



ESCOLA SUPERIOR
DE TURISMO E
TECNOLOGIA DO MAR

***Utilização de Mytilus edulis como bioindicador marinho da
costa de Peniche***

Luísa Miguel Afonso de Almeida Ramalho

2022



ESCOLA SUPERIOR
DE TURISMO E
TECNOLOGIA DO MAR

***Utilização de Mytilus edulis como bioindicador marinho da
costa de Peniche***

Luísa Miguel Afonso de Almeida Ramalho

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos
Marinhos

Dissertação de Mestrado realizada sob orientação da Professora Doutora Carla
Tecelão, Professora Doutora Marta Neves e Professor Doutor Paulo
Maranhão

2022

Título: Utilização de *Mytilus edulis* como bioindicador marinho da costa de Peniche

Copyright © Luísa Miguel Afonso de Almeida Ramalho

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho de projeto através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

À família, amigos e Professores, que me acompanharam nesta etapa acadêmica, que é o culminar de uma curiosidade pelo ambiente marinho desde a infância, a qual me levou a esta caminhada, que me permitiu crescer, aprender e perceber que há ainda um sem fim de conhecimentos sobre os recursos marinhos para explorar e investigar.

A todos vós, pela força que me transmitiram e por todo o encorajamento para dirimir as dificuldades, e adversidades, o meu grande obrigada!

Resumo

Os mexilhões, por serem organismos sésseis filtradores, têm sido utilizados como bioindicadores de contaminação ambiental. *Mytilus edulis* é a espécie de mexilhão mais comum na costa portuguesa, o que justificou a sua utilização no presente estudo como bioindicador da qualidade da água costeira de Peniche, Portugal.

Para o efeito, foram analisadas amostras de água e de mexilhão provenientes de três locais de Peniche (Marina, Fosso e ETAR) em quatro períodos (julho, setembro, novembro e dezembro de 2020). As amostras de mexilhão foram analisadas no que respeita a parâmetros microbiológicos (quantificação de microrganismos totais, pesquisa de *E. coli* e de esporos de clostrídios sulfito redutores), bioquímicos (teores de proteína, lípidos, cinzas, hidratos de carbono e perfil de ácidos gordos) e pesquisa de partículas de microplásticos na biomassa do mexilhão. As amostras de água foram analisadas no que concerne ao pH, O₂ dissolvido, temperatura, clorofila *a*, bem como aos teores de nitratos, nitritos, amónia e fosfatos.

A elevada carga microbiológica das amostras provenientes da ETAR revelou que este local proporcionou condições menos favoráveis ao desenvolvimento dos mexilhões, o que se traduziu por uma inibição do seu crescimento. Os mexilhões provenientes da ETAR destacaram-se também por maiores teores de MUFA, PUFA e proteína e menor conteúdo em SFA, comparativamente às amostras recolhidas na Marina e no Fosso.

Em todas as amostras estudadas foi detetada a presença de microplásticos, com valores entre 2 a 16 itens por grama de amostra. Estes resultados sugerem que existe uma elevada presença de microplásticos na costa de Peniche, o que até à data não tinha sido reportado. Porém, são necessários mais estudos para determinar a composição dos itens detetados a fim de identificar possíveis fontes poluentes do polímero.

Os valores microbiológicos e nutricionais dos indivíduos recolhidos indicam a baixa qualidade ambiental da costa de Peniche. Os resultados confirmam que a espécie *Mytilus edulis* reúne os requisitos de bioindicador ambiental.

Palavras-chave: *Mytilus edulis*, bioindicador, Peniche, microbiologia, bioquímica, microplásticos.

Abstract

Mussels, as sessile filter-feeding organisms, have been used as bioindicators of environmental contamination. *Mytilus edulis* is the most common mussel species on the Portuguese coast, which justified its use in this study as a bioindicator of coastal water quality in Peniche, Portugal.

For this purpose, water and mussel samples from three sites in Peniche (Marina, Fosso and ETAR) were analyzed in four periods (July, September, November and December, 2020). The mussel samples were analyzed for microbiological parameters (quantification of total microorganisms, *E. coli* and sulphite-reducing clostridium spores), biochemical parameters (contents of protein, lipids, ash, carbohydrates and fatty acid profile) and microplastic particles in the mussel biomass. Water samples were analyzed for pH, dissolved O₂, temperature, chlorophyll *a*, as well as nitrate, nitrite, ammonia and phosphate contents.

The high microbiological content of the samples from the ETAR showed that this location provided less favorable conditions for the mussels, which resulted in an inhibition of their growth. The mussels from the ETAR also had higher MUFA, PUFA and protein contents and lower SFA content, compared to the samples taken from the Marina and the Fosso.

In all samples studied the presence of microplastics was detected, with values between 2 and 16 items per gram of sample. These results suggest that there is a high presence of microplastics on Peniche coast, which has not been reported so far. However, further studies are needed to determine the composition of the detected items in order to identify possible pollutant sources of the polymer.

The microbiological and nutritional values of the collected individuals indicate the low environmental quality of Peniche coast. The results confirm that the species *Mytilus edulis* meets the requirements of an environmental bioindicator.

Key-words: *Mytilus edulis*, bioindicator, Peniche, microbiology, biochemistry, microplastics

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice.....	ix
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xiii
1.Introdução.....	1
1.1. Ambiente marinho e poluição antropogénica	1
1.2. Bioindicadores de contaminação ambiental.....	2
1.3. O mexilhão	3
1.3.1. <i>Mytilus edulis</i> : classificação taxonómica e caracterização morfológica	3
1.3.2. Caracterização nutricional.....	6
1.3.3 Utilização como bioindicador de contaminação ambiental.....	7
2 Enquadramento e objetivos	9
3. Materiais e métodos.....	11
3.1. Delineamento experimental	11
3.2. Preparação das amostras	13
3.3. Análises ao mexilhão (<i>Mytilus edulis</i>)	13
3.3.1. Análises microbiológicas	13
3.3.1.1. Quantificação microrganismos totais	14
3.3.1.2 Quantificação de <i>Escherichia coli</i>	15
3.3.1.3 Pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores	16
3.3.2. Análises bioquímicas	17
3.3.2.1. Quantificação de proteína total	17
3.3.2.2. Determinação de teor de lípidos totais.....	18
3.3.2.3. Determinação do teor de cinzas	19
3.3.2.4. Determinação do teor de hidratos de carbono	19
3.3.2.5. Análise do perfil de ácidos gordos	20
3.3.3 Análise da presença de microplásticos	21
3.4. Análises à água.....	21
3.4.1 Quantificação de clorofila <i>a</i>	22
3.4.2. Quantificação de nitratos.....	23
3.4.3 Quantificação de nitritos.....	23

3.4.4. Quantificação de amónia	24
3.4.5. Quantificação de fosfatos	24
3.5. Análise estatística	25
4. Resultados e discussão	27
4.1. Análises Microbiológicas	27
4.1.1 Quantificação de microrganismos totais.....	27
4.1.2. Pesquisa de <i>E. coli</i>	29
4.1.3 Pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores	31
4.2 Análises Bioquímicas	33
4.2.1 Teor de proteína.....	33
4.2.2 Conteúdo lipídico	34
4.2.3 Teor de cinzas.....	35
4.2.4 Conteúdo em hidratos de carbono	36
4.2.5. Perfil de ácidos gordos	37
4.3 Presença de microplásticos.....	42
4.4. Análises físico-químicas às amostras de água.....	44
4.4.1 Temperatura.....	44
4.4.2. Salinidade	45
4.4.3. Teor de O ₂ dissolvido	46
4.4.4 pH da água do mar nos locais de recolha.....	47
4.4.5 Quantificação de clorofila <i>a</i>	47
4.4.6. Quantificação de nitratos.....	48
4.4.7. Quantificação de nitritos.....	49
4.4.8. Quantificação de amónia	50
4.4.9. Quantificação de fosfatos	51
5.Considerações Finais	53
6. Referências Bibliográficas.....	55
Anexos	65

Índice de Figuras

Figura 1.1- Atividade de serviços ecossistémicos providenciados pelos mexilhões (Retirada de Vaughn, 2018).....	5
Figura 3.1- Mapa indicativo dos locais de recolha de amostras analisadas.....	11
Figura 3.2- Esquema global das análises efetuadas às amostras de água e de mexilhão recolhidas nos locais e datadas em estudo.....	12
Figura 3.3- Resumo do procedimento de quantificação de microrganismos totais em UFC.....	14
Figura 3.4- Resumo do procedimento para a quantificação do teor em bactérias entéricas <i>Escherichia coli</i> , pelo NMP nas amostras de mexilhão.....	16
Figura 3.5- Resumo do procedimento para a identificação da presença de esporos do género <i>Clostridium</i>	17
Figura 4.1- Aspeto do meio de cultura (caldo MMGB) inoculado com amostras <i>E. coli</i> (positivo a amarelo) e negativas (vermelho).....	29
Figura 4.2- Placa com meio TBX positiva para a presença de colónias <i>E. coli</i>	29
Figura 4.3- Identificação da presença de esporos de clostrídios sulfito-redutores com a existência de manchas pretas e de presença negativa os tubos amarelos.....	31
Figura 4.4- Variação do teor de proteína, expresso em % de peso seco, das amostras de mexilhão colhidas na ETAR; Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro. Para cada local os meses que partilham o mesmo símbolo apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si. Os dados estão apresentados na forma média \pm DP.....	34
Figura 4.5- Variação do teor de lípidos, expresso em % de peso seco, das amostras de mexilhão colhidas na ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro. Para cada local, os meses que partilham o mesmo símbolo, apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si. Os dados estão apresentados na forma média \pm DP.....	35
Figura 4.6- Variação do teor de cinzas, expresso em % de peso seco, das amostras de mexilhão colhidas na ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro. Para cada local, os meses que partilham o mesmo símbolo, apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si. Os dados estão apresentados na forma média \pm DP.....	36
Figura 4.7- Variação do teor de hidratos de carbono, expresso em % de peso seco, das amostras de mexilhão colhidas na ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro. Para cada local, os meses que partilham o mesmo símbolo, apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si. Os dados estão apresentados na forma média \pm DP.....	37
Figura 4.8- Variação do teor de ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA), expresso em % de ácidos gordos totais, das amostras de mexilhão colhidas na ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro. Em cada local, diferentes símbolos, letras ou números indicam diferenças estatisticamente significativas nos SFA, MUFA, e PUFA, respetivamente. Os dados estão apresentados na forma média \pm DP.....	39

Figura 4.9- Análise de componentes principais (PCA) das amostras de mexilhão colhidas na Marina, no Fosso e na ETAR nos meses de julho, setembro, e novembro e dezembro, atendendo aos teores de ácidos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA) bem como teores de proteína, lípidos, cinzas e hidratos de carbono.....	41
Figura 4.10- Média de itens encontrados por g de amostra liofilizada, de mexilhão colhido na ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro.....	42
Figura 4.11- Item de cor azulada observado na amostra de mexilhão do Fosso no mês de novembro.....	43
Figura 4.12- Item observados na amostra de mexilhão da Marina no mês de novembro.....	43
Figura 4.13- Item observados na amostra de mexilhão da Marina no mês de dezembro.....	43
Figura 4.14- Item observado na amostra de mexilhão da ETAR no mês de novembro.....	44
Figura 4.15- Variação da temperatura (°C) da água, da ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro.....	45
Figura 4.16- Variação da salinidade, expressa em g/Kg, da água da ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro.....	46
Figura 4.17- Variação da quantidade de O ₂ dissolvido, expresso em mg/L, da água da ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro.....	46
Figura 4.18- Variação do pH da água da ETAR; Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro.....	47
Figura 4.19- Variação da concentração de Clorofila <i>a</i> , em mg.m ⁻³ da água da ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro.....	48
Figura 4.20- Variação da concentração de nitratos, expressa em mg/L, da água da ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro.....	49
Figura 4.21- Concentração de nitritos, expressa em mg/L. da água da ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro.....	50
Figura 4.22- Concentração de amônia, expressa em mg/L, da água da ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de estudo.	51
Figura 4.23- Concentração de fosfatos, expressa em mg/L, da água da ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de estudo.....	52

Índice de Tabelas

Tabela 4.1- Número de microrganismos totais, expressos em UFC/g, das amostras de mexilhão colhidas na Marina, Fosso e ETAR, nos meses de julho setembro, novembro e dezembro.....	28
Tabela 4.2- Resultados da presença de <i>E. coli</i> , expressos em NMP por 100g das amostras de mexilhão colhidas na Marina, Fosso e ETAR, nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro.....	30
Figura 4.3- Identificação da presença de esporos de clostrídios sulfito-redutores com a existência de manchas pretas e de presença negativa os tubos amarelos.....	32
Tabela 4.4- Ácidos gordos detetados nas amostras de mexilhão onde, com relevo em negrito, estão identificados os principais elementos de cada família, saturados, monoinsaturados e polinsaturados.	40

1.Introdução

1.1. Ambiente marinho e poluição antropogénica

O meio marinho representa cerca de 70% da superfície do planeta Terra. A sua evolução ao longo dos anos permitiu que nele habite um vasto número de organismos, de variadas espécies. Os ecossistemas marinhos têm extrema importância na vida do nosso planeta, uma vez que é onde se cria cerca de 50% da produção primária global, providenciando à sociedade, recursos renováveis que apesar da sua importância, têm vindo a ser alvo de várias ameaças (Goulletquer *et al.*, 2014).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, (OMS, 2000), durante várias gerações existiu uma relação harmoniosa entre as populações e o oceano, de onde eram retirados recursos para sobreviverem. A sociedade beneficiava das águas costeiras de diversas formas, não só pela alimentação obtida através da pesca, como também pelas consequências desta atividade, seja de cariz social, pelos postos de emprego criados, como económico, através do comércio dos recursos marinhos capturados.

Com a evolução da sociedade e da ciência, observou-se um aumento das atividades humanas e as águas marinhas costeiras entraram num intenso processo de poluição e exploração (Waldichuk, 1977). Inicialmente os recursos marinhos tinham apenas interesse alimentar. No entanto, após descoberta do seu uso para fins farmacêuticos e científicos, houve um considerável aumento na procura e exploração do stock disponível com consequências para o meio marinho. As espécies têm mais dificuldade em repor indivíduos existentes, uma vez que são também fortemente afetadas pela poluição antropogénica (Boeuf, 2011). A Tragédia dos Comuns, proposta em 1968 por Garret Hardin (Hardin, 2010), justifica a existência de poluição com o crescimento populacional, por se considerar os recursos naturais de uso comum. Estes acabam por sofrer o efeito trágico do desenvolvimento da sociedade, seja de forma poluente ou excesso de consumo. Contrariamente ao descrito por Garret Hardin, a problemática da poluição marinha não é considerada como uma forma de retirar um bem comum como propriedade privada, mas sim, colocar algo, despejar resíduos no meio marinho, como uma partilha de poluição de um recurso comum, o que se deve principalmente à dificuldade de fazer cumprir os direitos de propriedade (Afonso *et al.*, 2021; Hardin, 2010).

A Convenção das Nações Unidas sobre o Direito do Mar (Oficial & Europeias, 1998) descreve como poluição marinha a introdução pelo homem, direta ou indiretamente, de

substâncias ou de energia no meio marinho, incluindo os estuários, sempre que a mesma provoque ou possa vir a provocar efeitos nocivos, tais como danos aos recursos vivos e à vida marinha, riscos à saúde do homem, entrave às atividades marítimas, incluindo a pesca e outras utilizações legítimas do mar, alteração da qualidade da água do mar, no que se refere à sua utilização e deterioração dos locais de recreio. A ocorrência de poluição pode ter diversas causas, estando as mais comuns associadas a resíduos industriais, esgotos, plásticos e derrames de óleo. O seu transporte até ao mar dá-se pelo rio, desde a costa terrestre até à costa marinha e oceanos (Sheppard, 2001). O mar torna-se, então, o destino final dos elementos desperdiçados, além da matéria orgânica, acumulando muitos contaminantes inorgânicos e químicos nos sedimentos ou tecidos dos organismos. Algumas dessas substâncias são biodegradáveis, enquanto outras persistem no ambiente marinho, onde alguns organismos as podem bioacumular nos seus tecidos gordos. Esta situação tem impactos devastadores para os ecossistemas marinhos e para os consumidores finais dos seres vivos marinhos (Frid, 2017).

Nos últimos anos, a poluição por plásticos nomeadamente por microplásticos, tem merecido particular atenção devido ao seu elevado consumo à escala global. Os microplásticos são pequenas partículas de plástico com dimensões compreendidas entre 1µm e 1mm, algumas das quais produzidas especificamente a essa microescala como, por exemplo, para produtos cosméticos (Fendall & Sewell, 2009). Por outro lado, podem também ser o resultado da degradação de detritos de plásticos maiores, tais como fibras de poliéster, sacos de plástico, entre diversos outros objetos criados com este material (Browne *et al.*, 2011). Estes polímeros têm sido foco de estudo pela sua presença em seres vivos, sendo já conhecidos alguns dos malefícios que podem causar. Neste âmbito, foram já encontrados e reportados microplásticos em mexilhões.

1.2. Bioindicadores de contaminação ambiental

Designa-se por bioindicador uma espécie que atue como indicador biológico da qualidade de determinado ambiente, seja este um habitat uma comunidade ou todo um ecossistema (Markert & Breure, 2003).

Os bioindicadores são utilizados, de acordo com uma seleção criteriosa, para complementarem outros testes de monitorização, de modo que seja possível identificar alterações existentes, antes de atingirem níveis problemáticos (Harris, 1995).

Ao utilizar uma espécie para monitorização ambiental é necessário que a mesma corresponda a alguns critérios, como ampla distribuição, biologia conhecida, imobilidade, capacidade de alertar precocemente possíveis alterações, função crucial no ecossistema, resposta homogénea aos poluentes e reação tóxica identificável com o nível de poluição (Hilty & Merenlender, 2000)

Os bivalves, como o mexilhão, têm sido utilizados de forma recorrente para estudar o impacto da poluição antropogénica na qualidade de águas costeiras, por reunirem as características acima referidas. A sua reduzida mobilidade torna-os sensíveis a alterações na qualidade da água, inclusive aos poluentes que tendem a acumular-se no ecossistema (Laitano & Fernández-Gimenez, 2016). O facto de serem filtradores sésseis e a sua área de distribuição incidir em zonas costeiras e estuarinas, fornece-lhes uma capacidade de reter contaminantes que acumulam, atingindo níveis que, quando estudados, são superiores aos detetados por meio de medições instrumentais na água do mar (Walker *et al.*, 2013).

