97% in São Bartolomeu do Mar, 97% in Cabo do Mundo, 93% in Homem do Leme and 80 % in São Félix da Marinha. The total number of PS-PL recovered per organism and per site was: 118 in Vila Praia de Âncora, 107 in Praia do Cabedelo, 99 in São Bartolomeu do Mar, 177 in Cabo do Mundo, 152 in Homem do Leme and 59 in São Félix da Marinha. The mean and standard deviation (\pm SD) of the number of PS-PL per organism and per site was: 4 (\pm 2) in Vila Praia de Âncora, 4 (\pm 3) in Praia do Cabedelo, 3 (\pm 3) in São Bartolomeu do Mar, 6 (\pm 3) in Cabo do Mundo, 5 (\pm 3) in Homem do Leme and 2 (\pm 2) in São Félix da Marinha. The mean (\pm SD) of the number of PS-PL expressed per weight of the analysed tissue and per site was: 6 (\pm 3) in Vila Praia de Âncora, 8 (\pm 8) in Praia do Cabedelo, 6 (\pm 5) in São Bartolomeu do Mar, 11 (\pm 6) in Cabo do Mundo, 7 (\pm 4) in Homem do Leme and 4 (\pm 4) in São Félix da Marinha. Significant differences in the number of PS-PL per organism and in the number of PS-PL per weight of the analysed tissue among sites were found.

Considering the total number of gastropods analysed for biomarkers, the mean (\pm SD) of each biomarker was: 81 (\pm 30) for ChE activity, 2 (\pm 1) for IDH activity, 171 (\pm 51) for ODH activity, 16 (\pm 11) for GST activity in the gills and 117 (\pm 44) in the digestive gland, 15 (\pm 4) for GR activity, 0.5 (\pm 0.3) for GPx activity, 81 (\pm 31) for CAT activity and 0.7 (\pm 0.4) for LPO levels. Significant differences among sites were found. Overall, the comparison of among sites highlights the following differences: gastropods collected in Cabo do Mundo had lower ChE and IDH activity and higher GST (gills) and ODH activity compared to specimens from other sites; Homem do Leme gastropods had lower IDH activity, higher GST (gills), ODH, GR, and CAT activity and higher LPO levels than some organisms from other sites; gastropods from São Bartolomeu do Mar had higher GST (digestive gland), GR, and CAT activity and increased LPO levels than some organisms from other sites.

In summary, the results obtained indicate that *P. lineatus* from the coastal zone of the Northwest of Portugal have considerable contamination by a great diversity of PS-PL, mainly by fibres and particles suspected of being microplastics. PS-PL, as well as other contaminants known to be present in the sampling sites studied, may be inducing adverse effects in organisms, such as neurotoxicity (Cabo do Mundo), alterations in energy metabolism (Cabo do Mundo and Homem do Leme) and in the biotransformation of xenobiotics (Cabo do Mundo, Homem do Leme, and São Bartolomeu do Mar) and lipid oxidative damage (Homem do Leme and São Bartolomeu do Mar).

The results indicate that *P. lineatus* is suitable for monitoring contamination by PS-PL and microplastics in coastal areas where it is abundant, as well as its potential biological

effects. Following this study and others that have been developed, it is recommended to continue and intensify long-term monitoring of wild populations in marine waters under Portuguese jurisdiction to increase knowledge on the contamination of wild populations by plastics and its potential effects, which is necessary to support adequate mitigation measures.

Keywords: marine gastropod; *Phorcus lineatus*; wild populations; marine litter; plastics; microplastics; biomarkers.

Índice geral

Agradecimentos	III
Resumo	IV
Abstract	VII
Índice de figuras.....	XI
Índice de tabelas.....	XIII
Lista de abreviaturas.....	XIV
1. Introdução	1
1.1. Contaminação por microplásticos em águas marinhas sob jurisdição de Portugal	3
1.2. <i>Phorcus lineatus</i> como organismo bioindicador	4
1.3. Objetivos	4
2. Material e Métodos	5
2.1. Reagentes e outros agentes químicos.....	5
2.2. Locais de amostragem	5
2.3. Parâmetros morfométricos e preparação das amostras biológicas	7
2.4. Biomarcadores selecionados e sua determinação	9
2.5. Isolamento e caracterização primária das partículas	14
2.6. Análise estatística.....	16
3. Resultados	17
3.1. Parâmetros abióticos	17
3.2. Parâmetros morfométricos.....	18
3.3. Biomarcadores	19
3.4. Contaminação dos gastrópodes por partículas suspeitas de serem plásticos.....	22
4. Discussão	28
4.1. Caracterização primária das partículas suspeitas de serem plásticos	28
4.2. Contaminação dos gastrópodes por partículas suspeitas de serem plásticos.....	29
4.3. Biomarcadores	30
5. Conclusões.....	32
Referências.....	33

Índice de figuras

- Figura 1** – Foto de *Phorcus lineatus*..... 4
- Figura 2** – Localização dos locais de amostragem presentes ao longo da costa noroeste de Portugal. S1 – Vila Praia de Âncora; S2 – Praia do Cabedelo; S3 – São Bartolomeu do Mar; S4 – Cabo do Mundo; S5 – Homem do Leme; S6 – São Félix da Marinha..... 5
- Figura 3** - Esquema representativo dos parâmetros morfométricos determinados nos exemplares de *Phorcus lineatus*. A – Altura; C – Comprimento; L – Largura. 8
- Figura 4** – Média e erro padrão da média da atividade total das colinesterases do pé dos 25 gastrópodes recolhidos em cada um dos locais de amostragem. S1 - Vila Praia de Âncora; S2 - Praia do Cabedelo; S3 - São Bartolomeu do Mar; S4 - Cabo do Mundo; S5 - Homem do Leme; S6 - São Félix da Marinha. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre locais (teste de Nemenyi, $p \leq 0,05$).....20
- Figura 5** – Média e erro padrão da média da atividade enzimática da isocitrato desidrogenase (A) e da octopina desidrogenase (B) do pé dos 25 gastrópodes recolhidos em cada um dos locais de amostragem. S1 - Vila Praia de Âncora; S2 - Praia do Cabedelo; S3 - São Bartolomeu do Mar; S4 - Cabo do Mundo; S5 - Homem do Leme; S6 – São Félix da Marinha. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre locais (teste de Nemenyi, $p \leq 0,05$).....20
- Figura 6** – Média e erro padrão da média da atividade total das enzimas glutiona S-transferases nas brânquias (A) e na glândula digestiva (B) dos 25 gastrópodes recolhidos em cada um dos locais de amostragem. S1 - Vila Praia de Âncora; S2 - Praia do Cabedelo; S3 - São Bartolomeu do Mar; S4 - Cabo do Mundo; S5 - Homem do Leme; S6 - São Félix da Marinha. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre locais (teste de Tukey (A) e teste de Nemenyi (B), $p \leq 0,05$).21
- Figura 7** – Média e erro padrão da média da atividade enzimática da glutiona redutase (A) e da glutiona peroxidase (B) na glândula digestiva dos 25 gastrópodes recolhidos em cada um dos locais de amostragem. S1 - Vila Praia de Âncora; S2 - Praia do Cabedelo; S3 - São Bartolomeu do Mar; S4 - Cabo do Mundo; S5 - Homem do Leme; S6 - São Félix da Marinha. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre locais (teste de Nemenyi, $p \leq 0,05$).....21
- Figura 8** – Média e erro padrão da média da atividade enzimática da catalase (A) e dos níveis de peroxidação lipídica (B) na glândula digestiva dos 25 gastrópodes recolhidos em cada um dos locais de amostragem. S1 - Vila Praia de Âncora; S2 - Praia do Cabedelo; S3 - São Bartolomeu do Mar; S4 - Cabo do Mundo; S5 - Homem do Leme; S6 - São Félix da Marinha. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre locais (teste de Nemenyi, $p \leq 0,05$).....22

Figura 9 – Percentagem de PS-PL nas brânquias/pé (B+P) e glândula digestiva (GD) dos 30 organismos recolhidos em cada um dos locais de amostragem categorizadas por cores. S1 – Vila Praia de Âncora; S2 – Praia do Cabedelo; S3 – São Bartolomeu do Mar; S4 – Cabo do Mundo; S5 – Homem do Leme; S6 – São Félix da Marinha (S6).....23

Figura 10 – Percentagem de PS-PL nas brânquias/pé (B+P) e na glândula digestiva (GD) dos 30 organismos recolhidos em cada um dos locais de amostragem categorizadas por forma. S1 – Vila Praia de Âncora; S2 – Praia do Cabedelo; S3 – São Bartolomeu do Mar; S4 – Cabo do Mundo; S5 – Homem do Leme; S6 – São Félix da Marinha (S6).....23

Figura 11 – Percentagem de fibras nas brânquias/pé (B+P) e na glândula digestiva (GD) dos 30 organismos recolhidos em cada um dos locais de amostragem categorizadas por tamanho. S1 – Vila Praia de Âncora; S2 – Praia do Cabedelo; S3 – São Bartolomeu do Mar; S4 – Cabo do Mundo; S5 – Homem do Leme; S6 – São Félix da Marinha (S6).....24

Figura 12 – Percentagem de gastrópodes com partículas suspeitas de serem plásticos em qualquer local do corpo (Total), nas brânquias/pé, e na glândula digestiva provenientes de Vila Praia de Âncora (S1), Praia do Cabedelo (S2), São Bartolomeu do Mar (S3), Cabo do Mundo (S4), Homem do Leme (S5) e São Félix da Marinha (S6).25

Índice de tabelas

Tabela 1 – Coordenadas geográficas dos locais de amostragem.	6
Tabela 2 – Média e desvio padrão (\pm DP) dos parâmetros abióticos determinados nos locais de amostragem, nomeadamente: Vila Praia de Âncora (S1), Praia do Cabedelo (S2), São Bartolomeu do Mar (S3), Cabo do Mundo (S4), Homem do Leme (S5) e São Félix da Marinha (S6). São também apresentados os resultados do teste de Kruskal-Wallis (H) e teste de Nemenyi. N – Número de réplicas. Diferentes letras na coluna do teste de Nemenyi indicam diferenças significativas entre locais ($p \leq 0,05$).	17
Tabela 3 – Média e desvio padrão (\pm DP) dos parâmetros morfométricos determinados nos organismos provenientes, nomeadamente: Vila Praia de Âncora (S1), Praia do Cabedelo (S2), São Bartolomeu do Mar (S3), Cabo do Mundo (S4), Homem do Leme (S5) e São Félix da Marinha (S6). São também apresentados os resultados do teste de Kruskal-Wallis (H) e teste de Nemenyi. Peso corporal total (peso húmido) – peso do organismo com concha; Peso da parte corporal mole – peso total húmido do organismo sem concha; N – Número de organismos analisados. Diferentes letras na coluna do teste de Nemenyi indicam diferenças significativas entre locais ($p \leq 0,05$).	18
Tabela 4 - Média e desvio padrão (\pm DP) do número de partículas suspeitas de serem plástico por organismo (Nº PS-PL/organismo) registadas em qualquer local do corpo (Total), nas brânquias/pé, e na glândula digestiva dos organismos provenientes de Vila Praia de Âncora (S1), Praia do Cabedelo (S2), São Bartolomeu do Mar (S3), Cabo do Mundo (S4), Homem do Leme (S5) e São Félix da Marinha (S6). São também apresentados os resultados do teste de Kruskal-Wallis (H) e teste de Nemenyi. N – Número de organismos analisados. Diferentes letras na coluna do teste de Nemenyi indicam diferenças significativas entre locais ($p \leq 0,05$).	25
Tabela 5 - Média e desvio padrão (\pm DP) do número de partículas suspeitas de serem plástico por peso de amostra de tecido analisado (Nº PS-PL/g) registadas em qualquer local do corpo (Total), nas brânquias/pé, e na glândula digestiva dos organismos provenientes de Vila Praia de Âncora (S1), Praia do Cabedelo (S2), São Bartolomeu do Mar (S3), Cabo do Mundo (S4), Homem do Leme (S5) e São Félix da Marinha (S6). São também apresentados os resultados do teste de Kruskal-Wallis (H) e teste de Nemenyi. N – Número de organismos analisados. Diferentes letras na coluna do teste de Nemenyi indicam diferenças significativas entre locais ($p \leq 0,05$).	26

Lista de abreviaturas

- ADN – Ácido desoxirribonucleico
ANOVA – Análise de variância
BHT – Hidroxitolueno butilado
CAT – Enzima catalase
CDNB – 2,4-dinitroclorobenzeno
ChE – Enzimas colinesterases
DTNB – Ácido 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzóico)
DTPA – Ácido dietileno triamina pentaacético
DTT – Ditioneitol
EDTA/ Na₂EDTA – Ácido etileno diamina tetraacético
EUA – Estados Unidos da América
FT-IR – Espectroscopia infravermelha com transformação de Fourier
GPx – Enzima glutaciona peroxidase
GR – Enzima glutaciona redutase
GSH – Glutaciona reduzida
GSSG – Glutaciona oxidada
GST – Enzimas glutaciona S-transferases
H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio
IDH – Enzima isocitrato desidrogenase
KOH – Hidróxido de potássio
LPO – Peroxidação lipídica
NAHCO₃ – Hidrogenocarboneto de sódio
NADH – Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP⁺ – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
NaNO₃ – Nitrato de sódio
ODH – Enzima octopina desidrogenase
PAHs – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
PS-PL – Partículas suspeitas de serem plásticos
TBA – Ácido tiobarbitúrico
TBARS – Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TCA – Ácido tricloroacético
UV – Ultravioleta
v/v – Volume/volume

1. Introdução

Com o aumento da população humana a nível global, tem aumentado também a industrialização e a consequente poluição ambiental (Coyle *et al.*, 2020; Prata *et al.*, 2020a). Entre os principais problemas ecológicos está o lixo marinho, o qual é maioritariamente (61 a 87% segundo algumas estimativas) constituído por detritos de plástico (Barboza *et al.*, 2019).

Os plásticos são muito utilizados devido ao seu baixo custo de produção, resistência a diferentes temperaturas, versatilidade, entre outras propriedades que os tornam adequados para diversos usos, incluindo a nível médico, diversos tipos de indústria, agricultura, entre muitos outros (Prata *et al.*, 2020a). Por conseguinte, a produção de plásticos tem vindo a aumentar e, em 2019, produziram-se 57,9 milhões de toneladas de plásticos na Europa e 368 milhões de toneladas de plásticos em todo o mundo segundo algumas estimativas (PlasticsEurope, 2020).

Apesar da contribuição do plástico para a qualidade de vida humana, o seu incorreto uso e descarte tem levado à acumulação de plásticos no ambiente, com potenciais efeitos negativos em diferentes organismos, ecossistemas e saúde humana (Prata *et al.*, 2020a; Thompson *et al.*, 2004). A poluição marinha por plásticos pode ter origem em diferentes fontes (Rodrigues *et al.*, 2018). Os rios são considerados uma via de transporte importante de detritos de plástico do ecossistema terrestre para o marinho (Rodrigues *et al.*, 2018; Lebreton *et al.*, 2017). Por exemplo, os plásticos podem ser descartados para o solo através de perdas durante a manufatura e água residuais chegando ao oceano através dos rios (Lebreton *et al.*, 2017). Os plásticos podem também ser diretamente descartados para o ambiente marinho através da atividade piscatória, atividade turística, entre outros tipos de atividade marinha (Coyle *et al.*, 2020; Prata *et al.*, 2020a). Em Portugal continental, a quantidade de plásticos encontrados na costa, nomeadamente, 185,1 itens/m² de plásticos (Martins e Sobral, 2011), é superior à quantidade de plásticos encontrada em outras países com maior território como, por exemplo, a Rússia com 0,2 itens/m², onde 55,1% eram plásticos, e o Japão com 3,4 itens/m², onde 72,9% eram plásticos (Kusui *et al.*, 2003).

