

M 2013



EFEITOS DE MICROPLÁSTICOS NA FUNÇÃO PREDATÓRIA E NO ESTADO DE SAÚDE DE JUVENIS DO GÓBIO COMUM (*POMATOSCHISTUS MICROPS*)

LUÍS CARLOS GONÇALVES DE SÁ
TESE DE MESTRADO APRESENTADA
AO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM
TOXICOLOGIA E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAIS

Efeitos de Microplásticos na Função Predatória e no Estado de Saúde de Juvenis do Góbio Comum (Pomatoschistus microps)

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 – Doutora Lúcia Maria das Candeias Guilhermino

Categoria – Professora Catedrática

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, Departamento de Estudos de Populações, Laboratório de Ecotoxicologia.

O trabalho de investigação conducente à presente Tese foi desenvolvida no âmbito do projecto “*SIGNAL - Efeitos da poluição em interações ecológicas estuarinas zooplâncton-peixes zooplanctívoros em relação a alterações climáticas*”, financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PTDC/AAC-AMB/110331/2009) e por fundos FEDER do programa COMPETE “FCOMP-01-0124-FEDER-013876), e do projecto Projecto Estratégico - LA 15 - 2013-2014 (PEst-C/MAR/LA0015/2013), tendo ainda sido parcialmente suportado por verbas próprias do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, atribuídas ao Departamento de Estudos de Populações e ao Laboratório de Ecotoxicologia.



Com base nos resultados obtidos foi apresentada a seguinte comunicação (o nome a itálico indica quem apresentou o trabalho, o nome do autor da presente tese apresenta-se sublinhado):

Sá, L. C. de; Guilhermino, L. 2013. *Relationships between microplastics properties and their ingestion by zooplankton-zooplanktivorous fish*. IJUP'13 – 6º Encontro de Investigação Jovem da Universidade do Porto. Porto, 13 a 15 de Fevereiro de 2013. <http://www.ijup.up.pt/2013/DOCS/poster.pdf> (painel)

Alguns dos resultados obtidos foram ainda integrados nas seguintes comunicações, estando os seus resumos publicados no *Abstract Book* dos encontros científicos:

Luis, L. G.; Sá, L. C. de; Guilhermino, L. 2013. *Influence of microplastics on the toxicity of metals and polycyclic aromatic hydrocarbons to the common goby Pomatoschistus microps: biomarkers and predatory behaviour*. CICTA 2013 – 9th Iberian and 6th Iberoamerican Congress on Environmental Contamination and Toxicology – The Environmental Research: Essential for Sustainability. Valencia, Espanha, 1 a 4 de junho de 2013. Abstract Book, 34. (comunicação oral)

Miranda, T.; Norberto, R.; Luis, L.G.; Sá, L.; Oliveira, M.; Guilhermino, L. 2013. *Combined effects of microplastics and other environmental contaminants on predation behaviour of juvenile Pomatoschistus microps*. SETAC Europe 23rd Annual Meeting - "Building a better future: responsible innovation and environmental protection". Glasgow, 12–16 May. Abstract Book, 419. (painel)

Agradecimentos

Gostaria de agradecer numa primeira instância a todos aqueles que das diferentes formas contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço à Prof. Doutora Lúcia Guilhermino, o apoio, a disponibilidade, a ajuda e a orientação prestada no âmbito desta dissertação.

Agradeço ainda, aos membros do Laboratório de Ecotoxicologia, que integraram o mesmo durante a minha passagem. Entre os quais quero destacar, Tiago Miranda, Rita Norberto, Luís Luís, Andreia Catarino, Ana Ribeiro, Vanessa Modesto e os Doutores, Luís Vieira e Miguel Oliveira.

Um agradecimento especial à Professora Natividade Vieira, pela cedência das artémias utilizadas neste trabalho.

Por fim, mas não menos significativa, agradecer às três pessoas mais importantes da minha vida, a minha namorada, Inês Cerveira, a minha mãe, Maria Gonçalves, e a minha irmã, Cláudia Sá.

Resumo

Os peixes são organismos que se encontram em praticamente todos os ecossistemas aquáticos. Desta forma, encontram-se sujeitos a “pressões” causadas pelo Homem nestes mesmos sistemas. Uma dessas “pressões” é a presença de plásticos como contaminantes ambientais. Efetivamente, os plásticos são considerados atualmente um dos tipos de contaminantes ambientais emergentes de maior preocupação nos ecossistemas aquáticos, sobretudo no meio marinho. Podem ter diversas dimensões e, para além dos agentes químicos que os constituem, podem transportar outros contaminantes incorporados intencionalmente aquando da sua manufatura ou adsorvidos durante a sua permanência no meio ambiente, constituindo um risco acrescido de exposição a agentes tóxicos para o biota desses ecossistemas.

O objetivo central deste trabalho foi avaliar os efeitos de microplásticos na função predatória e na saúde de juvenis precoces (grupo etário 0+) do góbio comum (*Pomatoschistus microps*) provenientes das populações dos estuários dos rios Minho e Lima, as quais têm um historial de exposição a longo prazo a distintos níveis de contaminação ambiental. Numa primeira fase, foram aprendidas as metodologias e técnicas utilizadas em bioensaios com peixes e na determinação de diversos biomarcadores ambientais nos organismos a testar. De seguida, foi adaptada e otimizada a metodologia para avaliação da capacidade predatória em juvenis de *P. microps* a utilizar no âmbito do trabalho. Após esta fase, foram efetuados os bioensaios agudos (96 horas) para avaliar a capacidade predatória dos juvenis relativamente a diferentes tipos de microplásticos (*e.g.* diferentes cores e outras propriedades), na presença e ausência de náuplios de *Artemia franciscana*. Finalmente, avaliaram-se os efeitos da “exposição” a um dos tipos de microplásticos testado anteriormente na saúde dos peixes. Os resultados obtidos indicaram que: (i) os juvenis do góbio comum (média \pm desvio padrão do comprimento total: 2,00 \pm 0,2 cm) confundem alguns dos microplásticos com presas (náuplios de *Artemia*); (ii) o processo é seletivo, aparentemente de acordo com algumas propriedades dos microplásticos (*e.g.* cor); (iii) há diferenças entre peixes provenientes de distintos estuários, sugerindo que a exposição a longo prazo a diferentes condições ambientais pode influenciar a função predatória; (iv) a exposição mesmo de curta duração a microplásticos tem efeitos adversos na saúde dos peixes; (v) os microplásticos, depois de ingeridos, aparentemente libertam componentes que poderão ser

responsáveis pelos efeitos observados, não excluindo a possível contribuição de efeitos indiretos derivados e danos físicos (*e.g.* nas brânquias).

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a exposição de juvenis de peixes estuarinos a microplásticos resulta numa redução da sua eficácia enquanto predadores e no seu estado de saúde, o que pode ter efeitos muito negativos a nível do ecossistema devido à função crucial dos peixes zooplânctívoros. Efetivamente, nas circunstâncias referidas, pode resultar um sobredesenvolvimento da comunidade de zooplâncton devido à redução da pressão predatória de peixes em fase predominantemente zooplânctívora, bem como diminuição das populações de predadores de nível superior por falta de alimento, com potenciais reflexos no funcionamento de todo o ecossistema.

Palavras-chave: *Pomatoschistus microps*; microplásticos; biomarcadores; comportamento de predação; estado de saúde.

Abstract

Fish are often key components of biological communities of aquatic ecosystems. Therefore, they are exposed to different types of anthropogenic pressures. One of them is the presence of plastics as environmental contaminants. These plastics are currently seen as one of the types of emerging environmental contaminants of high concern in aquatic systems, especially in the marine environment. They can have different sizes and, additionally to their components, they may have other contaminants intentionally incorporated during its manufacture or incorporated/adsorbed during their stay in the environment, constituting an increased risk of exposure to toxic agents for the biota.

The aim of this work was to evaluate the effects of microplastics in the predatory function and health status of early juveniles (0⁺ age group) of the common goby (*Pomatoschistus microps*) from the populations of the Minho and Lima Rivers estuaries, which have a distinct history of long-term exposure to different levels of environmental contamination. In the first phase, the methodologies and techniques for use in the fish bioassays, including several biomarkers to be used as effect criteria were learned. Then, the methodology for assessing the predatory behaviour of *P. microps* juveniles to be used as effect criterion was also learned. After this first phase, acute bioassays were conducted to evaluate the predatory behaviour of juveniles in relation to different types of

microplastics (*e.g.* different colors and other properties), in the presence and absence of *Artemia franciscana* nauplii. Finally, the effects resulting from the exposure to one type of microplastics, previously tested, on fish health were assessed. The results indicated that: (i) juveniles of the common goby (mean \pm standard deviation of the total length: 2.00 \pm 0.2 cm) confound some microplastics with preys (*Artemia* nauplius); (ii) the process is selective, apparently depending of some properties of the microplastics (*e.g.* color); (iii) significant differences in the predatory behaviour were found between fish of distinct estuaries, suggesting that previous long-term exposure to different environmental conditions may influence the predatory behaviour; (iv) even short exposure to microplastics may have adverse effects on fish health; (v) the microplastics, after being ingested by the fish seem to have released toxic components that may have induced the adverse health effects observed.

In summary, the results of this study demonstrate that exposure of early juvenile estuarine fish to microplastics may result in a reduction of their effectiveness as predators and of their health status, which can have very negative effects at the ecosystem level because of the crucial role of zooplanktivorous fish. Indeed, a reduction of their community may cause an overdevelopment of the zooplankton community due to a reduction of the predation pressure over them, and a declining of higher level predators due to food shortness, with potential impact on ecosystem functioning.

Key-words: *Pomatoschistus microps*; microplastics; biomarkers; predatory behaviours; health status

Lista de Abreviaturas

AChE – Acetilcolinesterase

BHT – Hidroxitolueno butilado

Cyt P4501A – Citocromo P4501A

DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano

DTNA – Alfa-distrobrevina

DTNB – Ácido 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzóico)

DZP – Diazepam

EROD – Etoxiresurofina-*O*-deetilase

GSH – Glutaciona reduzida

GST – Glutaciona-S-transferases

LPO – Peroxidação lipídica

MP – Microplásticos

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido

NaHCO₃ – Hidrogenocarbonato de Sódio

OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

PAH – Hidrocarboneto aromático policíclico

PCB – Bifenilpoliclorado

POPs – Poluentes orgânicos persistentes

ROS – Espécies reativas de oxigénio

TBARS – Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

WHO – Organização Mundial de Saúde

Índice

Agradecimentos.....	iv
Resumo.....	v
1. Introdução	4
1.1. Plásticos	5
1.1.1. Microplásticos.....	6
1.1.1.1. Biodisponibilidade, Ingestão e Egestão de Microplásticos	9
1.1.1.2. Toxicidade dos Microplásticos	10
1.2. Bioensaios Laboratoriais.....	11
1.3. <i>Pomatoschistus microps</i> (Teleostei, Gobiidae)	12
1.4. Objetivos e Estrutura da Dissertação	13
2. Material e Métodos	15
2.1. Microplásticos (MP) e outras Substâncias Químicas	15
2.2. Recolha, Transporte e Manutenção dos Organismos Teste.....	16
2.3. Bioensaio para Avaliar se os Juvenis de <i>P. microps</i> confundem MP com Presas....	16
2.4. Bioensaio para Avaliar os Efeitos das MEP Ingeridas	19
2.5. Determinação dos Biomarcadores	21
2.6. Análise Estatística.....	23
3. Resultados e Discussão.....	24
3.1. Mortalidade e Fatores Abióticos durante os Ensaios	24
3.2. Bioensaio para Avaliar se os Juvenis de <i>P. microps</i> confundem MP com Presas....	25
3.3. Bioensaio para Avaliar os Efeitos das MEP Ingeridas	29
4. Conclusões e Perspectivas Futuras	36
Referências	37

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Características das microesferas de polietileno utilizadas como modelos de microplásticos.....	15
Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos determinados no meio de teste ao longo de 96h dos ensaios destinados a avaliar se os juvenis de <i>Pomatoschistus microps</i> confundem microplásticos com presas.....	24
Tabela 3 – Parâmetros físico-químicos determinados no meio de teste ao longo de 96h dos ensaios destinados a avaliar se os efeitos dos microplásticos sobre os juvenis de <i>Pomatoschistus microps</i>	25
Tabela 4 – Valores e diferenças correspondentes às diferenças entre o número de “presas” ingeridos em cada estuário (rio Minho e Lima), às diferenças totais entre os tratamentos e à interação entre o estuário e o tratamento.....	28
Tabela 5 – Valores e diferenças correspondentes às diferenças entre o número de “presas” ingeridos em cada estuário (rio Minho e Lima), às diferenças entre a ingestão em cada tratamento e à interação entre o estuário e o tratamento.....	30
Tabela 6 – Valores e diferenças correspondentes às diferenças de atividade da AchE entre estuários (rio Minho e Lima), às diferenças das atividades entre tratamentos e à interação entre o estuário e o tratamento.....	32
Tabela 7 – Valores e diferenças correspondentes às diferenças de atividade da EROD entre estuários (rio Minho e Lima), às diferenças das atividades entre tratamentos e à interação entre o estuário e o tratamento.....	33
Tabela 8 – Valores e diferenças correspondentes às diferenças de atividade da GST entre estuários (rio Minho e Lima), às diferenças das atividades entre tratamentos e à interação entre o estuário e o tratamento.....	34
Tabela 9 – Valores e diferenças correspondentes às diferenças de níveis de LPO entre estuários (rio Minho e Lima), às diferenças de níveis entre tratamentos e à interação entre o estuário e o tratamento.....	35