1.3. O mexilhão

1.3.1. *Mytilus edulis*: classificação taxonómica e caracterização morfológica

O mexilhão é um molusco bivalve pertencente à família Mytilidae, filo Mollusca, que habita na zona intertidal rochosa. No mesmo habitat coexistem espécies de lapas (*Patella vulgata* e *Patella depressa*), cracas (*Chthamalus montagui*) e de algas (*Corallina spp.*, *Caulacanthus ustulatus*) (Boaventura *et al.*, 2002). Por partilhar espaço com outros seres vivos, a disponibilidade e qualidade do alimento têm um grande impacto no crescimento da espécie *Mytilus spp.*, estima-se que a sua vida pode ter uma duração de 20 anos (Suchanek, 1981; J Widdows & Johnson, 1988). Fisicamente, distinguem-se pela sua concha alongada, que pode ter cor acastanhada ou azulada.

Os mexilhões são animais sésseis que se alimentam por filtração de fitoplâncton e matéria que esteja em suspensão na coluna de água. No entanto, têm a capacidade de se disporem em relação benéfica para o alimento (Seed, 1969). Por habitarem em zonas com grande variação de temperatura e salinidade, são animais com grande dependência do alimento disponível no local, e o seu desenvolvimento varia com a sua localização, a qualidade da água e o alimento disponível (Ross & Nisbet, 1990).

A reprodução da espécie ocorre por libertação dos espermatozoides e óvulos para a coluna de água, onde ocorre a fertilização externa. Nesta fase existe uma grande perda de óvulos devido à ação de predadores, pelo que a espécie liberta um maior número de óvulos em relação a espermatozoides, de modo a garantir a sua reprodução. As condições ambientais influenciam a libertação de gâmetas bem como a sua sobrevivência durante o processo larvar, que pode durar até um mês. A gametogénese tem início quando o mexilhão adulto sofre maturação das gónadas. Este processo está sujeito aos fatores ambientais já mencionados, à profundidade a que o indivíduo se encontra, bem como a fatores endógenos, genéticos e hormonais. A libertação dos gâmetas dá-se em épocas de água quente e os espermatozoides fecundam os óvulos dando início à fase larvar. Neste estágio os indivíduos fixam-se a um substrato, no entanto, num estado de desenvolvimento tardio podem mudar-se fixando-se noutra local com melhores condições de sobrevivência (Skibinski *et al.*, 1983; Thompson, 1979).

Os mexilhões formam colónias, agregando-se uns aos outros, de modo a facilitar o processo de reprodução e assegurar a sua proteção. Ao longo do seu ciclo de vida os mexilhões têm diversos predadores, nomeadamente, medusas, estrelas-do-mar, búzios, caranguejos e aves marinhas (Kitching *et al.*, 1959). O espessamento da concha, ocorrido ao longo do tempo e em condições ambientais mais quentes, é essencial para a defesa do indivíduo.

O crescimento do mexilhão é sazonal, na primavera e verão ocorre mais rapidamente por haver maior disponibilidade de alimento, devido à temperatura elevada da água, sendo mais lento no inverno, com as temperaturas mais baixas o alimento disponível diminui e, conseqüentemente, o seu crescimento.

As brânquias do mexilhão têm um grande desenvolvimento uma vez que são o órgão responsável pela alimentação, bem como pela respiração. No processo de alimentação, uma parte das partículas filtradas ficam retidas nas brânquias. Uma porção é imediatamente rejeitada e eliminada para o exterior, e outra é ingerida pela boca e direcionada para o estômago para posterior digestão (B. L. Bayne, 1998; Wai & Levinton, 2004).

É relevante referir a importância que esta espécie tem para o ecossistema (Figura 1.1). A sua condição de animais filtradores torna-os por si só um serviço ecossistémico, que providência alimento (tanto para os seus predadores animais, como para os humanos) e habitat para outras espécies (parasitas como algas e cracas, por exemplo). Como consumidores primários, ao filtrarem os poluentes da coluna de água acumulam-nos no

seu organismo, retiram uma quantidade elevada de partículas da água, tornando-a com melhor qualidade. Os produtos obtidos do mexilhão não são apenas alimentares, mas também existem peças de arte e bijuteria criadas a partir da concha destes animais. A biofiltração realizada, proporciona uma regulação do meio marinho, que providencia uma melhor qualidade da água envolvente, mas também a acumulação dos elementos filtrados, no seu organismo, permite que os mexilhões sejam um ótimo indicador para monitorização ambiental marinha, desta forma, mexilhões servem ainda em mais um serviço ecossistêmico pelo seu valor de conservação (Vaughn, 2018).

Uma vez que os mexilhões são seres vivos filtradores que se alimentam retirando partículas da coluna de água para o seu organismo, acumulando assim nutrientes para se alimentarem, mas também poluentes que possam estar presentes na água filtrada, estes seres vivos passam os elementos tóxicos para os níveis seguintes da cadeia trófica. Assim, transferem os poluentes marinhos, que consumiram, para os seus predadores (Beyer *et al.*, 2017). Os predadores que se alimentam de mexilhão podem ter consequências derivadas do consumo de indivíduos contaminados e dentro do grupo de consumidores da espécie está o ser humano.

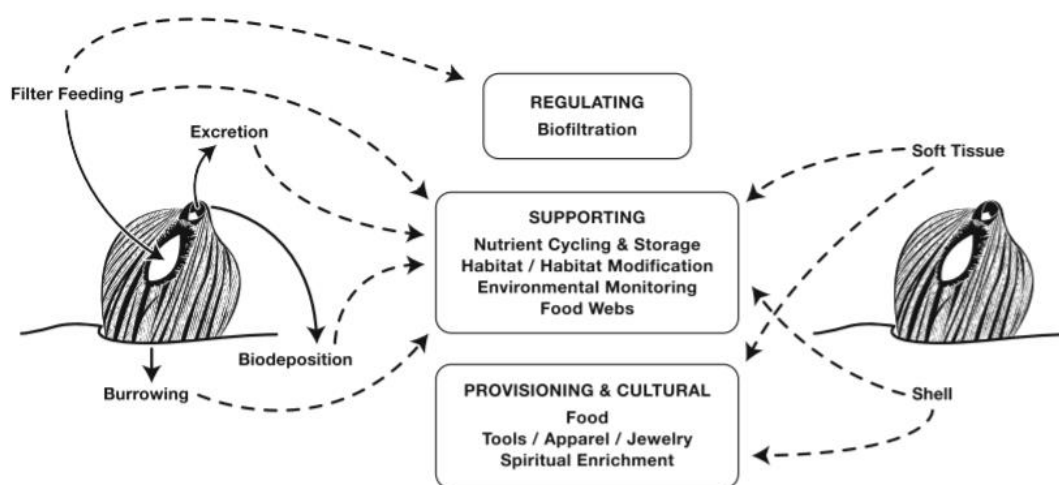


Figura 1.1- Atividades de serviços ecossistêmicos providenciados pelos mexilhões (Retirada de (Vaughn, 2018).

Pelas características inerentes à sua alimentação, estes seres vivos estão sujeitos a ingerirem qualquer elemento presente na coluna de água sejam estes orgânicos ou inorgânicos.

Além dos seus predadores, a poluição antropogénica é, de facto, uma grande ameaça para a espécie. A corrente de água vinda do meio terrestre que chega ao meio

marinho transporta consigo uma elevada quantidade de componentes tóxicos, como bactérias, que, mais tarde, serão ingeridos e acumulados no organismo de animais filtradores como o mexilhão. As bactérias e microrganismos derivadas da poluição afetam de forma prejudicial o organismo onde se aloja.

1.3.2. Caracterização nutricional

O interesse pela composição nutricional dos mexilhões deve-se não só ao facto de serem um recurso alimentar, mas também à sua utilização como animais sentinela, o que despoletou diversos estudos (Azizi *et al.*, 2018; Viarengo & Canesi, 1991).

A disponibilidade de alimento e a temperatura do ambiente têm influência no crescimento da população. Um estudo desenvolvido por (J. Widdows, 1978) sugere que condições pouco favoráveis aos indivíduos da espécie *Mytilus edulis* condicionam o seu crescimento, uma vez que o organismo recorre às suas reservas metabólicas até existirem melhores condições no seu habitat (Thompson & Bayne, 1974). O mesmo fenómeno pode ser observado relativamente a restrição do ciclo reprodutivo das populações (B. Bayne & Worrall, 1980). A variação da composição bioquímica do mexilhão ao longo do ano foi alvo de estudos que revelam que as principais variações se devem não só a fatores ambientais, disponibilidade de alimento, temperatura, crescimento, como também relacionam fatores nutricionais com o ciclo reprodutivo (Dare & Edwards, 1975)

A relação entre a qualidade da alimentação das populações e a sua composição bioquímica foi estudada por (Pleissner *et al.*, 2012). Nesta pesquisa o conteúdo de ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) em indivíduos da espécie *Mytilus edulis* teve total relação com a presença desta família de ácidos gordos na alimentação. Existiu também um aumento nos níveis de proteína e lípidos nos mexilhões alimentados por algas com maiores concentrações desses nutrientes. Nos indivíduos que não tiveram alimento disponível não foi observado crescimento ao longo do tempo. No entanto, os seus níveis de proteína e glicogénio diminuíram, enquanto o conteúdo lipídico e de PUFAs se manteve. Neste e noutros estudos foi possível detetar uma relação direta entre a composição da dieta dos mexilhões e o seu conteúdo nutricional (de Zwaan & Zandee, 1972). Apesar de todas as variáveis estarem a ser controladas em laboratório, houve também variações temporais, sugerindo que na época reprodutiva, abril, exista uma diminuição nos níveis de glicogénio e proteína, enquanto que o conteúdo lipídico só apresenta variação no inverno, época de desova que requer um elevado gasto de energia.

As mesmas variações foram observadas no estudo de (Zandee *et al.*, 1980) que ainda reportou um aumento proteico durante o crescimento dos indivíduos.

Nutricionalmente o mexilhão é composto por cerca de 50% proteína, 15% de gordura, 20 a 30% de matéria inorgânica e 5 a 15% de hidratos de carbono (Capuzzo & Leavitt, 1988; Dare & Edwards, 1975; Okumuş & Stirling, 1998; Slabyj, Eoh Dan M. Carpenter, 1977). Os ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) compõem a fração lipídica. Apesar da família de ácidos gordos mais abundante variar bastante entre populações, geralmente existem maiores concentrações de PUFA ou SFA, sendo que no último são geralmente amostras associadas a zonas de menor qualidade ambiental (Freites *et al.*, 2002; Fuentes *et al.*, 2009). Os SFA mais representativos são os ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), dos MUFA sobressaem os ácidos palmitoleico (C16:1) e oleico (C18:1), nos PUFA destacam-se os ácidos linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3), eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) (Fernández *et al.*, 2015; Galap *et al.*, 1999; Orban *et al.*, 2002)

A pesquisa bibliográfica reporta que a composição da biomassa do mexilhão *Mytilus edulis* depende dos fatores do seu habitat séssil (quantidade e qualidade de alimento disponível), e da época de recolha das amostras (fase do ciclo reprodutivo) (Pleissner *et al.*, 2012).

1.3.3 Utilização como bioindicador de contaminação ambiental

Tal como referido anteriormente, os mexilhões são seres filtradores, alimentando-se por filtração das partículas que se encontram na coluna de água. Desta forma, ingerem o que estiver disponível no meio marinho, inclusive poluentes e nanopartículas (Koehler *et al.*, 2008). Compostos químicos, como os hidrocarbonetos, entram no meio marinho através de atividades em alto mar, derrames de óleo, descargas de rios e inclusive através de transporte atmosférico. Na coluna de água são ingeridos e, desta forma, contaminam os mexilhões (De Witte *et al.*, 2014). Outra grande ameaça é a água contaminada proveniente de esgotos, onde a poluição microbiana de origem fecal atinge as populações de mexilhões existentes em zona de efluentes de esgoto, de descargas industriais, escoamentos de zonas com atividades agrícolas (Campos *et al.*, 2013).

Por corresponderem aos requisitos de bioindicador, os mexilhões foram dos primeiros animais usados para avaliar a qualidade ambiental da água do mar, por fornecerem alimento e habitat para muitas outras espécies (Bennet-Clark, 1976; Laitano & Fernández-Gimenez, 2016; Markert & Breure, 2003). No entanto, são, também, um meio de transporte de poluentes marinhos para níveis tróficos mais elevados na cadeia alimentar, o que o torna um elemento crucial por também servir de alimento para a população humana. Consequentemente, a qualidade dos mexilhões afeta, também, a saúde humana (Beyer *et al.*, 2017; Goldberg, 1975). Viarengo (Viarengo & Canesi, 1991) aponta para as alterações bioquímicas resultantes do stress que os mexilhões sofrem ao estarem em contacto com contaminantes, que tornam a população mais vulnerável para outras alterações ambientais que possam ocorrer (Azizi *et al.*, 2018; Cunha *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019; Walker *et al.*, 2013).

Vários estudos apontam a utilização dos mexilhões como bioindicadores marinhos, dando a conhecer a qualidade da água costeira da região em estudo. Em Portugal foram realizadas diversas pesquisas utilizando mexilhões como bioindicadores ambientais. Um estudo toxicológico realizado em 8 locais ao longo da costa, incluiu a zona de Peniche, para pesquisa da presença de componentes anti-inflamatórios no organismos dos mexilhões, concluindo que a toxicidade presente nesses seres vivos era semelhante à do ambiente costeiro (Cunha *et al.*, 2017).

No âmbito do uso de mexilhões como indicadores do estado da água, foi realizada uma pesquisa para onde foi reportada a exposição a que estes organismos têm aos contaminantes marinhos, mais precisamente, aos poluentes com filtro-UV (Castro *et al.*, 2018).

Outro estudo mais recente, a fim de documentar a presença de plásticos na costa nacional, levou à observação de mexilhões de 4 locais onde foi possível detetar partículas de microplásticos nos seus organismos (Marques *et al.*, 2021).

2 Enquadramento e objetivos

Peniche é uma península com clima temperado mediterrânico do tipo oceânico, caracterizada pela sua costa intertidal rochosa com escarpas, sistemas dunares e diversas praias. Na época balnear é um destino turístico muito procurado, pelas suas famosas condições para praticar surf. Esta pressão turística e os seus impactos ambientais contrastam com os pacatos meses de inverno onde a atividade piscatória é o principal fator de movimentação na costa da cidade.

Na costa Oeste, durante o verão e inverno, os ventos dominantes são de norte para sul e de sul para oeste, respetivamente (Santos *et al.*, 2015). A circulação do vento influencia a direção das correntes superficiais, que transportam detritos de um local para o outro.

Com o desenvolvimento social cresce também a poluição marinha, com especial impacto nas zonas costeiras. Os animais filtradores estão expostos aos mesmos componentes tóxicos presentes na coluna de água.

A monitorização da qualidade da água e conseqüentemente, dos seres vivos presentes, previne futuros problemas ambientais. Neste estudo, pretendeu-se utilizar a espécie de mexilhão *Mytilus edulis* como bioindicador para avaliar a qualidade da água da zona costeira de Peniche.

3. Materiais e métodos

3.1. Delineamento experimental

A área de estudo localiza-se na região oeste de Portugal continental, em Peniche, onde foram escolhidos 3 locais para a realização das amostragens, a Marina de Peniche, um local conhecido por “Fosso”, localizado no centro da cidade, e a zona da ETAR de Peniche (Figura 3.1).

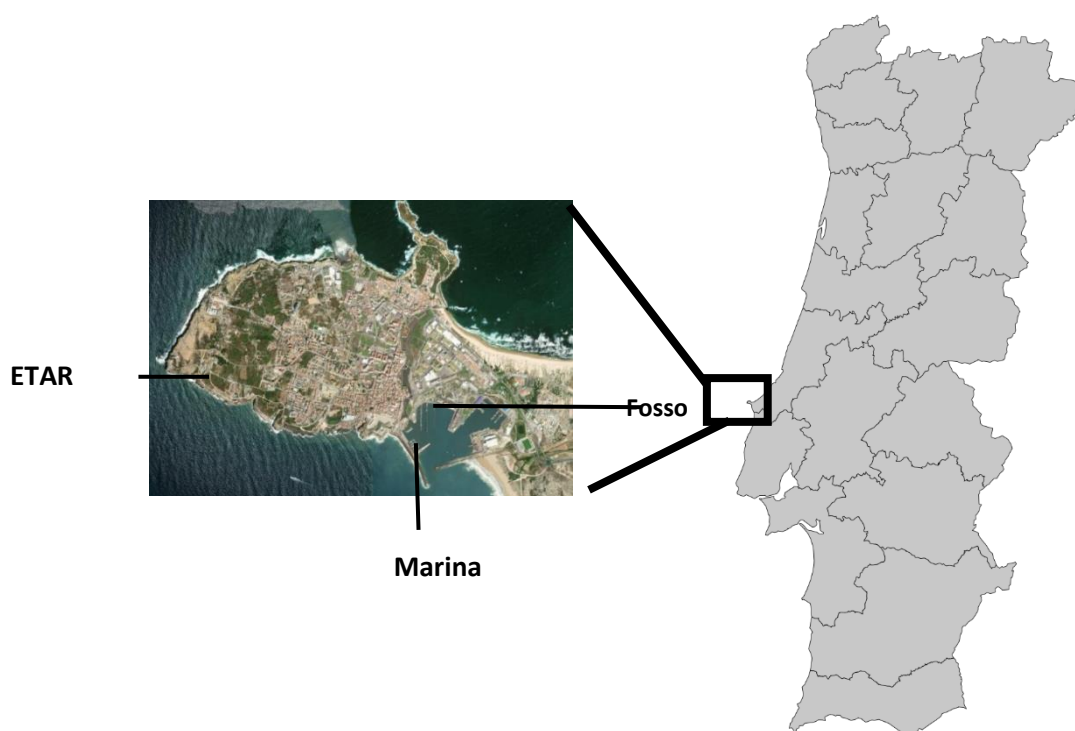


Figura 3.1-Mapa indicativo dos locais de recolha de amostras analisadas

Em cada local de amostragem foram recolhidos mexilhões e água tendo este processo sido realizado nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro de 2020. As datas foram escolhidas tendo em consideração a maré mais baixa de cada mês. Em cada momento de amostragem foram registados os valores de temperatura, clorofila a e

oxigénio dissolvido da água do mar. A água recolhida foi também analisada no que respeita aos teores de amónia, fosfatos, nitratos e nitritos.