Os plásticos presentes no ambiente marinho são muito diversificados e incluem partículas com diversas dimensões. As partículas de plástico com dimensões inferiores a 5 milímetros são vulgarmente designadas por microplásticos (Picó e Barceló 2019). De acordo com a sua origem, os microplásticos são frequentemente divididos em microplásticos primários e microplásticos secundários. Os microplásticos primários são produzidos já com dimensões na escala dos micro- ou nanómetros para serem utilizados na indústria têxtil, equipamentos eletrónicos, produtos de higiene e cuidado pessoal, entre outros tipos de utilização (GESAMP, 2016; Picó e Barceló, 2019). Os microplásticos

secundários resultam da fragmentação sucessiva de resíduos de plástico de maior dimensão que ocorre no ambiente (GESAMP, 2016).

Os microplásticos têm uma distribuição a nível global (Coyle *et al.*, 2020). Efetivamente, os estudos que têm sido realizados demonstraram a presença de microplásticos em diversas áreas (Feng *et al.*, 2019; Reguera *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019), sendo particularmente abundantes em zonas costeiras de regiões industrializadas e urbanizadas e em zonas de confluência de correntes marinhas de grande amplitude, vulgarmente designados por “giros oceânicos” (Franco *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2020).

Os microplásticos presentes no meio marinho podem ser ingeridos por diferentes organismos (Barboza *et al.*, 2020; Bessa *et al.*, 2018; Reguera *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). A ingestão de microplásticos pode ocorrer devido a estas partículas terem semelhanças de cor, forma e tamanho com presas (Barboza *et al.*, 2018a; Feng *et al.*, 2019), acidentalmente, por exemplo em organismos que se alimentam por filtração (Reguera *et al.*, 2019). A população humana está também provavelmente exposta a microplásticos através do consumo alimentar de espécies marinhas, entre outras vias de exposição. Por exemplo, estimativas apontam para a ingestão de 842 microplásticos por ano através do consumo de tecido muscular de peixes do Oceano Atlântico em adultos (Barboza *et al.*, 2020). Para além deste tipo de efeitos, estudos laboratoriais têm demonstrado a capacidade dos microplásticos para causarem neurotoxicidade (Oliveira *et al.*, 2013), inflamação (von Moos *et al.*, 2012), supressão imunitária, apoptose hemolítica (Canesi *et al.*, 2015) peroxidação lipídica (Barboza *et al.*, 2018b), distúrbios no metabolismo energético (Wright *et al.*, 2013), alteração do comportamento (Barboza *et al.*, 2018c; Fonte *et al.*, 2016), redução do desempenho reprodutivo (Besseling *et al.*, 2014) e crescimento (Watts *et al.*, 2015), entre outros (Barboza *et al.*, 2018a; Miranda *et al.*, 2019). Por outro lado, estudos laboratoriais também documentaram a inexistência de efeitos adversos à exposição a microplásticos como, por exemplo, em zooplâncton marinho após exposição aguda (Beiras *et al.*, 2018) e em bivalves marinhos após exposição crónica (Santana *et al.*, 2018).

Diversos estudos têm também demonstrado a capacidade de vários tipos de microplásticos para modular a toxicidade de outros contaminantes ambientais, incluindo fármacos (Fonte *et al.*, 2016; Prata *et al.*, 2018), metais contaminantes (Barboza *et al.*, 2018b; Miranda *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2021), hidrocarbonetos (Oliveira *et al.*, 2013), entre outros.

Pelos motivos acima referidos, é importante continuar o estudo sobre a contaminação e efeitos de microplásticos em organismos marinhos, particularmente em populações naturais. Portugal, com a sua extensa área marítima é um dos principais consumidores de produtos provenientes da pesca *per capita* na Europa (Barboza *et al.*, 2020). Para além

disso, como Estado-Membro da União Europeia deve cumprir a Diretiva Quadro da Estratégia Marinha (MSFD, Directive, 2008/ 56/ EC) e monitorizar a qualidade das suas áreas costeiras, incluindo a presença de lixo marinho.

1.1. Contaminação por microplásticos em águas marinhas sob jurisdição de Portugal

A presença de microplásticos tem sido reportada em diversos ambientes marinhos, estando normalmente associada a centros urbanos ou áreas de elevada atividade antropogénica (Coyle *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2020). Em Portugal, diversos estudos demonstraram a presença de microplásticos em zonas costeiras, tendo a maior concentração sido encontrada na região Centro, seguida das encontradas nas regiões do Sul e do Norte (Antunes *et al.*, 2018; Martins e Sobral, 2011). Por exemplo, um estudo realizado na praia da Barra, localizada na região Centro, demonstrou que em média por cada Kg de sedimento recolhido estavam presentes 100 microplásticos (Chouchene *et al.*, 2021). Um outro estudo, realizado ao longo da costa algarvia, demonstrou que em média por cada Kg de sedimento recolhido estavam presentes 10 partículas de microplásticos (Frias *et al.*, 2016). Nas ilhas dos Açores e da Madeira a concentração de microplásticos encontrada foi menor, respetivamente, 0,077 – 0,144 e 0,040 – 0,087 microplásticos/m² (Herrera *et al.*, 2020).

Em estuários (Guilhermino *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2019) a presença de microplásticos também tem sido demonstrada. Os estudos em estuários têm tido especial relevância, dado que diferentes organismos habitam ou permanecem as primeiras fases de vida nestes locais (Rodrigues *et al.*, 2019). A exposição a microplásticos pode provocar diferentes efeitos adversos em organismos estuarinos, entre os quais, diminuir a capacidade dos organismos para discriminarem presas de microplásticos (de Sá *et al.*, 2015) e afetar o crescimento e desenvolvimento dos organismos (Rodrigues *et al.*, 2019)

Estudos em ecossistemas marinhos e estuarinos portugueses têm documentado a contaminação por microplásticos em diferentes tipos de organismos, incluindo tartarugas marinhas (Barreiros e Barcelos, 2001; Barreiros e Raykov, 2014; Pham *et al.*, 2017), aves (Nicastro *et al.*, 2018; Rodríguez *et al.*, 2016), peixes (Barboza *et al.*, 2020; Bessa *et al.*, 2018; Guilhermino *et al.*, 2021; Neves *et al.*, 2015), bivalves (Marques *et al.*, 2021; Pequeno *et al.*, 2021) e zooplâncton (Frias *et al.*, 2014). Contudo, são necessários mais estudos que indiquem os potenciais efeitos adversos provocados pela contaminação por microplásticos em populações do ambiente marinho e estuarino em Portugal com o objetivo de gerar mais conhecimento científico.

1.2. *Phorcus lineatus* como organismo bioindicador

Phorcus lineatus (da Costa, 1778), espécie também conhecida por *Monodonta lineata*, entre outras designações (Figura 1), é um gastrópode herbívoro, de dimensões e mobilidade reduzidas, amplamente distribuído ao longo da costa oeste da Europa (Almeida e Nunes, 2019). Esta espécie tem sido utilizada como bioindicador em estudos de biomonitorização da poluição e dos seus efeitos. Por exemplo, indivíduos de *P. lineatus* recolhidos na costa norte de Espanha foram utilizados para monitorizar a contaminação por microplásticos (Janssens e Garcia-Vazquez, 2021). No estuário do rio Shannon na Irlanda foram utilizados para monitorizar a contaminação por metais contaminantes (O'Leary e Breen, 1997). Em Portugal, esta espécie foi utilizada em estudos de biomonitorização da poluição por diferentes contaminantes ambientais, nomeadamente, produtos petrolíferos e seus efeitos (Tim-Tim *et al.*, 2009), bem como metais contaminantes e seus efeitos (Cabral-Oliveira *et al.*, 2015; Cunha *et al.*, 2007).



Figura 1 – Foto de *Phorcus lineatus*.

Assim, esta espécie poderá ter potencial para ser utilizada em estudos de biomonitorização da poluição por microplásticos e dos seus efeitos em zonas costeiras rochosas.

1.3. Objetivos

Os objetivos da presente dissertação foram investigar a contaminação por partículas suspeitas de serem plásticos (PS-PL) em organismos da espécie *Phorcus lineatus* recolhidos em diversos locais da zona costeira do noroeste de Portugal, assim como potenciais efeitos que possam estar a ser induzidos pela contaminação presente nesses locais.

2. Material e Métodos

2.1. Reagentes e outros agentes químicos

O reagente Biorad utilizado para a determinação da proteína nas amostras biológicas foi fornecido pela Bio-Rad (Alemanha). Os restantes agentes químicos foram de grau analítico e fornecidos pela Sigma-Aldrich (Alemanha) ou Merck (Alemanha).

2.2. Locais de amostragem

Para este estudo foram selecionados seis locais de amostragem, doravante indicados como locais, ao longo da costa noroeste de Portugal, situados nas praias de Vila Praia de Âncora (S1), Praia do Cabedelo (S2), São Bartolomeu do Mar (S3), Cabo do Mundo (S4), Homem do Leme (S5) e São Félix da Marinha (S6). Os locais estão indicados na Figura 2 e as respetivas coordenadas geográficas na Tabela 1. Estes locais foram selecionados pois têm vindo a ser utilizados pela equipa em estudos de biomonitorização da contaminação ambiental e seus efeitos biológicos.



Figura 2 – Localização dos locais de amostragem presentes ao longo da costa noroeste de Portugal. S1 – Vila Praia de Âncora; S2 – Praia do Cabedelo; S3 – São Bartolomeu do Mar; S4 – Cabo do Mundo; S5 – Homem do Leme; S6 – São Félix da Marinha.

Tabela 1 – Coordenadas geográficas dos locais de amostragem.

Local de amostragem	Coordenadas geográficas
S1 – Vila Praia de Âncora	41°48'58.931"N, 8°52'17.374"W
S2 – Praia do Cabedelo	41°40'45.922"N, 8°50'11.810"W
S3 – São Bartolomeu do Mar	41°34'27.264"N, 8°48'2.358"W
S4 – Cabo do Mundo	41°13'15.802"N, 8°42'58.092"W
S5 – Homem do Leme	41°9'31.818 "N, 8°41'10.096 "W
S6 – São Félix da Marinha	41°2'8.918"N, 8°38'55.181"W

A praia de Vila Praia de Âncora, onde se localiza S1, é extensa e situa-se nas proximidades de pequenas vilas piscatórias e da foz do Rio Âncora, o qual tem uma extensão de cerca de 21 Km desde a nascente até à foz (Tim-Tim *et al.*, 2009). Decorrente das atividades piscatórias existe um pequeno porto, o qual foi sujeito a obras de requalificação há alguns anos. Após o término da construção do novo porto a sua bacia apresentava um elevado índice de assoreamento. Por conseguinte, em certas ocasiões, o acesso ao canal e ao porto acumulam sedimentos, o que implica operações de dragagem frequentes (Santos-Ferreira *et al.*, 2015). De referenciar que a praia de Vila Praia de Âncora tem tido bandeira azul desde 2014 (APA, 2020).

A praia do Cabedelo, onde se situa o S2, tem um areal extenso e localiza-se na foz do Rio Lima. Este rio, com uma extensão de cerca de 108 Km, tem a sua nascente na Serra de São Mamede, em Espanha (Rocha *et al.*, 2021). Percorre cerca de 67 Km em território português e desagua no Oceano Atlântico na costa noroeste de Portugal, nas proximidades da cidade de Viana do Castelo. Ao longo do curso de água principal existe uma degradação da qualidade da água, em parte devido a descargas de efluentes domésticos e industriais (Guimarães *et al.*, 2012). É de referir também que o estuário do Rio Lima alberga no seu interior o Porto de Viana do Castelo e nas imediações uma fábrica de pasta de papel. Apesar da diminuição de cargas e descargas de diferentes materiais entre os anos de 2015 e 2020, o Porto de Viana do Castelo é considerado um dos grandes operadores mundiais do setor marítimo-portuário (APDL, 2019). Recentemente, realizaram-se obras de requalificação nas proximidades do Porto de Viana do Castelo, entre as quais o aprofundamento do anteporto, estradas de acesso e canal de acesso aos estaleiros (APDL, 2019). A praia do Cabedelo tem tido bandeira azul desde 2011 (APA, 2020).

A praia de São Bartolomeu do Mar, onde se situa o S3, é uma praia de areal curto com seixos (Tim-Tim *et al.*, 2009). Devido ao elevado processo erosivo sentido nesta linha de costa, foram executadas variadas ações que incluíram a demolição de 27 edificações localizadas na zona de risco, reabilitação e proteção do cordão dunar, reestruturação da

praia, entre outras (Norte, 2014). Esta praia não tem tido classificação de qualidade ambiental (APA, 2020).

A praia do Cabo do Mundo, onde se localiza S4, é uma praia com afloramentos rochosos, situa-se nas imediações das ribeiras da Joane e de Guarda e tem tido bandeira azul desde 2014 (APA, 2020). Perto da praia situa-se a antiga refinaria de petróleo de Matosinhos, uma fábrica de materiais de construção, entre outros. Para além disso, o Porto de Leixões também se localiza nas imediações da praia do Cabo do Mundo. Entre os anos de 2015 e 2020, verificou-se um aumento de cargas e descargas de diferentes tipologias no Porto de Leixões (APDL, 2019).

A praia do Homem do Leme, onde se situa S5, é uma praia de areal extenso com afloramentos rochosos e tem tido bandeira azul desde 2011 (APA, 2020). Mais a sul desagua o Rio Douro com uma extensão de 927 Km e a maior bacia hidrográfica da Península Ibérica com uma área total de 97 476 Km² (APA, 2019). Este rio com nascente na serra de Urbion em Espanha e foz no Oceano Atlântico junto às cidades do Porto e Gaia, percorre cerca de 208 Km em território português (APA, 2019). Ao longo do seu percurso, o Rio Douro está continuamente exposto a descargas de efluentes domésticos e industriais, aterros urbanos e industriais, atividades agrícolas e pecuárias, diferentes atividades de recreio, entre outros (APA, 2019).

A praia de São Félix da Marinha, onde se localiza o S6, é uma praia urbana com morfologia arenosa e rochosa onde desagua a Ribeira do Prego. Desde 2015 a praia tem tido bandeira azul (APA, 2020).

Em novembro de 2020, em cada local de amostragem foram recolhidos à mão, na zona intertidal e durante a maré baixa, 55 exemplares de *P. lineatus*: 25 para determinação de biomarcadores e 30 para investigação da sua potencial contaminação por PS-PL. Os organismos foram transportados para o laboratório o mais rapidamente possível em malas térmicas com água do local onde foram recolhidos.

Na altura da amostragem, foi medida a salinidade, a turbidez, a temperatura e o pH da água em cada um dos locais utilizando uma sonda multiparamétrica (Hydrolab DS5X, Alemanha), tendo sido feitas três determinações por local.

2.3. Parâmetros morfométricos e preparação das amostras biológicas

No laboratório, foi determinado o peso corporal total, incluindo a concha (peso húmido), de cada exemplar (balança Kern 572, Kern & Sohn GmbH, Alemanha). Foram ainda determinados os seguintes parâmetros morfométricos utilizando um paquímetro digital *Electronic Digital calliper* (China): dimensão vertical entre o vértice e a base da concha (altura); máxima dimensão entre os bordos anterior e posterior da concha

(comprimento) e máxima dimensão perpendicular à anterior (largura), conforme ilustrado na Figura 3.



Figura 3 - Esquema representativo dos parâmetros morfométricos determinados nos exemplares de *Phorcus lineatus*. A – Altura; C – Comprimento; L – Largura.