Índice de Figuras

Figura 1 – Microesferas de polietileno usadas como modelo de microplásticos.....	15
Figura 2 – Recipientes de teste e sistema de arejamento usado nos bioensaios.....	19
Figura 3 – Recipientes de alimentação usados nos bioensaios.....	19
Figura 4 – Média do número total de presas ingeridas por juvenis de <i>Pomatoschistus microps</i> provenientes dos estuários dos rios Minho e Lima.....	27
Figura 5 – Número de náuplios de <i>Artemia franciscana</i> ou de microesferas de polietileno de diferentes cores ingeridas por juvenis de <i>Pomatoschistus microps</i> provenientes do estuário do rio Minho.....	27
Figura 6 – Número de náuplios de <i>Artemia franciscana</i> ou de microesferas de polietileno de diferentes cores ingeridas por juvenis de <i>Pomatoschistus microps</i> provenientes do estuário do rio Lima.....	28
Figura 7 – Média do número total de presas ingeridas por juvenis de <i>Pomatoschistus microps</i> provenientes dos estuários dos rios Minho e Lima.....	29
Figura 8 – Número de náuplios de <i>Artemia franciscana</i> ou de microesferas de polietileno vermelhas ingeridas por juvenis de <i>Pomatoschistus microps</i> provenientes do estuário do rio Minho e Lima.....	30
Figura 9 – Microesferas de polietileno vermelhas ingeridas por juvenis de <i>Pomatoschistus microps</i> provenientes do estuário do rio Lima que se apresentavam de cor branca após passagem pelo sistema gastrointestinal dos peixes.....	31
Figura 10 – Atividade da AChE medida na cabeça de <i>Pomatoschistus microps</i> provenientes do estuário do rio Minho e Lima.....	32
Figura 11 – Atividade da EROD medida no corpo de <i>Pomatoschistus microps</i> provenientes do estuário do rio Minho e Lima.....	33
Figura 12 – Atividade da GST medida no corpo de <i>Pomatoschistus microps</i> provenientes do estuário do rio Minho e Lima.....	34
Figura 13 – Níveis de LPO medida no corpo de <i>Pomatoschistus microps</i> provenientes do estuário do rio Minho e Lima.....	35

1.Introdução

Com o aumento da população humana e o aumento do nível médio de vida, ao longo das últimas décadas, tem-se observado uma procura crescente por uma grande diversidade de produtos que quer na sua manufatura, quer na sua utilização “libertam” contaminantes com possíveis impactes ambientais adversos (Sá, L., 2011). Esses impactes passam em muito por interferências no estado normal de muitos organismos, e vão desde efeitos tóxicos ao nível de diferentes sistemas (dependendo do contaminante) até a morte em última análise (Oliveira *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2008, 2009). Tais consequências têm obtido, ao longo dos últimos anos, maior atenção da população em geral e da comunidade científica em particular, através da procura de soluções para evitar a perturbação ambiental (Godoi *et al.*, 2003). Esse interesse vai desde a contaminação atmosférica à contaminação aquática. Esta última tem concentrado mais preocupações, uma vez que ao longo das últimas três décadas a pressão do Homem sobre os ecossistemas aquáticos tem aumentado de uma forma desmesurada (Godoi *et al.*, 2003).

A entrada de poluentes no meio aquático não só acarreta danos para os seres vivos mas também, possivelmente, bastantes riscos para a saúde humana, bem como prejuízo da qualidade da água (Godoi *et al.*, 2003). Esses efeitos sobre os diferentes organismos aquáticos poderão levar a uma alteração na atividade enzimática ou provocar algum tipo de stress oxidativo que conduzirá a uma maior dificuldade na procura/identificação de alimento e a um menor estado de saúde do organismo (Anacleto e Gomes, 2006). Tais efeitos resultam não só da entrada no meio de agentes com propriedades tóxicas, mas também da poluição térmica, microorganismos patogénicos, nutrientes, material suspenso ou resíduos sólidos (Santiago-Silva, 2003), nos quais podemos incluir os plásticos.

Os ecossistemas estuarinos são conhecidos como sendo a fronteira entre o meio marinho e fluvial, sendo ainda considerados os habitats naturais mais produtivos, consistindo em áreas de alimentação e reprodução de muitas espécies de peixes e aves (Anacleto e Gomes, 2006). Os estuários devem a sua produtividade aos seus produtores primários, que reúnem uma elevada quantidade de consumidores primários (*e.g. Artemia franciscana*) e consequentemente de consumidores secundários, como o góbio comum

(*Pomatoschistus microps*), que mais tarde poderá ser consumido por espécies com alguma relevância económica (Anacleto e Gomes, 2006), podendo assim, um determinado poluente ser bioamplificado e causar danos à saúde humana.

1.1. Plásticos

Os polímeros orgânicos sintéticos, vulgarmente conhecidos como plásticos, revolucionaram por completo a história da humanidade, ao tornarem possível uma maior facilidade em diversas tarefas quotidianas, bem como uma maior proteção do ser humano (Piatti e Rodrigues, 2005). Entre as aplicações dos plásticos, encontram-se (Piatti e Rodrigues, 2005):

- ✓ Construção cívil;
- ✓ Indústria agrícola;
- ✓ Indústria alimentar;
- ✓ Indústria automóvel;
- ✓ Indústria têxtil;
- ✓ Indústria farmacêutica;
- ✓ Artesanato;
- ✓ Indústria dos Cosméticos (Gregory, 1996);
- ✓ Entre muitas outras.

O primeiro plástico moderno foi desenvolvido no início do século XX, mais precisamente em 1907, com a produção da baquelite (Cole *et al.*, 2011), uma resina sintética. Desde aí, mas com maior relevância a partir da década de 40 do século passado, tem-se observado um aumento massificado de produtos que tem na sua composição estes polímeros, devido à optimização das práticas associadas a este processo (Cole *et al.*, 2011). Os fatores responsáveis pela sua larga utilização são os mesmos associados à sua contribuição para a poluição aquática (elevada persistência, baixa condução térmica, baixa condução elétrica e elevada resistência a corrosão) (Bockhorn *et al.*, 1999), para além da sua produção ter custos relativamente baixos.

Os plásticos podem ser classificados em termoplásticos, os quais são facilmente manuseados e perdem facilmente a sua forma normal, e termofixos,

cuja forma é difícil de ser alterada e o seu endurecimento é resultado de uma reação química irreversível.

Os plásticos poderão ainda ser distinguidos quanto ao tamanho, em macroplásticos, mesoplásticos (Andrady, 2011), microplásticos e nanoplásticos (Andrady, 2011).

Os meso e macroplásticos provocam impactes nos diferentes compartimentos ecossistémicos, mas com especial relevância nos sistemas aquáticos. Tais efeitos tornaram estes plásticos objeto de diferentes estudos ao longo das últimas décadas (Fowler, 1987; Carpenter *et al.*, 1972; Carpenter e Smith, 1972). Os seus impactes incidem em última instância na morte de aves marinhas (44% das quais ingerem plásticos) (Rios *et al.*, 2007), mamíferos, répteis e peixes (Cole *et al.*, 2011). Essa morte resulta de uma pseudo-satisfação causada pela ingestão destes polímeros (Rios *et al.*, 2007; Cole *et al.*, 2011). Entre os impactes causados por este tipo de plásticos, encontra-se ainda, o transporte de espécies não nativas para novos habitats (Cole *et al.*, 2011) e o impedimento da passagem da luz para maiores profundidades. De referir, que os plásticos de maiores dimensões (macro e meso) entram no meio aquático através de uma fonte terrestre, pelo uso indiscriminado de plásticos pelas diferentes atividades terrestres, como o comércio ou por atividades aquáticas, como o turismo, a pesca comercial e recreacional e as indústrias marinhas (aquacultura, plataformas petrolíferas, entre outras) (Cole *et al.*, 2011).

Apesar de os macroplásticos terem sido bastante estudados ao longo das últimas décadas, nos anos mais recentes é possível observar-se uma maior preocupação com os plásticos de menores dimensões, designadamente os microplásticos.

1.1.1. Microplásticos

Nos últimos anos, os potenciais efeitos de microplásticos em populações selvagens tem vindo a suscitar grande preocupação (Rios *et al.*, 2007; Graham e Thompson, 2009). Este termo refere-se a pequenos fragmentos, fibras e grânulos de plástico (Cole *et al.*, 2011) que se vieram a tornar por si só e pelas

consequências inerentes a sua presença no ambiente, contaminantes ambientais emergentes de elevada preocupação (Ryan *et al.*, 2009).

Os microplásticos dividem-se em duas categorias, conforme a sua forma de introdução no meio, introdução direta (microplásticos primários) ou degradação dos meso e macropelásticos (microplásticos secundários) (Andrady, 2011). As indústrias com maior peso na libertação direta dos microplásticos para o meio aquático são a farmacêutica e a dos cosméticos, uma vez que estas partículas são utilizadas para fins medicinais, como vetores de fármacos (Patel *et al.*, 2009), assim como, por exemplo, em produtos de limpeza facial (exfoliantes) (Zitko e Hanlon, 1991). Desde o estabelecimento da patente da presença de microplásticos em cosméticos nos anos 80, que o uso de exfoliantes contendo estes mesmos plásticos tem vindo a aumentar consideravelmente (Fendall e Sewell, 2009; Zitko e Hanlon, 1991). Os microplásticos presentes nos cosméticos variam de acordo com a forma, composição e dimensão (Fendall e Sewell, 2009), existindo registos da presença de esferas de polietileno com dimensões inferiores a 5mm (Gregory, 1996) e de formas irregulares de microplásticos com tamanhos inferiores a 0,5 mm de diâmetro (Fendall e Sewell, 2009).

Por sua vez, a degradação dos plásticos de médias e grandes dimensões depende das ações a que estes plásticos são submetidos. No caso do meio marinho, estas ações podem ocorrer de uma forma agravada e a fragmentação dos plásticos de maiores dimensões resulta de processos físico/químicos e biológicos (Browne *et al.*, 2007; Cole *et al.*, 2011).

Segundo alguns autores, uma exposição longa à luz solar resulta numa foto-degradação dos plásticos, sendo que a exposição direta à radiação ultravioleta (UV) origina a oxidação da matriz, levando a uma quebra das ligações do polímero (Andrady, 2011; Barnes *et al.*, 2009; Browne *et al.*, 2007; Rios *et al.*, 2007). Uma das possíveis consequências deste tipo de degradação, é a libertação, por parte dos plásticos, de outros contaminantes, que foram utilizados como aditivos aquando da sua manufatura, para aumentar a durabilidade e a resistência à corrosão dos mesmos. Apesar disto, a foto-degradação em alto mar é relativamente baixa, devido à salinidade e às baixas temperaturas existentes no meio marinho (Cole *et al.*, 2011). Por outro lado, muitos plásticos são transportados para a linha de costa, depositando-se nos areais onde se

encontram expostos diretamente à luz solar e onde existe grande disponibilidade de oxigênio para uma rápida degradação (Andrady, 2011; Barnes *et al.*, 2009). Com a perda da sua matriz estrutural, os plásticos depositados na linha de costa vão-se tornando cada vez mais vulneráveis à abrasão (Barnes *et al.*, 2009; Browne *et al.*, 2007) provocada pela areia movimentada pelo mar. Este processo constante resulta numa redução progressiva do tamanho dos plásticos (Rios *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2009), culminando com o regresso dos de menores dimensões (microplásticos) ao meio marinho (Rios *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2009). De referir, que segundo Galgani *et al.* (2010), a partícula mais pequena detetada no oceano apresentava cerca 1,6 μm de diâmetro, dimensões estas que certamente dificultam a sua deteção.

A produção de plásticos biodegradáveis teve efeitos positivos, na substituição dos plásticos tradicionais (Cole *et al.*, 2011), mas também é bem possível que tenha alocado em si, o efeito negativo, de serem uma das principais, senão mesmo a principal fonte de microplásticos no ambiente (Thompson *et al.*, 2004). Estes plásticos são degradados não só pelas condições químicas ou físicas referidas anteriormente mas também por seres vivos (biodegradação). Este processo resulta na deterioração de qualquer substância orgânica por estes organismos. Os plásticos, objeto de estudo desta dissertação, são biodegradados em condições aeróbias na água do mar, enquanto que no substrato marinho, a biodegradação poderá ocorrer por via aeróbia e anaeróbia (Shah *et al.*, 2008). Em condições aeróbias são produzidos dióxido de carbono e água (Shah *et al.*, 2008). Por sua vez, na biodegradação anaeróbia são produzidos dióxido de carbono, água e metano (Shah *et al.*, 2008). A biodegradação geralmente envolve um número elevado de diferentes tipos de organismos, que são responsáveis pela transformação dos polímeros em moléculas mais simples (Shah *et al.*, 2008).

O tamanho que os plásticos deverão ter para se poderem considerar micro varia de autor para autor. Segundo Graham e Tompson (2009), são partículas com tamanhos inferiores a 10 mm. Por sua vez, Derraik (2002), referencia que estas partículas deverão possuir tamanhos entre os 2 e 6 mm e Barnes *et al.* (2009) e Betts (2008) consideram que são partículas com tamanho inferior a 5 mm. Para além destes estudos existem outros com diferentes considerações quanto ao tamanho que um plástico deverá ter para ser considerado micro (Browne *et al.*, 2007, 2010; Claessens *et al.*, 2011; Ryan *et al.*, 2009). Isto poderá

constituir um problema, se não ocorrer uma standardização do tamanho, uma vez que complicará uma comparação dos resultados obtidos nos diferentes estudos.

1.1.1.1. Biodisponibilidade, Ingestão e Egestão de Microplásticos

Devido à grande variedade de tipologias de microplásticos e às respectivas diferenças de densidades, estes tanto se encontram ao longo da coluna de água como no substrato, encontrando-se disponíveis e sendo ingeridos por uma vasta variedade de organismos (Betts, 2008; Cole *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 2009). Estes dados são apoiados por diversos estudos, que demonstram a ingestão deste tipo de plásticos por copépodes (Wilson, 1973), larvas de equinodermes (Hart, 1991), anfípodes (Thompson *et al.*, 2004), moluscos (Brillant e MacDonald, 2002; Browne *et al.*, 2008) e pepinos do mar (Graham e Thompson, 2009). Assim sendo, existem diversos fatores que afetam a biodisponibilidade dos microplásticos no meio aquático, desde logo o tamanho (Wright *et al.*, 2013). O reduzido tamanho dos microplásticos é considerado um fator chave, uma vez que o torna disponível para níveis tróficos mais baixos (Wright *et al.*, 2013). Grande parte dos organismos destes níveis ingere partículas adequadas ao seu tamanho (Moore, 2008). Por outro lado, organismos planctívoros de níveis tróficos superiores podem ingerir de forma passiva micropásticos por confusão com o alimento ou durante o processo natural de alimentação (Wright *et al.*, 2013), conjugado com o alimento natural.