Os mexilhões capturados foram caracterizados em termos de (i) contaminação microbiológica (microrganismos totais; presença de *E. coli* e de esporos de clostrídios sulfito-redutores; (ii) composição bioquímica (teores de proteína, lípidos, cinzas e hidratos de carbono bem como perfil de ácidos gordos; (iii) contaminação por microplásticos (Figura 3.2).

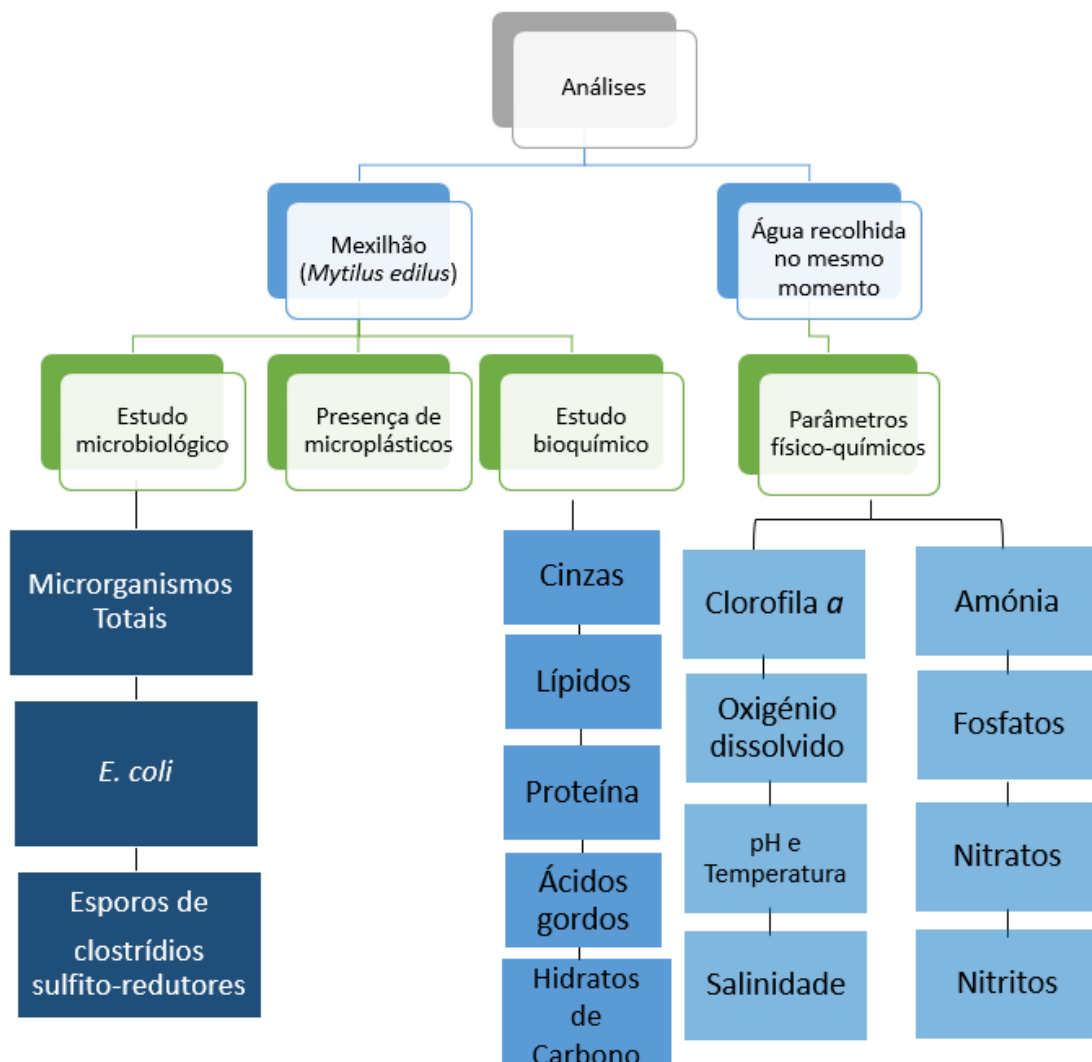


Figura 3.2- Esquema global das análises efetuadas às amostras de água e de mexilhão recolhidas nos locais e datas em estudo.

3.2. Preparação das amostras

A preparação dos bivalves foi efetuada lavando-se cuidadosamente a parte exterior, eliminando toda a sujidade. Os bivalves utilizados para as análises microbiológicas (cerca de 20 indivíduos de cada local) foram mantidos fechados e inteiros. Os restantes indivíduos foram agrupados em 3 conjuntos por cada local, aos quais foi removida a concha. Durante o processo de abertura dos mexilhões, foi ainda registada a massa (balança Sartorius, modelo: Entris 224I-1S, capacidade máxima de 220 g) e tamanho dos indivíduos e congelados em 3 frascos de 100 g cada. Os dados recolhidos encontram-se nos Anexos I a XII Posteriormente, os mexilhões foram liofilizados e homogeneizados de modo a obter uma amostra uniforme. As análises foram realizadas com recurso a 3 réplicas de cada amostra.

As amostras de água recolhida, nas duas primeiras datas foram congeladas devidamente identificadas. No entanto, as recolhas do mês de novembro e dezembro foram analisadas após a amostragem, sem passar pelo processo de congelamento.

3.3. Análises ao mexilhão (*Mytilus edulis*)

3.3.1. Análises microbiológicas

As amostras foram preparadas segundo a Norma Portuguesa (NP-3006, 1985), em condições de assepsia. Os mexilhões foram abertos recorrendo a um bisturi, retirando toda a sua carne e líquido intravalvar para um saco de Stomacher, obtendo-se uma massa de cerca de 100 g (balança Sartorius, modelo: Entris 224I-1S, capacidade máxima de 220 g). Ao saco de Stomacher com 100g de amostra foi adicionada igual massa de água peptonada (Merck) previamente esterilizada. O saco foi levado ao Stomacher por cerca de 5 minutos e, com uma pipeta, foram retirados 20 mL do homogeneizado para um frasco Schott com 80 mL de água peptonada, obtendo-se assim a solução mãe, diluição 10^{-1} . Foram realizadas diluições em duplicado até 10^{-4} , retirando 1 mL da solução anterior para cada frasco com 9 mL de água peptonada.

3.3.1.1. Quantificação microrganismos totais

A quantificação de microrganismos totais nas amostras foi feita de acordo com a Norma Portuguesa (NP 3278, 1986.). O método usado para o crescimento de colónias foi por incorporação da amostra, sendo assim propício ao desenvolvimento de bactérias formadoras de colónias. Esta análise representa, então, o número provável de bactérias presentes na amostra capaz de produzir colónias no meio utilizado nas condições de incubação descritas.

A quantificação de microrganismos totais foi realizada utilizando o meio de cultura Plate Count Agar- PCA (HiMedia). O meio foi distribuído por 2 caixas de Petri para cada diluição, através da técnica de incorporação, com 1 mL de suspensão da amostra. Findo o procedimento e fecho da placa, procedeu-se à agitação da mesma, de modo a obter uma distribuição homogénea dos microrganismos. Após solidificação do meio de cultura, as caixas de Petri foram colocadas a incubar em estufa (Memmert, UF450), a 30°C por 72±2 horas (Figura 3.3). Posteriormente, contaram-se as colónias das placas correspondentes às diluições que continham entre 30 e 300 colónias. Os resultados foram expressos em número de unidades formadoras de colónias (UFC) por grama de mexilhão fresco, multiplicando o número médio de colónias pelo inverso do fator de diluição.

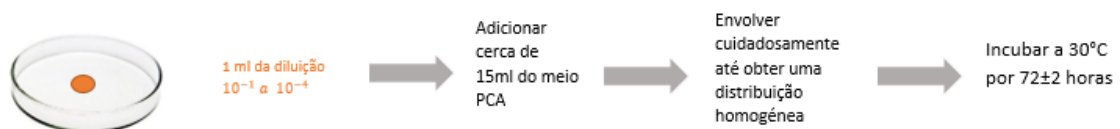


Figura 3.3- Resumo do procedimento de quantificação de microrganismos totais em UFC.

3.3.1.2 Quantificação de *Escherichia coli*

As bactérias entéricas, como a *Escherichia coli* (*E. coli*) são usadas como organismos indicadores para avaliar a qualidade sanitária de moluscos. As análises de quantificação de *E. coli* nas amostras foram realizadas com o caldo de glutamato com minerais- MMGB (HiMedia)- força dupla e força simples de acordo com a Norma Portuguesa (NP 2308, 1986). O método usado é composto por duas fases. A primeira é uma etapa de reanimação que requer a inoculação de caldo MMGB com uma série de 5 tubos de cada diluição de amostra, e incubação das mesmas nas condições propícias à produção de ácido a partir da lactose presente no caldo. A segunda fase é onde se realiza a confirmação pela subcultura dos tubos com alteração de cor, que passaram de roxo para amarelo- possíveis positivos- que foram produtores de ácido, em placas de Petri com agar e incubadas em condições propícias à expressão da atividade da enzima β -glucuronidase.

No caldo MMGB força dupla apenas foi inoculada a solução-mãe (correspondente à diluição 10^{-1}), transferindo-se 10mL da suspensão para cada um de 5 tubos de ensaio com 10 mL do meio. Foram preparados 5 tubos com 9mL de MMGB força simples para cada diluição onde foram inoculados 1 mL em cada um. Os tubos de ensaio foram incubados em estufa (Memmert, UF450) a 37°C durante 24 ± 2 horas (Figura 3.4). Findo o tempo de incubação, os tubos cuja solução mostrou alteração de cor foram repicados com uma ansa de 10 μL para uma placa com cerca de 15 mL de meio TBX (HiMedia), utilizando a técnica do riscado. As placas submetidas ao teste de verificação foram a incubar por 24h à temperatura de 44°C .

A partir do número de tubos positivos obtidos para cada diluição testada fez-se a avaliação estatística da densidade dos coliformes existentes na amostra. Este método é conhecido por Número Mais Provável (NMP), descrito na norma ISO 16649-3 (2015) (Stockley, 2017). Os resultados obtidos foram expressos como NMP por 100 g de mexilhão fresco.

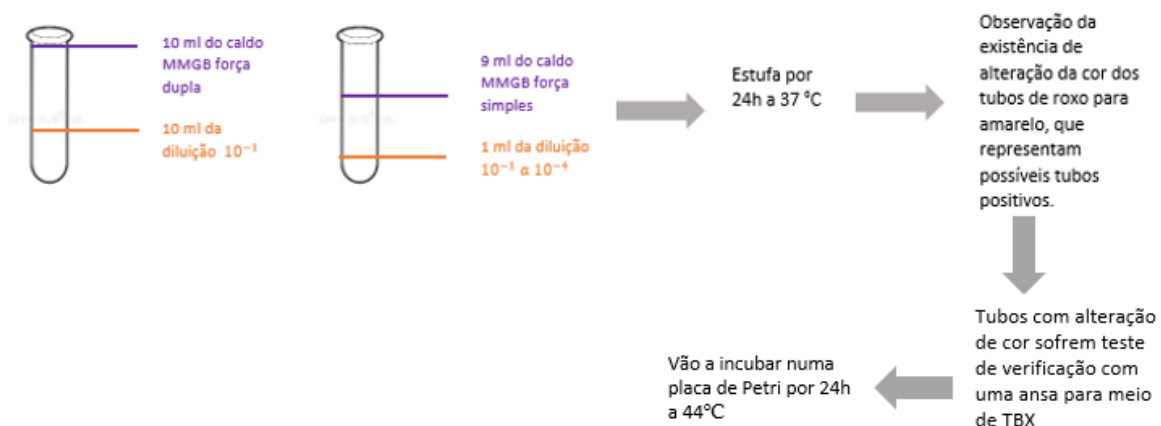


Figura 3.4. Resumo do procedimento para a quantificação do teor em bactérias entéricas *Escherichia coli*, pelo NMP, nas amostras de mexilhão.

3.3.1.3 Pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores

As bactérias do género *Clostridium* são caracterizadas pela capacidade de formação de esporos nos intestinos de animais de sangue quente, o que, aliado à sua grande resistência a condições ambientais adversas, torna os esporos de clostrídios um bom indicador de poluição (Sumampouw & Risjani, 2014). Estas bactérias são capazes de reduzir o sulfito, e devido à precipitação do sulfureto de ferro, dá-se o escurecimento do meio de cultura envolvente, permitindo, assim, identificar a sua presença através da observação de colónias negras nos inóculos (Cabral, 2010; Costán-Longares *et al.*, 2008).

A pesquisa de esporos de clostrídios na amostra foi realizada segundo a Norma Portuguesa (NP 2262, 1986.) que se destina especificamente à pesquisa de esporos em géneros alimentícios.

A partir da solução-mãe foram retiradas amostras de 10 mL para 2 tubos de ensaio vazios estéreis, além disso foi retirado 1 mL para outros 2 tubos de ensaios nas mesmas condições, repetindo o processo para as restantes diluições. Os tubos foram levados ao banho a 80°C, durante 10 minutos, para eliminar qualquer organismo que não fosse esporos. Os tubos foram rapidamente arrefecidos, posteriormente foram introduzidos 10 mL do meio SPS (HiMedia) de concentração dupla nos tubos com 10 mL de solução-mãe e 10 mL de SPS concentração simples nos restantes tubos. As amostras

foram a incubar por 5 dias em estufa (Memmert, UF450) a 37°C (Figura 3.5). Consideram-se positivos os tubos onde ocorreu o aparecimento de zonas pretas no meio de cultura. Os resultados foram expressos indicando a diluição menor onde foram detetados resultados positivos.

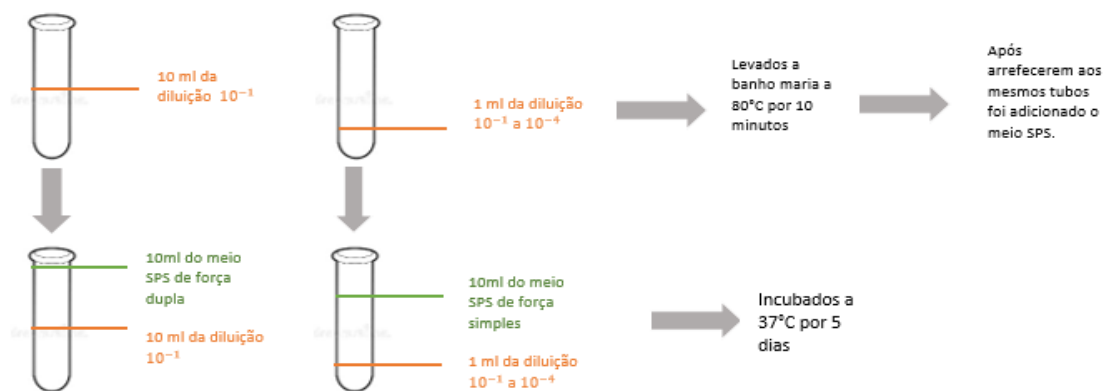


Figura 3.5- Resumo do procedimento para a identificação da presença de esporos do género *Clostridium*.

3.3.2. Análises bioquímicas

As amostras de mexilhão foram caracterizadas em termos de composição nutricional, nomeadamente teor de proteínas totais, cinzas, hidratos de carbono, lípidos e perfil de ácidos gordos.

3.3.2.1. Quantificação de proteína total

A determinação de proteína foi realizada pelo método de Kjeldahl (Bodily, 1956), que se baseia na quantificação de azoto total existente nas amostras e na sua conversão para percentagem de proteína bruta.

Em tubos de Kjeldahl (Linex) transferiu-se 200 mg de amostra e um pouco de água para garantir que não se perdia amostra no momento da passagem para os tubos. Adicionou-se uma pastilha de catalisador Kjeldahl (VWR Chemicals) e 25 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 97% (Fisher Scientific UK). Os tubos foram levados ao digestor (Foss digestor 2006) a 220°C por 30 minutos e de seguida a 400°C por 90 minutos. Na digestão, por ação do ácido sulfúrico, todo o azoto orgânico foi convertido em amónio (NH_4^+).

Após terminar o processo de digestão, os tubos arrefeceram até à temperatura ambiente e adicionou-se 70 mL de água destilada. A seguir as amostras foram destiladas (destilador Foss Kjelttec 2100) em condições alcalinas (por adição de 10x 10 mL de NaOH a 40%) e o destilado foi recolhido numa solução (30 mL) de ácido bórico (Merck) a 4% contendo verde de bromocresol e vermelho de metilo a 1%. Finalmente, a mistura resultante foi titulada com uma solução padrão de HCl até mudança de cor para um tom rosa. O teor de proteína total foi expresso em % de peso seco e calculado por aplicação da equação 1. Os resultados apresentados correspondem à média ± desvio padrão de três amostras independentes.

$$\%proteína = 100 \times \frac{(V_A - V_B) \times 0,014 \times FC \times [HCl]}{m_A} \quad (1)$$

Sendo V_A e V_B o volume de HCl, expresso em mL, gasto na titulação da amostra e do ensaio em branco respetivamente; 0,014 a massa molar do azoto; FC (Fator de Conversão)= 6,25; [HCl] = concentração da solução de HCl; m_A = massa da amostra em g.

3.3.2.2. Determinação de teor de lípidos totais

A quantificação de lípidos nas amostras seguiu o método descrito por Folch (Folch *et al.*, 1957). O reagente de Folch foi preparado adicionando 200mL de metanol (CH_3OH) (Merck) a 400 mL de clorofórmio ($CHCl_3$) (Merck).