Após a determinação dos parâmetros morfométricos, os gastrópodes destinados a investigar a contaminação por PS-PL foram conservados a -20°C (Ariston, Merloni Eletrodomésticos S.A., Portugal).

Os gastrópodes destinados a determinar os biomarcadores biológicos foram colocados sobre o gelo, de modo a serem sacrificados pelo frio, sob efeito da anestesia induzida pelo frio. Utilizou-se papel de alumínio entre os organismos e o gelo para evitar quaisquer contaminações.

Todos os procedimentos descritos seguidamente foram efetuados sobre gelo, tendo os microtubos sido sempre mantidos em gelo, mesmo durante as homogeneizações. Todas as pesagens foram efetuadas numa balança *Kern 572* (Kern & Sohn GmbH, Alemanha), todas as homogeneizações foram efetuadas utilizando um homogeneizador *Ystral D-79282* (Power Technology Inc., EUA) e todas as centrifugações foram efetuadas numa centrífuga *5810 R* (Sigma-Aldrich, Alemanha). Imediatamente após a sua preparação, as amostras foram congeladas e mantidas a -80°C até à sua posterior utilização.

A componente corporal mole foi extraída da concha de cada gastrópode, tendo sido depois pesada (peso húmido) utilizando a balança anteriormente indicada. Seguidamente, a glândula digestiva, o pé e as brânquias foram isolados e cuidadosamente lavados separadamente com água ultrapura.

A glândula digestiva foi dividida em duas partes. A primeira parte foi colocada num microtubo de 2 mL com 1,3 mL de tampão fosfato (100 mM, pH = 7,4) e homogeneizada durante 15 segundos. Posteriormente, 300 μL do homogeneizado foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL com 4 μL de hidroxitolueno butilado (BHT) e metanol 4%. O restante homogeneizado foi centrifugado a 10000 g durante 15 minutos a 4°C . Do sobrenadante, foram retiradas amostras de 200 μL para três microtubos de 1,5 mL. A

segunda parte da glândula digestiva foi colocada num microtubo de 2 mL com 500 µL de tampão fosfato (100 mM, pH = 6,5) e homogeneizada durante 15 segundos. De seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 9000 g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido para um microtubo de 1,5 mL.

As brânquias foram colocadas num microtubo de 2 mL com 600 µL de tampão fosfato (100 mM, pH = 6,5) e homogeneizadas durante 20 segundos. Seguidamente, o homogeneizado foi centrifugado a 9000 g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido para um microtubo de 1,5 mL.

O pé foi dividido em três partes. A primeira parte foi colocada num microtubo de 2 mL com 1 mL de tampão Tris (50 mM, pH = 7,8) e homogeneizada durante 30 segundos. Seguidamente, o homogeneizado foi centrifugado a 3300 g durante 3 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido para um microtubo de 1,5 mL. A segunda parte do pé foi colocada num microtubo de 2 mL com 1 mL de tampão Tris (20 mM, pH = 7,5 com ácido etileno diamina tetraacético (Na₂EDTA) 1 mM e ditioneitol (DTT) 1 mM) e homogeneizada durante 30 segundos. O homogeneizado foi centrifugado a 3300 g durante 3 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido para um microtubo de 1,5 mL. A terceira parte do pé foi colocada num microtubo de 2 mL com 1 mL de tampão fosfato (100 mM, pH = 7,2) e homogeneizada durante 30 segundos. O homogeneizado foi centrifugado a 3300 g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido para um microtubo de 1,5 mL.

2.4. Biomarcadores selecionados e sua determinação

Os biomarcadores determinados foram: a atividade das enzimas colinesterases (ChE), isocitrato desidrogenase (IDH), octopina desidrogenase (ODH), glutathione S-transferases (GST), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e catalase (CAT) e os níveis de peroxidação lipídica (LPO). A atividade das ChE, IDH e ODH foram determinadas em amostras do pé, mantidas em tampão fosfato (100 mM, pH = 7,2), tampão Tris (50 mM, pH = 7,8) e tampão Tris (20 mM, pH = 7,5), respetivamente. A atividade da enzima GST foi determinada nas amostras das brânquias e da glândula digestiva, mantidas em tampão fosfato (100 mM, pH = 6,5). A atividade das enzimas GR, GPx, CAT e os níveis de LPO foram determinados em amostras da glândula digestiva, mantidos em tampão fosfato (100 mM, pH = 7,4).

A atividade total das enzimas ChE foi selecionada para este estudo como biomarcador de neurotoxicidade e porque tem sido amplamente utilizada em estudos de biomonitorização dos efeitos da poluição em organismos selvagens (Cunha *et al.*, 2007), incluindo na zona costeira da região Norte de Portugal utilizando *P. lineatus* como bioindicador (e.g. Tim-Tim *et al.*, 2009). A atividade enzimática das ChE é fortemente inibida por inseticidas organofosforados e carbamatos, sendo também inibida por outros

contaminantes ambientais em algumas espécies, podendo afetar o desempenho na transmissão colinérgica no sistema nervoso de invertebrados e vertebrados (Guilhermino *et al.*, 1998). Estas têm também um papel importante na biotransformação de alguns agentes químicos que ocorrem como contaminantes ambientais (Guilhermino *et al.*, 1998).

A atividade das enzimas IDH e ODH foi selecionada para este estudo dada a sua importância na produção de energia celular. Em estudos de monitorização com moluscos, são normalmente utilizadas como biomarcadores dos processos energéticos aeróbio e anaeróbio, respetivamente (Lima *et al.*, 2007). A IDH é responsável pela regeneração de NADPH, cofator da GR na conversão de glutathiona oxidada (GSSG) em glutathiona reduzida (GSH), durante o ciclo do ácido cítrico (Lima *et al.*, 2007). A ODH é uma enzima que substitui a lactato desidrogenase e regenera NAD⁺ durante a glicólise anaeróbia nos tecidos de alguns invertebrados marinhos (Lima *et al.*, 2007; Livingstone *et al.*, 1990).

A atividade total das enzimas GST foi selecionada por desempenhar uma função fundamental no processo de biotransformação e nas defesas antioxidantes. Estas enzimas catalisam a conjugação da GSH com compostos eletrofílicos facilitando a sua posterior eliminação (Bhagat *et al.*, 2016; Prokić *et al.*, 2019). São também responsáveis pela defesa de proteínas, lípidos e ADN contra danos oxidativos (Bhagat *et al.*, 2016). A presença de contaminantes ambientais (e.g. hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – PAHs – pesticidas) induz a atividade das GST, por outro lado, pode ser inibida por outros, como por exemplo alguns metais pesados (Cunha *et al.*, 2007). Dada a sua relevância, tem sido também muito utilizada em estudos de biomonitorização ambiental, incluindo em *P. lineatus* (Cunha *et al.*, 2007; Madeira *et al.*, 2019; Tim-Tim *et al.*, 2009).

Foram também selecionados como biomarcadores, as atividades de enzimas antioxidantes dada a sua importância na prevenção contra o aumento do stresse oxidativo e rápida resposta a muitos contaminantes ambientais que aumentam este tipo de stresse. A oxidação da GSH é catalisada pela GPx dando origem a GSSG; a reação em sentido contrário é catalisada pela GR (Lima *et al.*, 2007). A CAT facilita a remoção de peróxido de hidrogénio (H₂O₂), metabolizando-o em água e oxigénio molecular (Prokić *et al.*, 2019). Como a atividade das enzimas antioxidantes é induzida perante a presença de alguns contaminantes ambientais, as mesmas têm sido utilizadas em diferentes estudos (Almeida e Nunes, 2019; Fernández *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2007; Madeira *et al.*, 2019).

Os níveis de LPO foram selecionados porque indicam dano oxidativo em lípidos, um efeito que pode comprometer a integridade das membranas, afetar muitos processos fisiológicos e facilitar a entrada de contaminantes ambientais nos organismos e nas células (Bhagat *et al.*, 2016; Prokić *et al.*, 2019). Por conseguinte, os níveis de LPO são vulgarmente determinados em estudos de biomonitorização (Fernández *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2007; Madeira *et al.*, 2019).

No dia em que se procedeu à determinação de cada biomarcador, as amostras foram descongeladas em gelo. Posteriormente, determinou-se para cada uma das amostras a quantidade de proteína utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976), adaptado a microplaca (Frasco *et al.*, 2002). De forma resumida, numa microplaca de 96 poços, foi feita uma curva de calibração utilizando gama-globulinas de bovino como proteína padrão. Cada amostra foi diluída 1:4 (v/v) com o tampão no qual a amostra estava conservada. Para a determinação da proteína, colocaram-se 10 µL de amostra diluída e 40 µL de tampão correspondente a cada biomarcador. De seguida, transferiu-se 10 µL das amostras diluídas para os três poços seguintes e adicionou-se 250 µL de solução de Biorad (1 porção de Biorad para 4 de água ultrapura). Após 15 minutos à temperatura ambiente num agitador (Orbital Shaker SO3, Stuart Scientific, Reino Unido), fez-se a leitura da absorvância a 600 nm e a 25°C (espectrofotómetro Bio-Tek Powerwave 340, Bio-Tek instruments, EUA). Com base nas determinações efetuadas, a proteína das amostras enzimáticas foi padronizada para 1 mg/mL.

A atividade das enzimas ChE, IDH, ODH, GST, GPx e GR e os níveis de LPO foram determinados no espectrofotómetro indicado para a determinação da proteína, a 25°C. A atividade da enzima CAT foi determinada num espectrofotómetro *UV-Vis V-630* (Jasco, EUA) a 240 nm e 25°C.

Para a determinação da atividade total das enzimas ChE utilizou-se o método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961) adaptado a microplaca (Guilhermino *et al.*, 1996). De forma resumida, foi preparada uma solução de reação contendo 200 µL de uma solução de acetilcolina (75 mM preparada com 0,1084 g de acetilcolina em 5 mL de água ultrapura) e 1 mL de uma solução de ácido 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DTNB) (10 mM preparada com 0,0198 g de DTNB e 0,0075 g de hidrogenocarboneto de sódio (NaCHO₃) em 5 mL de tampão fosfato 100 mM, pH = 7,2) em 30 mL de tampão fosfato (100 mM, pH = 7,2). A cada um de 3 poços de uma microplaca, foram adicionados 50 µL de amostra ou tampão fosfato (100 mM, pH = 7,2) no caso das réplicas de branco. Seguidamente, adicionou-se 250 µL de solução de reação a cada poço. A absorvância foi lida imediatamente a 405 nm durante 5 minutos.

Relativamente à determinação da atividade enzimática da IDH utilizou-se o método de Ellis e Goldberg (Ellis e Goldberg, 1971) adaptado a microplaca (Lima *et al.*, 2007). Resumidamente, foi preparada uma solução de reação contendo 15 mL de uma solução de cloreto de manganésio (II) tetrahidratado (20 mM preparada com 0,0594 g de cloreto de manganésio (II) tetrahidratado em 15 mL de água ultrapura) e 15 mL de uma solução de DL-isocítrico (72 mM preparada com 0,2795 g de ácido DL-isocítrico em 15 mL de água ultrapura) em 40 mL de tampão Tris (50 mM, pH = 7,8). A cada um de 3 poços de uma microplaca, foram adicionados 50 µL de amostra ou tampão Tris (50 mM, pH = 7,8) no caso

das réplicas de branco. De seguida, foram adicionados 200 µL de solução de reação a cada poço. Para iniciar a reação, adicionaram-se 50 µL de uma solução de NADP⁺ (3 mM diluindo 0,0574 g de NADP⁺ em 25 mL de água ultrapura) a cada poço. A absorvância foi lida seguidamente a 340 nm durante 3 minutos.

Para a determinação da atividade da enzima ODH utilizou-se o método de Livingstone (Livingstone *et al.*, 1990). Resumidamente, foi adicionado a cada um de 3 poços de uma microplaca 50 µL de amostra ou tampão Tris (20 mM, pH = 7,5) no caso das réplicas de branco. Após este passo, adicionaram-se 200 µL de solução de reação, previamente preparada com 15 mL de uma solução de L-Arginina (33 mM diluindo 0,0871 g de L-Arginina em 15 mL de água ultrapura), 40 mL de tampão Tris (20 mM, pH = 7,5), 15 mL de uma solução de NADH (1,6 mM preparada com 0,0170 g de NADH em 15 mL de água ultrapura) e 30 mL água ultrapura. Com o intuito de iniciar a reação, adicionaram-se 50 µL de uma solução de piruvato de sódio (5 mM diluindo 0,0055 g de piruvato de sódio em 10 mL de tampão Tris 20 mM, pH = 7,5). De imediato, foi lida absorvância a 340 nm durante 3 minutos.

Quanto à atividade total das enzimas GST foi determinada segundo o método de Habig (Habig *et al.*, 1974). De forma resumida, foi preparada uma solução de reação contendo 150 µL de uma solução de 2,4-dinitroclorobenzeno (CDNB) (60 mM preparada com 0,6077 g de CDNB em 50 mL de etanol 100%) e 900 µL de uma solução de GSH (10 mM diluindo 0,3073 g de GSH em 100 mL de tampão fosfato 100 mM, pH = 6,5) em 4,95 mL de tampão fosfato (100 mM, pH = 6,5). A cada um de 3 poços de uma microplaca, foram adicionados 50 µL de amostra ou tampão fosfato (100 mM, pH = 6,5) no caso das réplicas de branco. Seguidamente, adicionou-se 250 µL de solução de reação a cada poço. A absorvância foi lida imediatamente a 340 nm durante 5 minutos.

Para a determinação da atividade da enzima GPx utilizou-se o método de Flohé e Günzler (Flohé e Günzler, 1984) adaptado a microplaca (Lima *et al.*, 2007). Resumidamente, a cada um de 3 poços de uma microplaca adicionaram-se 50 µL de amostra ou tampão fosfato (100 mM, pH = 7,5 preparado com 0,0065 g de nitrato de sódio (NaNO₃) em 100 mL de tampão fosfato 100 mM, pH = 7,5) no caso das réplicas de branco. De seguida, foram adicionados a cada poço 130 µL de tampão fosfato (100 mM, pH = 7,5 com NaNO₃), 30 µL de uma solução de GR (30 U/mL preparada com 539 µL de GR em 20 mL de tampão fosfato 100 mM, pH = 7,5) e 30 µL de uma solução de GSH (0,2 mM preparada com 0,0615 g em 1 L de tampão fosfato 100 mM, pH = 7,5). Após 10 minutos de incubação, foram adicionados a cada poço 30 µL de uma solução de NADPH (1 mM preparada com 0,7440 g de NADPH em 1 L de tampão Tris 100 mM, pH = 7,0) e 30 µL de uma solução de H₂O₂ (6 mM preparada com 0,2041 g de H₂O₂ em 1 L de tampão fosfato 100 mM, pH=7,5). De imediato, foi lida a absorvância a 340 nm durante 5 minutos. Foi

realizado exatamente o mesmo procedimento numa segunda microplaca, contudo não foi adicionado H_2O_2 às amostras.

Relativamente à determinação da atividade da enzima GR utilizou-se o método de Calberg e Mannervik (Carlberg e Mannervik, 1975) adaptado a microplaca (Lima *et al.*, 2007). De forma resumida, a cada um de 3 poços de uma microplaca adicionaram-se 50 μ L de amostra ou tampão fosfato (100 mM, pH = 7,5) no caso das réplicas de branco. Após este passo, foram adicionados 190 μ L de tampão fosfato (100 mM, pH = 7,5) e 30 μ L de uma solução de GSSG (5 mM diluindo 0,0460 g de GSSG em 15 mL de água ultrapura). Após 10 minutos de incubação, foi iniciada a reação com 30 μ L de uma solução de NADPH (1 mM diluindo 0,0125 g de NADPH em 15 mL de tampão Tris 10 mM). A leitura da absorvância foi lida seguidamente a 340 nm durante 3 minutos.