Outro fator que afeta a biodisponibilidade dos microplásticos é a densidade (Wright *et al.*, 2013). Esta afeta a biodisponibilidade na coluna de água, o que poderá levar a uma variação do tipo de microplásticos presente ao longo da mesma, bem como, conseqüentemente a uma variação do tipo de microplásticos ingeridos pelos diferentes organismos (Wright *et al.*, 2013). Assim sendo, animais filtradores e animais que se alimentem de partículas em suspensão, que habitam na fase superior da coluna de água, alimentam-se muito provavelmente, de microplásticos com menor densidade, como os polietilenos (Wright *et al.*, 2013). Por sua vez animais, que vivam num nível mais profundo da coluna de água, como animais bentônicos ou detritívoros, tenderão a ingerir microplásticos presentes na suspensão bentônica, como os compostos de

policloreto de vinil que têm uma maior densidade (Wright *et al.*, 2013). Estes poderão mesmo acabar por se depositar no fundo marinho (Wright *et al.*, 2013).

A abundância (Wright *et al.*, 2013) é outro fator que levará a um aumento ou a um decréscimo da biodisponibilidade de microplásticos. Desta forma, a probabilidade de um organismo encontrar um microplástico é aumentada pelo aumento da presença dos mesmos (Wright *et al.*, 2013). A presença dos microplásticos é aumentada progressivamente pela degradação dos macrolásticos (Wright *et al.*, 2013).

Por fim, existe a cor que poderá afetar não a biodisponibilidade, mas a seleção dos microplásticos como alimento (Wright *et al.*, 2013). Esta característica também será abordada no trabalho prático desta dissertação.

Relativamente à excreção de microplásticos, existe muito pouca informação disponível. No entanto, no estudo de Besseling *et al.* (2012) foi realizada uma análise da matéria fecal de um anelídeo marinho (*Arenicola marina*) que indica a presença de partículas microscópicas de plástico. A excreção de microplásticos pode ser um meio importante para impedir muitos dos seus efeitos prejudiciais (*e.g.* libertação dos compostos que os constituem) sobre um determinado organismo (Wright *et al.*, 2013).

1.1.1.2. Toxicidade dos Microplásticos

O meio marinho contém uma grande quantidade (entre 10 e 500 µg/L) de partículas de tamanhos ínfimos (<100 nm) de origem natural (Andrady, 2011; Rosse e Loizeau, 2003). Com a presença de filtradores nos oceanos, como as baleias, e tendo em consideração que nenhuma destas partículas de origem natural parece ter qualquer efeito ao nível dos mesmos, poderá pensar-se que os microplásticos poderão ser bio-inertes, uma vez que estes animais não digerem nem absorvem os microplásticos (Andrady, 2011). Da mesma maneira, sabe-se que estes animais não possuem qualquer via enzimática para a quebra das ligações destes polímeros (Andrady, 2011). No seu conjunto, estas evidências podem sugerir uma ausência de efeitos nestes organismos, no entanto tais conclusões necessitam de um maior aprofundamento de conhecimento, através de novos estudos que abordem esta temática. A ingestão destes polímeros de

pequenas dimensões pelo biota levanta diversas questões, uma vez que estes poderão transportar adsorvidos consigo outros contaminantes, como os poluentes orgânicos persistentes (POPs) ou fármacos (Andrady, 2011). Segundo Andrady (2011) pensa-se que a maioria dos efeitos adversos sobre o microbiota estará associada a este tipo de transporte por parte dos microplásticos. Ainda segundo o mesmo autor (Andrady, 2011) qualquer toxicidade associada aos microplásticos deve-se aos seguintes fatores, em conjugação ou individualmente:

- Aditivos tóxicos utilizados na manufatura dos plásticos e que são libertados após a ingestão dos mesmos;
- Monômeros resultantes da manufatura dos plásticos;
- Toxicidade provocada por alguns dos produtos intermediários da degradação dos plásticos;
- Adsorção de contaminantes ambientais, como POPs, metais aquosos (Betts, 2008) ou fármacos;

Quanto a estes contaminantes ambientais, o risco de efeitos adversos é significativo, uma vez que a água do mar possui baixos níveis dos contaminantes referidos (Andrady, 2011). Existem concentrações registradas destes contaminantes da ordem dos ng/g- μ g/g de plástico (Teuten *et al.*, 2007, 2009; Barnes *et al.*, 2009).

1.2. Bioensaios Laboratoriais

Uma das formas mais proficientes de avaliar os efeitos tóxicos de um determinado agente físico, químico ou biológico é através da interação entre esse mesmo agente e o organismo (WHO, 1993), essa interação irá ser refletida numa medida, o biomarcador. Entre os biomarcadores, encontram-se:

- Enzimas de biotransformação (fase I e II);
- Stress Oxidativo;
- Produtos de biotransformação;
- Proteínas de stress;
- Alterações endócrinas e reprodutivas;
- Efeitos Genotóxicos;
- Parâmetros fisiológicos e morfológicos.

Não obstante a presença de todos estes biomarcadores é de referir que os que são mais utilizados são as enzimas de biotransformação, o stress oxidativo e as proteínas de stress. Relativamente às enzimas de biotransformação, os biomarcadores mais utilizados em peixes são a atividade das enzimas como a etoxiresurofina-O-deetilase (EROD), enzima da fase I, que permite a medição da resposta indutiva do citocromo P4501A (cyt P4501A) (Goksøyr e Förlin, 1992), e a glutathione-s-transferases (GST), enzimas da fase II, que catalizam a conjugação de compostos eletrofílicos (ou xenobióticos) com a glutathione reduzida (GSH) tornando-os hidrofílicos para posterior excreção (Klaassen, 2008; Oost *et al.*, 2003). Outros biomarcadores muito utilizados são níveis de peroxidação lipídica (LPO), indicativa de danos oxidativos nos lípidos, e as enzimas anti-oxidantes (como a catalase ou a superóxido dismutase, entre outras) que permitem a manutenção da integridade celular, “impedindo” assim a destruição ou a danificação celular. Outro importante biomarcador, é a atividade das enzimas colinesterases (ChE), as quais incluem em vertebrados a acetilcolinesterase (AChE) com função determinante ao nível do funcionamento do sistema nervoso devido ao seu papel fundamental na degradação do neurotransmissor acetilcolina nas funções colinérgicas (Guilhermino *et al.*, 1998), e a pseudocolinesterase com função na biotransformação de alguns xenobióticos e que se pensa que desempenhe desta forma uma função protetora da AChE (Guilhermino *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 2000).

***1.3. Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae)**

O góbio comum, *Pomatoschistus microps*, e particularmente os juvenis desta espécie, são considerados muito adequados para utilização como organismos-teste em ensaios laboratórios (Monteiro *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2008, 2009) e como bioindicadores em estudos de biomonitorização dos efeitos induzidos por exposição à contaminação ambiental (*e.g.* Monteiro *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2012). A espécie possui ampla distribuição geográfica, habitando áreas costeiras e estuarinas que vão do norte da Noruega ao sul de Portugal (Oliveira *et al.*, 2012), abrangendo ainda certas regiões mediterrânicas (Berrebi *et al.*, 2005; Leitão *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2012). O góbio comum apresenta ainda uma grande importância sob o ponto de vista trófico, pois trata-se de um predador intermediário, alimentando-se de zooplâncton durante a fase

larvar e enquanto pequeno juvenil, passando progressivamente a ser predominantemente bentónico à medida que vai crescendo (Costa, 1988; Leitão *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2012) e sendo a presa de predadores de níveis tróficos superiores, como alguns peixes com interesse comercial ou algumas aves (Costa, 1988; Oliveira *et al.*, 2012). A ingestão do góbio por parte de alguns peixes com interesse económico, poderá fazer com que os microplásticos venham a ser ingeridos mais tarde pelo Homem, aquando da ingestão por parte deste de peixe e outras espécies aquáticas, podendo ou não ter efeitos para a saúde do mesmo. Devido a estas características favoráveis, foi uma das espécies intensivamente estudadas em projectos em curso no nosso laboratório desde 1999, resultando em vários estudos já publicados com esta espécie (*e.g.* Monteiro *et al.*, 2005, 2006; Vieira *et al.*, 2008, 2009; Guimarães *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2012, 2013).

1.4. Objetivos e Estrutura da Dissertação

O objetivo central deste trabalho foi avaliar os efeitos de microplásticos na função predatória e na saúde de juvenis precoces (grupo etário 0⁺) do góbio comum (*Pomatoschistus microps*). Tendo em consideração que a exposição prévia a longo prazo das populações selvagens a contaminantes ambientais, pode influenciar a sensibilidade dos peixes a microplásticos e a sua capacidade para enfrentarem o stress induzido por estes agentes. Foram estudados comparativamente juvenis provenientes das populações dos estuários dos rios Minho e Lima, os quais têm diferentes níveis de contaminação ambiental (*e.g.* Guimarães *et al.*, 2012). Esta espécie foi selecionada para o presente estudo por ser considerada um bom organismo-teste (*e.g.* Monteiro *et al.*, 2005, 2006; Vieira *et al.*, 2008, 2009; Oliveira *et al.*, 2012, 2013).

A presente dissertação encontra-se dividida nas seguintes secções principais: Capítulo 1 – Introdução, onde é feita a introdução ao problema da contaminação ambiental por microplásticos e a diversas abordagens de interesse, e são apresentados os objetivos e estrutura da Dissertação; Capítulo 2 – Material e Métodos, onde são descritos os procedimentos experimentais e se estabelece os objetivos a testar; Capítulo 3 – Resultados e Discussão, onde se descreve, analisa e valida os resultados obtidos; Capítulo 4 – Conclusões e Perspetivas

Futuras, onde se confirma/rejeita as hipóteses a testar propostas no Capítulo 2 e se estabelece metas futuras.

2. Material e Métodos

2.1. Microplásticos (MP) e outras Substâncias Químicas

Neste trabalho utilizaram-se microesferas de polietileno como modelos de microplásticos, doravante designadas por MEP, as quais foram fornecidas pela *Cospheric Innovations in Microtechnology* (Santa Barbara, USA). Foram testados três tipos de MEP com diâmetro entre 425 e 500 μm , de cor branca, vermelha e preta, as quais diferiam ainda noutras propriedades, conforme indicado na **Tabela 1**. O aspeto geral das MEP é apresentado na **Figura 1**.

Tabela 1 - Características das microesferas de polietileno utilizadas como modelos de microplásticos, de acordo com a informação disponibilizada pelo fornecedor (*Cospheric Innovations in Microtechnology*).

	Propriedades					
Tipos de Microplásticos	Resposta Magnética	Opacidade	Forma	Tamanho	Densidade	Reactividade
Microesferas de polietileno brancas	Sem resposta	100% opacas	Esférica	425 - 500 μm	1. 2 g/cc	Inerte na maioria dos solventes
Microesferas de polietileno pretas	Para-magnéticas	Elevada opacidade	>90% esférica	425 - 500 μm	1. 15 g/cc	Inerte na maioria dos solventes
Microesferas de polietileno vermelhas	Sem resposta	Transparentes	>90% esférica	425 - 500 μm	0. 98 g/cc	Inerte na maioria dos solventes

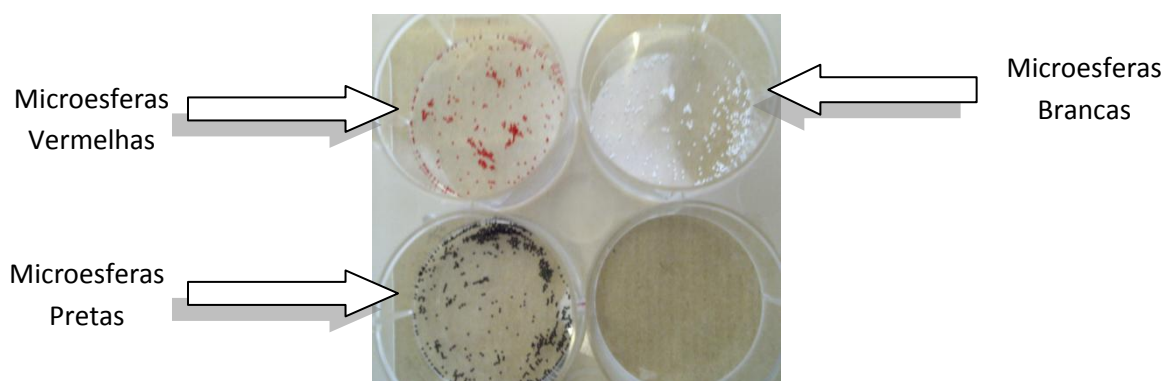


Figura 1 - Microesferas de polietileno usadas como modelo de microplásticos.

O meio de manutenção dos peixes e o meio de teste foram preparados com sal marinho *Ocean Fish*, fornecido pela *Prodac International S.r.l* (Cittadella, Itália). O reagente Biorad utilizado para a determinação das proteínas foi fornecido pela *Bio-Rad* (Alemanha). Os restantes reagentes foram de grau analítico e fornecidos pela *Sigma-Aldrich* (Alemanha) e *Merck* (Alemanha).