Em tubos Falcon de 50mL pesou-se 50mg de amostra, foi adicionado 1 mL de H_2O e 10 mL do reagente de Folch. As amostras foram homogeneizadas (vortex Velp) por 5 minutos. A seguir foram adicionados 1,2 mL de cloreto de sódio (NaCl) a 0,8% e seguiu-se uma nova homogeneização por 2 minutos. As amostras foram levadas à centrífuga por 10 minutos a 4427 g (Eppendorf Centrifuge 5810) e a fase orgânica inferior foi retirada, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro, e transferida, através de uma coluna de sulfato de sódio anidro (Merck), para balões de fundo redondo previamente tarados. Aos tubos Falcon foi adicionado mais 2 mL de clorofórmio ($CHCl_3$), repetindo-se o processo de homogeneização, centrifugação e recolha da fase orgânica para os balões de fundo redondo.

A fase orgânica contida nos balões de fundo redondo foi evaporada num evaporador rotativo (Heidolph) para remover o clorofórmio. Finalmente, os balões com o conteúdo lipídico das amostras, foram colocados numa estufa a 60°C (Memmert, UF450)

até peso constante (balança Sartorius, modelo: Entris 224I-1S, capacidade máxima de 220g). O teor de lípidos totais foi expresso em % de peso e calculado de acordo com a equação 2. Os resultados apresentados correspondem à média ± desvio padrão de três amostras independentes.

$$\% \text{lípidos} = 100 \times \frac{(m_{\text{pêras}} + m_{\text{gordura}}) - m_{\text{pêras}}}{m_{\text{amostra}}} \quad (2)$$

Onde: massa das pêras (g) = $m_{\text{pêras}}$; , massa da gordura (g) = m_{gordura} ; massa da amostra = m_{amostra} (g).

3.3.2.3. Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado por gravimetria, segundo a NP 2032 (1988). O processo baseia-se na incineração das amostras na mufla (Nabertherm, B170) a 525°C durante 8 horas. Para a determinação do teor de cinzas foram pesadas 0,2 g de amostra liofilizada em cadinhos. O teor de cinzas foi expresso em % de peso seco e foi determinado por aplicação da equação 3. Os resultados apresentados correspondem à média ± desvio padrão de três amostras independentes.

$$\% \text{cinzas} = 100 \times \frac{(m_{\text{cadinhos}} + m_{\text{cinzas}}) - m_{\text{cadinhos}}}{m_{\text{amostra}}} \quad (3)$$

Onde: massa de cadinhos (g) = m_{cadinhos} ; massa de cinzas (g) = m_{cinzas} ; massa da amostra (g) = m_{amostra}

3.3.2.4. Determinação do teor de hidratos de carbono

O valor referente aos hidratos de carbono presentes na amostra foi calculado por diferença, com base nos valores obtidos nos parâmetros- proteína, lípidos, cinzas- e expressos em % , de acordo com a equação 4 (FAO, 2003)

$$\% \text{Hidratos de carbono} = 100 - (\% \text{proteína} + \% \text{lípidos} + \% \text{cinzas}) \quad (4)$$

3.3.2.5. Análise do perfil de ácidos gordos

Para análise do perfil de ácidos gordos, as amostras de mexilhão foram submetidas a um processo de transmetilação direta em meio ácido, para obtenção dos ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG), segundo o procedimento descrito por (Fernández *et al.*, 2015). Para o efeito pesou-se 50 mg (balança Sartorius, modelo: Entris 224I-1S, capacidade máxima de 220 g) de amostra liofilizada e adicionou-se 2 mL de solução de H₂SO₄ a 2% em metanol e os tubos foram levados a um banho (Precistern-Selecta) à temperatura de 80°C por 2 horas. Após arrefecimento à temperatura ambiente, adicionou-se 1 mL de água MiliQ (VWR Chemicals) e 2 mL de *n*-hexano. De seguida procedeu-se à homogeneização (vortex Velp) dos tubos, e posterior centrifugação a 277 g por 5 minutos (Eppendorf Centrifuge). A fase superior, correspondente ao *n*-hexano, que contém os EMAG, foi colocada em vials e posteriormente analisada por cromatografia gasosa.

Para o efeito, utilizou-se um cromatógrafo gasoso (Finnigan Ultra Trace), equipado com uma coluna capilar Thermo Tr-FAME (60 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm de espessura de filme de fase estacionária), um injetor automático (Autosampler AS 3000, Thermo Electron Corporation) e um detetor de ionização de chama (FID).

O detetor e o injetor (a funcionar em modo splitless) foram programados para temperaturas de 280 °C e 250°C, respetivamente. A temperatura da coluna foi programada para um valor inicial de 100 °C durante 1 minuto, aumentando para 9°C min⁻¹ até aos 180°C, mantendo-se a essa temperatura durante 10 min. Depois procedeu-se a um novo aumento de 2°C min⁻¹ até aos 235°C, mantendo-se a essa temperatura durante 5 min. O hélio foi usado como gás de arraste, com um fluxo de 1,2 mL min⁻¹. Para a chama do detetor utilizou-se ar sintético e hidrogénio, com fluxo de 350 e 35 mL min⁻¹, respetivamente. Usou-se o software Xcalibur para a aquisição e análise de dados.

A identificação dos ácidos gordos foi feita por comparação dos tempos de retenção dos EMAG com os tempos de retenção dos componentes das misturas padrão de Supelco 37, PUFA 1 e PUFA 3 (Sigma-Aldrich). Os resultados foram expressos em percentagem de área total (% Área Total). As quantidades de cada ácido gordo (µg/mg DW de amostra) foram calculadas pelo método do padrão interno, de acordo com a equação 5 (Neves *et al.*, 2021):

$$AGx \left(\frac{\mu g}{m g} \right) = \frac{\text{Área}(AGx)}{\text{Área}(PI)} \times \frac{V_{PI} \times C_{PI}}{V_e} \times \frac{V_a}{m_a} \quad (5)$$

Sendo: AGx - o ácido gordo a ser quantificado; PI - Padrão interno; C_{PI} - concentração de PI (μg / mL); V_{PI} - volume de solução PI adicionado no frasco (μL); V_E - volume do extrato *n*-hexano da amostra adicionado no frasco (μL); V_a - volume de hexano utilizado para a extração de EMAG das amostras (mL); m_a - amostra de massa (m)

3.3.3 Análise da presença de microplásticos

A pesquisa de microplásticos na biomassa do mexilhão foi efetuada de acordo com o procedimento proposto por Ding *et al.* (2018) com algumas modificações.

Colocou-se 0,8 g de amostra liofilizada em frascos, e adicionou-se 80 mL de KOH (Merck) a 10%. Realizou-se uma digestão da amostra, sob agitação magnética (placa de agitação Selecta, Agimatic E), durante 72h a 60°C Imediatamente após a digestão, as amostras foram filtradas. Os filtros foram colocados na estufa (Memmert, UF450) a 50°C por 48h e observados à lupa (Zeiss, Stemi 2000-C), registando-se o número de partículas de plástico observadas. As amostras foram analisadas em triplicado. Numa das réplicas foi colocado um pequeno pedaço de plástico vermelho, de dimensões aproximadamente 1x0,5 cm, para monitorizar a sua eventual degradação (controlo positivo). Os resultados foram expressos em número de partículas por g de amostra liofilizada e correspondem à média ± desvio padrão de três réplicas independentes.

3.4. Análises à água

As amostras de água foram recolhidas de 3 locais diferentes de Peniche - Marina, Fosso e ETAR - no mesmo dia com pouca diferença de tempo, simultaneamente com a colheita de amostras de mexilhões. Foram transportadas em garrafas de plástico identificadas, dentro de uma caixa frigorífica com arrefecimento por gelo até ao laboratório, onde foram armazenadas no frio até a realização das análises.

Os parâmetros físico-químicos da água como a Temperatura, Salinidade e Oxigénio dissolvido foram lidos no local de amostragem com recurso a uma sonda multiparâmetros (YSI Professional Plus Handheld Multi-parameter Meter).

3.4.1 Quantificação de clorofila *a*

Os valores de clorofila *a* foram obtidos em laboratório, de acordo com a metodologia descrita por Strickland & Parsons. (1972), que consiste na recolha do fitoplâncton através de um filtro e posterior extração e quantificação dos seus pigmentos por espectrofotometria.

Após a recolha da água, a parte destinada para quantificação de clorofila foi filtrada numa rede de 300 µm e armazenada num frasco de polietileno onde, para evitar acidificação das clorofilas e a sua decomposição, foram adicionadas 2 a 3 gotas de suspensão de carbonato de magnésio.

A suspensão de carbonato de magnésio foi preparada adicionando 1g de pó de carbonato (Merck) a 100 mL de água destilada (Merck) e agitado antes da sua utilização, para garantir a suspensão da matéria.

A amostra de água (250 mL) foi filtrada usando um filtro de fibra de vidro (Whatman GF/C 4,5 cm) e drenou-se o filtro. De seguida, este foi colocado num tubo de centrífuga de 15 mL e adicionou-se 10 mL de acetona a 90%. Macerou-se o filtro usando uma vareta de vidro e o frasco foi fechado e agitado e colocado no frigorífico por 20h. Após esse tempo, com o frasco já à temperatura ambiente, foi a centrifugar a 1968 *g* durante 10 minutos (Eppendorf Centrifuge). 3 mL do sobrenadante resultante da centrifugação foram colocados na cuvette do espectrofotómetro (Thermo Scientific) e a absorvância foi lida a 665, 64,5, 630 nm. Foi utilizada acetona a 90% como branco.

A concentração foi calculada através da equação 6 (mg/m^3):

$$\frac{\text{mg pigmento}}{\text{m}^3} = \frac{C}{V} \times lc \quad (6)$$

Onde: V= Volume de água filtrada (L); lc= valor da espessura da cuvette utilizada, 1cm; C= concentração do valor obtido pela seguinte equação (mg/m^3):

$$C(\text{CHL } a) = 11.6 A_{665} - 1.31 A_{645} - 0.14 A_{630}$$

Sendo que A é o valor de Absorvância medido no comprimento de onda respetivo.

3.4.2. Quantificação de nitratos

A quantificação de nitratos nas amostras de água do mar foi efetuada por espectrofotometria de ultravioleta de acordo com o método proposto por Armstrong, (1963). Para se preparar a solução padrão, o nitrato de potássio foi colocado na estufa (Memmert, UF450) no dia anterior à realização das análises. Preparou-se uma solução de nitrato de potássio (KNO_3) (Merck) com concentração de 100 mg/L. Em 12 balões volumétricos de 50 mL foram colocados 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 5 mL; 8 mL; 10 mL da solução de nitrato de potássio em cada balão e obteve-se o volume final adicionando água destilada. As soluções padrão foram realizadas em duplicado.

Em balões volumétricos de 50 mL adicionou-se 5 mL de amostra e 0,15 mL de HCl 8 M. A mesma quantidade de HCl foi colocada nas soluções padrão. As amostras foram realizadas em triplicado. A absorvância foi lida a 220 nm (Thermo Scientific) e simultaneamente a 275 nm, com o propósito de se eliminar possíveis interferentes

3.4.3 Quantificação de nitritos

A análise de nitritos nas amostras de água realizou-se pelo do método de Zambelli. (1887). Para o efeito preparou-se o reagente de Zambelli, com 312,5 mL de água destilada, 150 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4), 3,75 g de cloreto de amônio (NH_4Cl) (JMGS), 3,5g Fenol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$) e 2g de ácido sulfanílico ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$) (Merck). Também se preparou uma solução padrão com dióxido de azoto (NO_2^-) a 0,0023 g/L.

Em balões volumétricos de 100 mL foram colocados 0.5 mL; 1 mL, 3 mL, 5 mL, 8 mL; 10 mL de solução padrão. Pela mesma ordem foi adicionada água destilada até atingir o volume final.

Em tubos de ensaio foram colocados 5mL de amostra ou da solução padrão e adicionados 0,2 mL de reagente de Zambelli. Após homogeneizar os tubos de ensaio, aguardou-se por 10 minutos e adicionou-se, por fim, 3 mL de amoníaco. Os tubos foram novamente homogeneizados e a absorvância foi lida no espectrofotómetro (Thermo Scientific) a 435 nm

3.4.4. Quantificação de amónia

A quantificação do catião amónio (NH_4^+) foi feita de acordo com o método fenol-indofenol descrito por Kanda (1995). Preparou-se uma série de soluções padrão de sulfato de amónio (NH_4SO_4) (VWR Chemicals) entre 2 e 20 mg/L de catião amónio usando-se uma solução de cloreto de sódio a 35% como solvente.

A reação de cor foi desenvolvida em tubos de ensaio onde foram colocados 5 mL da amostra de água do mar ou de solução padrão, e adicionados 0,2 mL de solução alcoólica de fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) (Panreac) a 10% em etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$). Após homogeneização no vortex, adicionou-se 0,2 mL de solução de nitroprussiato de sódio ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Fluka) a 0,5%, repetiu-se a passagem no vortex. Em cada tubo de ensaio foi ainda adicionado 0,5 mL de solução oxidante, criada a partir de 200 mL de uma solução alcalina (obtida usando 50 g de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (Merck) e 2,5 g de hidróxido de sódio (NaOH) (JMGS) dissolvidos em água até atingir o volume final de 250 mL) com 50 mL de hipoclorito de sódio (NaClO) (Merck). Após homogeneização no vortex, os tubos de ensaio foram armazenados fechados, num local escuro por uma hora. As amostras foram preparadas em triplicado e a absorvância foi lida num espectrofotómetro (Thermo Scientific) a 640 nm. A concentração de amónio nas amostras foi determinada por interpolação da curva de calibração (*Abs versus* (NH_4^+)) construída a partir dos dados das soluções padrão. Os resultados obtidos foram expressos em mg/L de catião amónio e correspondem à média \pm desvio padrão de três réplicas.

3.4.5. Quantificação de fosfatos

Para a análise de fosfatos nas amostras, utilizou-se o método espectrofotométrico do ácido ascórbico, de acordo com Murphy & Riley (1962), foi realizada uma reação de cor composta por: 30 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 2,5 mol/L; 6 mL de tartarato de antimónio de potássio ($\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) com concentração de 1,36 g/L; 12 mL de molibdato de amónio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Merck) a 30 g/L; 12 mL de ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) (Prolabo) a 0.3 M. Obtendo assim o volume final de 50 mL.

Preparou-se uma solução de 0,05 g de dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) dissolvido em água destilada num volume final de 500 mL.

As soluções padrão foram preparadas em balões volumétricos de 100 mL com o volume de 3 mL, 2 mL, 1,5 mL, 1 mL, 0,5 mL e, após ter sido feito o volume final com água destilada, foram retirados, da solução padrão nº3 (1,5 mL da solução de dihidrogenofosfato de potássio) 10 mL para um balão volumétrico e 5 mL para outro.

Em tubos de ensaio, foram colocados 5 mL de amostra ou da solução padrão, e adicionados 0,5 mL da reação de cor preparada anteriormente. Após homogeneização no vortex, os tubos repousaram por 20 minutos até leitura da absorvância (Thermo Scientific) a 880 nm.

3.5. Análise estatística

Com o objetivo de avaliar as diferenças dos dados bioquímicos (triplicados) entre meses (julho, setembro, novembro e dezembro), em cada um dos locais (ETAR, Fosso e Marina), realizou-se uma análise de variância (ANOVA) com um fator (Zar, 2010). Os requisitos inerentes à realização das análises (nomeadamente, normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias) foram devidamente validados. Nos casos em que os pressupostos não eram cumpridos, foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (Zar, 2010). Sempre que aplicável, foram aplicados os testes de comparações múltiplas de Tukey ou de Games-Howell, dependendo, respetivamente, do cumprimento ou não dos pressupostos inerentes à ANOVA (Zar, 2010). Sempre que adequado, os resultados são apresentados na forma média \pm desvio padrão (DP). Todos os resultados foram considerados estatisticamente significativos ao nível significância de 5% (ou seja, sempre que p -value $< 0,05$). Os cálculos foram realizados com recurso ao software IBM SPSS Statistics 28. Adicionalmente, para avaliar as variações simultâneas dos parâmetros bioquímicos nas diferentes amostras (datas e locais de recolha), realizou-se uma análise de componentes principais (PCA). O PCA permitiu a deteção de semelhanças e diferenças entre as diferentes amostras, bem como a identificação das principais associações entre variáveis que são responsáveis pela variabilidade total dos dados estudados. O modelo de PCA foi construído sobre a média dos dados de medição, com a respetiva standardização dos mesmos. Embora apenas os resultados relativos aos dois primeiros componentes sejam aqui apresentados, todos os outros foram igualmente analisados. Todos os cálculos foram realizados com recurso ao software CANOCO 4.5 (ter Braak & Šmilauer, 2002).

4. Resultados e discussão

De modo a utilizar o mexilhão como bioindicador da qualidade da água costeira da zona de Peniche foram colhidas amostras de água e de mexilhão nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro de 2020 em três locais distintos: Marina, Fosso e Etar.

As amostras de água foram caracterizadas em termos de temperatura, pH, oxigénio dissolvido, salinidade, teor de clorofila, de amónio, nitritos, nitratos e fosfatos. As amostras de mexilhão foram avaliadas em termos de carga microbiana, perfil bioquímico e presença de microplásticos.

4.1. Análises Microbiológicas

4.1.1 Quantificação de microrganismos totais

O método utilizado permitiu determinar o número de bactérias presentes capazes de produzir colónias no meio de cultura, Plate Count Agar, nas condições de 30°C por 72 horas. A contagem é relativa às colónias (Unidades formadoras de colónias- UFCs) observadas, sendo depois calculado o número de UFC/g usando a média das 2 placas com resultados entre os 30 e 300 UFC e multiplicando pelo inverso da diluição. As placas com UFC acima de 300 foram consideradas incontáveis

Observou-se uma grande variação da carga das amostras em função dos locais de recolha. No entanto, nenhuma ultrapassa o valor limite de referência para alimentação, que é 5×10^5 UFC/g (ICMSF 1996) Os resultados estão apresentados na Tabela 4.1.