Quanto à determinação da atividade enzimática da CAT utilizou-se o método de Aebi (Aebi, 1984). Foram adicionados a uma *cuvette* 50 μ L de amostra ou tampão fosfato (50 mM, pH = 7,0) no caso das réplicas de branco. De seguida, foram adicionados 950 μ L de tampão fosfato (50 mM, pH = 7,0) e 500 μ L de uma solução de H_2O_2 (30 mM diluindo 238 μ L de H_2O_2 em 70 mL de tampão fosfato 50 mM, pH = 7,0) para iniciar a reação. A leitura da absorvância foi imediatamente realizada a 240 nm durante 1 minuto.

Os níveis de LPO foram determinados através da quantificação das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) segundo o método de Ohkawa (Ohkawa *et al.*, 1979). Resumidamente, foi preparada uma solução de ácido tricloroacético 12% (TCA) (preparada com 12 g de TCA em 100 mL de água ultrapura) e uma solução de ácido tiobarbitúrico 0,73% (TBA) (preparada com 0,73 g de TBA em 100 mL de água ultrapura). O tampão Tris-HCl (60 mM, pH = 7,4) foi preparado com uma solução de Tris-HCL (1,89 g de Tris-HCL diluído em 50 mL de água ultrapura) e uma solução de ácido pentético (DTPA) (0,1 mM diluindo 0,0071 g de DTPA em 50 mL de água ultrapura). De seguida, foram transferidos 200 μ L do homogeneizado de glândula digestiva para tubos de 15 mL e foram preparadas 3 réplicas de branco com 200 μ L de tampão fosfato (100 mM, pH = 7,4). Posteriormente, a cada tubo foi adicionado 1 mL de solução de TCA 12%, 800 μ L de tampão Tris-HCl (60 mM, pH = 7,4) e 1 mL de solução de TBA 0,73%. Após 60 minutos a 100°C, as amostras foram centrifugadas a 11500 g durante 5 minutos e 25°C utilizando a centrífuga referida na secção 2.4. Após este passo, foram recolhidos 300 μ L do sobrenadante para cada um de 3 poços de uma microplaca. A absorvância foi lida imediatamente a 535 nm.

No final da determinação da atividade das enzimas e dos níveis de LPO, a quantidade de proteína em cada amostra foi novamente determinada e este valor foi utilizado para expressar a atividade enzimática. Todas as atividades enzimáticas foram determinadas a partir da parte linear da curva de reação. As atividades das enzimas ChE, IDH, ODH, GST,

GPx e GR foram expressas em nanomoles de substrato hidrolisado por minuto por mg de proteína (nmol/min/mg de proteína). A atividade da enzima CAT foi expressa em micromoles de substrato hidrolisado por minuto por mg de proteína ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína). Os níveis de LPO foram expressos em nanomoles de TBARS por mg de proteína (nmol TBARS/mg de proteína).

2.5. Isolamento e caracterização primária das partículas

O procedimento experimental foi executado em áreas previamente limpas e de acesso restrito. Todas as medidas recomendadas para evitar a contaminação externa e cruzada das amostras foram seguidas, tal como recomendado em Gago *et al.* (2018). Resumidamente, foi utilizada uma bata de algodão limpa, luvas de nitrilo e dadas as circunstâncias relativamente à contingência do COVID-19 foi utilizada máscara de algodão feita por uma costureira local. Todas as superfícies de trabalho e instrumentos (tesoura, pinça, bisturi, entre outros) utilizados foram limpos com etanol a 70%. Os materiais de vidro (gobelés, caixas de Petri, balões volumétricos, entre outros) foram limpos com água ultrapura. Estes procedimentos de limpeza e desinfecção foram realizados antes, entre amostras e no final de cada etapa experimental. Todos os filtros de microfibras de vidro e poro de tamanho 1,2 μm (Munktell & Filtrak GmbH, Alemanha) utilizados durante o procedimento experimental foram previamente analisados numa lupa (SMZ800, Nikon, Japão) com câmara CMOS incorporada (Leica S9i, Leica Microsystems GmbH, Alemanha), com o intuito de verificar possíveis contaminações. Em todas as etapas do procedimento experimental foram utilizadas três placas de Petri com filtros para servirem de controlo relativamente a potencial contaminação externa. No final de cada etapa experimental os filtros foram tapados e posteriormente analisados na lupa anteriormente referida (Barboza *et al.*, 2020; Dehaut *et al.*, 2016). O processo de digestão e filtração das amostras foi realizado numa *hotte* (Industrial Laborum Ibérica, Portugal). Para o processo de digestão foram utilizados brancos, apenas com água ultrapura e hidróxido de potássio 10% (KOH) (Barboza *et al.*, 2020). Os brancos foram filtrados e analisados simultaneamente com as amostras de forma a verificar possíveis contaminações provenientes das soluções utilizadas durante o procedimento experimental (Dehaut *et al.*, 2016).

No dia dos procedimentos de extração de partículas, os gastrópodes que tinham sido reservados para o efeito foram descongelados. Foi lavada a concha de cada organismo duas vezes com água ultrapura e uma vez com etanol 70% (Karami *et al.*, 2017). Os organismos foram colocados num tabuleiro forrado com papel de alumínio e tapados com papel de alumínio, para evitar quaisquer contaminações. De seguida foi extraído a cada organismo o tecido corporal da concha, tendo sido depois pesado utilizando a balança *HL-200i* (A&D Company, Limited, Japão). Cada organismo foi cuidadosamente lavado com

água ultrapura. Seguidamente, a glândula digestiva foi isolada e pesada utilizando a balança anteriormente referida. Após este passo, o pé e as brânquias foram isolados e pesados em conjunto utilizando a balança anteriormente mencionada.

A cada amostra foi adicionado um volume de uma solução de KOH 10%, previamente preparada com água ultrapura, pelo menos três vezes superior ao volume do material biológico, com o intuito de digerir a matéria orgânica das amostras. Seguidamente, todas as amostras foram incubadas durante 24 horas a 60°C numa estufa (Binder BD056, ProfiLab24 GmbH, Alemanha), tal como indicado em Dehaut *et al.* (2016). Quando finalizada esta etapa, cada amostra foi filtrada em condições de vácuo através de um filtro de microfibras de vidro e poro de tamanho 1,2 µm (Munktell & Filtrak GmbH, Alemanha) com o auxílio de uma bomba (Chemical Duty Pump WP6122050, Merck Millipore, Alemanha). Cada filtro foi cuidadosamente colocado numa caixa de Petri, a qual foi fechada. De seguida, as caixas de Petri com os filtros foram colocadas na estufa anteriormente mencionada durante 24 horas a 40°C.

Cada filtro foi observado à lupa (SMZ800, Nikon, Japão) com câmara CMOS (Leica S9i, Leica Microsystems GmbH, Alemanha) e sistema de imagem acoplados e cada uma das partículas foi fotografada. As imagens foram comparadas com partículas identificadas como plástico por espectroscopia infravermelha com transformação de Fourier (FT-IR) em trabalhos anteriores e posteriormente analisadas utilizando um programa de imagem (ImageJ disponível em <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>), o qual foi também utilizado para medir cada uma das partículas.

As partículas suspeitas de serem plásticos foram caracterizadas primariamente, de acordo com o seu tamanho, forma e cor. Para caracterização da forma, as partículas foram divididas e quantificadas nas seguintes categorias (Karami *et al.*, 2017): fibra – partícula fina e alongada; fragmento – partícula irregular; *pellets* – partícula regular; filme – partícula fina e maleável. Relativamente à cor, foram consideradas as seguintes categorias (Guilhermino *et al.*, 2021): brancas/esbranquiçadas, transparente, azul/azuladas, preto, cinzento, vermelho/avermelhado (incluindo rosa e laranja), amarelo, entre outras. De acordo com a sua maior dimensão, as partículas foram incluídas nas seguintes classes de tamanho (Barboza *et al.*, 2020; Guilhermino *et al.*, 2021): ≤ 100 µm; 101 – 150 µm; 151 – 500 µm; 501 – 1500 µm; 1501 – 3000 µm; 3001 – 4999 µm; ≥ 5000 µm.

As concentrações de PS-PL foram expressas como número de PS-PL por organismo (número PS-PL/organismo) ou número de PS-PL por peso da amostra de tecido analisado (número PS-PL/g).

2.6. Análise estatística

Os dados de cada parâmetro abiótico e biológico foram testados separadamente quanto à normalidade da sua distribuição utilizando o teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variância utilizando o teste de Levene. Quando estes requisitos da Análise de Variância (ANOVA) foram conseguidos (sem ou com transformação dos dados), utilizou-se a ANOVA de um fator para comparar os dados dos diferentes locais, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. Nos restantes casos, os locais ou os organismos neles recolhidos foram comparados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando foram obtidas diferenças significativas utilizou-se de seguida o teste de Nemenyi (Zar, 1999).

As análises estatísticas e a comparação dos dados dos diferentes locais utilizando o teste de comparações múltiplas de Tukey foram realizadas no programa IBM SPSS *Statistics* versão 27. No caso de existirem diferenças estatisticamente significativas a comparação entre os grupos utilizando o teste de Nemenyi foi realizada no programa Microsoft Office Excel 365. As diferenças entre os grupos analisados foram consideradas significativas para um valor de $p \leq 0,05$.

3. Resultados

3.1. Parâmetros abióticos

Os resultados dos parâmetros abióticos e da sua análise estatística estão indicados na Tabela 2.

Tabela 2 – Média e desvio padrão (\pm DP) dos parâmetros abióticos determinados nos locais de amostragem, nomeadamente: Vila Praia de Âncora (S1), Praia do Cabedelo (S2), São Bartolomeu do Mar (S3), Cabo do Mundo (S4), Homem do Leme (S5) e São Félix da Marinha (S6). São também apresentados os resultados do teste de Kruskal-Wallis (H) e teste de Nemenyi. N – Número de réplicas. Diferentes letras na coluna do teste de Nemenyi indicam diferenças significativas entre locais ($p \leq 0,05$).

Parâmetros abióticos	N	Locais de amostragem	Média (\pm DP)	Teste Nemenyi	Teste Kruskal-Wallis
Temperatura (°C)	3	S1	13,5 (\pm 0,3)	b	$H_5 = 15,756$; $p = 0,008$
		S2	14,09 (\pm 0,08)	a, b	
		S3	15,07 (\pm 0,07)	a	
		S4	14,75 (\pm 0,02)	a, b	
		S5	15,083 (\pm 0,006)	a	
		S6	14,12 (\pm 0,09)	a, b	
pH	3	S1	8,3 (\pm 0,2)		$H_5 = 7,364$; $p = 0,195$
		S2	8,2 (\pm 0,2)		
		S3	8,267 (\pm 0,003)		
		S4	8,08 (\pm 0,06)		
		S5	8,26 (\pm 0,03)		
		S6	8,27 (\pm 0,06)		
Salinidade (mScm)	3	S1	34,21 (\pm 0,01)	b	$H_5 = 15,855$; $p = 0,007$
		S2	35,11 (\pm 0,06)	a, b	
		S3	34,703 (\pm 0,006)	a, b	
		S4	35,7 (\pm 0,2)	a	
		S5	35,63 (\pm 0,01)	a	
		S6	35,3 (\pm 0,2)	a, b	
Turbidez (NTU)	3	S1	2,7 (\pm 0,2)	a, b	$H_5 = 16,182$; $p = 0,006$
		S2	1,4 (\pm 0,2)	b	
		S3	12,2 (\pm 0,3)	a	
		S4	8,67 (\pm 0,06)	a, b	
		S5	2,13 (\pm 0,06)	a, b	
		S6	2,2 (\pm 0,2)	a, b	

Foram encontradas diferenças significativas de temperatura, salinidade e turbidez da água entre locais. Relativamente ao pH da água não se obtiveram diferenças significativas entre locais.

A temperatura da água nos locais S3 e S5 era superior à registada no local S1. Quanto à salinidade nos locais S3 e S4 era superior à registada no local S1. A turbidez da água no local S3 era superior à registada no local S2.

3.2. Parâmetros morfométricos

Os resultados dos parâmetros morfométricos dos gastrópodes e os resultados da sua análise estatística estão indicados na Tabela 3.

Tabela 3 – Média e desvio padrão (\pm DP) dos parâmetros morfométricos determinados nos organismos provenientes, nomeadamente: Vila Praia de Âncora (S1), Praia do Cabedelo (S2), São Bartolomeu do Mar (S3), Cabo do Mundo (S4), Homem do Leme (S5) e São Félix da Marinha (S6). São também apresentados os resultados do teste de Kruskal-Wallis (H) e teste de Nemenyi. Peso corporal total (peso húmido) – peso do organismo com concha; Peso da parte corporal mole – peso total húmido do organismo sem concha; N – Número de organismos analisados. Diferentes letras na coluna do teste de Nemenyi indicam diferenças significativas entre locais ($p \leq 0,05$).

Parâmetros morfométricos	N	Locais de amostragem	Média (\pm DP)	Teste Nemenyi	Teste Kruskal-Wallis
Altura (cm)	55	S1	1,2 (\pm 0,1)	a	H ₅ = 35,264; p < 0,001
		S2	1,1 (\pm 0,2)	b	
		S3	1,1 (\pm 0,1)	b	
		S4	1,1 (\pm 0,1)	b	
		S5	1,1 (\pm 0,1)	b	
		S6	1,1 (\pm 0,1)	b	
Comprimento (cm)	55	S1	1,8 (\pm 0,1)	a	H ₅ = 92,029; p < 0,001
		S2	1,5 (\pm 0,3)	d	
		S3	1,6 (\pm 0,1)	c, d	
		S4	1,5 (\pm 0,2)	d	
		S5	1,7 (\pm 0,1)	a, b	
		S6	1,6 (\pm 0,2)	b, c	
Largura (cm)	55	S1	1,6 (\pm 0,1)	a	H ₅ = 81,681; p < 0,001
		S2	1,3 (\pm 0,3)	c, d	
		S3	1,4 (\pm 0,1)	c, d	
		S4	1,3 (\pm 0,1)	d	
		S5	1,5 (\pm 0,1)	a, b	
		S6	1,4 (\pm 0,1)	b, c	
Peso corporal total (g)	55	S1	3,4 (\pm 0,6)	a	H ₅ = 113,692; p < 0,001
		S2	3 (\pm 1)	b	

		S3	2,7 (\pm 0,5)	b	
		S4	2,1 (\pm 0,6)	c	
		S5	3,2 (\pm 0,6)	a	
		S6	2,6 (\pm 0,7)	b	
		S1	0,8 (\pm 0,2)	a	
		S2	0,5 (\pm 0,3)	c	
Peso da parte corporal mole (g)	55	S3	0,5 (\pm 0,1)	b, c	$H_5 = 124,762$; $p < 0,001$
		S4	0,5 (\pm 0,1)	b, c	
		S5	0,9 (\pm 0,2)	a	
		S6	0,6 (\pm 0,2)	b	

Foram encontradas diferenças significativas na altura, comprimento, largura, peso corporal total e peso da parte corporal mole.

A altura dos gastrópodes do local S1 era superior à registada nos gastrópodes dos restantes locais que não apresentavam diferenças entre si. O comprimento dos organismos de S1 era superior ao registado nos organismos de S2, S3, S4 e S6. O mesmo se verificou quando comparados os organismos de S5 com os de S2, S3 e S4 e os de S6 com os de S2 e S4. A largura dos gastrópodes de S1 era superior em relação aos gastrópodes de S2, S3, S4 e S6. O mesmo foi perceptível quando comparados os gastrópodes de S5 com os de S2, S3 e S4 e os gastrópodes de S6 com os de S4. O peso corporal total dos gastrópodes de S1 e S5 era superior ao registados nos gastrópodes dos restantes locais. Os gastrópodes de S4 apresentaram peso corporal total inferior ao registado nos gastrópodes dos restantes locais de amostragem. O peso da parte corporal mole dos organismos de S1 e S5 era superior aos organismos dos restantes locais. O mesmo se verificou nos gastrópodes de S6 em comparação com os de S2.