2.2. Recolha, Transporte e Manutenção dos Organismos Teste

Os organismos teste (juvenis de *P. microps*), com dimensões inferiores a 2,5 cm de comprimento total foram recolhidos numa área de referência do estuário do rio Minho (NW de Portugal 41° 53'26.8"N, 8°49'29.2"W) e no estuário do rio Lima (NW de Portugal 41°41'11.41"N, 8°49'20.42"W), com uma rede de mão, em baixa-mar. Esta técnica de captura já tinha sido utilizada anteriormente por Monteiro *et al.* (2005), Vieira *et al.* (2008, 2009) e Oliveira *et al.* (2012, 2013). Após a recolha, os peixes foram transportados em água com arejamento, dos locais de amostragem para o laboratório, num processo que durou cerca de uma hora, no máximo. Aí foram aclimatados durante duas semanas, em aquários contendo 80 L de água do mar artificial (salinidade $18 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$ mg/L) (medida com o refratómetro de água do mar HI 96822, fornecido pela *Hanna Instruments* (Rhode Island, USA)), aerificada e filtrada (bombas EHEIM, fornecidas pela *EHEIM GmbH & Co. KG*, (Estugarda, Alemanha)). Cada aquário continha cerca de 300 peixes. O fotoperíodo para a manutenção dos peixes nos aquários foi de 14h luz: 10h escuro e a temperatura da sala oscilou entre os 17 °C de mínima e os 22 °C de máxima. Os organismos teste foram alimentados diariamente *ad libitum* com alimento para peixe *Tropic Mix* fornecido pela *Aquapex Produtos* (Pombal, Portugal). O meio foi renovado três vezes por semana.

2.3. Bioensaio para Avaliar se os Juvenis de P. microps confundem MP com Presas

O objetivo deste bioensaio foi avaliar se os juvenis de *P. microps* confundem MP com presas e se juvenis provenientes de populações de estuários com diferentes níveis e tipos predominantes de contaminação ambiental têm uma capacidade de discriminação distinta. De forma geral, foram seguidos os procedimentos indicados nos protocolos da OECD para ensaios agudos com

juvenis de peixes (OECD, 1992), com algumas adaptações, conforme a seguir se descreve. Todo o material de vidro, antes de ser utilizado, foi lavado com solução de ácido (HNO_3 , 10%) e enxaguado diversas vezes com água destilada. Foram utilizados peixes provenientes do estuário do rio Minho e peixes provenientes do estuário do rio Lima (capturados durante a primavera). Para diminuir o stress devido à manipulação, os peixes não foram medidos e pesados no início do ensaio, mas apenas no fim, utilizando uma balança analítica (Kern ABS-N, *KERN & SOHN GmbH*, Alemanha) para determinar o peso húmido e uma craveira (*Electronic Digital Caliper*, China) para medir o comprimento dos organismos, tendo o comprimento total médio para o Minho sido de $2,02 \pm 0,2$ cm e para o Lima de $1,98 \pm 0,2$ cm. Em ambos os casos, após o período de aclimação (duas semanas), 63 juvenis de cada um dos estuários foram selecionados ao acaso e colocados durante 96h, individualmente, em frascos de vidro de 1L de capacidade, contendo 500 ml de água salgada artificial, com uma salinidade de $18 \times 10^3 \pm 1 \times 10^3$ mg/L, preparada conforme descrito no ponto 2.1 (**Figura 2**). Não foi fornecido alimento e os peixes deixaram de ser alimentados 24h antes dos ensaios. O meio de teste não foi renovado durante o ensaio. No início do bioensaio e a cada 24h, foi medida a temperatura, o pH e o oxigénio dissolvido na água utilizando uma sonda HACH 40d Field Case, fornecida pela *Hach Company* (CA, USA) e a salinidade da mesma utilizando o refratômetro HI 96822, fornecido pela *Hanna Instruments* (Rhode Island, USA). Foram ainda medidas a temperatura e humidade ambiente da sala de ensaios, utilizando o equipamento DATA LOGGER (PCE-HT 71 Humidity/Temperature) fornecido pela *PCE Instruments UK Ltd* (Reino Unido), as quais variaram entre 19,7 °C e 23,2 °C e 32,2 Pa e 46,4 Pa, respectivamente. No final das 96h foi efetuado um ensaio de predação pós-exposição (neste caso a condições laboratoriais sem stress químico), com base num protocolo previamente desenvolvido e validado pela equipa, o qual foi adaptado no âmbito da presente dissertação aos bioensaios efetuados. Assim, cada peixe foi transferido para um recipiente de plástico de diâmetro 14 cm, contendo 300 ml de água do mar artificial, onde ficaram 3 minutos em contato com as “presas”, previamente contadas utilizando uma lupa binocular Nikon SMZ800 fornecida pela *Nikon Instruments Inc.* (USA). Os tratamentos foram os seguintes (**Figura 3**): 30 náuplios de *Artemia franciscana*; 30 MEP brancas; 30 MEP pretas; 30 MEP vermelhas; 15 náuplios + 15 MEP brancas; 15 náuplios + 15 MEP pretas; 15 náuplios + 15 MEP vermelhas. Em cada tratamento e para cada população de origem, foram testados 9 juvenis

selecionados ao acaso. Os náuplios tinham sido pré-eclodidos anteriormente em água do mar a uma salinidade de $37 \times 10^3 \pm 1 \times 10^3$ mg/L tendo sido sempre utilizados no processo de predação náuplios com 24h. Após o tempo de contato dos peixes com as “presas”, os peixes foram retirados e foi contado o número de náuplios de *Artemia* e/ou MEP presentes nos recipientes e, por subtração entre o número inicial de “presas” e o número de “presas” contadas no final, foi calculado o número de “presas” ingeridas.



Figura 2 - Recipinetes de teste e sistema de arejamento usados nos bioensaios.



Figura 3 - Recipinetes de alimentação utilizados nos bioensaios.

2.4. Bioensaio para Avaliar os Efeitos das MEP Ingeridas

O objetivo do segundo bioensaio foi investigar os efeitos causados pelas MEP. O bioensaio foi efetuado em condições gerais semelhantes às descritas na secção anterior (2.3.), mas utilizando apenas dois tratamentos no ensaio de predação pós-exposição (náuplios de *Artemia* e MEP vermelhas) e 7 peixes de cada estuário por tratamento. Escolheram-se as MEP vermelhas, pois em ensaios preliminares observou-se que perdiam a cor depois de passarem o sistema gastrointestinal dos juvenis, o que poderá ter interesse toxicológico acrescido. Resumidamente, juvenis capturados no estuário do Minho e juvenis capturados

no estuário do rio Lima (Primavera) foram aclimatados a condições laboratoriais conforme indicado na secção 2.2. Seguidamente, 14 indivíduos de cada estuário, selecionados ao acaso, foram mantidos durante 96h em água do mar artificial sem alimento e sem renovação de meio nas condições descritas na secção 2.3. No início e durante o bioensaio foram medidos os parâmetros na água conforme indicado anteriormente (secção 2.3.). A temperatura ambiente e a humidade da sala onde foram efetuados os ensaios variou entre 22,3 °C e 23,2 °C e 44,7 Pa e 64,9 Pa, respectivamente.

Após este período, cada peixe foi transferido para um recipiente com água do mar, tendo-lhe sido oferecido náuplios de *Artemia* ou MEP vermelhas, nas condições anteriormente descritas (secção 2.3.). Após 3 minutos em contato com as “presas”, cada peixe foi colocado em meio limpo (água do mar artificial, conforme descrito em 2.2.), num recipiente de vidro de 1L, contendo 500 ml de meio, com arejamento, onde ficou durante mais 24 horas, tendo sido contabilizado o número de “presas” ingeridas por cada peixe, conforme referido no ponto anterior. Foi ainda avaliada, após as 24 horas, a eventual excreção de MEP por cada peixe, tendo-se numa primeira fase identificado e contado os MEP a olho nú e numa segunda fase tendo-se confirmado à lupa (lupa binocular Nikon SMZ800 fornecida pela *Nikon Instruments Inc.* (USA)).

Os peixes foram eutanasiados após anestesia pelo frio, não tendo sido utilizado outro tipo de anestesia a fim de evitar potenciais interações com o efeito das MEP ou interferência com as técnicas usadas para determinação dos biomarcadores. Após este passo, e sempre sobre gelo, o sistema gastrointestinal foi removido de cada peixe para averiguar a presença de náuplios e/ou MEP. De cada peixe, foi ainda isolada a cabeça, a bÍlis e a parte restante do corpo sempre sobre gelo. Cada cabeça foi colocada em 0,5 ml de tampão fosfato (0,1 M, pH = 7,2), homogeneizada durante 15 segundos, em gelo, usando um homogeneizador Ystral D-79282 fornecido pela *Power Technologies Inc.* (Alemanha). O homogeneizado foi centrifugado (centrífuga refrigerada Eppendorf 5810R) por um período de 3 minutos a 3300 x g, a uma temperatura de 4 °C, sendo então o sobrenadante recolhido e conservado a -80 °C (SANYO Ultra Low Vip Plus Freezer) para posterior determinação da atividade das enzimas colinesterases. A bÍlis de cada peixe foi isolada e conservada a -80°C para posterior análise química. A parte restante do corpo foi homogeneizado em 0,7

ml de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4), em gelo, durante 20 segundos utilizando o mesmo homogeneizador que anteriormente tinha sido utilizado para a cabeça. Posteriormente, 200 µl do homogeneizado foram transferidos para um microtubo de 1,5 ml com 4 µl da solução de hidroxitolueno botilado (BHT) e metanol (4%) (previamente realizada com 0,4 g de BHT e 10 ml de metanol), tendo sido os microtubos conservados a -80 °C para posterior determinação dos níveis de peroxidação lipídica. O resto do homogeneizado foi centrifugado durante 20 minutos a 1000 g (rcf) à temperatura de 4 °C para isolar a fração pós-mitocondrial. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80 °C para posterior determinação da atividade das enzimas EROD e GST.

2.5. Determinação dos Biomarcadores

No dia em que se procedeu à determinação de cada biomarcador, as amostras que estavam conservadas a -80°C foram descongeladas em gelo. Seguidamente e para cada uma delas, determinou-se a quantidade de proteína utilizando a técnica de Bradford (1976), adaptada a microplaca (Frasco *et al.*, 2002) utilizando γ -globulinas de bovino como padrão. De forma resumida, foram feitas na microplaca diluições de 5x para peixes com tamanhos compreendidos entre os 1,1 cm e os 1,8cm, ou seja, foram pipetados 40 µl da amostra e 160 µl de tampão fosfato. Para peixes com tamanhos superiores a 1,8 cm foram feitas na microplaca diluições de 10x, ou seja, 40 µl de amostra e 180 µl de tampão fosfato (0,1 M, pH=7,2 para amostras da cabeça e 0,1 M, pH=7,4 para amostras do corpo). Após a realização das diluições foram transferidos 10 µl das amostras diluídas para os respectivos três poços seguintes, tendo-se adicionado com uma pipeta multi-canais 250 µl da solução Bio-Rad (4 porções de água para 1 de Bio-Rad) e colocado no misturador a microplaca durante 15 minutos, após este tempo, foi lida a absorvância num leitor de microplacas (BIO-TEK, POWERWAVE 340) (BioTek, USA) a 600 nm, a temperatura de 25 °C. Esta determinação foi realizada para todos os biomarcadores. Com base nas determinações efetuadas, a proteína foi padronizada para 0,5 mg/ml nas amostras para determinação da AChE e GST.

No caso da AChE, a atividade foi determinada segundo o método Ellman *et al.* (1961), adaptado a microplaca (Guilhermino *et al.*, 1996), a 25 °C. Assim, 50 µl de cada amostra foram pipetados para cada poço da microplaca, aos quais

foram adicionados 250 µl da solução reação, anteriormente preparada com 200 µl de acetiltiocolina e 1 ml da solução DTNB (0,0198 g de DTNB (ácido 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzóico) e 0,0075 g de NaHCO₃ (bicarbonato de sódio) em 5 ml de tampão fosfato (0,1 M, pH=7,2)) em 30 ml de tampão fosfato (0,1 M, pH=7,2). A taxa a que ocorreu a degradação da AChE foi avaliada a 412 nm, durante 5 minutos, através da medição do aumento da coloração amarela, tendo depois sido feita a seleção da fase linear para calcular a atividade enzimática (automaticamente pelo aparelho). O sobrenadante do homogeneizado da cabeça do góbio comum havia sido descrito anteriormente como contendo essencialmente AChE (Monteiro *et al.*, 2005). Por fim, foi executado um procedimento semelhante ao realizado inicialmente para a proteína, mas sem diluições, por forma a quantificar a proteína e expressar a atividade da enzima em função da proteína (em nanomoles de substrato hidrolizado por minuto por mg de proteína).

Por sua vez, a EROD foi determinada pelo método de Burke e Mayer (1974) e foi lida a cinética no espectrofluorímetro (Jasco, FP-6200) (*Jasco Analytical Instruments*, USA) para o comprimento de onda de excitação de 530 nm e para o comprimento de onda de emissão de 585 nm, durante 4 ciclos de 30 segundos. Para tal, foram pipetados 100 µl de amostra para a cubete, tendo-se juntado 1000 µl de tampão reação (1,5 ml de etoxiresorufina em 49,5 ml de tampão fosfato (0,1 M, pH=7,4)) e 10 µl da solução NADPH (0,0166 g NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido reduzido) em 2 ml de tampão fosfato (0,1 M, pH=7,4)). A atividade enzimática deverá ser expressa em função da proteína (em picomoles de substrato hidrolizado por minuto por mg de proteína).

Quanto à atividade da GST foi avaliada com a fração pós-mitocondrial, segundo o método de Habig (Habig *et al.*, 1974) adaptado a microplacas (Frasco e Guilhermino, 2002). O procedimento foi em muito semelhante ao da AChE, tendo diferido apenas o tampão fosfato utilizado para os brancos (0,1 M, pH=6,5), a solução reação (1,5 ml de CDNB (2,4 - dinitroclorobenzeno), 9 ml de gsh e 49,5 ml de tampão fosfato (0,1 M, pH=6,5)) e o comprimento de onda a que a absorvância foi lida, tendo sido neste caso, de 340 nm. A atividade enzimática deverá ser expressa em função da proteína (em nanomoles de substrato hidrolizado por minuto por mg de proteína).