Comparando os locais de recolha, verificou-se que as amostras colhidas na Marina foram as que apresentaram menor carga microbiana, variando entre 5×10^2 UFC/g em julho e 4×10^3 UFC/g em setembro. Em oposição, foi na ETAR que se registaram valores de contaminação maiores, nomeadamente nos meses de julho (1×10^5 UFC/g) e novembro (4×10^4 UFC/g). No Fosso a carga microbiana foi relativamente constante ao longo do tempo, variando entre (5×10^2 e 4×10^3 UFC/g). Comparando as datas de recolha, não se verificou uma tendência comum. Efetivamente, foi no mês de setembro que se registaram os valores mais altos de contaminação microbiana na Marina e no Fosso, enquanto que na ETAR se registou uma carga microbiana muito baixa (25 UFC/g).

Tabela 4.1- Número de microrganismos totais, expressos em UFC/g, das amostras de mexilhão colhidas na Marina, Fosso e ETAR, nos meses de julho setembro, novembro e dezembro

Local	Data	UFC/g
Marina	julho	505 (5×10^2)
	setembro	4350 (4×10^3)
	novembro	2350 (2×10^3)
	dezembro	785 (8×10^3)
Fosso	julho	6100 (6×10^3)
	setembro	9400 (9×10^3)
	novembro	5700 (6×10^3)
	dezembro	6050 (6×10^3)
ETAR	julho	148500 (1×10^5)
	setembro	25 (2×10)
	novembro	40500 (4×10^4)
	dezembro	6500 (6×10^3)

Os resultados obtidos demonstram a existência de contaminação microbiana das amostras analisadas, o que já era esperado uma vez que se trata de uma espécie conhecida pelas suas propriedades bioacumuladoras (Olalemi *et al.*, 2016). Os valores detetados na pesquisa realizada vão de encontro a outros estudos publicados (Kacar, 2011; Winterbourn *et al.*, 2016).

4.1.2. Pesquisa de *E. coli*

A presença da bactéria *E. coli* foi confirmada pela produção de ácido, detetada pela alteração de cor do meio de cultura de roxo (resultado negativo) para amarelo (resultado positivo) como demonstrado na Figura 4.1.



Figura 4.1 Aspeto do meio de cultura (caldo MMGB) inoculado com amostras *E. coli* (positivo a amarelo) e negativas (vermelho).

A confirmação da presença de *E. coli* foi efetuada por inoculação de 10 μ L do meio MMGB positivo em placas de Petri contendo meio TBX. As placas com presença de colónias de cor azul foram consideradas positivas e negativas as placas sem formação de colónias (Figura 4.2).

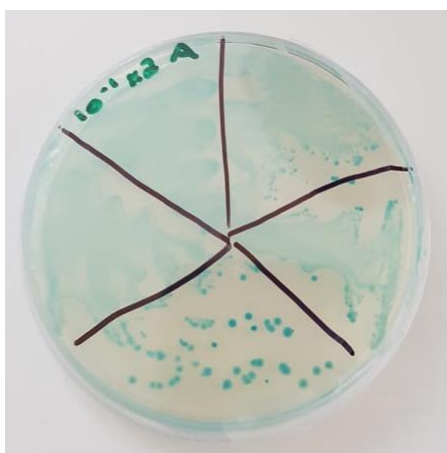


Figura 4.2- Placa com meio TBX positiva para a presença de colónias *E. coli*

Os resultados obtidos foram expressos em Número Mais Provável por 100 g de mexilhão fresco, de acordo com a norma ISO 16649-3 (2015), e estão indicados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2- Resultados da presença de *E. coli*, expressos em NMP por 100 g das amostras de mexilhão colhidas na Marina, Fosso e ETAR, nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro.

Local	Data	NMP (por 100g)	intervalo de confiança
Marina	julho	230	70 a 700
	setembro	2400	680 a 7500
	novembro	230	70 a 700
	dezembro	50	10 a 130
Fosso	julho	2400	680 a 7500
	setembro	230	70 a 700
	novembro	230	70 a 700
	dezembro	230	70 a 700
ETAR	julho	2400	680 a 7500
	setembro	2400	680 a 7500
	novembro	230	70 a 700
	dezembro	230	70 a 700

De acordo com os valores obtidos, a menor contaminação de *E. coli* foi observada na Marina de Peniche no mês de dezembro (50 NMP/100 g). A ETAR foi o local onde as amostras recolhidas apresentaram os valores mais elevados de contaminação ao longo dos 4 meses de amostragem.

O valor considerado limite para a bactéria *E. coli* é de 230/100 g (Reg. nº 853/2004, Inácio, 2008). Apenas na amostra proveniente da Marina no mês de dezembro foi registado um valor inferior a este limite. As concentrações mais baixas detetadas em dezembro, podem justificar-se pelo facto de ter sido neste mês que se registaram as temperaturas mais baixas da água (Figura 4.15) e de a *E. coli* ser uma bactéria que se desenvolve em temperaturas mais amenas. Outra justificação possível para esta variação deve-se à pressão turística existente em Peniche nos meses de verão, que, consequentemente, pode fazer aumentar o valor de *E. coli* na água do mar.

Em Portugal a entidade responsável pela apanha de bivalves é o Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) onde está regulamentado, de acordo com a publicação do Regulamento (UE) n.º 2285/2015 da Comissão, (Europa, 2015) as 3 zonas de captura de bivalves. Os locais de amostragem encontram-se nas zonas de Classe A e Classe B onde, respetivamente, é permitido ter até 700 NMP/100 g e 2400 NMP/100 g.

4.1.3 Pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores

As bactérias sulfito-redutoras são microrganismos anaeróbios que produzem esporos com grande resistência a condições adversas, como por exemplo temperatura e pH extremos. Os esporos de bactérias sulfito-redutoras, quer de origem fecal humana como animal, estão amplamente disseminados no ambiente, nomeadamente em águas residuais e nos solos. Os esporos destes organismos sobrevivem na água por longos períodos de tempo sendo até resistentes ao cloro utilizado para o seu tratamento. Desta forma, as análises de presença de esporos clostrídio sulfito-redutores têm sido utilizadas como indicadores da eficácia do processo de filtração no tratamento das águas residuais (Scheer, 1990).

A existência de esporos de clostrídios sulfito-redutores nas amostras analisadas é identificada pela presença de colónias negras originadas pela formação de sulfureto de ferro (Figura 4.3).



Figura 4.3- Identificação da presença de esporos de clostrídios sulfito-redutores com a existência de manchas pretas e de presença negativa os tubos amarelos

Foram inoculados 2 tubos para cada diluição de força simples e 2 tubos de força dupla para com a solução-mãe e observados os resultados. As diluições realizaram-se de 10^{-1} até 10^{-4} e os resultados foram lidos considerando a maior diluição positiva (Tabela 4.3).

Tabela 4.3- Resultados da presença de esporos de bactérias do género *Clostridium* nas amostras de mexilhão recolhidas na Marina, Fosso e ETAR, nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro.

Local	Data	Resultados
Marina	julho	positiva em 10^{-1} g negativa em 10^{-2} g
	setembro	positiva em 10^{-2} g negativa em 10^{-3} g
	novembro	positiva em 10^{-1} g negativa em 10^{-2} g
	dezembro	positiva em 10^{-1} g negativa em 10^{-2} g
Fosso	julho	positiva em 10^{-2} g negativa em 10^{-3} g
	setembro	positiva em 10^{-3} g negativa em 10^{-4} g
	novembro	positiva em 10^{-3} g negativa em 10^{-4} g
	dezembro	positiva em 10^{-3} g negativa em 10^{-4} g
ETAR	julho	positiva em 10^{-3} g negativa em 10^{-4} g
	setembro	positiva em 10^{-3} g negativa em 10^{-4} g
	novembro	positiva em 10^{-3} g negativa em 10^{-4} g
	dezembro	positiva em 10^{-3} g negativa em 10^{-4} g

No local de amostragem Marina a presença de esporos observou-se apenas nas diluições mais baixas, indicando que a sua concentração não era suficientemente alta para se revelar em maiores diluições. É, portanto, o local estudado menos contaminado uma vez que tanto no Fosso como na ETAR os resultados positivos deram-se em menores concentrações de amostra. Observando que o mês de julho, no Fosso, teve concentrações inferiores à mesma data da ETAR, conclui-se que a ETAR é o local mais contaminado por esporos clostrídios sulfito-redutores.

A presença de esporos de clostrídios em mexilhões em zonas poluídas é comum, podendo até ser maior a sua concentração no organismo dos indivíduos do que na coluna de água (Stabili *et al.*, 2005). As amostras da ETAR, apresentam quantidades maiores do que as relatadas noutros estudos onde foram analisadas amostras de zonas poluídas (Lévesque *et al.*, 2010; Madden *et al.*, 1986).

Estudos sugerem que a presença de esporos clostrídios sulfito-redutores se mantenha mais tempo no organismo do mexilhão do que outras bactérias, por exemplo *E. coli* (de Mesquita *et al.*, 1991) Nas amostras estudadas, a concentração de esporos é superior na ETAR, local que também tem os valores mais elevados nas outras análises microbiológicas. Concluindo assim que, dos três locais estudados, a ETAR é onde existe maior contaminação microbiológica nos mexilhões.

4.2 Análises Bioquímicas

As amostras de mexilhão foram caracterizadas em termos de teor de proteínas, lípidos, cinzas e hidratos de carbono totais, bem como no que respeita ao perfil de ácidos gordos.

4.2.1 Teor de proteína

O conteúdo proteico das amostras de mexilhão variou entre $40,2 \pm 1,1\%$ nas amostras de setembro colhidas no Fosso e $57,2 \pm 2,1\%$ e $57,2 \pm 0,7\%$ nas amostras colhidas em novembro na ETAR e na Marina, respetivamente (Figura 4.4). As amostras do Fosso apresentam diferenças estatisticamente significativas entre os meses de verão e os meses de outono-inverno, enquanto que na ETAR essas diferenças só existem entre os meses de julho e novembro e na Marina entre os meses de setembro e dezembro.

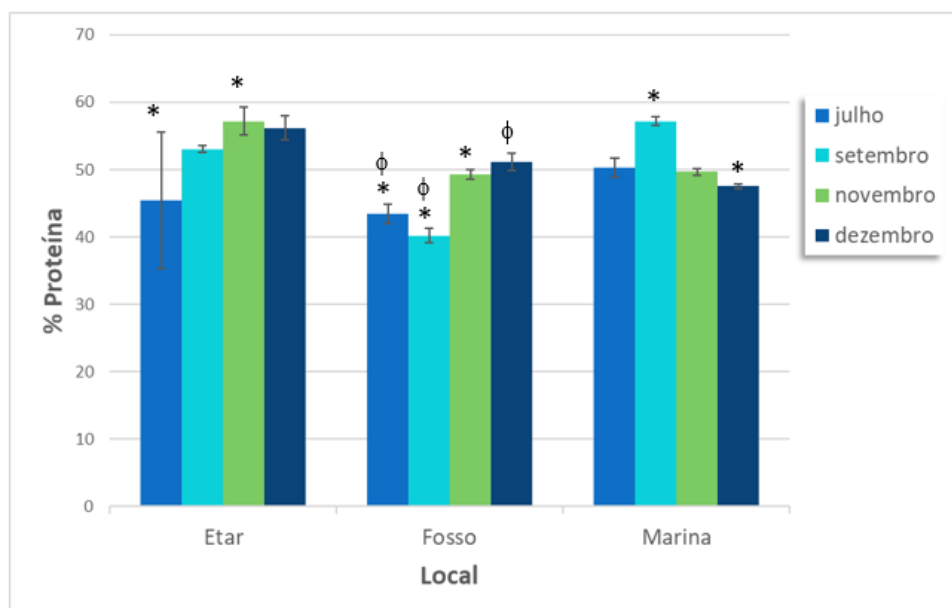


Figura 4.4- Variação do teor de proteína, expresso em % de peso seco, das amostras de mexilhão colhidas na ETAR; Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro. Para cada local os meses que partilham o mesmo símbolo apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si. Os dados estão apresentados na forma média \pm DP.

Nos meses de temperatura mais baixa (novembro e dezembro), a percentagem de proteína aumentou nas amostras capturadas no Fosso e na ETAR, enquanto que na

Marina as amostras colhidas em dezembro têm um teor proteico significativamente menor que em julho. As amostras da ETAR apresentaram valores de proteína superiores às amostras colhidas nos outros locais, o que poderá estar relacionado com maior disponibilidade de alimento. No Fosso obtiveram-se os valores mais baixos da pesquisa, o que também coincide com os valores mais baixos de nutrientes na coluna de água. O teor de proteína nas amostras e a sua variação ao longo dos meses estudados, são coerentes com os dados reportados na bibliografia (Capuzzo & Leavitt, 1988; Slabyj, Eoh Dan M. Carpenter, 1977)

4.2.2 Conteúdo lipídico

A quantidade de gordura das amostras de mexilhão analisadas variou entre $6,74 \pm 0,44\%$ nas amostras de dezembro colhidas na Marina e $9,55 \pm 0,34\%$ nas amostras colhidas na mesma data no Fosso (Figura 4.5). Com exceção das colheitas realizadas na Marina, nota-se um aumento significativo do conteúdo lipídico nos meses de inverno.

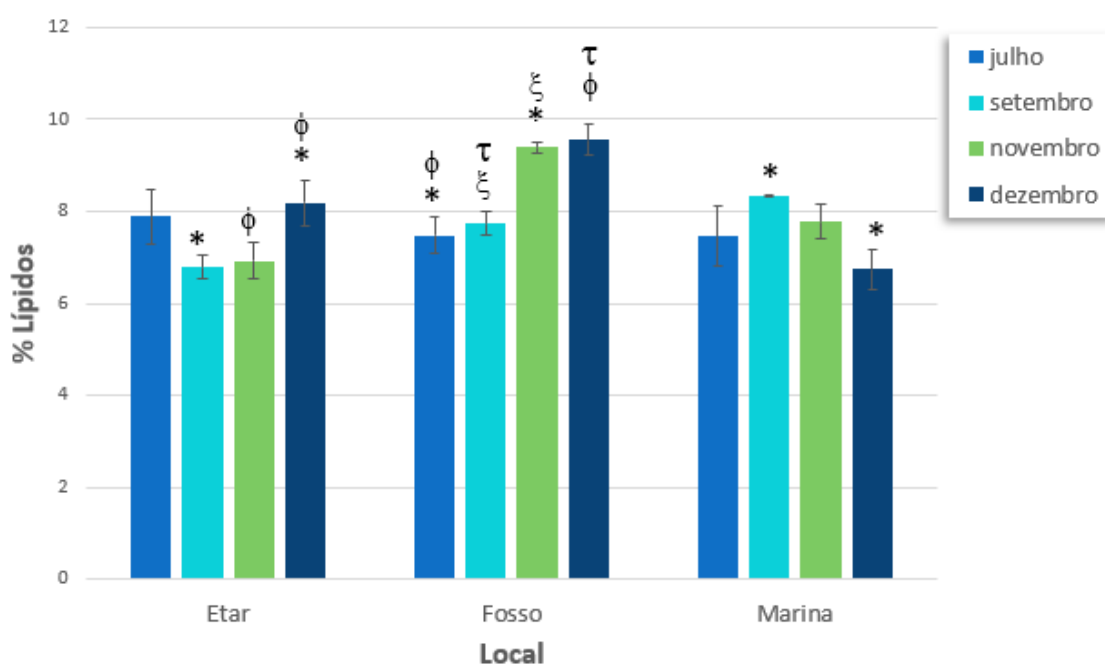


Figura 4.5- Variação do teor de lípidos, expresso em % de peso seco, das amostras de mexilhão colhidas na ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro. Para cada local, os meses que partilham o mesmo símbolo, apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si. Os dados estão apresentados na forma média \pm DP.

Por outro lado, na ETAR as amostras colhidas nos meses de setembro e novembro apresentaram teores lipídicos menores que as amostras colhidas na mesma data nos outros locais e em dezembro os valores registados são inferiores às amostras do Fosso. Estes resultados estão de acordo com outra pesquisa que refere que mexilhões que cresceram em zonas mais poluídas apresentaram um conteúdo lipídico mais baixo (Capuzzo & Leavitt, 1988).

No início do estudo foi realizada a medição e pesagem dos indivíduos de cada local e foi possível observar que os mexilhões colhidos na ETAR apresentavam uma massa cerca de 20 vezes inferior à dos outros locais (Anexo X, XI, XII). A relação entre o nível de poluição e o crescimento da população é descrita por vários autores que referem que os mexilhões de áreas com maiores níveis de poluição são mais sensíveis aos efeitos da toxicidade no seu organismo. Isto reflete-se num baixo conteúdo lipídico e menor tamanho de indivíduos, uma vez que a capacidade de filtração dos mexilhões não é diretamente relacionada com as suas necessidades nutricionais (Clausen & Riisgård, 1996; J Widdows & Johnson, 1988).

4.2.3 Teor de cinzas

O teor de matéria inorgânica das amostras de mexilhão, variou entre $20,7 \pm 1,0\%$ nas amostras colhidas na ETAR no mês de setembro e $35,8 \pm 0,3\%$ nas amostras da Marina em dezembro (Figura 4.6).

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas amostras da ETAR entre o mês de julho, setembro e novembro, sendo o valor mais elevado registado no primeiro mês de amostragem.

As amostras do Fosso colhidas em novembro apresentam o menor valor de cinza e diferem estatisticamente dos restantes meses. Nas amostras da Marina observam-se diferenças estatisticamente significativas entre as amostras de julho, setembro e dezembro, bem como entre as amostras de novembro e dezembro.

Neste local, a massa de cinzas foi maior em setembro, com uma ligeira diminuição nas amostras de novembro e um novo aumento no mês de dezembro. Até ao mês de dezembro, existiu um decréscimo no valor da massa de cinza detetada nos 2 outros locais.