3.3. Biomarcadores

Os resultados dos biomarcadores são apresentados nas Figuras 4 a 8. Foram encontradas diferenças significativas entre organismos provenientes de diferentes locais nos seguintes biomarcadores: atividade das enzimas ChE ($H_5 = 16,886$; $p = 0,005$), IDH ($H_5 = 33,351$; $p < 0,001$), ODH ($H_5 = 22,579$; $p < 0,001$), GST nas brânquias ($F_{5, 144} = 4,510$; $p < 0,001$) e na glândula digestiva ($H_5 = 91,205$; $p < 0,001$), GR ($H_5 = 58,393$; $p < 0,001$), CAT ($H_5 = 76,095$; $p < 0,001$) e níveis de peroxidação lipídica ($H_5 = 51,275$; $p < 0,001$). Não foram encontradas diferenças significativas na atividade da enzima GPx ($F_{5, 144} = 0,962$; $p = 0,443$).

Os organismos recolhidos em S1 e S6 apresentaram atividade das enzimas ChE semelhantes aos observados em S2, S3 e S5, sendo mais elevados do que os observados em gastrópodes do local S4 (Figura 4).

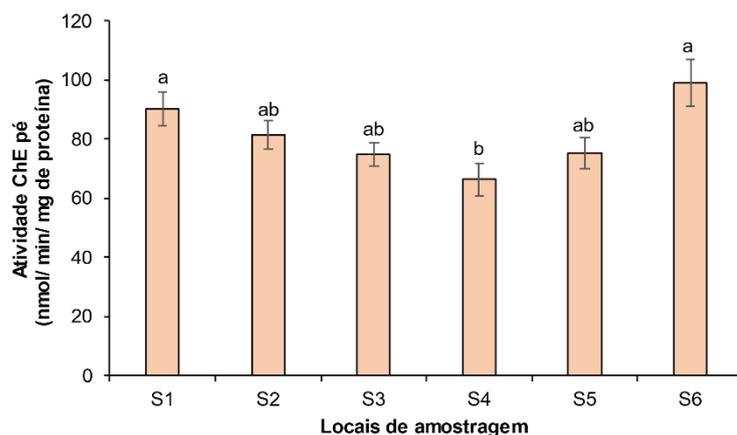


Figura 4 – Média e erro padrão da média da atividade total das colinesterases do pé dos 25 gastrópodes recolhidos em cada um dos locais de amostragem. S1 - Vila Praia de Âncora; S2 - Praia do Cabedelo; S3 - São Bartolomeu do Mar; S4 - Cabo do Mundo; S5 - Homem do Leme; S6 - São Félix da Marinha. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre locais (teste de Nemenyi, $p \leq 0,05$).

Os organismos recolhidos em S2, S3 e S6 apresentaram atividade da enzima IDH semelhantes aos observados em S1, sendo superior aos observados em gastrópodes S4 e S5 (Figura 5-A). Os organismos recolhidos em S1, S4 e S5 exibiram atividade da enzima ODH semelhantes aos observados em S2 e S3, sendo mais elevados do que os observados em organismos do local S6 (Figura 5-B).

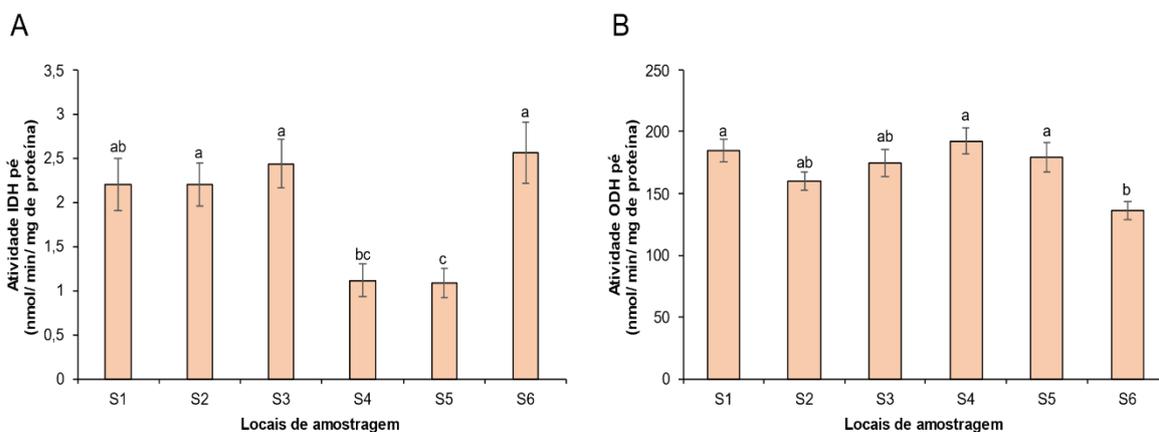


Figura 5 – Média e erro padrão da média da atividade enzimática da isocitrato desidrogenase (A) e da octopina desidrogenase (B) do pé dos 25 gastrópodes recolhidos em cada um dos locais de amostragem. S1 - Vila Praia de Âncora; S2 - Praia do Cabedelo; S3 - São Bartolomeu do Mar; S4 - Cabo do Mundo; S5 - Homem do Leme; S6 – São Félix da Marinha. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre locais (teste de Nemenyi, $p \leq 0,05$).

Os gastrópodes recolhidos em S4 e S5 apresentaram atividade total das enzimas GST nas brânquias semelhantes aos observados em S2, sendo superior aos observados em gastrópodes S1, S3 e S6 (Figura 6-A). Os organismos recolhidos em S3 exibiram atividade total das enzimas GST na glândula digestiva mais elevada do que os observados em

organismos dos restantes locais. O contrário foi verificável nos organismos recolhidos no local S2 em relação aos gastrópodes dos restantes locais (Figura 6-B).

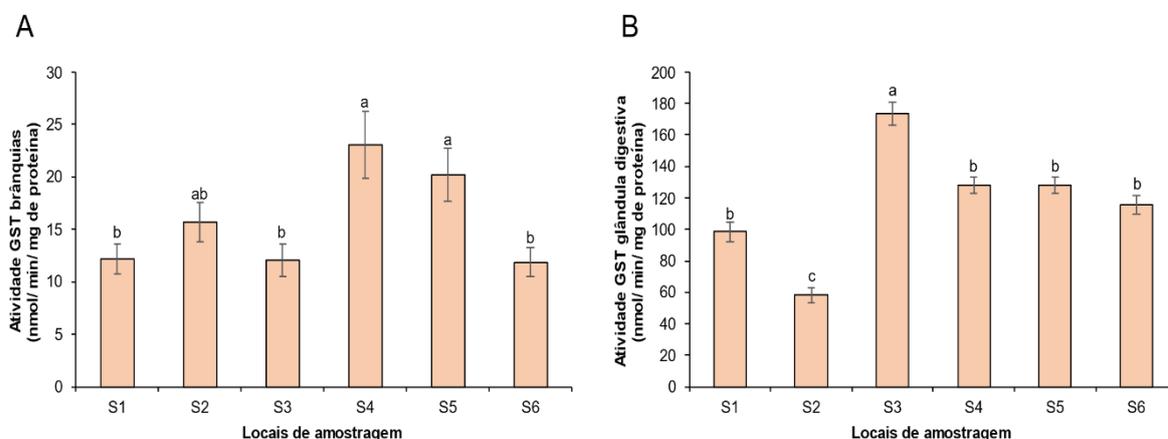


Figura 6 – Média e erro padrão da média da atividade total das enzimas glutathione S-transferases nas brânquias (A) e na glândula digestiva (B) dos 25 gastrópodes recolhidos em cada um dos locais de amostragem. S1 - Vila Praia de Âncora; S2 - Praia do Cabedelo; S3 - São Bartolomeu do Mar; S4 - Cabo do Mundo; S5 - Homem do Leme; S6 - São Félix da Marinha. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre locais (teste de Tukey (A) e teste de Nemenyi (B), $p \leq 0,05$).

Os gastrópodes recolhidos em S1 e S2 apresentaram atividade da enzima GR inferior aos gastrópodes recolhidos nos restantes locais (Figura 7-A). Relativamente à atividade enzimática da GPx não foram observadas diferenças entre os organismos recolhidos nos diferentes locais (Figura 7-B).

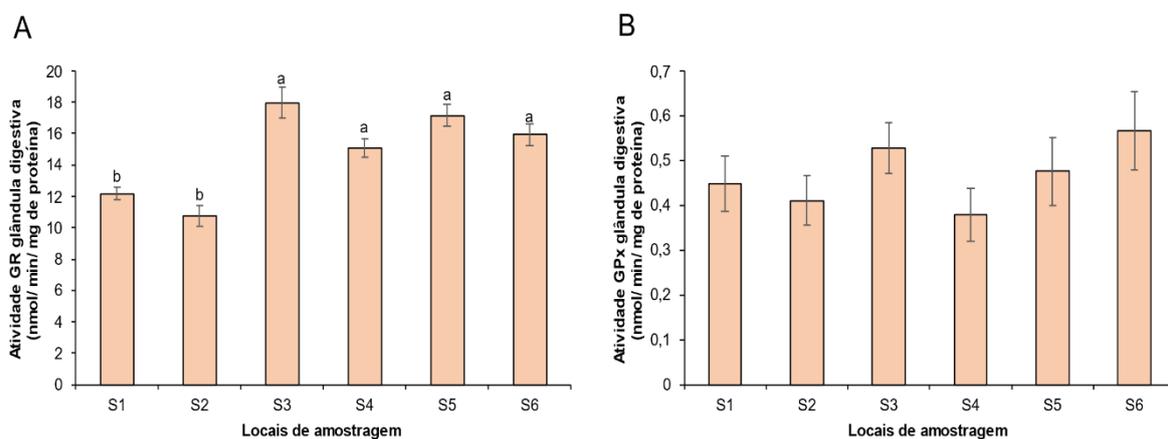


Figura 7 – Média e erro padrão da média da atividade enzimática da glutathione redutase (A) e da glutathione peroxidase (B) na glândula digestiva dos 25 gastrópodes recolhidos em cada um dos locais de amostragem. S1 - Vila Praia de Âncora; S2 - Praia do Cabedelo; S3 - São Bartolomeu do Mar; S4 - Cabo do Mundo; S5 - Homem do Leme; S6 - São Félix da Marinha. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre locais (teste de Nemenyi, $p \leq 0,05$).

Os gastrópodes recolhidos em S3 e S5 apresentaram atividade da enzima CAT semelhantes aos observados em S4, sendo superior aos observados em gastrópodes dos

restantes locais (Figura 8-A). Os organismos recolhidos em S3 e S5 apresentaram níveis de LPO superior aos observados nos restantes locais (Figura 8-B).

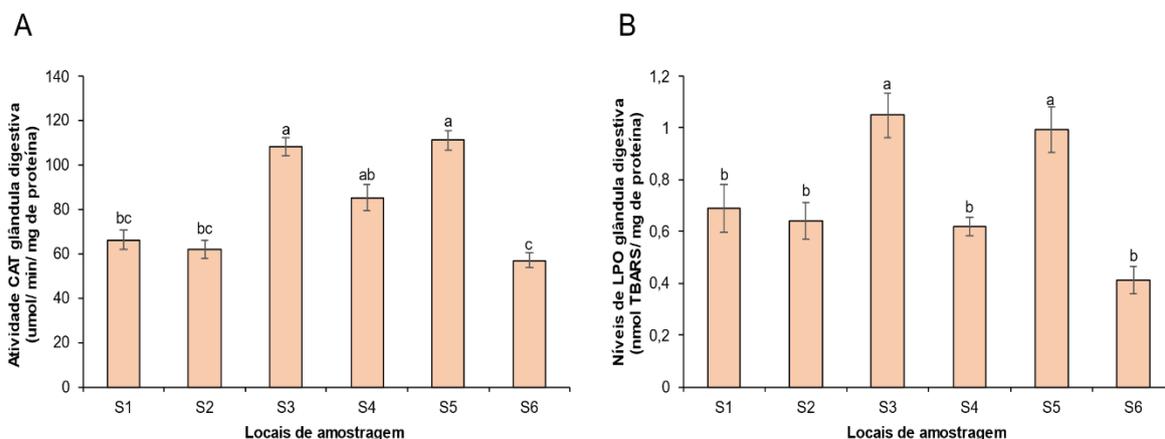


Figura 8 – Média e erro padrão da média da atividade enzimática da catalase (A) e dos níveis de peroxidação lipídica (B) na glândula digestiva dos 25 gastrópodes recolhidos em cada um dos locais de amostragem. S1 - Vila Praia de Âncora; S2 - Praia do Cabedelo; S3 - São Bartolomeu do Mar; S4 - Cabo do Mundo; S5 - Homem do Leme; S6 - São Félix da Marinha. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre locais (teste de Nemenyi, $p \leq 0,05$).

3.4. Contaminação dos gastrópodes por partículas suspeitas de serem plásticos

Não foram encontradas PS-PL nos brancos analisados.

Das 360 amostras isoladas dos gastrópodes analisados, foram recolhidas 712 PS-PL. Destas, 99,6% tinham dimensões inferiores a 5 mm sendo, portanto, suspeitas de serem microplásticos, e as 3 partículas restantes tinham dimensões superiores a 5 mm. Do número total de PS-PL, 46% foram encontradas nas brânquias/pé, e 54% na glândula digestiva. O número de PS-PL por tecido e local de amostragem está indicado na Tabela 4.

Foram registadas as cores branco/esbranquiçado, azul/azulado, preto, vermelho/avermelhado e amarelo nas PS-PL recolhidas das amostras isoladas dos gastrópodes analisados e os resultados observam-se na Figura 9. Do número total de PS-PL, 258 eram brancas/esbranquiçadas, 196 azuis/azuladas, 119 pretas e 109 vermelho/avermelhado, as mesmas foram isoladas em todas as amostras analisadas. Isolaram-se 30 partículas amarelas e estas não foram encontradas nas amostras de brânquias/pé dos gastrópodes de S6. As percentagens das cores das PS-PL registadas foram as seguintes: 36% brancas/esbranquiçadas, 28% azuis/azuladas, 17% pretas, 15% vermelho/avermelhado e 4% amarelas.

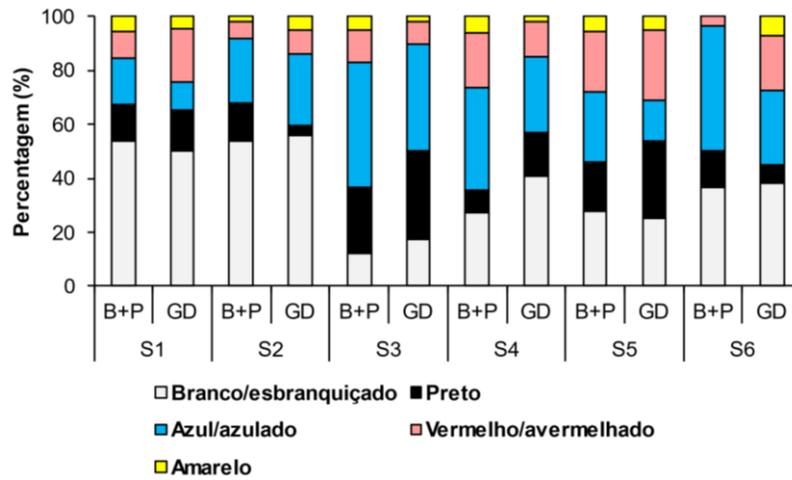


Figura 9 – Percentagem de PS-PL nas brânquias/pé (B+P) e glândula digestiva (GD) dos 30 organismos recolhidos em cada um dos locais de amostragem categorizadas por cores. S1 – Vila Praia de Âncora; S2 – Praia do Cabedelo; S3 – São Bartolomeu do Mar; S4 – Cabo do Mundo; S5 – Homem do Leme; S6 – São Félix da Marinha (S6).