Por fim, foram ainda determinados os níveis de LPO através da quantificação das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Ohkawa *et al.*, 1979). Assim, 200 µl do homogeneizado foram transferidos dos microtubos da LPO para tubos de 15 ml e foram preparados dois brancos com 200 µl de tampão fosfato (0,1 M, pH=7,4), foram adicionados 1000 µl de TCA 12% (ácido tricloroacético), 800 µl da solução Tris-HCL 60 mM com DTNA (alfa-distrobrevina) 0,1 mM e 1000 µl da solução TBA 0,78%. Após estas adições os tubos foram incubados em banho-maria por um período de 60 minutos a uma temperatura de 100 °C. Seguidamente, 2 ml da solução de cada tubo foram transferidos para microtubos e centrifugados a uma velocidade de 11500 rpm, durante 5 minutos a uma temperatura de 25 °C. Por último, foi lida a absorvância no espectrofotômetro a 535 nm.

2.6. Análise Estatística

Os dados foram testados quanto à homogeneidade da variância (teste Bartlett's) e normalidade de distribuição (teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov), a fim de testar os dois pressupostos principais da análise de variância (ANOVA). No primeiro bioensaio, o número de “presas” ingerido pelos peixes de cada tratamento (*i.e.* náuplios de *Artemia*, MEP de 3 tipos, ou combinações de náuplios e MEP) foi comparado utilizando uma ANOVA de dois fatores com interação (2-way ANOVA), utilizando o tratamento (*i.e.* tipo de presas) e o estuário de origem dos juvenis como fatores principais. Seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey ou Dunnett quando foram encontradas diferenças significativas e quando aplicável. No segundo ensaio, para cada biomarcador e para o número de “presas” ingerido utilizaram-se também 2-way ANOVA para comparar peixes de diferentes estuários e de distintos tratamentos, e investigar a potencial interação entre os dois fatores.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS, versão 20, e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

3. Resultados e Discussão

3.1. Mortalidade e Fatores Abióticos durante os Ensaios

Durante os ensaios não se observou mortalidade durante os períodos em que os organismos estiveram mantidos durante 96h sem alimento, pelo que relativamente à exigência de um máximo de 10% de mortalidade nos controlos de acordo com as normas da OECD (OECD, 1992), ambos os ensaios podem ser considerados válidos. Os resultados da temperatura, pH, oxigénio dissolvido e salinidade medidos no meio de teste ao longo do primeiro bioensaio estão indicados na **Tabela 2** e os do segundo bioensaio estão indicados na **Tabela 3**. Em ambos os casos, o pH do meio de teste situou-se sempre entre as 6 e as 8,5 unidades, o oxigénio dissolvido no meio de teste foi sempre superior a 60%, pelo que relativamente a esses parâmetros, os ensaios podem ser considerados válidos segundo as normas da OECD (1992). A temperatura variou sempre menos de 2 °C nas medições, no entanto, durante o período noturno poderá ter variado mais, mas pretendia-se simular o ciclo dia/noite.

Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos determinados no meio de teste ao longo de 96h dos ensaios destinados a avaliar se os juvenis de *Pomatoschistus microps* confundem microplásticos com presas. Os valores indicados para cada parâmetro correspondem à média das determinações efetuadas em 9 recipientes-teste com o respectivo erro padrão da média (E.P.M.).

	Parâmetro	0h	24h	48h	72h	96h	Diferença 96h-0h
Recipientes-teste com peixes do estuário do rio Minho	Temperatura (°C)	17,4 ± 0,158	17,6 ± 0,196	17,4 ± 0,282	17,2 ± 0,175	17,6 ± 0,193	0,20 ± 0,035
	Salinidade (mg/L)	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	0
	pH	8,42 ± 0,013	8,43 ± 0,014	8,44 ± 0,020	8,45 ± 0,016	8,45 ± 0,015	0,03 ± 0,002
	Oxigénio dissolvido (mg/L)	9,73 ± 0,042	9,60 ± 0,056	9,60 ± 0,089	9,71 ± 0,045	9,61 ± 0,042	0,12
Recipientes-teste com peixes do estuário do rio Lima	Temperatura (°C)	17,8 ± 0,182	18,0 ± 0,164	17,3 ± 0,275	17,2 ± 0,138	17,7 ± 0,188	0,10 ± 0,006
	Salinidade (mg/L)	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	0
	pH	8,40 ± 0,016	8,41 ± 0,016	8,40 ± 0,020	8,41 ± 0,015	8,41 ± 0,016	0,01
	Oxigénio dissolvido (mg/L)	9,68 ± 0,044	9,57 ± 0,044	9,66 ± 0,062	9,69 ± 0,050	9,58 ± 0,048	0,10 ± 0,004

Tabela 3 – Parâmetros físico-químicos determinados no meio de teste ao longo de 96h dos ensaios destinados a avaliar se os efeitos dos microplásticos sobre os juvenis de *Pomatoschistus microps*. Os valores indicados para cada parâmetro correspondem à média das determinações efetuadas em 7 recipientes-teste com o respectivo erro padrão da média (E.P.M.).

	Parâmetro	0h	24h	48h	72h	96h	Diferença 96h-0h
Recipientes-teste com peixes do estuário do rio Minho	Temperatura (°C)	20,4 ± 0,081	20,9 ± 0,086	20,9 ± 0,064	20,9 ± 0,058	21,2 ± 0,070	0,80 ± 0,011
	Salinidade (mg/L)	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	0
	pH	8,30 ± 0,011	8,31 ± 0,009	8,33 ± 0,008	8,33 ± 0,010	8,29 ± 0,023	0,01 ± 0,012
	Oxigénio dissolvido (mg/L)	9,67 ± 0,040	9,66 ± 0,052	9,73 ± 0,063	9,55 ± 0,044	9,69 ± 0,049	0,02 ± 0,009
Recipientes-teste com peixes do estuário do rio Lima	Temperatura (°C)	21,8 ± 0,039	22,8 ± 0,081	22,6 ± 0,073	22,5 ± 0,097	22,0 ± 0,129	0,20 ± 0,090
	Salinidade (mg/L)	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	18 x 10 ³ ± 1,0 x 10 ³	0
	pH	8,35 ± 0,029	8,34 ± 0,012	8,37 ± 0,008	8,41 ± 0,008	8,43 ± 0,005	0,08 ± 0,024
	Oxigénio dissolvido (mg/L)	9,66 ± 0,042	9,57 ± 0,048	9,73 ± 0,055	9,59 ± 0,057	9,65 ± 0,046	0,01 ± 0,004

3.2. Bioensaio para Avaliar se os Juvenis de P. microps confundem MP com Presas

Na **Figura 4** é apresentada a média do número total de “presas” ingerido pelos peixes dos estuários dos rios Minho e Lima, enquanto que nas **Figuras 5 e 6** é apresentada a média do número de “presas” ingerido em cada tratamento pelos juvenis provenientes dos estuários dos rios Minho e Lima, respectivamente. Foram encontradas diferenças significativas entre peixes de diferentes estuários, e no número de presas ingeridas em diferentes tratamentos, sendo a interação entre os dois fatores não significativa (**Tabela 4**). Os peixes do Minho ingeriram significativamente mais “presas” do que os juvenis do estuário do Lima, o que sugere uma maior capacidade predadora dos primeiros relativamente aos segundos. Este facto, poderá estar relacionado com a exposição de longo prazo da população do estuário do rio Lima a níveis mais elevados de contaminação, conforme sugerem também as diferenças no estado de saúde destas duas populações observadas no estudo de Guimarães *et al.* (2012). Em ambos os estuários, os juvenis capturaram e ingeriram significativamente mais náuplios de

Artemia do que MEP, quando cada presa era oferecida isoladamente e na maioria dos tratamentos de mistura de “presas” (**Figura 5 e 6, Tabela 4**). Um dos fatores que pode ajudar os peixes a distinguir os náuplios de *Artemia* das MEP é a mobilidade dos primeiros. No entanto, os resultados da **Tabela 4** também indicam que não houve diferenças significativas no número total de presas ingerido entre o grupo controlo, a quem foram só oferecidos náuplios de *Artemia*, e o tratamento em que foram oferecidos 15 náuplios de *Artemia* e 15 MEP-B. Esta evidência e o facto dos peixes quando alimentados apenas com MEP-B ingerirem entre 25 % (Minho) e 33 % (Lima), relativamente ao grupo em que foram oferecidos apenas náuplios de *Artemia*, sugerem que os juvenis confundem estas partículas com os náuplios, talvez por ambos terem uma cor esbranquiçada. Os resultados da **Figura 5 e 6** também sugerem que os peixes confundem menos MEP-V e MEP-P com presas do que as MEP-B. Para além de a cor ser diferente da coloração dos náuplios de *Artemia*, as MEP-V possuem uma densidade menor, ficando normalmente na superfície da água, enquanto que os peixes tinham tendência para permanecer mais junto ao fundo do recipiente. Relativamente às MEP-P, para além da maior diferença da cor relativamente aos náuplios de *Artemia*, possuem algum magnetismo, o que poderá eventualmente contribuir para que os peixes as distingam melhor de presas reais do que as MEP-B. Quando as “presas” oferecidas foram 15 náuplios de *Artemia* e 15 MEP-B, os peixes do estuário do Lima ingeriram cerca de 41 % de MEP-B, enquanto os do Minho ingeriram apenas 6,25 % destas partículas. Estes resultados sugerem que os peixes do rio Minho conseguem discriminar melhor os náuplios de *Artemia* das MEP-B do que os do Lima, podendo ser levantada hipótese de que a exposição a longo prazo da população de origem à poluição pode interferir com a capacidade dos peixes para distinguirem presas reais de outras partículas em suspensão. Infelizmente, o nosso plano experimental não nos permite ir mais longe nesta questão que será do maior interesse investigar em estudos futuros.

Independentemente das causas, os resultados deste estudo demonstram que os juvenis de *P. microps* podem capturar e ingerir MP, confundindo-os com presas, o que está de acordo com os resultados de um estudo de biomonitorização efetuado com *Zeus faber*, onde se verificou a ingestão de MP por esta espécie em cenários reais (Lusher *et al.*, 2013).

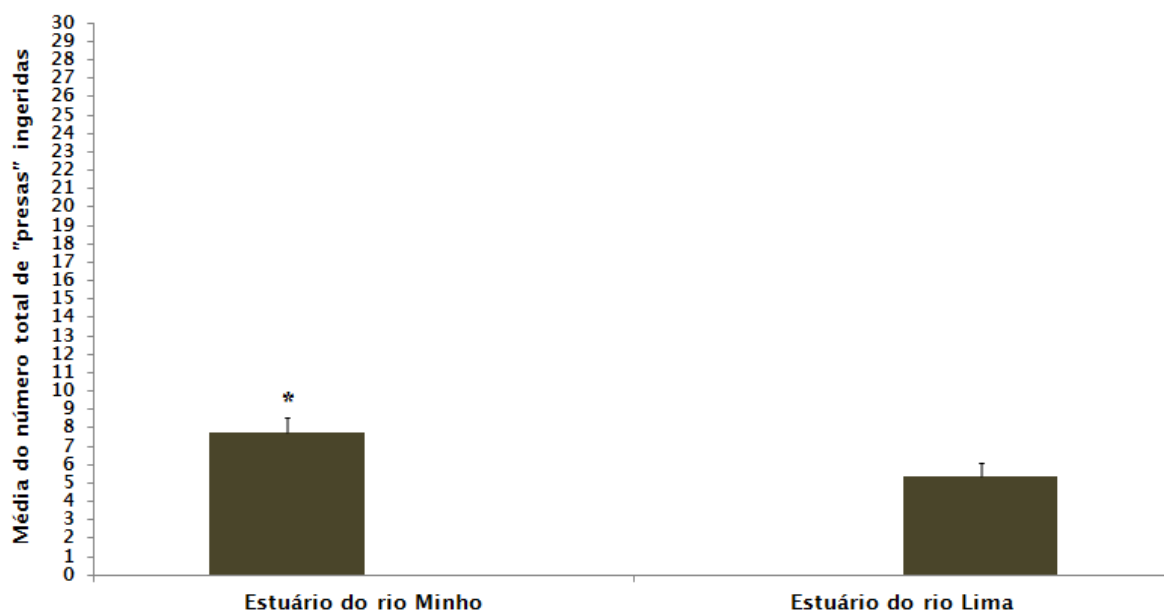


Figura 4 - Média do número total de presas ingeridas por juvenis de *Pomatoschistus microps* provenientes dos estuários dos rios Minho e Lima, com as correspondentes barras de erro padrão da média. * indica diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0.05$).

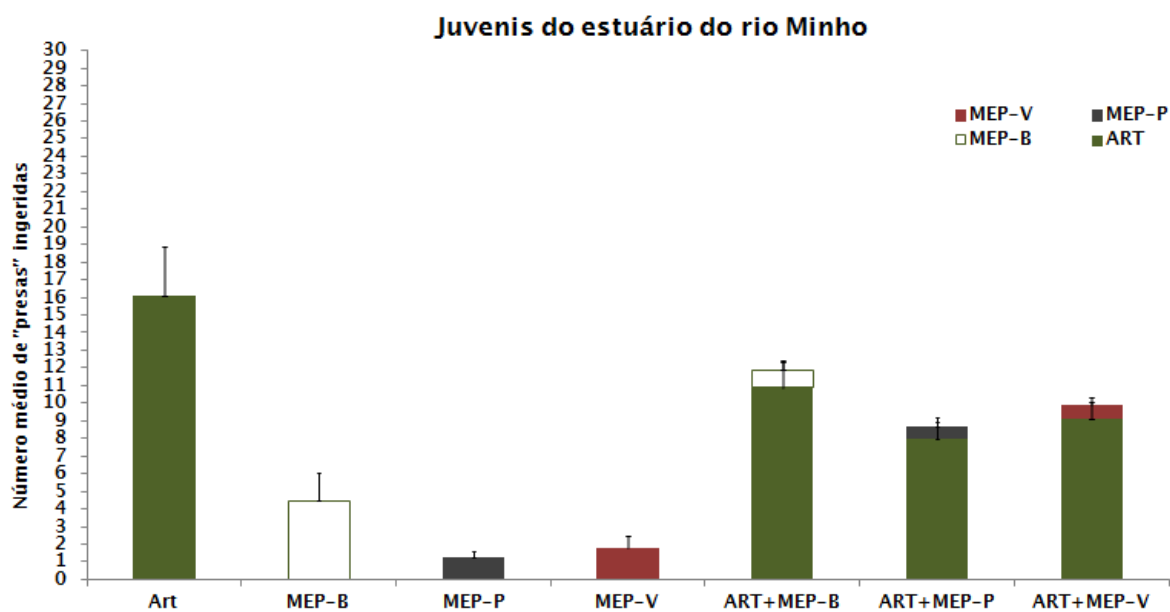


Figura 5 - Número de náuplios de *Artemia franciscana* e/ou de microesferas de polietileno de diferentes cores ingeridas por juvenis de *Pomatoschistus microps* provenientes do estuário do rio Minho. Em cada tratamento, o valor indica a média de nove peixes com a correspondente barra de erro padrão da média. ART - náuplios de *Artemia franciscana*; MEP-B - microesferas de polietileno brancas; MEP-P - microesferas de polietileno pretas; MEP-V - microesferas de polietileno vermelhas; ART+MEP-B - náuplios de *A. franciscana* + microesferas de polietileno brancas; ART+MEP-P - náuplios de *A. franciscana* + microesferas de polietileno pretas; ART+MEP-V - náuplios de *A. franciscana* + microesferas de polietileno vermelhas.