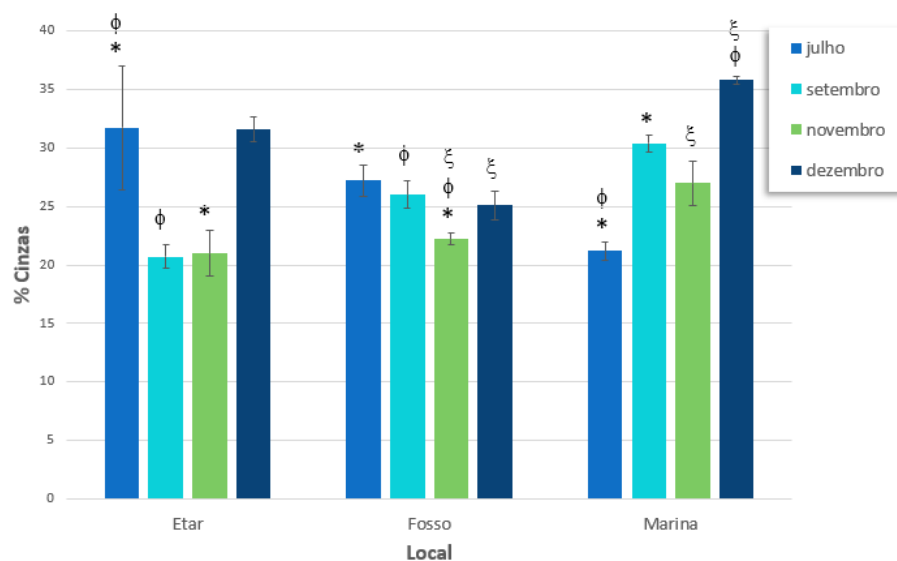


Figura 4.6- Variação do teor de cinzas, expresso em % de peso seco, das amostras de mexilhão colhidas na ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro. Para cada local, os meses que partilham o mesmo símbolo, apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si. Os dados estão apresentados na forma média \pm DP.

O aumento do teor de cinzas no mês de captura mais frio para as amostras da Marina e da ETAR é consistente com o estudo desenvolvido por Okumuş & Stirling, (1998).

Estudos com semelhantes valores bioquímicos apresentaram %cinzas inferiores aos obtidos. Estudos sugerem que as amostras com maior teor de proteína apresentam menores valores de matéria inorgânica, uma vez que durante a incineração das amostras, o conteúdo orgânico é degradado, ficando apenas para contabilizar os minerais existentes, (Slabyj, Eoh Dan M. Carpenter, 1977), (Dare & Edwards, 1975)

4.2.4 Conteúdo em hidratos de carbono

Os teores de hidratos de carbono nas amostras estudadas variam entre $3,3 \pm 2,9\%$ nas amostras colhidas na Marina em setembro e $22,6 \pm 4,8\%$ nas amostras do Fosso do mesmo mês.

Os resultados de carboidratos das amostras da ETAR não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, ao contrário das amostras da Marina que exibiram maior variabilidade.(Figura 4.7).

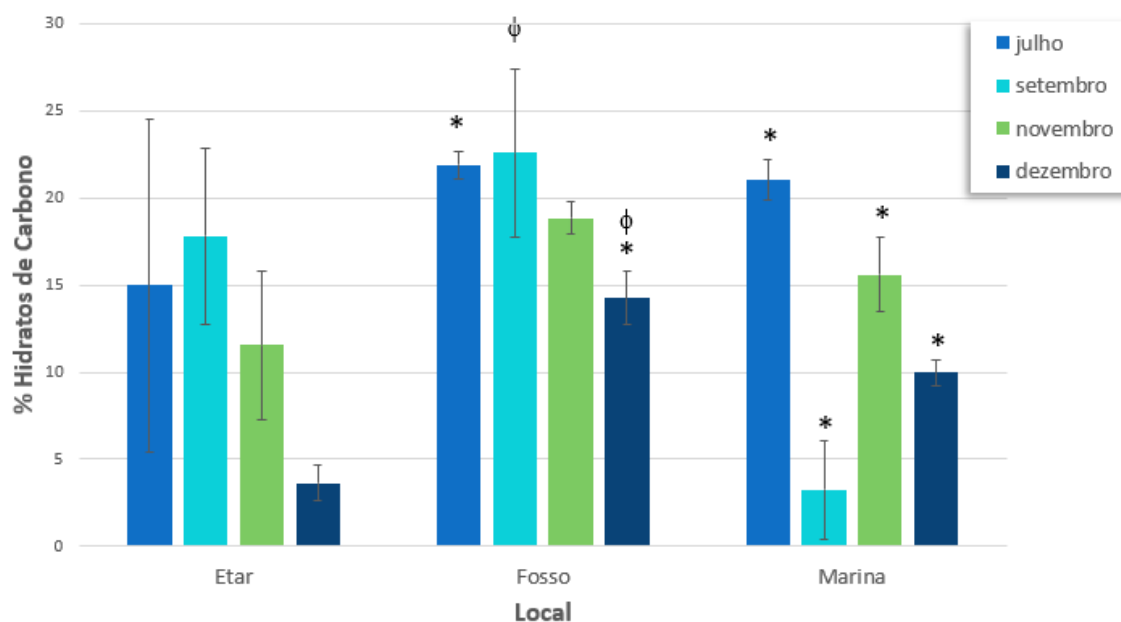


Figura 4.7- Variação do teor de hidratos de carbono, expresso em % de peso seco, das amostras de mexilhão colhidas na ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro. Para cada local, os meses que partilham o mesmo símbolo, apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si. Os dados estão apresentados na forma média \pm DP

Os mexilhões colhidos na Marina tiveram os valores mais baixo de hidratos de carbono e os colhidos no Fosso os mais elevados. Em dezembro todos os locais de amostragem tiveram diminuição do teor de hidratos de carbono por grama de mexilhão.

Os valores de hidratos de carbono obtidos neste estudo estão em linha com os relatados por (Slabyj, Eoh Dan M. Carpenter, 1977). Estudos sugerem que a composição nutricional das populações de mexilhão depende quer da disponibilidade de alimento como das características do meio envolvente (J. Widdows, 1978; J. Widdows *et al.*, 1979).

4.2.5. Perfil de ácidos gordos

A classe de ácidos gordos saturados é predominante nas amostras, principalmente na Marina e no Fosso (Figura 4.8). As amostras da ETAR continham maiores concentrações de MUFA e PUFA comparativamente aos restantes locais. Os ácidos gordos predominantes nas amostras em estudo foram os ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n-3), docosahexaenoico (DHA, C22:6 n-3) e tricosanoico (C23:0) (Tabela 4.4). (Fokina *et al.*,

2007) reportaram a relação entre a variação de ácidos gordos e a disponibilidade de alimento, indicada pela concentração de clorofila *a* na água. ¹

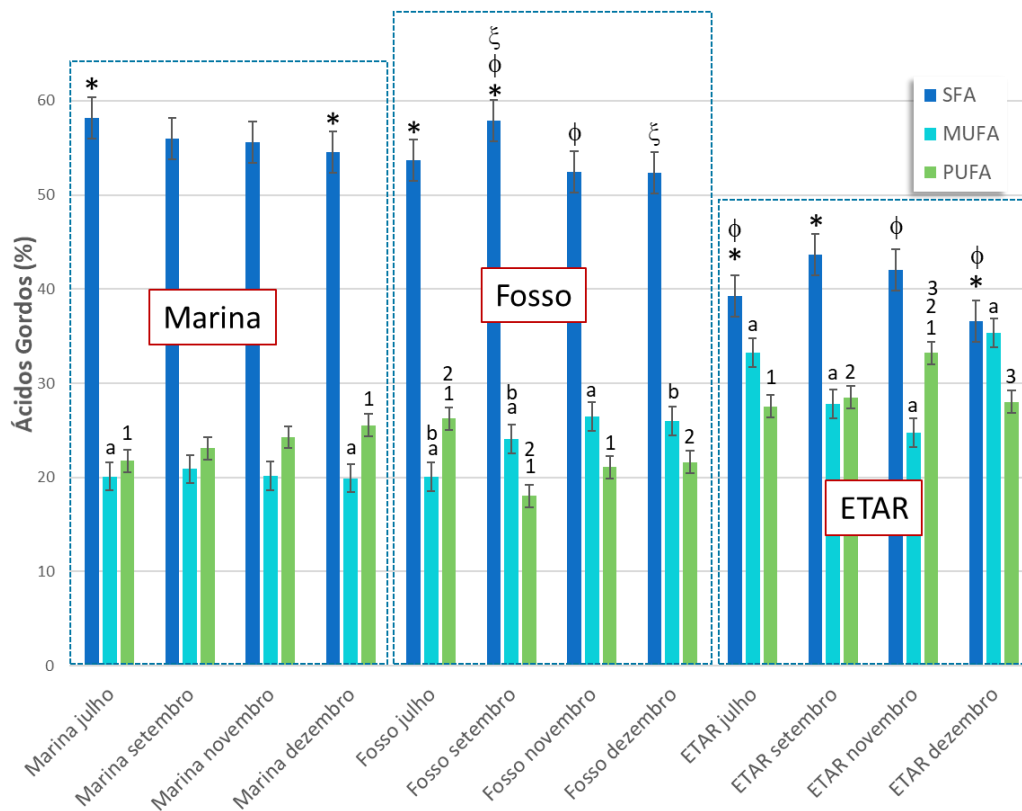


Figura 4.8- Variação do teor de ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA), expresso em % de ácidos gordos totais, das amostras de mexilhão colhidas na ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro. Em cada local, diferentes símbolos, letras ou números indicam diferenças estatisticamente significativas nos SFA, MUFA, e PUFA, respetivamente. Os dados estão apresentados na forma média ± DP.

Atendendo à influência dos fatores ambientais na composição dos ácidos gordos do mexilhão, existe uma elevada variabilidade nos resultados descritos na literatura. alguns estudos realizados referem os ácidos gordos polinsaturados como a classe predominante (Freites *et al.*, 2002; Merdzhanova *et al.*, 2016; Orban *et al.*, 2002; Otles & Sengor, 2005), enquanto outros sustentam os resultados obtidos no presente estudo, referindo os ácidos gordos saturados como os mais abundantes (Fuentes *et al.*, 2009; Galap *et al.*, 1999).

Estudos da variação dos parâmetros nutricionais de organismos sésseis, atribuem os níveis elevados de ácidos gordos saturados (SFA) em bivalves a habitats poluídos e com pouca disponibilidade de alimento, uma vez que o stress energético faz aumentar as

¹

concentrações dos ácido mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0), ambos SFAs que têm funções do tipo energético (Freites *et al.*, 2002; Galap *et al.*, 1999; Perry *et al.*, 1979)

As alterações bioquímicas devem-se à exposição a poluentes a que os mexilhões estão sujeitos, uma vez que se tratam de uma resposta ao stress por via de uma resposta compensativa que irá aumentar os valores de ácidos gordos saturados (Signa *et al.*, 2015)

Tabela 4.4- Ácidos gordos detetados nas amostras de mexilhão onde, com relevo em negrito, estão identificados os principais elementos de cada família, saturados, monoinsaturados e polinsaturados.

µg/mg	Marina jul	Marina Set	Marina nov	Marina dez	Fosso jul	Fosso set	Fosso nov	Fosso dez	ETAR jul	ETAR set	ETAR nov	ETAR dez
C12:0	0,04	0,03	0,03	0,00	0,02	0,06	0,07	0,08	0,19	0,14	0,05	0,09
C14:0	2,12	1,26	1,30	0,90	1,13	1,50	1,44	1,32	0,94	0,56	0,40	0,48
C14:1 n5	0,30	0,24	0,23	0,25	0,30	0,18	0,28	0,25	0,38	0,32	0,33	0,23
C15:0	0,28	0,19	0,20	0,20	0,23	0,26	0,29	0,30	0,26	0,18	0,14	0,17
C15:1 n5	0,18	0,14	0,15	0,15	0,18	0,12	0,16	0,14	0,20	0,19	0,20	0,15
C16:0	8,00	5,16	5,80	4,80	6,04	7,88	8,45	8,43	7,33	5,65	4,67	5,59
C16:1 n7	1,27	0,92	0,92	0,67	0,67	1,26	1,23	1,30	2,18	1,38	0,67	1,12
C16:2 n4	0,41	0,19	0,20	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:0	1,79	1,24	1,29	1,16	1,55	1,60	1,83	1,88	1,58	1,23	1,11	1,15
C18:1 n9 trans	0,08	0,02	0,00	0,00	0,06	0,10	0,15	0,12	0,16	0,11	0,11	0,19
C18:1 n9 cis	0,83	0,47	0,64	0,48	0,69	1,65	2,92	2,81	3,36	1,42	0,90	3,46
C18:1 n7 cis	0,57	0,35	0,45	0,35	0,42	0,57	0,73	0,74	2,07	1,24	0,87	1,23
C18:2 n6 cis	0,44	0,22	0,30	0,26	0,37	0,63	1,19	1,24	1,98	0,97	0,65	1,79
C18:3 n3 (ALA)	0,15	0,06	0,14	0,11	0,10	0,12	0,21	0,23	0,30	0,17	0,10	0,14
C18:1	1,48	0,85	1,09	0,84	1,17	2,32	3,80	3,67	5,58	2,77	1,88	4,88
C18:2	0,58	0,28	0,44	0,37	0,47	0,75	1,40	1,48	2,27	1,14	0,75	1,93
C20:1 n11	0,50	0,41	0,43	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,48	0,40	0,39	0,36
C20:1 n11 cis	0,00	0,00	0,00	0,00	0,49	0,35	0,35	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:1 n9	0,95	0,65	0,74	0,66	0,94	0,84	1,06	1,12	1,50	0,95	1,03	1,15
C18:4 n3	0,92	0,81	0,74	0,69	1,10	0,75	0,96	0,95	1,72	1,24	1,35	1,31
C20:2 n6	0,14	0,08	0,10	0,08	0,11	0,09	0,13	0,17	0,16	0,14	0,12	0,13
C20:4 n6	0,58	0,51	0,57	0,54	0,67	0,43	0,53	0,55	0,86	0,84	0,87	0,73
EPA	0,82	0,71	0,67	0,58	0,85	0,50	0,47	0,50	0,76	0,66	0,93	0,76
C23:0	1,34	0,72	1,19	0,99	0,96	0,85	1,51	1,70	1,90	1,68	1,25	0,70
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,04	0,05	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:5 n3	0,19	0,13	0,17	0,14	0,10	0,12	0,22	0,21	0,37	0,28	0,32	0,00
DHA	1,42	0,83	1,39	1,19	0,46	0,30	0,55	1,57	2,00	1,52	1,38	1,11
ω3	1,84	1,52	1,62	1,48	3,38	2,40	3,35	3,47	5,14	3,87	4,08	3,32
ω6	1,15	0,81	0,97	0,88	1,15	1,16	1,85	1,96	2,99	1,95	1,64	2,65

Num estudo publicado por Silva *et al.*(2017), sugere-se que a exposição a determinados elementos possa ter influência no perfil de ácidos gordos do grupo de moluscos dessa zona. O ácido palmítico, SFA, foi um dos mais detetados nas amostras de todos os locais, podendo ser indicador de uma exposição considerável a metais. No mesmo estudo é referido que o composto C20:3, detetado em amostras colhidas na Marina, apenas é identificado em organismos com elevada exposição a metais. Dos SFAs, também o ácido mirístico e ácido esteárico foram dos mais abundantes nas amostras,

deste estudo, o que está de acordo com o reportado noutros trabalhos (Fernández *et al.*, 2015; Orban *et al.*, 2002).

Fatores de stress, como a alteração da temperatura da água ou exposição a agentes inflamatórios podem justificar a variação dos valores de EPA e DHA observados nas amostras deste estudo (Fokina *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2017).

Considerando os ácidos gordos polinsaturados ω_3 e ω_6 , verificou-se que as amostras colhidas na ETAR têm os níveis mais elevados destes compostos, enquanto que os mexilhões da Marina e do Fosso têm a concentração mais baixas de ω_6 e ω_3 , respetivamente. Esta variação pode ser atribuída ao fitoplâncton disponível que varia entre datas e locais (Fernández *et al.*, 2015).

Com vista a obter uma perspetiva global da variação dos parâmetros bioquímicos das amostras de mexilhão colhidas na Marina, no Fosso e na ETAR ao longo dos meses deste estudo, fez-se uma análise de componentes principais (PCA) (Figura 4.9).

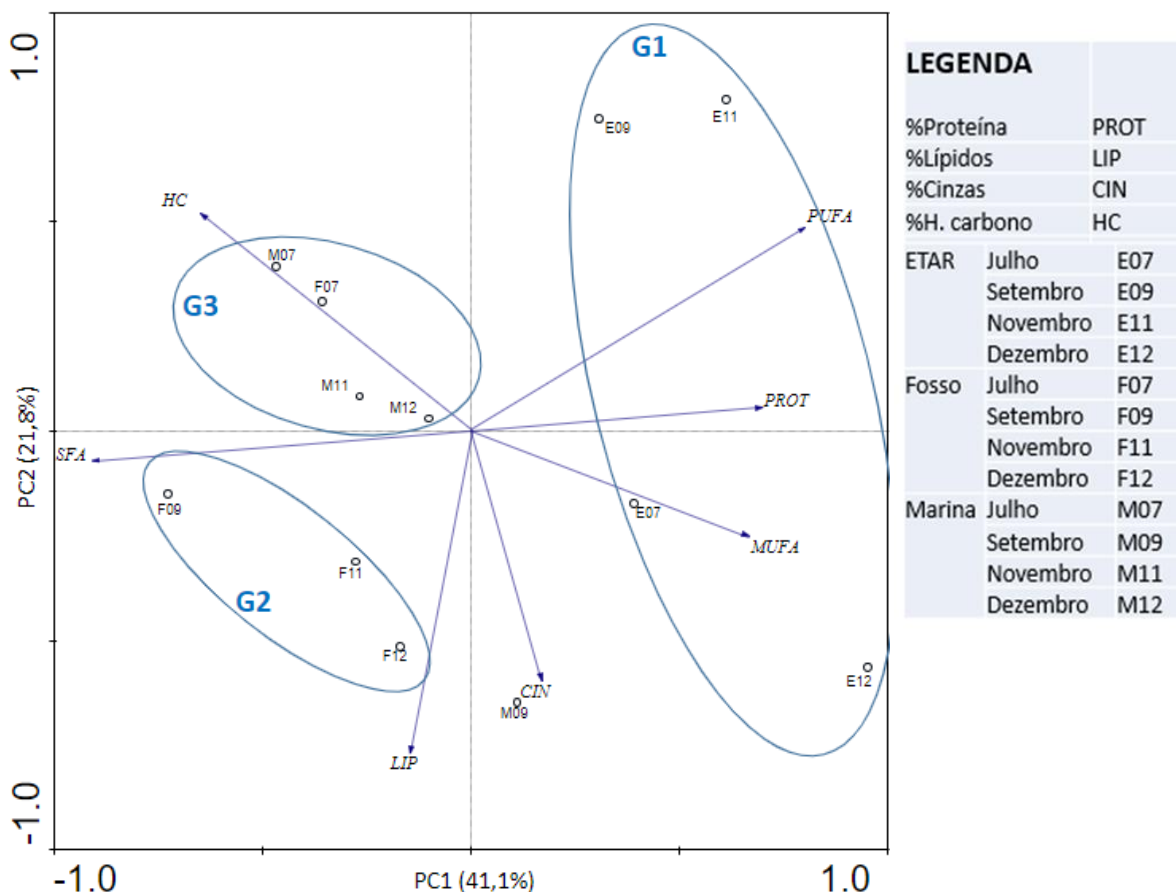


Figura 4.9- Análise de componentes principais (PCA) das amostras de mexilhão colhidas na Marina, no Fosso e na ETAR nos meses de julho, setembro, e novembro e dezembro, atendendo aos teores de ácidos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) bem como teores de proteína, lípidos, cinzas e hidratos de carbono.