Isolaram-se PS-PL com as formas fibras, fragmentos, filmes e *pellets* e os resultados observam-se na Figura 10. Do número total de PS-PL isoladas, 621 eram fibras, sendo a forma mais encontrada em todas as amostras analisadas. Foram também isolados 45 fragmentos, 38 filmes e 8 *pellets*. As percentagens das formas das PS-PL registadas foram as seguintes: 87% fibras, 6% fragmentos, 5% filmes e 1% *pellets*.

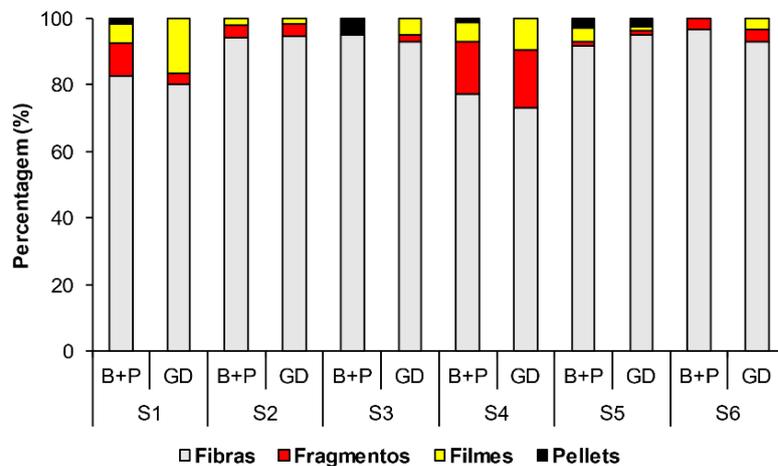


Figura 10 – Percentagem de PS-PL nas brânquias/pé (B+P) e na glândula digestiva (GD) dos 30 organismos recolhidos em cada um dos locais de amostragem categorizadas por forma. S1 – Vila Praia de Âncora; S2 – Praia do Cabedelo; S3 – São Bartolomeu do Mar; S4 – Cabo do Mundo; S5 – Homem do Leme; S6 – São Félix da Marinha (S6).

Uma vez que a forma fibra foi a mais comum e encontrada em todos os locais de amostragem, as PS-PL foram categorizadas por tamanho e os resultados observam-se na Figura 11. Do número total de fibras isoladas, 119 estavam no intervalo de tamanho 1001 – 2500 μm , 73 no de 101 – 500 μm , 67 no de 501 – 1000 μm e 24 no de 2501 – 4999 μm . Foram registadas 9 fibras com tamanho inferior ou igual a 100 μm e apenas 3 com tamanho superior ou igual a 5 mm. As percentagens de fibras nos diferentes intervalos de tamanho foram as seguintes: 39,1% no de 1001 – 2500 μm , 28,3% no de 101 – 500 μm , 22,1% no de 501 – 1000 μm , 8,5% no de 2501 – 4999 μm , 1,4% no de $\leq 100 \mu\text{m}$ e 0,5% no de $\geq 5000 \mu\text{m}$.

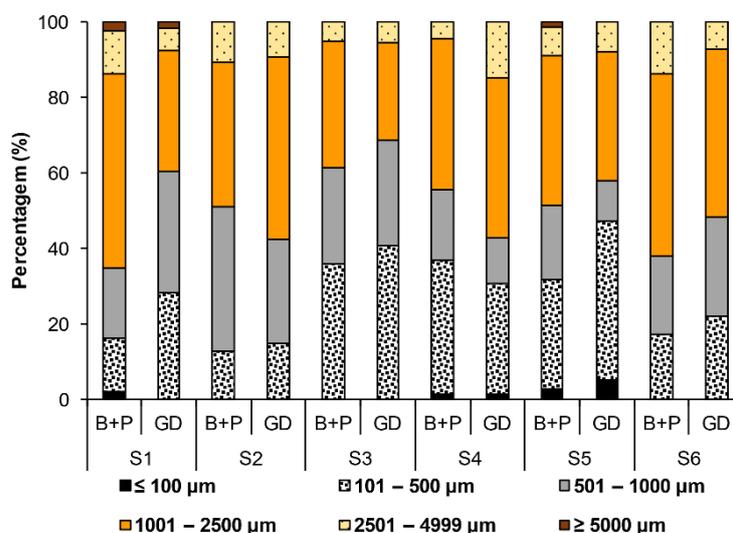


Figura 11 – Percentagem de fibras nas brânquias/pé (B+P) e na glândula digestiva (GD) dos 30 organismos recolhidos em cada um dos locais de amostragem categorizadas por tamanho. S1 – Vila Praia de Âncora; S2 – Praia do Cabedelo; S3 – São Bartolomeu do Mar; S4 – Cabo do Mundo; S5 – Homem do Leme; S6 – São Félix da Marinha (S6).

Dos 180 gastrópodes analisados, 94% continham PS-PL. Ainda em relação ao número total de organismos, 81% tinham PS-PL nas brânquias/pé e 80% na glândula digestiva. As percentagens de organismos com PS-PL por tecido e por local estão indicadas na Figura 12. Relativamente ao número de organismos analisados em cada local foram encontradas pelo menos uma PS-PL num local do corpo em: 29 gastrópodes de S1, 30 de S2, 29 de S3, 29 de S4, 28 de S5 e 24 de S6. As percentagens de exemplares com pelo menos uma PS-PL num local do corpo por local de amostragem foram as seguintes: 97% em S1, 100% em S2, 97% em S3, 97% em S4, 93% em S5 e 80% em S6.

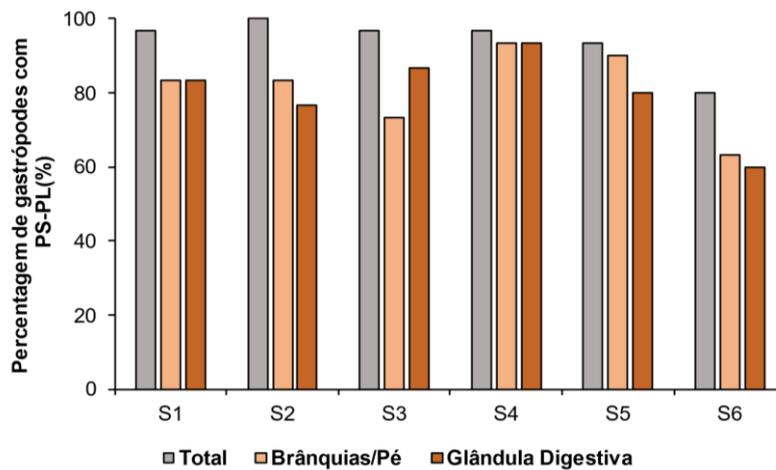


Figura 12 – Percentagem de gastrópodes com partículas suspeitas de serem plásticas em qualquer local do corpo (Total), nas brânquias/pé, e na glândula digestiva provenientes de Vila Praia de Âncora (S1), Praia do Cabedelo (S2), São Bartolomeu do Mar (S3), Cabo do Mundo (S4), Homem do Leme (S5) e São Félix da Marinha (S6).

A Tabela 4 apresenta o número total de PS-PL recolhidas por tecido e por local de amostragem e a média do número de PS-PL por amostras isoladas dos gastrópodes analisados.

Tabela 4 - Média e desvio padrão (\pm DP) do número de partículas suspeitas de serem plástico por organismo (N° PS-PL/organismo) registadas em qualquer local do corpo (Total), nas brânquias/pé, e na glândula digestiva dos organismos provenientes de Vila Praia de Âncora (S1), Praia do Cabedelo (S2), São Bartolomeu do Mar (S3), Cabo do Mundo (S4), Homem do Leme (S5) e São Félix da Marinha (S6). São também apresentados os resultados do teste de Kruskal-Wallis (H) e teste de Nemenyi. N – Número de organismos analisados. Diferentes letras na coluna do teste de Nemenyi indicam diferenças significativas entre locais ($p \leq 0,05$).

Parâmetro de comparação	N	Locais de amostragem	Número de PS-PL	N° PS-PL/organismo (\pm DP)	Teste Nemenyi	Teste Kruskal-Wallis
Brânquias/pé	30	S1	52	2 (\pm 1)	a, b, c	$H_5 = 27,396$; $p < 0,001$
		S2	50	2 (\pm 2)	a, b, c	
		S3	41	1 (\pm 1)	b, c	
		S4	84	3 (\pm 2)	a	
		S5	72	2 (\pm 2)	a, b	
		S6	30	1 (\pm 1)	c	
Glândula Digestiva	30	S1	66	2 (\pm 2)	a	$H_5 = 27,220$; $p < 0,001$
		S2	57	2 (\pm 2)	a, b	
		S3	58	2 (\pm 2)	a, b	
		S4	93	3 (\pm 2)	a	
		S5	80	3 (\pm 2)	a	
		S6	29	1 (\pm 1)	b	
Total	30	S1	118	4 (\pm 2)	a, b	$H_5 = 44,170$; $p < 0,001$

S2	107	4 (\pm 3)	b, c
S3	99	3 (\pm 3)	b, c
S4	177	6 (\pm 3)	a
S5	152	5 (\pm 3)	a, b
S6	59	2 (\pm 2)	c

Foram encontradas diferenças significativas no número médio de PS-PL por organismo nas amostras analisadas de brânquias/pé, glândula digestiva e total.

O número médio de PS-PL/organismo nas amostras de brânquias/pé dos gastrópodes de S4 era superior ao registado nos gastrópodes de S3 e S6. O mesmo se verificou nos gastrópodes de S5 em relação aos de S6. O número médio de PS-PL/organismo nas amostras da glândula digestiva dos gastrópodes de S6 era inferior ao registado nos gastrópodes de S1, S4 e S5. O número médio de PS-PL/organismo no total era superior nos gastrópodes de S4 em relação aos de S2, S3 e S6. O mesmo se verificou nos gastrópodes de S1 e S5 em comparação com os de S6.

A Tabela 5 apresenta a média do peso das amostras de tecido analisado e a média do número de PS-PL por peso de amostra de tecido analisado dos gastrópodes recolhidos nos diferentes locais.

Tabela 5 - Média e desvio padrão (\pm DP) do número de partículas suspeitas de serem plástico por peso de amostra de tecido analisado (Nº PS-PL/g) registadas em qualquer local do corpo (Total), nas brânquias/pé, e na glândula digestiva dos organismos provenientes de Vila Praia de Âncora (S1), Praia do Cabedelo (S2), São Bartolomeu do Mar (S3), Cabo do Mundo (S4), Homem do Leme (S5) e São Félix da Marinha (S6). São também apresentados os resultados do teste de Kruskal-Wallis (H) e teste de Nemenyi. N – Número de organismos analisados. Diferentes letras na coluna do teste de Nemenyi indicam diferenças significativas entre locais ($p \leq 0,05$).

Parâmetro de comparação	N	Locais de amostragem	Peso amostra (g)	Nº PS-PL/g (\pm DP)	Teste de Nemenyi	Teste de Kruskal-Wallis
Brânquias/pé	30	S1	0,43	5 (\pm 4)	a, b, c	H ₅ = 22,606; p < 0,001
		S2	0,28	8 (\pm 11)	a, b	
		S3	0,34	4 (\pm 4)	b, c	
		S4	0,36	8 (\pm 5)	a	
		S5	0,55	5 (\pm 3)	a, b, c	
		S6	0,34	3 (\pm 3)	c	
Glândula Digestiva	30	S1	0,27	9 (\pm 8)	a, b	H ₅ = 19,381; p = 0,002
		S2	0,23	11 (\pm 12)	a, b	
		S3	0,20	11 (\pm 12)	a, b	
		S4	0,22	17 (\pm 14)	a	
		S5	0,24	14 (\pm 11)	a	
		S6	0,20	7 (\pm 10)	b	

		S1	0,70	6 (\pm 3)	b, c	
		S2	0,51	8 (\pm 8)	a, b	
Total	30	S3	0,53	6 (\pm 5)	b, c	$H_5 = 32,445;$ $p < 0,001$
		S4	0,58	11 (\pm 6)	a	
		S5	0,79	7 (\pm 4)	a, b	
		S6	0,55	4 (\pm 4)	c	

Foram encontradas diferenças significativas no número médio de PS-PL por peso de amostra de tecido de brânquias e pé, de glândula digestiva e no total.

O número médio de PS-PL/g nas amostras de brânquias/pé dos gastrópodes de S4 era superior ao registado nos gastrópodes de S3 e S6. O mesmo foi perceptível nos organismos de S2 em relação aos de S6. O número médio de PS-PL/g nas amostras da glândula digestiva dos gastrópodes de S6 era inferior ao registado nos gastrópodes de S4 e S5. O número médio de PS-PL/g no total era superior nos gastrópodes de S4 em relação aos de S1, S3 e S6. O mesmo se verificou nos organismos de S2 e S5 em relação aos de S6.

4. Discussão

Os resultados dos parâmetros abióticos determinados na água do mar apresentaram algumas diferenças entre locais, as quais poderão ter influenciado os níveis dos biomarcadores nos organismos, tal como referido em estudos anteriores (Cunha *et al.*, 2007). Os parâmetros abióticos podem ainda influenciar a biodisponibilidade de plásticos e microplásticos (Guilhermino *et al.*, 2021).

Os gastrópodes analisados apresentaram diferenças nos parâmetros morfométricos. Estas diferenças podem influenciar a ingestão de plásticos e microplásticos e os resultados dos biomarcadores (Bessa *et al.*, 2018; de Sá *et al.*, 2015). De forma a compreender melhor a influência dos parâmetros morfométricos sobre a ingestão de PS-PL em populações de *P. lineatus* são necessários estudos adicionais com maior número de organismos de diferentes tamanhos.

4.1. Caracterização primária das partículas suspeitas de serem plásticos

Não foram encontradas PS-PL nos brancos analisados, pelo que a potencial contaminação terá sido residual. Até ao momento da entrega da dissertação, as PS-PL foram caracterizadas apenas visualmente, sendo necessária a caracterização da sua composição química para confirmar que são partículas de plástico (Picó e Barceló, 2019).

A presença de PS-PL de diferentes cores, formas e tamanhos indicam grande diversidade de partículas suspeitas de serem plásticos na água do mar dos locais estudados, nas algas de substrato rochoso de que *P. lineatus* se alimenta e/ou sobre o substrato rochoso podendo ser ingeridas acidentalmente uma vez que esta espécie é raspadora. A maioria das PS-PL (99,6%) tinha dimensão inferior a 5 mm, sendo, portanto, suspeitas de serem microplásticos, e eram fibras (87%), o que está de acordo com a literatura. Por exemplo, cerca de 91% dos microplásticos encontrados em amostras de água recolhidas em diversas zonas do globo eram fibras o que indica a sua elevada abundância no meio marinho (Barrows *et al.*, 2018). Estudos anteriores onde foram utilizadas diferentes espécies de gastrópodes (Naji *et al.*, 2018; Ojeda *et al.*, 2021; Zaki *et al.*, 2021) indicam que a maioria dos microplásticos encontrados eram fibras. As fibras foram também predominantes em estudos com outras espécies recolhidas em águas Portuguesas (Barboza *et al.*, 2020; Marques *et al.*, 2021; Pequeno *et al.*, 2021). No presente estudo, foram também encontrados fragmentos, filmes e pellets, em percentagem consideravelmente menor do que as fibras, o que indica a sua biodisponibilidade na zona estudada. No geral, a maioria das fibras registadas encontravam-se nos intervalos de tamanho 101 – 500 µm, 501 – 1000 µm e 1001 – 2500 µm, estando de acordo com estudos anteriores no noroeste do Oceano Atlântico (Herrera *et al.*, 2020; Lusher *et al.*, 2014). As partículas de cores branca/esbranquiçada e azul/azulada foram as mais abundantes nos

organismos analisados. Estudos anteriores registaram a presença abundante de microplásticos brancos em sedimentos de praias Portuguesas (Prata *et al.*, 2020b) e azuis em águas marinhas sob jurisdição de Portugal (Barboza *et al.*, 2020; Neves *et al.*, 2015).