Juvenis do estuário do rio Lima

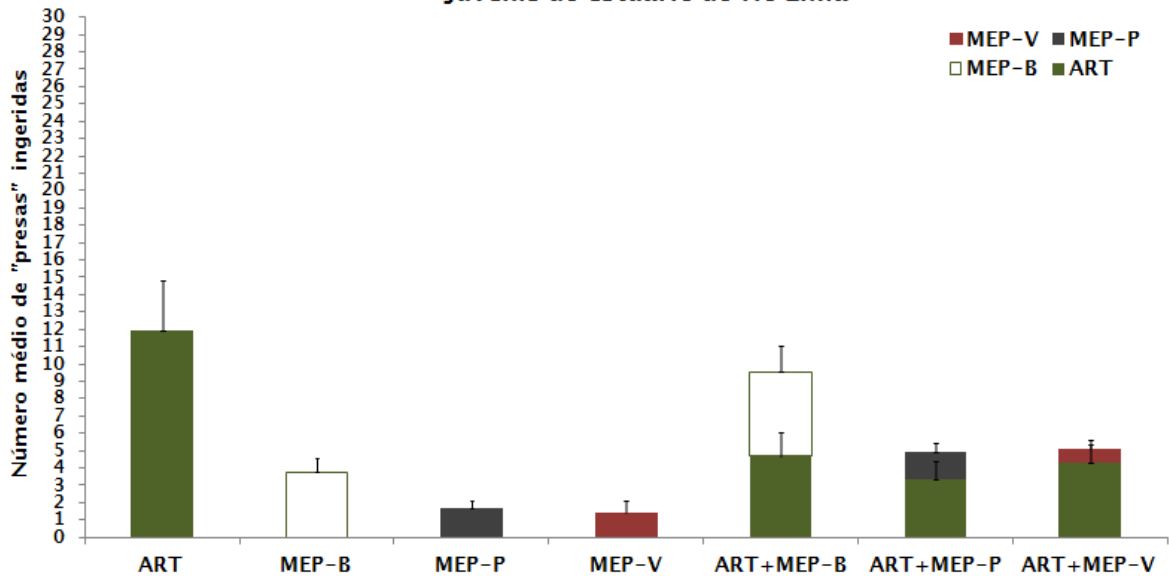


Figura 6 – Número de náuplios de *Artemia franciscana* e/ou de microesferas de polietileno de diferentes cores ingeridas por juvenis de *Pomatoschistus microps* provenientes do estuário do rio Lima. Em cada tratamento, o valor indica a média de nove peixes com a correspondente barra de erro padrão da média. ART – náuplios de *Artemia franciscana*; MEP-B – microesferas de polietileno brancas; MEP-P – microesferas de polietileno pretas; MEP-V – microesferas de polietileno vermelhas; ART+MEP-B – náuplios de *A. franciscana* + microesferas de polietileno brancas; ART+MEP-P – náuplios de *A. franciscana* + microesferas de polietileno pretas; ART+MEP-V – náuplios de *A. franciscana* + microesferas de polietileno vermelhas.

Tabela 4 – Valores e diferenças correspondentes às diferenças entre o número de “presas” ingeridos em cada estuário (rio Minho e Lima), às diferenças totais entre os tratamentos e à interação entre o estuário e o tratamento. ART – náuplios de *Artemia franciscana*; MEP-B – microesferas de polietileno brancas; MEP-P – microesferas de polietileno pretas; MEP-V – microesferas de polietileno vermelhas; ART+MEP-B – náuplios de *A. franciscana* + microesferas de polietileno brancas; ART+MEP-P – náuplios de *A. franciscana* + microesferas de polietileno pretas; ART+MEP-V – náuplios de *A. franciscana* + microesferas de polietileno vermelhas.

		F	P	Conclusão/Tukey
Factor	Estuários (Figura 4)	$F_{(1,112)} = 7,894$	$P \leq 0,05$	Há diferenças significativas
	Tratamento (Figura 5 e 6)	$F_{(6,112)} = 17,983$	$P \leq 0,05$	ART – a ART+MEP-B – a, b ART+MEP-P – b, c ART+MEP-V – b, c MEP-B – c, d MEP-P – d MEP-V – d
	Interação (Estuário x Tratamento)	$F_{(6,112)} = 0,084$	$P > 0,05$	Não há diferenças significativas

3.3. Bioensaio para Avaliar os Efeitos das MEP Ingeridas

Na **Figura 7** está indicado o número de “presas” ingeridas por juvenis dos estuários dos rios Minho e Lima, sendo os resultados da análise estatística apresentados na **Tabela 5**. Não houve diferenças significativas entre peixes provenientes de diferentes os estuários (**Figura 7**), sendo que em ambos os casos, o número de náuplios de *Artemia* ingerido foi significativamente superior ao número de MEP-V ingeridas (**Figura 8**). Estes resultados estão de acordo com os obtidos no primeiro bioensaio (secção 3.2.) e indicam que apenas um pequeno número de *P. microps* confunde as MEP-V com alimento. As MEP-V ingeridas foram todas excretadas pelos peixes num intervalo de 24 horas, tendo perdido a cor original e apresentado uma cor esbranquiçada (**Figura 9**). Este resultado sugere que os agentes que conferiam a cor vermelha foram absorvidos pelos peixes.

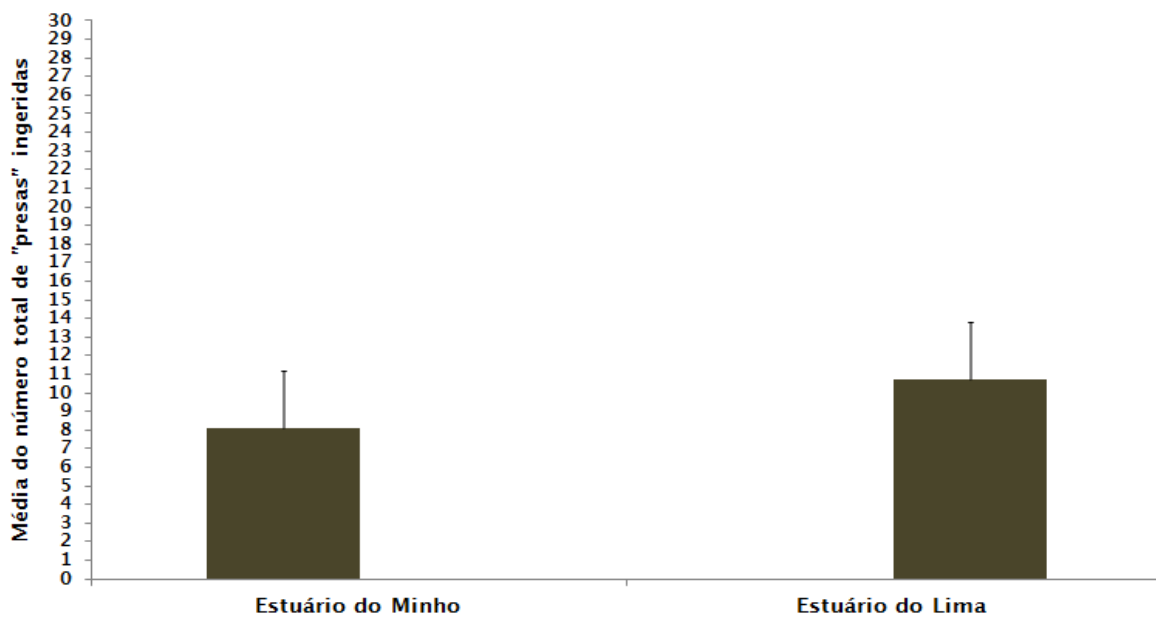


Figura 7 – Média do número total de presas ingeridas por juvenis de *Pomatoschistus microps* provenientes dos estuários dos rios Minho e Lima, com as correspondentes barras de erro padrão da média.

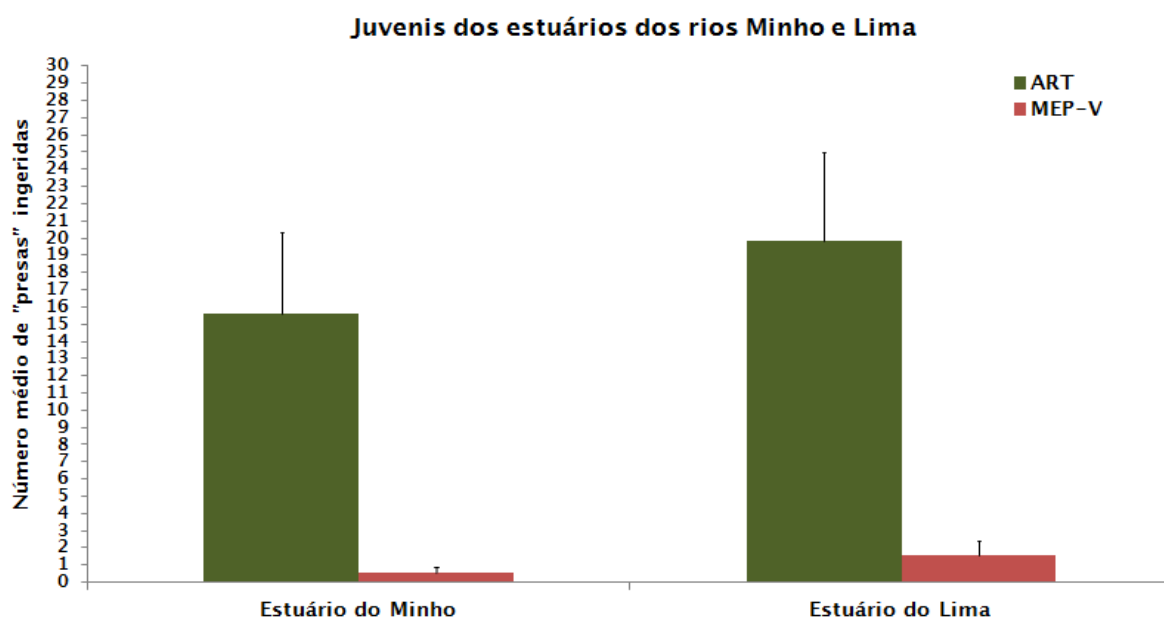


Figura 8 - Número de náuplios de *Artemia franciscana* ou de microesferas de polietileno vermelhas ingeridas por juvenis de *Pomatoschistus microps* provenientes do estuário do rio Minho e Lima. Em cada tratamento, o valor indica a média de sete peixes com a correspondente barra de erro padrão da média. ART - náuplios de *Artemia franciscana*; MEP-V - microesferas de polietileno vermelha.

Tabela 5 - Valores e diferenças correspondentes às diferenças entre o número de “presas” ingeridos em cada estuário (rio Minho e Lima), às diferenças entre a ingestão em cada tratamento e à interação entre o estuário e o tratamento.

		F	P	Conclusão/Dunnett
Factor	Estuários (Figura 7)	$F_{(1,24)} = 0,555$	$P > 0,05$	Não há diferenças significativas
	Tratamento (Figura 8)	$F_{(1,24)} = 22,012$	$P \leq 0,05$	Há diferenças significativas
	Interação (Estuário x Tratamento)	$F_{(1,24)} = 0,214$	$P > 0,05$	Não há diferenças significativas

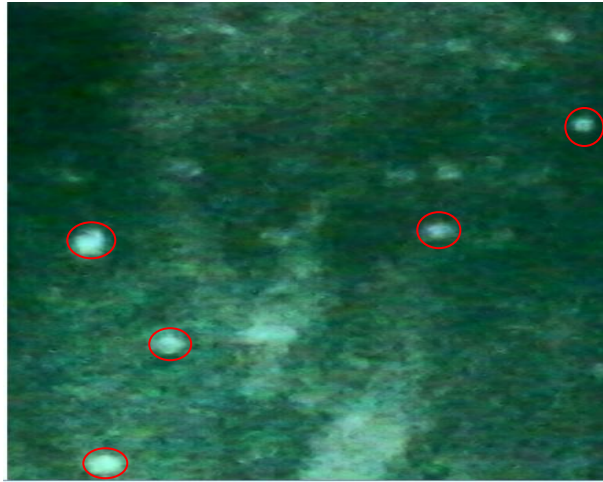


Figura 9 – Microesferas de polietileno vermelhas ingeridas por juvenis de *Pomatoschistus microps* provenientes do estuário do rio Lima que se apresentavam de cor branca após passagem pelo sistema gastrointestinal dos peixes. (Ampliação 6x, lupa binocular Nikon SMZ800 fornecida pela *Nikon Instruments Inc.* (USA).