O primeiro componente principal, PC1 representa 41,1% da variabilidade das amostras e está mais relacionado com os teores de ácidos gordos (SFA, MUFA e PUFA) e teor de proteína. O segundo componente principal PC2, representa 21,8% da variabilidade e é definido essencialmente pelos teores de cinza e lípidos.

Destacam-se 3 grupos, assinalados na Figura 4.9, como G1, G2 e G3. O Grupo 1, constituídos pelas amostras da ETAR caracteriza-se por conter níveis elevados de proteína, MUFA e PUFA e menores teores de SFA. O grupo 2, onde estão incluídas a maioria das amostras do Fosso, caracteriza-se por elevadas percentagens de lípidos, cinzas e SFA e menores teores de MUFA, PUFA e proteína. O grupo 3, constituído essencialmente por amostras da Marina, distingue-se do G2 pelo menor teor de lípidos e cinzas.

4.3 Presença de microplásticos

Neste estudo pretendeu-se fazer uma abordagem completa do uso dos mexilhões como bioindicadores marinhos da zona costeira de Peniche. Para o efeito, foi desenvolvido um protocolo para observação de partículas sólidas existentes no organismo dos mexilhões. A observação foi realizada à lupa e os resultados foram registados por itens.

Em todas as amostras analisadas foi possível observar itens (Figura 4.10). No mês de julho, os resultados referentes à recolha da ETAR não têm dados, uma vez que não foi possível realizar essas análises.

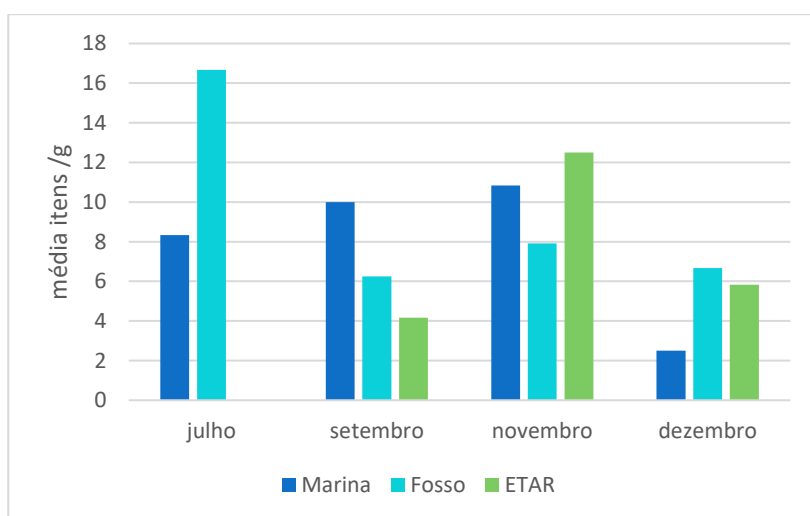


Figura 4.10- Média de itens encontrados por g de amostra liofilizada, de mexilhão colhido na ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro.

As amostras recolhidas no Fosso em julho apresentaram o valor mais elevado, com cerca de 16 itens/g. O valor mais baixo deteta foi nas amostras da Marina, no mês de dezembro, onde se observou cerca de 2 itens/g.

As imagens capturadas estão na resolução máxima da lupa (32x) e são demonstrativas de alguns dos diversos itens encontrados e contabilizados (Figuras 4.11; 4.12; 4.13; e 4.14).



Figura 4.11- Item de cor azulada observado na amostra de mexilhão do Fosso no mês de novembro

Comparando com a bibliografia, os itens apresentam formas semelhantes aos reportados, apesar de terem sido detetados em maiores quantidades, a cor e formato são semelhantes (Pequeno *et al.*, 2021)



Figura 4.12 Item observados na amostra de mexilhão da Marina no mês de novembro



Figura 4.13- Item observados na amostra de mexilhão da Marina no mês de dezembro



Figura 4.14- Item observado na amostra de mexilhão da ETAR no mês de novembro

A pesquisa realizada apenas pretendia detetar a presença de partículas sólidas nas amostras, sem recorrer a técnicas que permitissem a sua identificação, nomeadamente a espectrofotometria de infravermelho. Desta forma, só é possível afirmar que foram detetados itens sólidos em todas as amostras estudadas, que resistiram ao processo de digestão efetuado. As quantidades detetadas são superiores às relatadas na bibliografia (Digka *et al.*, 2018), que indica uma média de 5,3 itens encontrados por grama de peso seco, enquanto que no presente estudo, a média é de 8,2 itens/g de peso seco.

Numa pesquisa realizada na costa chinesa, (Qu *et al.*, 2018) concluíram que existe uma relação entre a quantidade de fibras encontradas no organismo dos mexilhões e as existentes no seu ambiente. Desta forma, assumindo que houve uma média de 8 partículas/g de mexilhão, podemos considerar que o meio envolvente tem presença de microplásticos na mesma proporção, ou maior.

4.4. Análises físico-químicas às amostras de água

Os resultados obtidos para os parâmetros físico-químicos das amostras de água foram comparados entre datas e locais de amostragem.

4.4.1 Temperatura

Os 3 locais apresentaram temperatura semelhante e as variações foram, também idênticas e características da época da recolha, sendo superiores no mês de julho e inferiores no mês de dezembro (Figura 4.15).

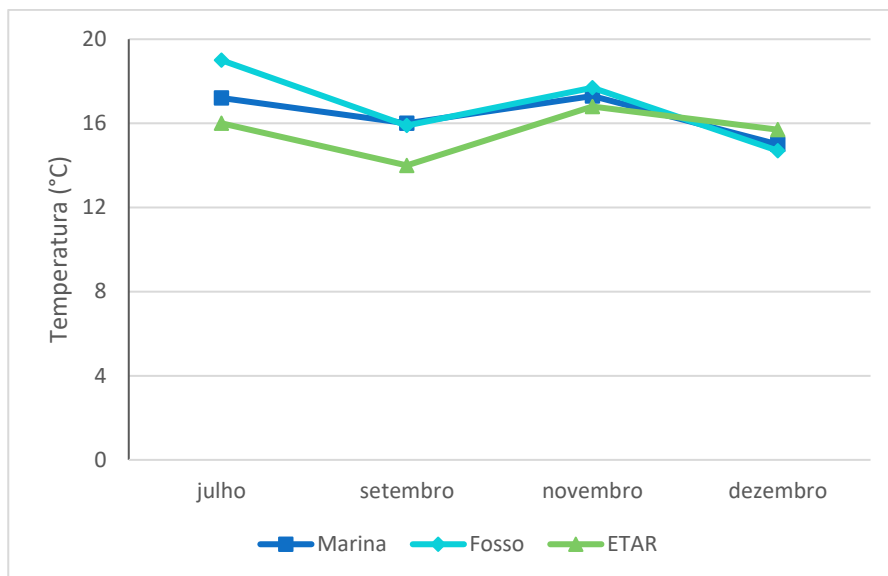


Figura 4.15-Variação da temperatura (°C) da água , da ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro.

Nos dados obtidos, a temperatura da água variou entre 14°C e 19°C, valores dentro do intervalo considerado por (Boaventura *et al.*, 2002), que define que a temperatura das águas costeiras pode variar entre 13°C e 22°C.

4.4.2. Salinidade

O mesmo princípio se aplica ao parâmetro da salinidade da água do mar. Os valores medidos foram semelhantes entre locais e datas de amostragem. No entanto, pode-se observar uma diminuição no valor da salinidade da água do Fosso, nos meses de novembro e dezembro (Figura 4.16). Ainda assim, os valores de salinidade não divergem dos estudos de Cabral-Oliveira *et al* (2014) e Figueira & Barata (2007).

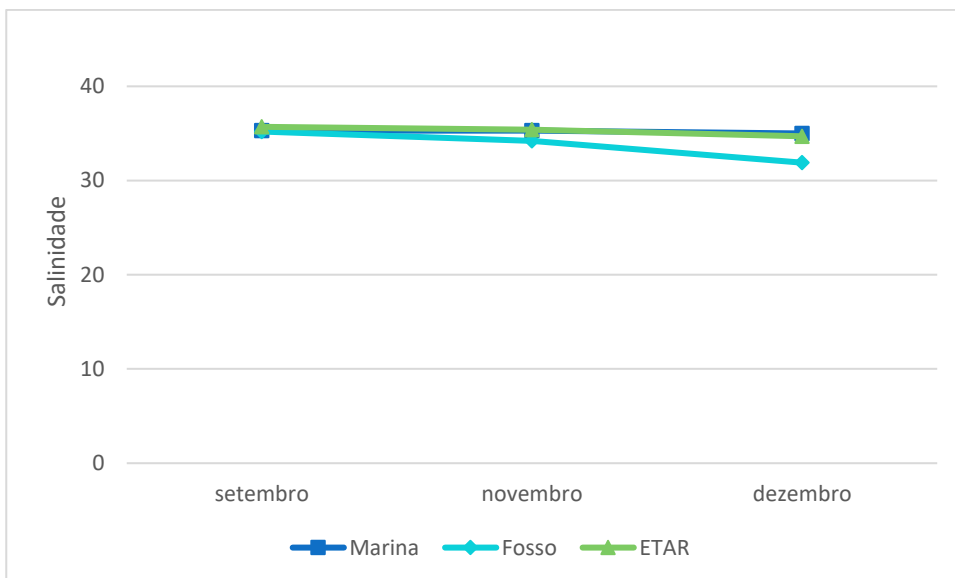


Figura 4.16- Variação da salinidade da água da ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro.

4.4.3. Teor de O₂ dissolvido

O teor de O₂ dissolvido nas amostras teve variações idênticas entre locais e os valores da ETAR foram sempre superiores (Figura 4.17). Nos meses de inverno os valores são coerentes com (Cabral-Oliveira *et al.*, 2014), que também observou a relação entre a diminuição da temperatura e o aumento da quantidade de O₂ dissolvido.

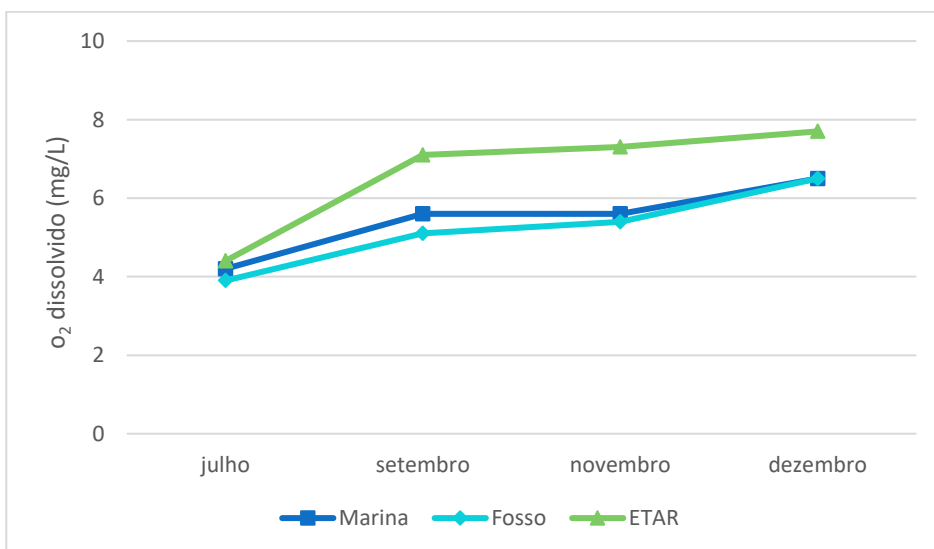


Figura 4.17- Variação da quantidade de O₂ dissolvido, expresso em mg/L, da água da ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro.

4.4.4 pH da água do mar nos locais de recolha

Os valores de pH medidos situaram-se entre 7,9 e 8,15, com diferenças mínimas entre locais (Figura 4.18). Estes dados são semelhantes aos valores de pH da água do mar reportados em Portugal (Figueira & Barata, 2007).

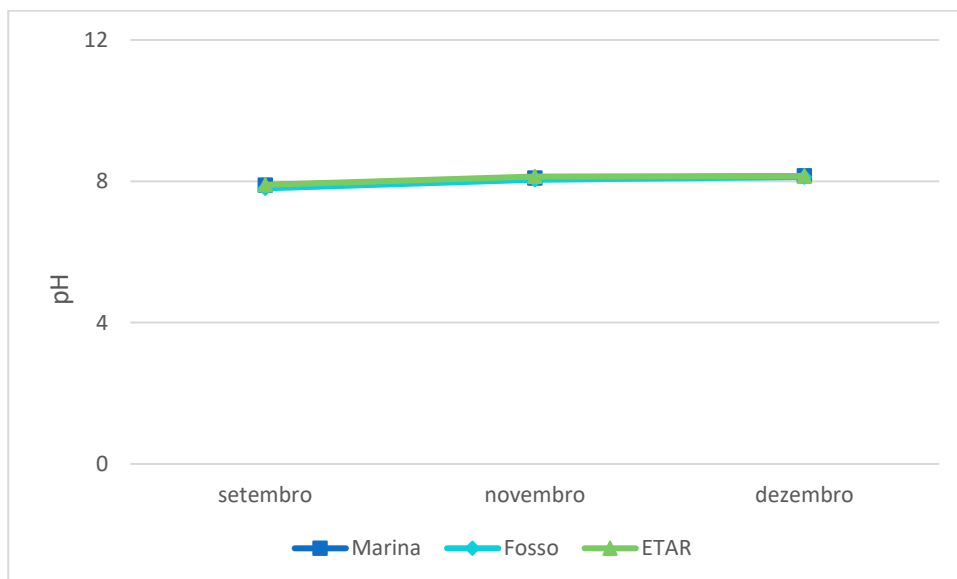


Figura 4.18- Variação do pH da água da ETAR; Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro

4.4.5 Quantificação de clorofila a

A água proveniente da Marina apresentou a maior variabilidade no teor de clorofila a ao longo do período de amostragem, registando o valor mais elevado no mês de novembro. A concentração deste pigmento nas amostras de água recolhida no Fosso e na ETAR sofreu ligeiras alterações ao longo dos meses, com valores concordantes entre os locais (Figura 4.19).

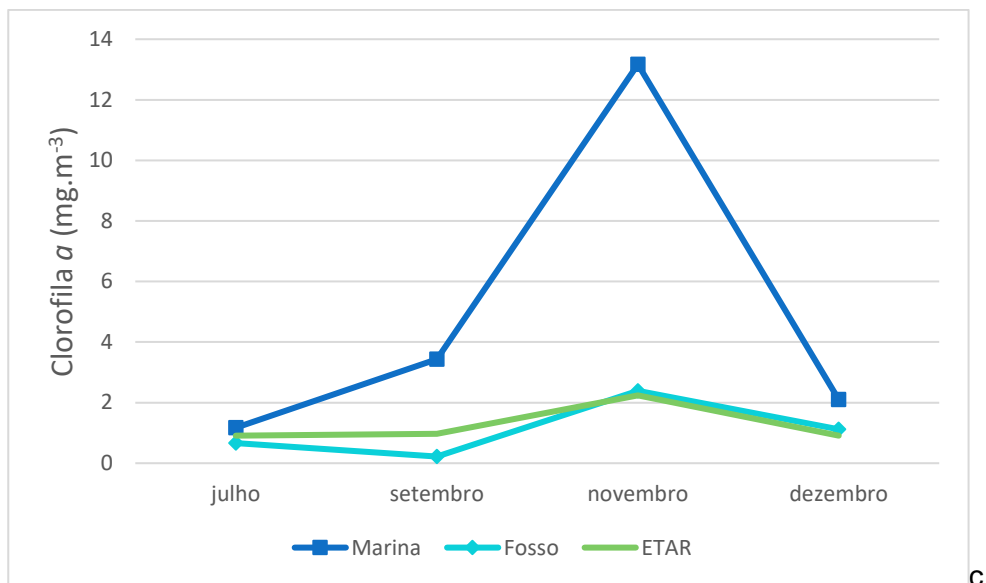


Figura 4.19- Variação da concentração de Clorofila *a*, em mg.m⁻³ da água da ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro.

A concentração de clorofila *a* teve valores dentro do esperado para as águas costeiras (Falcão *et al.*, 2003). No entanto, o valor medido em novembro na Marina pode ter como justificção uma elevada movimentação dos fundos, fazendo ressuspender a clorofila *a* na coluna de água, sendo assim um valor momentâneo; ou derivado de um maior número de partículas em suspensão na coluna de água, que dificultasse o processo de filtração.

4.4.6. Quantificação de nitratos

A concentração de nitratos nas águas variou bastante, ainda que de forma concordante entre locais. No entanto, nas amostras da ETAR, os valores obtidos foram mais elevados no mês de novembro, em relação aos outros 2 locais. No mês de dezembro houve um aumento de concentração nas três amostras (Figura 4.20).