4.2. Contaminação dos gastrópodes por partículas suspeitas de serem plásticos

Do número total de organismos recolhidos, 94% tinham PS-PL. A concentração de PS-PL por organismo determinada no presente estudo (1,97 – 5,90 PS-PL/organismo) é comparável aos valores encontrados em organismos da mesma espécie recolhidos noutros locais, por exemplo: 2,90 – 10,00 microplásticos/organismo na costa norte do Canal de Beagle, Argentina (Ojeda *et al.*, 2021) e 3,5 – 17,7 microplásticos/organismo no Golfo Pérsico, Irão (Naji *et al.*, 2018). Os nossos valores, padronizados por peso do tecido analisado (4,03 – 10,85 PS-PL/g), também são comparáveis aos determinados por outros autores, por exemplo: 1,50 – 5,37 microplásticos/g na costa de Hong Kong, China (Xu *et al.*, 2020) e 0,2 – 20,0 microplásticos/g no Golfo Pérsico, Irão (Naji *et al.*, 2018).

As populações de *P. lineatus* provenientes de diferentes locais de amostragem apresentaram diferentes números de PS-PL, o que pode estar relacionado com o tipo de contaminação existente no local e proximidade com fontes emissoras. Por exemplo, o local Cabo do Mundo insere-se nas imediações de uma área urbanizada com um importante porto comercial, especificamente o Porto de Leixões, e um parque industrial. O local São Félix da Marinha não parece estar sob a influência de fontes específicas de contaminação. Outros autores sugeriram também a hipótese da presença de microplásticos estar associada a centros urbanos ou áreas de elevada atividade antropogénica (Chouchene *et al.*, 2021; Franco *et al.*, 2020).

Foram encontradas PS-PL nos dois tipos de amostras analisadas (glândula digestiva e brânquias/pé), sendo o número de PS-PL na glândula digestiva superior ao encontrado no outro tipo de amostras, em todos os locais, o que está de acordo com estudos anteriores em bivalves (Hariharan *et al.*, 2021; Kolandhasamy *et al.*, 2018).

As PS-PL encontradas na glândula digestiva provavelmente entraram pela cavidade bucal, podendo ter sido ingeridas através da água, de algas de que *P. lineatus* se alimenta, ou diretamente do substrato por estarem entre algas aquando da atividade raspadora que é o modo de alimentação principal deste gastrópode. As PS-PL presentes nas amostras brânquias/pé podem ter sido retidas nas brânquias durante a respiração, ou incorporadas no tecido muscular do pé de outra forma. Por exemplo, o pé fornece a locomoção ao longo das diferentes superfícies do habitat e ajuda na deteção de alimentos (Smolowitz, 2011; Sousa *et al.*, 2018), pelo que não se pode excluir a hipótese de partículas muito pequenas poderem ser incorporadas diretamente. A presença de PS-PL nos tecidos de glândula

digestiva e brânquias/pé pode provocar infecções, danos físicos e consequente morte dos organismos (Oliveira *et al.*, 2018; von Moos *et al.*, 2012).

4.3. Biomarcadores

Os gastrópodes de Cabo do Mundo apresentaram a menor atividade das enzimas ChE, o que pode indicar neurotoxicidade causada por contaminantes ambientais, tais como alguns metais e hidrocarbonetos que se sabem estar presentes neste local, conforme sugerido em estudos anteriores realizados com moluscos recolhidos neste local (Lima *et al.*, 2007; Tim-Tim *et al.*, 2009). Os gastrópodes deste local também apresentaram elevada concentração de PS-PL podendo ter contribuído para a sua menor atividade das ChE uma vez que em estudos laboratoriais, alguns microplásticos inibem as ChE de moluscos (Avio *et al.*, 2015).

Os organismos dos locais Cabo do Mundo e Homem do Leme tinham menor atividade enzimática da IDH do que os de outros locais, bem como atividades mais elevadas da enzima ODH. As enzimas IDH e ODH desempenham um papel importante nos mecanismos de produção de energia celular e a IDH é importante também para manter o balanço redox, pelo que variações da sua atividade sugerem alterações nestes processos (Barboza *et al.*, 2018b; Lima *et al.*, 2007).

Os gastrópodes de Cabo do Mundo e Homem do Leme apresentaram elevada atividade das enzimas GST nas brânquias e os gastrópodes de São Bartolomeu do Mar a maior atividade enzimática da GST na glândula digestiva. A atividade das GST é induzida por diversos contaminantes ambientais, incluindo por compostos petrolíferos e metais que se sabe estarem presentes no Cabo do Mundo (Lima *et al.*, 2007; Tim-Tim *et al.*, 2009) e ocorrem de forma mais pontual no Homem do Leme (Tim-Tim *et al.*, 2009). Quando na presença de diferentes stressores ou contaminantes ambientais pode haver alteração da atividade das enzimas GST e consequente disrupção dos processos onde desempenha um papel fundamental (Oliveira *et al.*, 2015). Os gastrópodes do Cabo do Mundo e Homem do Leme apresentaram elevada concentração de PS-PL nas brânquias e os de São Bartolomeu do Mar elevada concentração de PS-PL na glândula digestiva. Estes fatores parecem também afetar a atividade da enzima GST. O mesmo foi verificado em estudos anteriores utilizando outras espécies (Barboza *et al.*, 2018a).

Os gastrópodes de São Bartolomeu do Mar e Homem do Leme tinham elevada atividade das enzimas GR e CAT, assim como dos níveis de LPO. A enzima GR desempenha um papel essencial em processos de proteção celular, especificamente no ciclo da glutathione, mantendo o equilíbrio entre a GSH e a GSSG (Lima *et al.*, 2007). Esta enzima e a CAT fazem parte das defesas antioxidantes e o aumento da sua atividade em estudos de biomonitorização ambiental é utilizado como indicativo de exposição a agentes

que aumentam o stresse oxidativo, sendo o aumento dos níveis de LPO indicativo de danos oxidativos nos lípidos (Lima *et al.*, 2007; Tim-Tim *et al.*, 2009). Assim, os resultados obtidos sugerem que os gastrópodes destes locais estão expostos a agentes indutores de stresse oxidativo e podem ser compostos petrolíferos que são contaminantes destes locais, conforme anteriormente referido. Os níveis elevados de PS-PL nos organismos destes locais também podem ter contribuído, uma vez que em estudos laboratoriais com bivalves e outras espécies se tem verificado que alguns tipos de microplásticos podem aumentar o stresse oxidativo e consequentemente o dano oxidativo (*e.g.* Avio *et al.*, 2015; Barboza *et al.*, 2018a).

5. Conclusões

Das amostras recolhidas de 180 gastrópodes (*P. lineatus*) recolhidos em seis locais da costa noroeste de Portugal foram recolhidas 712 PS-PL. A maior parte das PS-PL (99,6%) tinha dimensões inferiores a 5 mm e 87% eram fibras. As fibras tinham diversas dimensões e as classes de tamanho mais abundantes foram 101 – 500 µm, 501 – 1000 µm e 1001 – 2500 µm. As PS-PL tinham diversas cores (branco/esbranquiçado, azul/azulado, preto, vermelho/avermelhado e amarelo), sendo as cores branco/esbranquiçado e azul/azulado as mais abundantes. Estes resultados indicam elevada biodisponibilidade de partículas diversas nos locais estudados.

Do número total de gastrópodes estudados, 94% tinham pelo menos uma PS-PL nos tecidos corporais analisados. Foram encontradas PS-PL em 80% das amostras de glândula digestiva e 81% das amostras de brânquias/pé. A concentração de PS-PL nos organismos recolhidos em diferentes locais variou entre 1,97 – 5,90 PS-PL/organismo. Os gastrópodes de Cabo do Mundo tinham o maior número de PS-PL e os de São Félix da Marinha o menor. As concentrações de PS-PL/organismo variaram entre 0,9 e 3,1 nas amostras da glândula digestiva e entre 1 e 2,89 nas amostras de brânquias/pé.

Encontraram-se diferenças significativas nos biomarcadores entre locais. Os gastrópodes recolhidos no Cabo do Mundo tinham menor atividade das enzimas ChE e IDH e maior atividade das enzimas GST (brânquias) e ODH relativamente a exemplares de outros locais. Os gastrópodes do Homem do Leme tinham menor atividade enzimática da IDH, maior atividade das enzimas GST (brânquias), ODH, GR e CAT e níveis aumentados de LPO relativamente a alguns gastrópodes provenientes de outros locais. Os gastrópodes de São Bartolomeu do Mar apresentaram maior atividade das enzimas GST (glândula digestiva), GR e CAT e níveis aumentados de LPO em relação a alguns gastrópodes de outros locais. No seu conjunto, estes resultados indicam que a contaminação por agentes químicos existente no Cabo do Mundo, Homem do Leme e São Bartolomeu do Mar poderá estar a causar efeitos adversos nos gastrópodes e que as PS-PL podem contribuir para os mesmos.

Os resultados obtidos indicam também que a espécie *P. lineatus* é adequada para ser utilizada como bioindicador da contaminação ambiental por agentes químicos, incluindo PS-PL, bem como dos seus efeitos biológicos, em estudos de biomonitorização em zonas costeiras em que seja abundante. Recomenda-se a continuação da biomonitorização da zona costeira do Noroeste de Portugal a longo-prazo.

Referências

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro, methods in enzymology. *Elsevier* 13: 121-126.
- Almeida, F., Nunes, B. 2019. Effects of acetaminophen in oxidative stress and neurotoxicity biomarkers of the gastropod *Phorcus lineatus*. *Environmental Science and Pollution Research* 26: 9823-9831.
- Antunes, J., Frias, J., Sobral, P. 2018. Microplastics on the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin* 131: 294-302.
- APA, 2019. Relatório: Plano de gestão da região hidrográfica do Douro (RH3). Agência Portuguesa do Ambiente. www.apambiente.pt/sites/default/files/Aqua/DRH/ParticipacaoPublica/PGRH/2022-2027/2_Fase/PGRH_3_RH3_QSiGA_RNT.pdf. Consultado a 8 de julho de 2021.
- APA, 2020. Relatório: Classificação das águas balneares de acordo com os requisitos estabelecidos na Diretiva 2006/7/CE entre 2011 e 2020. Agência Portuguesa do Ambiente. www.apambiente.pt/sites/default/files/Aqua/DRH/MonitorizacaoAvaliacao/AguasBalneares/ClassAB_2011_2020_Continente.pdf. Consultado 2 de julho de 2021.
- APDL, 2019. Relatório: Plano estratégico da APDL, 2017-2026. Administração dos portos do Douro, Leixões e Viana do Castelo. www.apdl.pt/documents/10180/29292/PE+APDL+2017-2016_ALTERACOES_dez2019.pdf. Consultado a 9 de janeiro de 2021.
- Avio, G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., Regoli, F. 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental pollution* 198: 211-222.
- Barboza, L., Cózar, A., Gimenez, B., Barros, T., Kershaw, P., Guilhermino, L. 2019. Macroplastics pollution in the marine environment. In: *World Seas: an environmental evaluation*. Sheppard, C. (Ed.). Vol III, 2º edição. Academic Press, Londres, 305-328 pp.
- Barboza, L., Lopes, C., Oliveira, P., Bessa, F., Otero, V., Henriques, B., Raimundo, J., Caetano, M., Vale, C., Guilhermino, L. 2020. Microplastics in wild fish from Northeast Atlantic Ocean and its potential for causing neurotoxic effects, lipid oxidative damage, and human health risks associated with ingestion exposure. *Science of The Total Environment* 717: 134625.
- Barboza, L., Vieira, L., Branco, V., Carvalho, C., Guilhermino, L. 2018a. Microplastics increase mercury bioconcentration in gills and bioaccumulation in the liver, and cause oxidative stress and damage in *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Scientific Reports* 8: 15655.
- Barboza, L., Vieira, L., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, F., Carvalho, C., Guilhermino, L. 2018b. Microplastics cause neurotoxicity, oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquatic Toxicology* 195: 49-57.

Barboza, L., Vieira, L., Guilhermino, L. 2018c. Single and combined effects of microplastics and mercury on juveniles of the European seabass (*Dicentrarchus labrax*): changes in behavioural responses and reduction of swimming velocity and resistance time. *Environmental Pollution* 236: 1014-1019.

Barreiros, J., Barcelos, J. 2001. Plastic ingestion by a leatherback turtle *Dermochelys coriacea* from the Azores (NE Atlantic). *Marine Pollution Bulletin* 42: 1196-1197.

Barreiros, J., Raykov, S. 2014. Lethal lesions and amputation caused by plastic debris and fishing gear on the loggerhead turtle *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758). Three case reports from Terceira Island, Azores (NE Atlantic). *Marine Pollution Bulletin* 86: 518-522.

Barrows, A., Cathey, S., Petersen, C. 2018. Marine environment microfiber contamination: global patterns and the diversity of microparticle origins. *Environmental Pollution* 237: 275-284.

Beiras, R., Bellas, J., Cachot, J., Cormier, B., Cousin, X., Engwall, M., Gambardellag, C., Garaventag, F., Keiterd, S., Le Bihanicc, F., López-Ibáñez, S., Piazzag, V., Rialb D., Tatoa, T., Vidal-Liñán, L. 2018. Ingestion and contact with polyethylene microplastics does not cause acute toxicity on marine zooplankton. *Journal of hazardous materials* 360: 452-460.

Bessa, F., Barria, P., Neto, J., Frias, J., Otero, V., Sobral, P., Marques, J. 2018. Occurrence of microplastics in commercial fish from a natural estuarine environment. *Marine Pollution Bulletin* 128: 575-584.

Besseling, E., Wang, B., Lurling, M., Koelmans, A. 2014. Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. *Environmental Science & Technology* 48: 12336-12343.

Bhagat, J., Ingole, B., Singh, N. 2016. Glutathione S-transferases, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and lipid peroxidation as biomarkers of oxidative stress in snails: a review. *Invertebrate Survival Journal* 13: 336-349.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Cabral-Oliveira, J., Pratas, J., Mendes, S., Pardal, M. 2015. Trace elements in edible rocky shore species: effect of sewage discharges and human health risk implications. *Human and Ecological Risk Assessment* 21: 135-145.

Canesi, L., Ciacci, C., Bergami, E., Monopoli, M., Dawson, K., Papa, S., Canonico, B., Corsi, I. 2015. Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*. *Marine Environmental Research* 111: 34-40.

Carlberg, I., Mannervik, B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of biological chemistry* 250: 5475-5480.

Chouchene, K., Prata, J., da Costa, J., Duarte, A., Rocha-Santos, T., Ksibi, M. 2021. Microplastics on Barra beach sediments in Aveiro, Portugal. *Marine Pollution Bulletin* 167: 112264.