A média de atividade da enzima AChE determinada na fracção solúvel de homogeneizado da cabeça de *P. microps*, alimentados com náuplios de *Artemia*, provenientes dos estuários dos rios Minho e Lima foi de $95,1 \pm 9,32$ e $127, 2 \pm 13,5$, respectivamente (**Figura 10**). Estes valores são semelhantes aos reportados em juvenis de dimensões semelhantes provenientes do rio Minho (Oliveira *et al.*, 2013). Não foram encontradas diferenças significativas entre peixes provenientes dos estuários dos rios Minho e Lima, nem entre organismos alimentados com náuplios ou com MEP-V, sendo a interacção entre os dois fatores também não significativa (**Tabela 6**). Estes resultados sugerem que nem as MEP-V nem o(s) agente(s) que lhe(s) confere(m) a cor são anticolinesterásicos. Num estudo anterior com juvenis da mesma espécie (Oliveira *et al.*, 2013) expostos durante 96h a MEP de menores dimensões inibiram significativamente a atividade da AChE. As diferenças entre os dois estudos podem ser devidas, entre outras causas, à presença de constituintes dos MP usados no estudo de Oliveira *et al.* (2013) que não estão presentes nas MEP-V usadas no presente estudo e/ou à menor dimensão dos MP usados no referido estudo que podem causar efeitos diretos ou indiretos (*e.g.* colmatção das brânquias) e à diferença das condições de exposição (tempo).

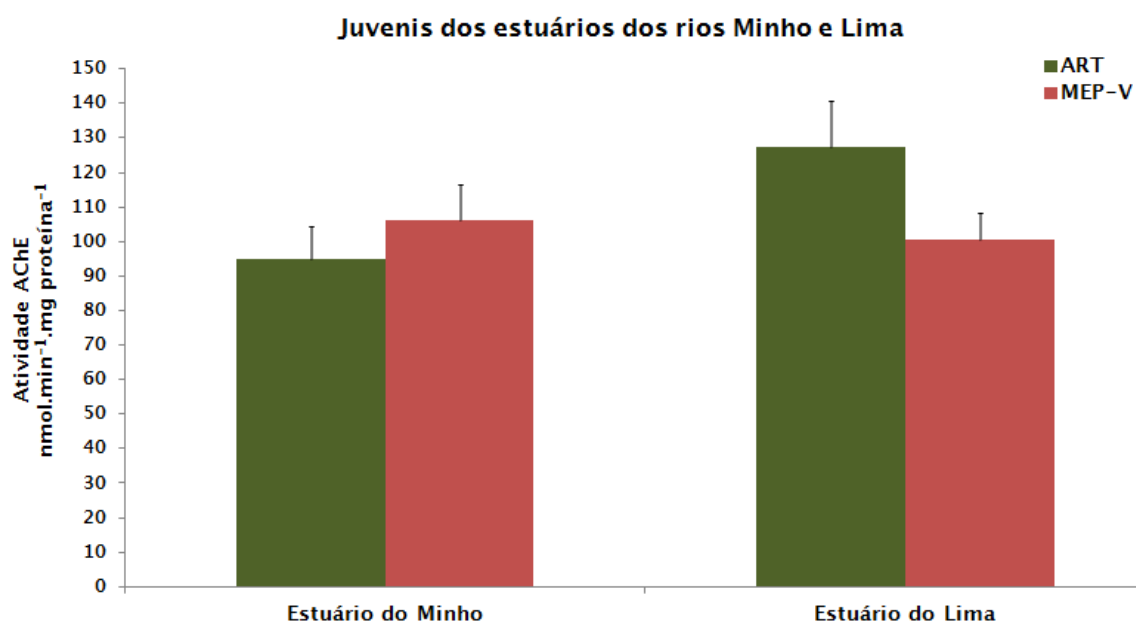


Figura 10 - Atividade da AChE medida na cabeça de *Pomatoschistus microps* provenientes do estuário do rio Minho e Lima. Em cada tratamento, o valor indica a média de sete peixes com a correspondente barra de erro padrão da média. ART - náuplios de *Artemia franciscana*; MEP-V - microesferas de polietileno vermelha.

Tabela 6 - Valores e diferenças correspondentes às diferenças da atividade da AChE entre estuários (rio Minho e Lima), às diferenças das atividades entre tratamentos e à interação entre o estuário e o tratamento.

		F	P	Conclusão/Dunnett
Factor	Estuários	$F_{(1,24)} = 1,634$	$P > 0,05$	Não há diferenças significativas
	Tratamento	$F_{(1,24)} = 0,572$	$P > 0,05$	Não há diferenças significativas
	Interação (Estuário x Tratamento)	$F_{(1,24)} = 3,244$	$P > 0,05$	Não há diferenças significativas

Foram observadas diferenças significativas na atividade da EROD entre peixes de estuários distintos, entre tratamentos mas a interação entre os dois fatores não foi significativa (Figura 11, Tabela 7). A atividade desta enzima foi superior nos juvenis provenientes do estuário do rio Lima do que nos peixes provenientes do estuário do Minho, sugerindo pré-exposição da população de origem a indutores desta enzima. Relativamente aos peixes alimentados com náuplios, os que foram alimentados com MEP-V, apresentaram níveis de atividade da EROD significativamente inferiores, sugerindo exposição a agentes inibidores desta enzima.

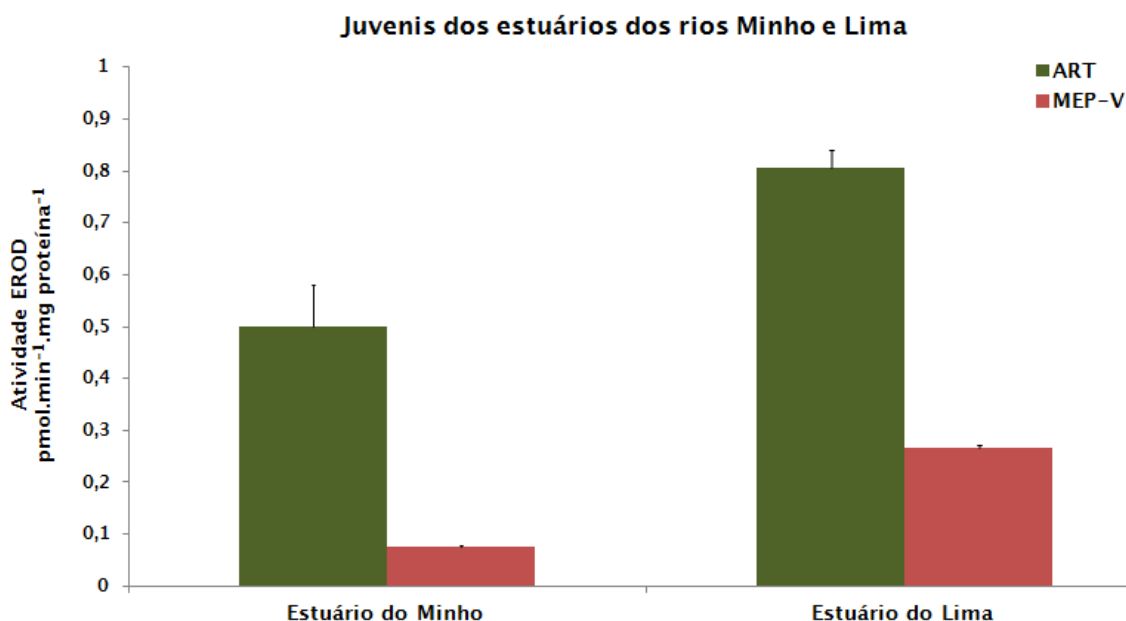


Figura 11 – Atividade da EROD medida no corpo de *Pomatoschistus microps* provenientes do estuário do rio Minho e Lima. Em cada tratamento, o valor indica a média de sete peixes com a correspondente barra de erro padrão da média. ART – náuplios de *Artemia franciscana*; MEP-V – microesferas de polietileno vermelha.

Tabela 7 – Valores e diferenças correspondentes às diferenças da atividade da EROD entre estuários (rio Minho e Lima), às diferenças das atividades entre tratamentos e à interação entre o estuário e o tratamento.

		F	P	Conclusão/Dunnett
Factor	Estuários	$F_{(1,4)} = 9,059$	$P \leq 0,05$	Há diferenças significativas
	Tratamento	$F_{(1,4)} = 34,369$	$P \leq 0,05$	Há diferenças significativas
	Interação (Estuário x Tratamento)	$F_{(1,4)} = 0,525$	$P > 0,05$	Não há diferenças significativas

A atividade média da GST determinada no presente estudo para os organismos alimentados com náuplios de *Artemia* foi de $26,5 \pm 3,26$ para o estuário do rio Minho e de $22,4 \pm 3,70$ para o estuário do rio Lima. Estes valores são inferiores aos mencionados no estudo de Oliveira *et al.* (2013). Neste estudo não se verificaram diferenças significativas na atividade da GST entre peixes provenientes de estuários distintos, entre peixes que ingeriram presas distintas (Figura 12, Tabela 8), nem na interação destes dois fatores (Tabela 8). Estes resultados são semelhantes aos reportados por Oliveira *et al.* (2013) em juvenis expostos a outro tipo de MP.

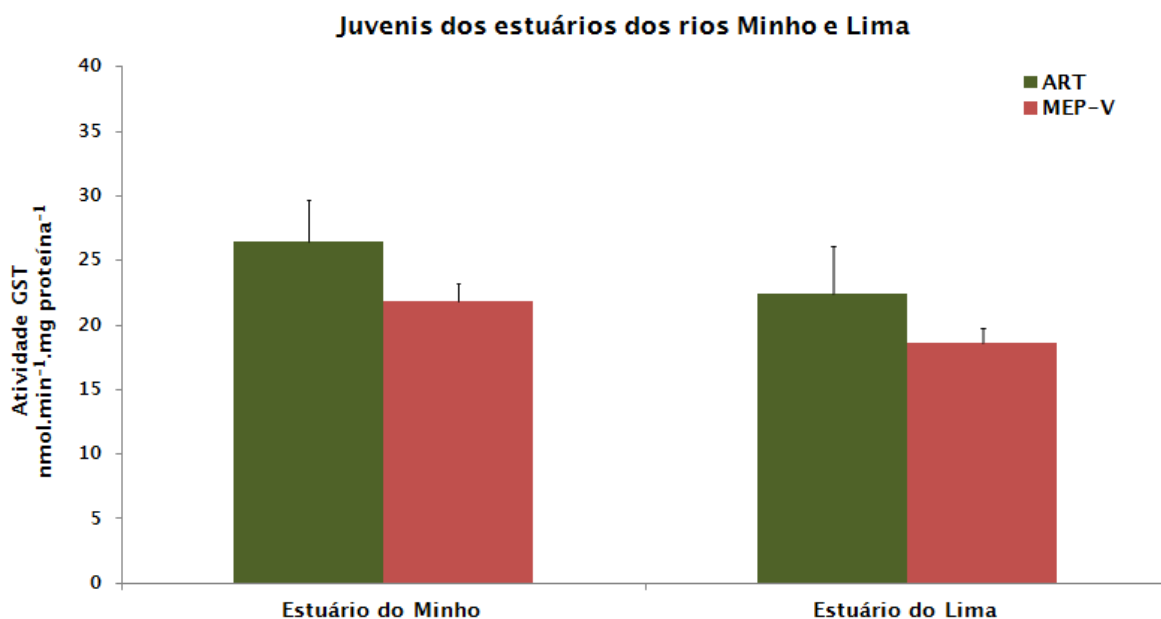


Figura 12 - Atividade da GST medida no corpo de *Pomatoschistus microps* provenientes do estuário do rio Minho e Lima. Em cada tratamento, o valor indica a média de sete peixes com a correspondente barra de erro padrão da média. ART - náuplios de *Artemia franciscana*; MEP-V - microesferas de polietileno vermelha.

Tabela 8 - Valores e diferenças correspondentes às diferenças da atividade da GST entre estuários (rio Minho e Lima), às diferenças das atividades entre tratamentos e à interação entre o estuário e o tratamento.

		F	P	Conclusão/Dunnett
Factor	Estuários	$F_{(1,24)} = 1,946$	$P > 0,05$	Não há diferenças significativas
	Tratamento	$F_{(1,24)} = 2,558$	$P > 0,05$	Não há diferenças significativas
	Interação (Estuário x Tratamento)	$F_{(1,24)} = 0,024$	$P > 0,05$	Não há diferenças significativas

Os níveis de LPO determinados no presente estudo (**Figura 13**) são inferiores aos referidos por Oliveira *et al.* (2013). As diferenças significativas nos níveis de LPO entre estuários sugerem, mais uma vez, que tal se poderá dever a diferentes níveis e tipos de contaminação ambiental a que os organismos se encontram expostos nos seus estuários de origem (Guimarães *et al.*, 2012), e não à utilização de MEP como “presas”, uma vez que não se observam diferenças significativas entre tratamentos (**Figura 13, Tabela 9**), o que indica que as MEP-V e/ou o(s) agente(s) que lhe(s) confere(m) a cor não causa(m) danos de stress oxidativo significativos.

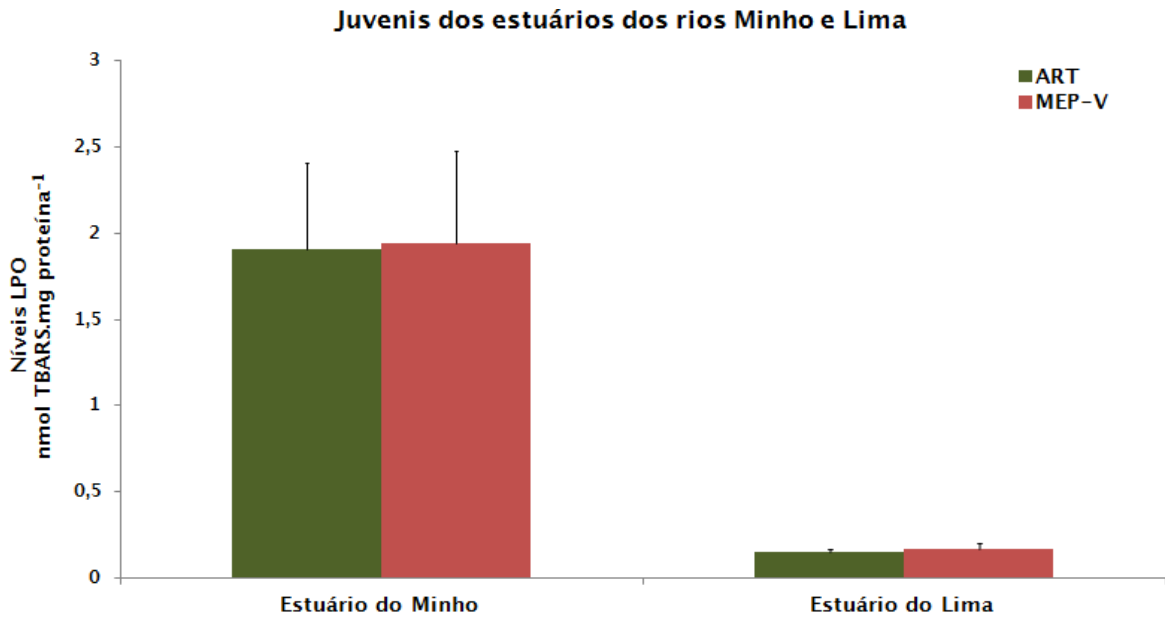


Figura 13 - Níveis de LPO medida no corpo de *Pomatoschistus microps* provenientes do estuário do rio Minho e Lima. Em cada tratamento, o valor indica a média de sete peixes com a correspondente barra de erro padrão da média. ART - náuplios de *Artemia franciscana*; MEP-V - microesferas de polietileno vermelha.

Tabela 9 - Valores e diferenças correspondentes às diferenças de níveis de LPO entre estuários (rio Minho e Lima), às diferenças de níveis entre tratamentos e à interação entre o estuário e o tratamento.

		F	P	Conclusão/Dunnett
Factor	Estuários	$F_{(1,24)} = 22,603$	$P \leq 0,05$	Há diferenças significativas
	Tratamento	$F_{(1,24)} = 0,005$	$P > 0,05$	Não há diferenças significativas
	Interação (Estuário x Tratamento)	$F_{(1,24)} = 0,000$	$P > 0,05$	Não há diferenças significativas

4. Conclusões e Perspectivas Futuras

Os resultados do presente estudo indicaram que: 1) juvenis precoces (grupo etário 0⁺) confundem alguns tipos de microplásticos com presas e que a semelhança de cor entre os microplásticos e as presas poderá ser um factor importante; 2) a exposição a longo prazo à contaminação ambiental poderá diminuir a capacidade dos peixes para discriminarem presas reais de microplásticos; 3) As MEP-V perdem a cor vermelha após passagem pelo sistema gastrointestinal dos juvenis, sugerindo que o(s) agente(s) responsável(eis) pela cor é(são) absorvido(s); 4) A ingestão das MEP-V inibe a atividade da enzima EROD, sugerindo a sua ligação a componentes das MEP-V libertados após absorção das mesmas, possivelmente num mecanismo de biotransformação; 5) As MEP-V não causaram efeitos na actividade das enzimas AChE e GST em juvenis de *P. microps*.

Na continuação deste trabalho, seria interessante investigar os efeitos das MEP-B, uma vez que são as mais confundidas com presas reais, estudar de forma mais aprofundada a contribuição de cada característica (*e.g.* cor, magnetismo) na capacidade de discriminação dos peixes, e o papel da pré-exposição a longo prazo da população de origem na capacidade dos peixes discriminarem entre MP e presas. Seria ainda interessante, utilizar a bÍlis dos organismos para avaliar possíveis substâncias libertadas pelos MP que fossem excretadas pela mesma.

Referências

- Anacleto, E., Gomes, E., 2006. *Plankton trophic relationships in a tropical estuarine environment: Lagoa dos Patos (RS), BRASIL. Saúde e Ambiente em Revista* 2: 26–39.
- Andrady, A.L., 2011. *Microplastics in the marine environment. Marine Pollution Bulletin* 62: 1596–1605.
- Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., 2009. *Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364: 1985–1998.
- Berrebi, P., Rodriguez, P., Tomasini, J.-A., Cattaneo-Berrebi, G., Crivelli, A.J., 2005. *Differential distribution of the two cryptic species, Pomatoschistus microps and P. marmoratus, in the lagoons of southern France, with an emphasis on the genetic organization of P. microps. Estuarine. Coastal and Shelf Science* 65: 708–716.
- Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E. M., Heuvel-Greve, M. J., Koelmans, A. A.. 2013. *Effects of microplastic on fitness and PCB bioaccumulation by the lugworm Arenicola marina (L.). Environmental Science and Technology* 47: 593–600.
- Betts, K., 2008. *Why small plastic particles may pose a big problem in the oceans. Environmental Science & Technology* 42 (24): 8995–8995.
- Bockhorn, H., Hornung, A., Hornung, U., Schawaller, D., 1999. *Kinetic study on the thermal degradation of polypropylene and polyethylene. Journal of Analytic and Applied Pyrolysis*, 48: 93–109.
- Bradford, M.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.
- Brillant, M.G.S., MacDonald, B.A., 2002. *Postingestive selection in the sea scallop (Placopecten magellanicus) on the basis of chemical properties of particles. Marine Biology* 141: 457–465.
- Browne, M.A., Galloway, T.S., Thompson, R., 2007. *Microplastic – an emerging contaminant of potential concern?. Integrated Environmental Assessment and Management* 3: 559–561.
- Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M., Thompson, R.C., 2008. *Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, Mytilus edulis (L.). Environmental Science and Technology* 42: 5026–5031.

- Browne, M.A., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2010. *Spatial patterns of plastic debris along estuarine shorelines. Environmental Science & Technology* 44: 3404– 3409.
- Burke, M.D., Mayer, R.T., 1974. *Ethoxyresorufin: direct fluorometric assay of microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholantrene. Drug Metabolism and Disposition* 2: 583–588.
- Carpenter, E.J., Smith Jr., K.L., 1972. *Plastics on the Sargasso Sea surface. Science* 175: 1240–1241.
- Carpenter, E.J., Anderson, S.J., Harvey, G.R., Miklas, H.P., Peck, B.B., 1972. *Polystyrene spherules in coastal water. Science* 178: 749–750.
- Claessens, M., Meester, S.D., Landuyt, L.V., Clerck, K.D., Janssen, C.R., 2011. *Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. Marine Pollution Bulletin* 62: 2199–2204.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. *Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. Marine Pollution Bulletin* 62: 2588–2597.
- Costa, M.J., 1988. *Ecologie alimentaire des poissons de l'estuaire du Tage. Cybium* 12: 301–320.
- Derraik, J.G.B., 2002. *The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. Marine Pollution Bulletin* 44: 842–852.
- Ellman, G.L, Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology* 7: 88–95.
- Fendall, L.S., Sewell, M.A., 2009. *Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. Marine Pollution Bulletin* 58: 1225–1228.
- Fowler, C.W., 1987. *Marine debris and northern fur seals: a case study. Marine Pollution Bulletin* 18 (6): 326–335.
- Frasco, M.F., Guilhermino, L., 2002. *Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of Poecilia reticulata. Fish Physiology and Biochemistry* 26: 149–156.
- Galgani, F., Fleet, D., Franeker, J.V., Katsanevakis, S., Maes, T., Mouat, J., Oosterbaan, L., Poitou, L., Hanke, G., Thompson, R., Amato, E., Birkun, A., Janssen, C., 2010. *Task group 10 report: marine litter. In: Zampoukas, N. (Ed.), Marine Strategy Framework Directive. JRC, IFREMER & ICES.*
- Garcia, L. M., Castro, B., Guilhermino, L., 2000. *Characterization of cholinesterases from guppy (Poecilia reticulata) muscle and its in vitro inhibition by environmental contaminants. Biomarkers* 5 (4): 274–284.

- Godoi, A., Favoreto, R., Santiago-Silva, M., 2003. *Environmental contamination for organotin compounds. Quimica Nova* 26 (5): 708–716.
- Goksøyr, A., Förlin, L., 1992. *The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. Aquatic Toxicology* 22: 287–312.
- Graham, E.R., Thompson, J.T., 2009. *Deposit- and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 368: 22–29.
- Gregory, M.R., 1996. *Plastic “scrubbers” in hand cleansers: a further (and minor) source for marine pollution identified. Marine Pollution Bulletin* 32: 867–871.
- Guilhermino, L., Lopes, M.C., Carvalho, A.P., Soares, A., 1996. *Acetylcholinesterase activity in juveniles of Daphnia magna Straus. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 57: 979–985.
- Guilhermino, L., Barros, P., Silva, M. C., Soares, A. M. V. M., 1998. *Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned?. Biomarkers* 3 (2): 157–163.
- Guimarães, L., Medina, M. H., Guilhermino, L., 2012. *Health status of Pomatoschistus microps populations in relation to pollution and natural stressors: implications for ecological risk assessment. Biomarkers* 17 (1): 62–77.
- Hart, M.W., 1991. *Particle capture and the method of suspension feeding by echinoderm larvae. Biology Bulletin* 180: 12–27.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. *Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry* 249: 7130–7139.
- Klaassen, C. D., 2008. Disposition of toxicants. Em: *Casarett and Doull’s Toxicology: The Basic Science of Poisons*. Klaassen, C. D (Ed.). Vol I., 7º Edição, McGraw Hill, Nova Iorque, 129–325.
- Leitão, R., Martinho, F., Neto, J.M., Cabral, H., Marques, J.C., Pardal, M.A., 2006. *Feeding ecology, population structure and distribution of Pomatoschistus microps (Kroyer, 1838) and Pomatoschistus minutes (Pallas, 1770) in a temperate estuary, Portugal. Estuarine, Coastal, and Shelf Science* 66: 231–239.

- Lusher, A.L, McHugh, M., Thompson, R.C., 2013. *Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. Marine Pollution Bulletin* 67: 94–99.
- Monteiro, M., Quintaneiro, C., Morgado, F., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2005. *Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the estuarine fish Pomatoschistus microps: application to biomonitoring. Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 341–347.
- Monteiro, M., Quintaneiro, C., Pastorinho, M., Pereira, M.L., Morgado, F., Guilhermino, L., Soares, A.M.M., 2006. *Acute effects of 3,4-dichloroaniline on biomarkers and spleen histology of the common goby Pomatoschistus microps. Chemosphere* 62: 1333–1339.
- Moore, C.J., 2008. *Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, a long-term threat. Environmental Research* 108: 131–139.
- OECD, 1992. Test No. 203: *Fish, Acute Toxicity test*.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. Yagi, K., 1979. *Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry* 95: 351–358.
- Oliveira, M., Gravato, C., Guilhermino, L., 2012. *Acute toxic effects of pyrene on Pomatoschistus microps (Teleostei, Gobiidae): Mortality, biomarkers and swimming performance. Ecological Indicators* 19: 206–214.
- Oliveira, M., Ribeiro, A., Hylland, K., Guilhermino, L., 2013. *Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of common goby Pomatoschistus microps (Teleostei, Gobiidae). Ecological Indicators* 34: 641–647.
- Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E., 2003. *Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57–149.
- Patel, M. M., Goyal, B. R., Bhadada, S.V., Bhatt, J.S, Amin, A.F., 2009. *Getting into the brain: approaches to enhance brain drug delivery. CNS Drugs* 23: 35–58.
- Piatti, T., Rodrigues, R., 2005. *Plásticos: características, usos, produção e impactos ambientais*. Maluf, S. (Ed.). Edufal, Alagoas, Brasil, 51p.
- Rios, L.M., Moore, C., Jones, P.R, 2007. *Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. Marine Pollution Bulletin* 54 (8): 1230–1237.

- Rosse, P., Loizeau, J.-L., 2003. *Use of single particle counters for thefor the determination of the number and size distribution of colloids in natural surface waters. Colloids and Surfaces A* 217: 109–120.
- Ryan, P.G., Moore, C.J., van Franeker, J.A., Moloney, C.L., 2009. *Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364: 1999–2012.
- Sá, L., 2011. *Construção Sustentavel – Esquemas de Avaliação e Certificação (Novas Construções)*. Relatório de Estágio no Mestrado em Ciências e Tecnologia do Ambiente. Faculdade de Ciências – Universidade do Porto. Porto.
- Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S., 2008. *Biological degradation of plastics: A comprehensive review. Biotechnology Advances* 26: 246–265.
- Teuten, E.L., Rowland, S.J., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2007. *Potencial for plastics to transport hydrophobic contaminants. Environmental Science and Technology* 41: 7759–7764.
- Teuten, E.L., Saquing, J.M., Knappe, D.R.U., Barlaz, M.A., Jonsson, S., Björn, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., Galloway, T.S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P.H., Tana, T.S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., Alckhavong, K., Ogata, Y., Hirai, H., Iwasa, S., Mizukawa, K., Hagino, Y., Imamura, A., Saha, M., Takada, H., 2009. *Transport and release of chemicals from plastics to the environment and wildlife. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364: 2027–2045.
- Thompson, R.C, Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J., John, A.W.C., McGonigle, D., Russell, A.E., 2004. *Lost at sea: where is all the plastic? Science* 304: 838–838.
- Thompson, R.C, Moore, C.J., vom Saal, F.S., Swan, S.H., 2009. *Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Science* 364: 2153–2166.
- Vieira, L.R., Sousa, A., Frasco, M.F., Lima, I., Morgado, F., Guilhermino, L., 2008. *Acute effects of benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby Pomatoschistus microps (Teleostei, Gobiidae). Science of the Total Environment* 395: 87–100.
- Vieira, L.R., Gravato, C., Soares, A.M.V.M., Morgado, F., Guilhermino, L., 2009. *Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish Pomatoschistus microps: linking biomarkers to behavior. Chemosphere* 76: 1416–1427.
- WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1993. *Biomarkers and risk assessment: concepts and principles*. Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva.

Wilson, D.S., 1973. *Food size selection among copepods. Ecology* 54: 909–914.

Wright, S.L., Thompson, R.C., Galloway, T.S., 2013. *The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. Environmental Pollution* 178: 483–492.

Zitko, V., Hanlon, M., 1991. *Another source of pollution by plastics: skin cleansers with plastic subbers. Marine Pollutin Bulletin* 22: 41–42.