Coyle, R., Hardiman, G., O'Driscoll, K. 2020. Microplastics in the marine environment: a review of their sources, distribution processes, uptake, and exchange in ecosystems. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering* 2: 100010.

Cunha, I., Mangas-Ramirez, E., Guilhermino, L. 2007. Effects of copper and cadmium on cholinesterase and glutathione S-transferases activities of two marine gastropods (*Monodonta lineata* and *Nucella lapillus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 145: 648-657.

de Sá, L., Luís, L., Guilhermino, L. 2015. Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions. *Environmental Pollution* 196: 359-362.

Dehaut, A., Cassone, A., Frere, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., Riviere, G., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Duflos, G., Paul-Pont, I. 2016. Microplastics in seafood: benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environmental Pollution* 215: 223-233.

Directive 2008/56/EC <https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32008L0056>.

Ellis, G., Goldberg, D. 1971. An improved manual and semi-automatic assay for NADP-dependent isocitrate dehydrogenase activity, with a description of some kinetic properties of human liver and serum enzyme. *Clinical Biochemistry* 4: 175-185.

Ellman, G., Courtney, K., Andres, V., Feather-Stone, R. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88-95.

Feng, Z., Zhang, T., Li, Y., He, X., Wang, R., Xu, J., Gao, G. 2019. The accumulation of microplastics in fish from an important fish farm and mariculture area, Haizhou Bay, China. *Science of the Total Environment* 696: 133948.

Fernández, B., Campillo, J., Martínez-Gómez, C., Benedicto, J. 2010. Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. *Aquatic Toxicology* 99: 186-197.

Flohé, L., Günzler, W. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology* 105: 114-120.

Fonte, E., Ferreira, P., Guilhermino, L. 2016. Temperature rise and microplastics interact with the toxicity of the antibiotic cefalexin to juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): post-exposure predatory behaviour, acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation. *Aquatic Toxicology* 180: 173-185.

Franco, A., Arellano, J., Albendin, G., Rodriguez-Barroso, R., Zahedi, S., Quiroga, M., Coello, M. 2020. Mapping microplastics in Cadiz (Spain): occurrence of microplastics in municipal and industrial wastewaters. *Journal of Water Process Engineering* 38: 101596.

Frasco, M., Guilhermino, L. 2002. Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. *Fish Physiology and Biochemistry* 26: 149-156.

Frias, J., Gago, J., Otero, V., Sobral, P. 2016. Microplastics in coastal sediments from Southern Portuguese shelf waters. *Marine Environmental Research* 114: 24-30.

Frias, J., Otero, V., Sobral, P. 2014. Evidence of microplastics in samples of zooplankton from Portuguese coastal waters. *Marine Environmental Research* 95: 89-95.

Gago, J., Filgueiras, A., Pedrotti, M., Caetano, M., Frias, J. 2018. Standardised protocol for monitoring microplastics in seawater, deliverable 4.1. In: *JPI-Oceans BASEMAN Project*. Bruxelles, 33 p.

GESAMP, 2016. Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: part two of a global assessment. In: Kershaw, P., Rochmann, C. (Eds.), (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). *Reports and Studies* 93: 220 p.

Guilhermino, L., Barros, P., Silva, M., Soares, A. 1998. Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned. *Biomarkers* 3: 157-163.

Guilhermino, L., Lopes, M., Carvalho, A., Soares, A. 1996. Acetylcholinesterase activity in juveniles of *Daphnia magna* Straus. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 57: 979-985.

Guilhermino, L., Martins, A., Lopes, C., Raimundo, J., Vieira, L., Barboza, L., Costa, J., Antunes, C., Caetano, M., Vale, C. 2021. Microplastics in fishes from an estuary (Minho River) ending into the NE Atlantic Ocean. *Marine Pollution Bulletin* 173: 113008.

Guimarães, L., Medina, M., Guilhermino, L. 2012. Health status of *Pomatoschistus microps* populations in relation to pollution and natural stressors: implications for ecological risk assessment. *Biomarkers* 17: 62-77.

Habig, W., Pabst, M., Jakoby, W. 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry* 249: 7130-7139.

Hariharan, G., Purvaja, R., Anandavelu, I., Robin, R., Ramesh, R. 2021. Accumulation and ecotoxicological risk of weathered polyethylene (wPE) microplastics on green mussel (*Perna viridis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 208: 111765.

Herrera, A., Raymond, E., Martinez, I., Alvarez, S., Canning-Clode, J., Gestoso, I., Pham, C., Rios, N., Rodriguez, Y., Gomez, M. 2020. First evaluation of neustonic microplastics in the Macaronesian region, NE Atlantic. *Marine Pollution Bulletin* 153: 110999.

Janssens, L., Garcia-Vazquez, E. 2021. Dangerous microplastics in topshells and anemones along the north coast of Spain. *Marine Pollution Bulletin* 173: 112945.

Jiang, Y., Yang, F., Zhao, Y., Wang, J. 2020. Greenland Sea Gyre increases microplastic pollution in the surface waters of the Nordic Seas. *Science of The Total Environment* 712: 136484.

Karami, A., Golieskardi, A., Ho, Y., Larat, V., Salamatinia, B. 2017. Microplastics in eviscerated flesh and excised organs of dried fish. *Scientific Reports* 7: 5473.

Kolandhasamy, P., Su, L., Li, J., Qu, X., Jabeen, K., Shi, H. 2018. Adherence of microplastics to soft tissue of mussels: a novel way to uptake microplastics beyond ingestion. *Science of The Total Environment* 610-611: 635-640.

Kusui, T., Noda, M. 2003. International survey on the distribution of stranded and buried litter on beaches along the Sea of Japan. *Marine Pollution Bulletin* 47: 175-179.

Lebreton, L., Van Der Zwet, J., Damsteeg, J., Slat, B., Andrady, A., Reisser, J. 2017. River plastic emissions to the world's oceans. *Nature communications* 8: 1-10.

Lima, I., Moreira, S., Osten, J., Soares, A., Guilhermino, L. 2007. Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the Northwester coast of Portugal. *Chemosphere* 66: 1230-1242.

Livingstone, D., Stickle, W., Kapper, M., Wang, S., Zurburg, W. 1990. Further studies on the phylogenetic distribution of pyruvate oxidoreductase activities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 97: 661-666.

Lusher, A., Burke, A., O'Connor, I., Officer, R. 2014. Microplastic pollution in the Northeast Atlantic Ocean: validated and opportunistic sampling. *Marine Pollution Bulletin* 88: 325-333.

Madeira, D., Mendonca, V., Madeira, C., Gaiteiro, C., Vinagre, C., Diniz, M. 2019. Molecular assessment of wild populations in the marine realm: importance of taxonomic, seasonal and habitat patterns in environmental monitoring. *Science of The Total Environment* 654: 250-263.

Marques, F., Vale, C., Rudnitskaya, A., Moreirinha, C., Costa, S., Botelho, M. 2021. Major characteristics of microplastics in mussels from the Portuguese coast. *Environmental Research* 197: 110993.

Martins, J., Sobral, P. 2011. Plastic marine debris on the Portuguese coastline: a matter of size? *Marine Pollution Bulletin* 62: 2649-2653.

Miranda, T., Vieira, L., Guilhermino, L. 2019. Neurotoxicity, behavior, and lethal effects of cadmium, microplastics, and their mixtures on *Pomatoschistus microps* juveniles from two wild populations exposed under laboratory conditions? Implications to environmental and human risk assessment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16: 2857.

Naji, A., Nuri, M., Vethaak, A. 2018. Microplastics contamination in molluscs from the northern part of the Persian Gulf. *Environmental Pollution* 235: 113-120.

Neves, D., Sobral, P., Ferreira, J., Pereira, T. 2015. Ingestion of microplastics by commercial fish off the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin* 101: 119-126.

Nicastro, K., Lo Savio, R., McQuaid, C., Madeira, P., Valbusa, U., Azevedo, F., Casero, M., Lourenco, C., Zardi, G. 2018. Plastic ingestion in aquatic-associated bird species in Southern Portugal. *Marine Pollution Bulletin* 126: 413-418.

Norte, P. 2014. Relatório: Reordenamento e qualificação de frentes marítimas: praia de S. Bartolomeu do Mar. Polis Litoral Norte. www.polislitoralnorte.pt/projetos. Consultado a 29 de julho de 2021.

O'Leary, C., Breen, J. 1997. Metal levels in seven species of mollusc and in seaweeds from the Shannon Estuary. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy* 97: 121-132.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95: 351-358.

Ojeda, M., Cossi, P., Rimondino, G., Chiesa, I., Boy, C., Perez, A. 2021. Microplastics pollution in the intertidal limpet, *Nacella magellanica*, from Beagle Channel (Argentina). *Science of The Total Environment* 795: 148866.

Oliveira, C., Vilares, P., Guilhermino, L. 2015. Integrated biomarker responses of the invasive species *Corbicula fluminea* in relation to environmental abiotic conditions: a potential indicator of the likelihood of clam's summer mortality syndrome. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 182: 27-37.

Oliveira, M., Ribeiro, A., Hylland, K., Guilhermino, L. 2013. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Ecological Indicators* 34: 641-647.

Oliveira, P., Barboza, L., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, C., Guilhermino, L. 2018. Effects of microplastics and mercury in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Muller, 1774): filtration rate, biochemical biomarkers and mercury bioconcentration. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 164: 155-163.

Pequeno, J., Antunes, J., Dhimmer, V., Bessa, F., Sobral, P. 2021. Microplastics in marine and estuarine species from the coast of Portugal. *Frontiers in Environmental Science* 9: 579127.

Pham, C., Rodriguez, Y., Dauphin, A., Carrico, R., Frias, J., Vandeperre, F., Otero, V., Santos, M., Martins, H., Bolten, A., Bjorndal, K. 2017. Plastic ingestion in oceanic-stage loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) off the North Atlantic subtropical gyre. *Marine Pollution Bulletin* 121: 222-229.

Picó, Y., Barceló, D. 2019. Analysis and prevention of microplastics pollution in water: current perspectives and future directions. *American Chemical Society Omega* 4: 6709-6719.

PlasticsEurope, 2020. Relatório: The Facts - an analysis of European plastics production, demand and waste data. www.plasticseurope.org. Consultado a 13 de setembro de 2021.

Prata, J., da Costa, J., Lopes, I., Duarte, A., Rocha-Santos, T. 2020a. Environmental status of (micro)plastics contamination in Portugal. *Ecotoxicology Environmental Safety* 200: 110753.

Prata, J., Lavorante, B., Montenegro, M., Guilhermino, L. 2018. Influence of microplastics on the toxicity of the pharmaceuticals procainamide and doxycycline on the marine microalgae *Tetraselmis chuii*. *Aquatic Toxicology* 197: 143-152.

Prata, J., Reis, V., Paco, A., Martins, P., Cruz, A., da Costa, J., Duarte, A., Rocha-Santos, T. 2020b. Effects of spatial and seasonal factors on the characteristics and carbonyl index of (micro)plastics in a sandy beach in Aveiro, Portugal. *Science of The Total Environment* 709: 135892.

Prokić, M., Radovanović, T., Gavrić, J., Faggio, C. 2019. Ecotoxicological effects of microplastics: examination of biomarkers, current state and future perspectives. *Trends in Analytical Chemistry* 111: 37-46.

Reguera, P., Vinas, L., Gago, J. 2019. Microplastics in wild mussels (*Mytilus spp.*) from the North coast of Spain. *Scientia Marina* 83: 337-347.

Rocha, A., Teixeira, C., Almeida, C., Basto, M., Reis-Henriques, M., Ferreira, M., Guimarães, L. 2021. Assessing contamination from maritime trade and transportation on Iberian waters: impact on *Mytilus sp.* *Ecological Indicators* 121: 107031.

Rodrigues, M., Abrantes, N., Gonçalves, F., Nogueira, H., Marques, J., Gonçalves, A. 2018. Spatial and temporal distribution of microplastics in water and sediments of a freshwater system (Antuã River, Portugal). *Science of The Total Environment* 633: 1549-1559.

Rodrigues, S., Almeida, C., Ramos, S. 2020. Microplastics contamination along the coastal waters of NW Portugal. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering* 2: 100056.

Rodrigues, S., Almeida, C., Silva, D., Cunha, J., Antunes, C., Freitas, V., Ramos, S. 2019. Microplastic contamination in an urban estuary: abundance and distribution of

microplastics and fish larvae in the Douro estuary. *Science of The Total Environment* 659: 1071-1081.

Rodríguez, Y., Frias, J., Carriço, R., Neves, V., Bried, J., Martins, H., Vandeperre, F., Santos, M., van Franeker, J., Bolten, A. 2016. Monitoring plastic ingestion in selected Azorean marine organisms. *Fate and Impact of Microplastics in Marine Ecosystems*: 150-151.

Santana, M., Moreira, F., Pereira, C., Abessa, D., Turra, A. 2018. Continuous exposure to microplastics does not cause physiological effects in the cultivated mussel *Perna perna*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 74: 594-604.

Santos-Ferreira, A., Santos, C., Cabral, M. 2015. Local hydrodynamics and the siltation of Vila Praia de Âncora harbor. *Procedia Engineering* 116: 932-938.

Santos, D., Luzio, A., Matos, C., Bellas, J., Monteiro, S., Felix, L. 2021. Microplastics alone or co-exposed with copper induce neurotoxicity and behavioral alterations on zebrafish larvae after a subchronic exposure. *Aquatic Toxicology* 235: 105814.

Smolowitz, R. 2011. Gastropods. In: *Invertebrate Medicine*. Vol I, 2ª edição. John Wiley & Sons, Chichester, 95-111 pp.

Sousa, R., Delgado, J., González, J., Freitas, M., Henriques, P. 2018. Marine snails of the genus *Phorcus*: biology and ecology of sentinel species for human impacts on the rocky shores. In: *Biological Resources of Water*. Sajal Ray, Londres, 141-147 pp.

Thompson, R., Olsen, Y., Mitchell, R., Davis, A., Rowland, S., John, A., McGonigle, D., Russell, A. 2004. Lost at sea: where is all the plastic? *Science* 304: 838-838.

Tim-Tim, A., Morgado, F., Moreira, S., Rangel, R., Nogueira, A., Soares, A., Guilhermino, L. 2009. Cholinesterase and glutathione S-transferases activities of three mollusc species from the NW Portuguese coast in relation to the 'Prestige' oil spill. *Chemosphere* 77: 1465-1475.

von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., Kohler, A. 2012. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environmental Science & Technology* 46: 11327-11335.

Watts, A., Urbina, M., Corr, S., Lewis, C., Galloway, T. 2015. Ingestion of plastic microfibers by the crab *Carcinus maenas* and its effect on food consumption and energy balance. *Environmental Science & Technology* 49: 14597-14604.

Wright, S., Rowe, D., Thompson, R., Galloway, T. 2013. Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Current Biology* 23: 1031-1033.

Xu, X., Wong, C., Tam, N., Lo, H., Cheung, S. 2020. Microplastics in invertebrates on soft shores in Hong Kong: influence of habitat, taxa and feeding mode. *Science of The Total Environment* 715: 136999.

Zaki, M., Zaid, S., Zainuddin, A., Aris, A. 2021. Microplastic pollution in tropical estuary gastropods: abundance, distribution and potential sources of Klang River estuary, Malaysia. *Marine Pollution Bulletin* 162: 111866.

Zar, J. 1999. Biostatistical analysis. Vol I, 5^o edição. Pearson Education Limited, Edinburgh, 756 p.

Zhang, F., Wang, X., Xu, J., Zhu, L., Peng, G., Xu, P., Li, D. 2019. Food-web transfer of microplastics between wild caught fish and crustaceans in East China Sea. *Marine Pollution Bulletin* 146: 173-182.