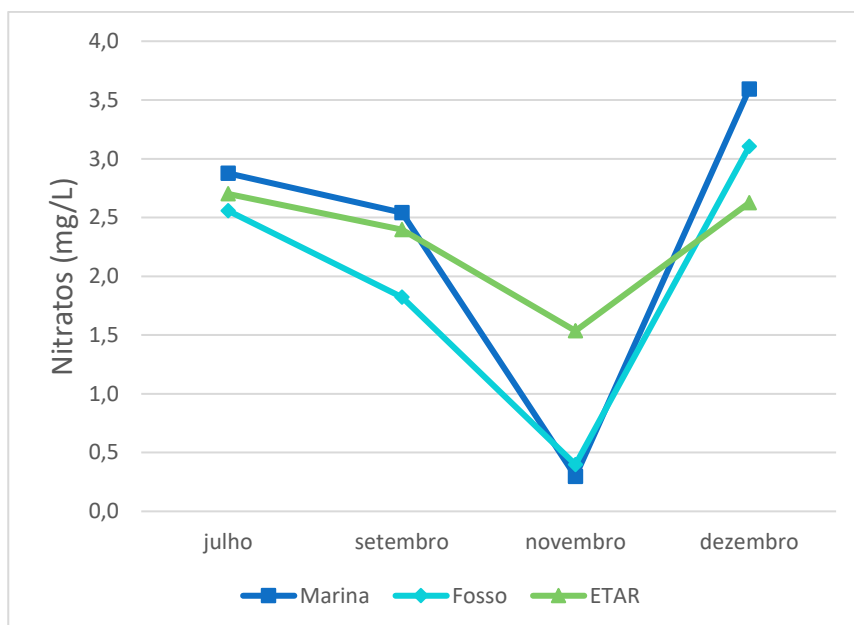


Figura 4.20- Variação da concentração de nitratos, expressa em mg/L, da água da ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro.

Os dados apresentados indicam que a Marina foi o local que teve a concentração mais baixa de nitratos (0,3 mg/L) e a mais elevada (3,6 mg/L), nos meses de novembro e dezembro respetivamente. Apesar de os valores variarem de forma semelhante entre datas, a concentração de nitratos nas amostras é superior aos valores apresentados nas zonas mais impactadas de (Cabral-Oliveira *et al.*, 2014).

4.4.7. Quantificação de nitritos

Os resultados da análise de nitritos mostram um aumento da concentração na água da Marina e da ETAR no mês de dezembro, no entanto, as amostras recolhidas na ETAR apresentam a maior concentração de nitritos (Figura 4.21).

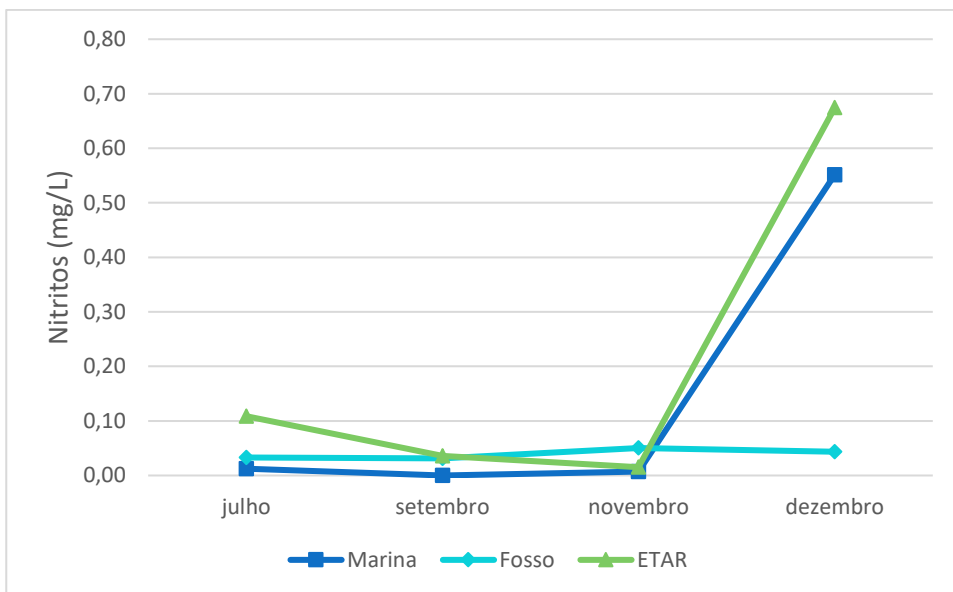


Figura 4.21- Concentração de nitritos, expressa em mg/L. da água da ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de julho, setembro, novembro e dezembro

As amostras do Fosso têm resultados semelhantes e constantes em todos os meses, sendo este o local com menor concentração de nitritos com valores que vão de encontro aos do estudo de (Cabral-Oliveira *et al.*, 2014), que reportou concentrações de nitrito num intervalo entre 0,02 e 0,1 mg/L.

4.4.8. Quantificação de amónia

Nos meses de julho e setembro, não foram detetadas quantidades mensuráveis de amónia em nenhum dos pontos de recolha (Figura 4.22). No entanto, em novembro registou-se um pico de concentração de amónia no Fosso (11,85 mg/L) e na ETAR (2,64 mg/L) enquanto que na Marina o valor máximo de amónio foi registado em dezembro (9,31 mg/L).

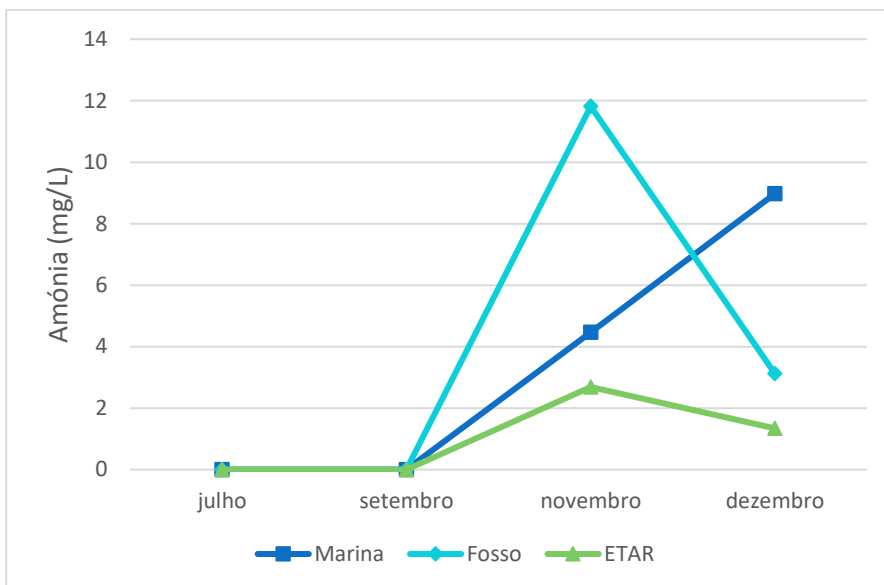


Figura 4.22- Concentração de amónia, expressa em mg/L, da água da ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de estudo.

Os teores de amónia detetados nos meses de novembro e dezembro são em muito superiores aos registados por (Cabral-Oliveira *et al.*, 2014), que tem como valor máximo $1,1 \pm 1,0$ mg/L. Nas amostras recolhidas, a ETAR apresenta as concentrações mais baixas de amónia, sendo o Fosso o local com maiores concentrações deste composto químico.

4.4.9. Quantificação de fosfatos

A concentração de fosfatos teve diversas variações, entre locais e datas, ao longo do estudo. Como se pode observar no gráfico da Figura 4.23, em setembro registaram-se os valores mais baixos de fosfatos em todos os locais. A concentração máxima foi registada na marina no mês de julho (0,45 mg/L). No Fosso, o valor máximo foi detetado em novembro, diminuindo no último mês, ficando em valores semelhantes aos outros locais.

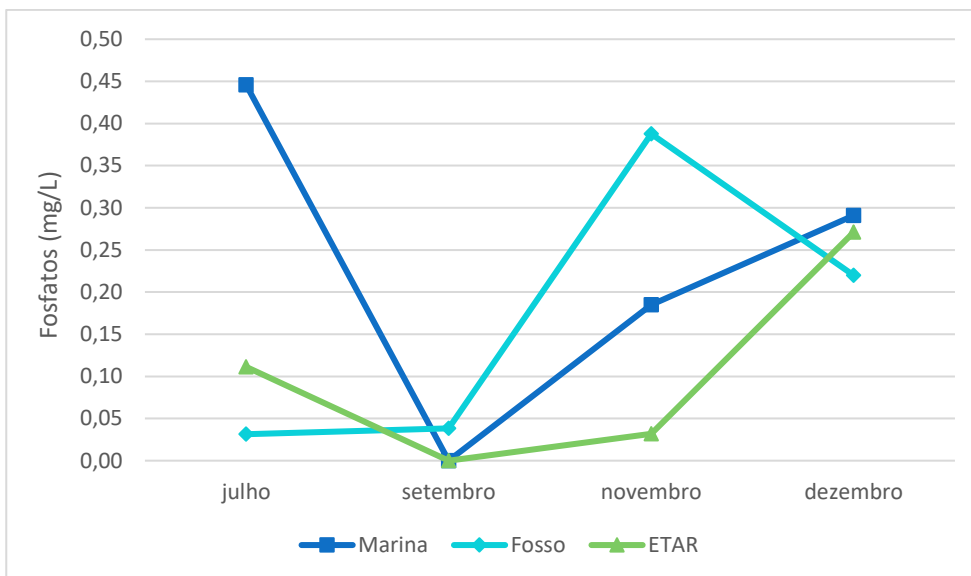


Figura 4.23- Concentração de fosfatos, expressa em mg/L, da água da ETAR, Fosso e Marina de Peniche nos meses de estudo.

As concentrações de fosfato mais baixas foram detetadas nas amostras da ETAR, tendo sido na Marina recolhidas as amostras com maiores concentrações.

A concentração de fosfato nas águas costeiras deve-se, maioritariamente, aos produtos usados para agricultura que, nos períodos de chuva, tendem a escorrer da terra para a costa, fazendo assim alterar os valores na coluna de água. (Newton *et al.*, 2003) Nos dados recolhidos, nas épocas de chuva houve um aumento da concentração de fosfato, que está de acordo com os resultados descritos por (Falcão *et al.*, 2003). No entanto, os locais estudados apresentaram valores inferiores aos de zonas poluídas (Cabral-Oliveira *et al.*, 2014).

5.Considerações Finais

O presente estudo permitiu concluir que os animais filtradores sofrem alterações microbiológicas e bioquímicas na presença de elementos tóxicos na coluna de água. Desta forma, a espécie *Mytilus edulis*, tal como reportado, é uma espécie adequada como bioindicador ambiental (Bennet-Clark, 1976)

As amostras de mexilhão recolhidas nas zonas estudadas apresentaram contaminação por bactérias fecais e de origem antropogénica, e estavam também possivelmente contaminadas por microplásticos. A zona da ETAR de Peniche foi a mais pobre em nutrientes na coluna de água e os seus mexilhões tinham, em todas as análises microbiológicas, uma maior carga de poluição. Nestas amostras foi ainda possível observar que o seu tamanho e peso era muito inferior em comparação com os outros locais de amostra, o que poderá estar relacionado com a poluição ambiental, uma vez que o crescimento pode ser limitado pelos componentes químicos do meio ambiente (J. Widdows *et al.*, 1979; John Widdows & Donkin, 1988), apesar de não ser o local com maior conteúdo de matéria inorgânica. As amostras recolhidas na zona conhecida como o “Fosso” de Peniche continham a segunda maior carga bacteriológica e também não foram as amostras de maior tamanho recolhidas, apesar da estável composição bioquímica destes mexilhões, que não apresentou grandes alterações em relação à bibliografia. A água recolhida da Marina de Peniche, ao longo do estudo, apresentou os valores mais elevados de nutrientes, e a população de mexilhões estudada apresentava os indivíduos de maiores dimensões, com menor carga microbiológica e com valores nutricionais mais elevados.

As metodologias utilizadas adequaram-se à pesquisa permitindo ter uma diversidade de parâmetros para estudo da qualidade da água da costa de Peniche, podendo ser acrescentado o estudo microbiológico da água, a par com o dos mexilhões, para que seja possível comparação de valores obtidos.

Este trabalho vem salientar o perigo da dispersão de poluentes como microplásticos na cadeia trófica. É necessária uma consciencialização global dos perigos da poluição e de como afetam a saúde de quem consome animais filtradores.

Em pesquisas futuras poder-se-ia desenvolver um estudo onde fossem selecionadas áreas com diferentes predisposições a poluição antropogénica, a fim de se obter uma perspectiva mais completa da costa de Peniche. A observação com recurso a FTIR (Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier) das partículas sólidas presentes no mexilhão garantirá a sua natureza, enriquecendo o estudo do meio marinho de Peniche.

De acordo com os resultados obtidos e a pesquisa bibliográfica, as variações do conteúdo de ácidos gordos dos mexilhões parecem ter maior relação com parâmetros ambientais (poluição, temperatura e disponibilidade de alimento) e as variações de conteúdo lipídico e proteico dependem principalmente do ciclo reprodutivo. Num estudo com maior duração seria possível ter estes fatores em consideração e obter conhecimento mais aprofundado do ambiente marinho da costa de Peniche.

6. Referências Bibliográficas

- Afonso, F., Félix, P. M., Chainho, P., Heumüller, J. A., de Lima, R. F., Ribeiro, F., & Brito, A. C. (2021). Assessing Ecosystem Services in Mangroves: Insights from São Tomé Island (Central Africa). *Frontiers in Environmental Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.501673>
- Armstrong, F. A. J. (1963). Determination of Nitrate in Water by Ultraviolet Spectrophotometry. In *Analytical Chemistry* (Vol. 35, Issue 9). <https://doi.org/10.1021/ac60202a036>
- Azizi, G., Akodad, M., Baghour, M., Layachi, M., & Moumen, A. (2018). The use of *Mytilus* spp. mussels as bioindicators of heavy metal pollution in the coastal environment. A review. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 9(4).
- Bayne, B. L. (1998). The physiology of suspension feeding by bivalve molluscs: An introduction to the Plymouth “TROPHEE” workshop. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 219(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(97\)00172-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(97)00172-X)
- Bayne, B., & Worrall, C. (1980). Growth and Production of Mussels *Mytilus edulis* from Two Populations. *Marine Ecology Progress Series*, 3. <https://doi.org/10.3354/meps003317>
- Bennet-Clark, H. C. (1976). MARINE MUSSELS: THEIR ECOLOGY AND PHYSIOLOGY. International Biological Programme 10 Edited by B. L. Bayne, Cambridge University Press, 1976. Pp. xvii+506. £22.00. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences*, 61(4). <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1976.sp002367>
- Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., Bråte, I. L. N., & Schøyen, M. (2017). Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review. In *Marine Environmental Research* (Vol. 130). <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.07.024>
- Boaventura, D., Ré, P., Da Fonseca, L. C., & Hawkins, S. J. (2002). Intertidal rocky shore communities of the continental Portuguese coast: Analysis of distribution patterns. *Marine Ecology*, 23(1). <https://doi.org/10.1046/j.1439-0485.2002.02758.x>
- Bodily, H. L. (1956). Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. In *American Journal of Public Health and the Nations Health* (Vol. 46, Issue 7, pp. 916–916). <https://doi.org/10.2105/ajph.46.7.916-a>
- Boeuf, G. (2011). Marine biodiversity characteristics. *Comptes Rendus - Biologies*, 334(5–6).

<https://doi.org/10.1016/j.crv.2011.02.009>

- Browne, M. A., Crump, P., Niven, S. J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., & Thompson, R. (2011). Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide: Sources and Sinks - Environmental Science & Technology (ACS Publications). *Environ. Sci. Technol.*
- Cabral-Oliveira, J., Mendes, S., Maranhão, P., & Pardal, M. A. (2014). Effects of sewage pollution on the structure of rocky shore macroinvertebrate assemblages. *Hydrobiologia*, 726(1).
<https://doi.org/10.1007/s10750-013-1773-5>
- Cabral, J. P. S. (2010). Water microbiology. Bacterial pathogens and water. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 7, Issue 10).
<https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>
- Campos, C. J. A., Kershaw, S. R., & Lee, R. J. (2013). Environmental Influences on Faecal Indicator Organisms in Coastal Waters and Their Accumulation in Bivalve Shellfish. In *Estuaries and Coasts* (Vol. 36, Issue 4). <https://doi.org/10.1007/s12237-013-9599-y>
- Capuzzo, J., & Leavitt, D. (1988). Lipid composition of the digestive glands of *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* in response to pollutant gradients. *Marine Ecology Progress Series*, 46.
<https://doi.org/10.3354/meps046139>
- Castro, M., Fernandes, J. O., Pena, A., & Cunha, S. C. (2018). Occurrence, profile and spatial distribution of UV-filters and musk fragrances in mussels from Portuguese coastline. *Marine Environmental Research*, 138. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.04.005>
- Clausen, I., & Riisgård, H. U. (1996). Growth, filtration and respiration in the mussel *Mytilus edulis*: No evidence for physiological regulation of the filter-pump to nutritional needs. *Marine Ecology Progress Series*, 141(1–3). <https://doi.org/10.3354/meps141037>
- Costán-Longares, A., Montemayor, M., Payán, A., Méndez, J., Jofre, J., Mujeriego, R., & Lucena, F. (2008). Microbial indicators and pathogens: Removal, relationships and predictive capabilities in water reclamation facilities. *Water Research*, 42(17).
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.07.037>
- Cunha, S. C., Pena, A., & Fernandes, J. O. (2017). Mussels as bioindicators of diclofenac contamination in coastal environments. *Environmental Pollution*, 225.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.02.061>
- Dare, P. J., & Edwards, D. B. (1975). Seasonal changes in flesh weight and biochemical composition

- of mussels (*Mytilus edulis* L.) in the Conwy Estuary, North Wales. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 18(2). [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(75\)90066-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(75)90066-0)
- de Mesquita, M. M. F., Evison, L. M., & West, P. A. (1991). Removal of faecal indicator bacteria and bacteriophages from the common mussel (*Mytilus edulis*) under artificial depuration conditions. *Journal of Applied Bacteriology*, 70(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02746.x>
- de Zwaan, A., & Zandee, D. I. (1972). Body distribution and seasonal changes in the glycogen content of the common sea mussel *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Physiology*, 43(1). [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(72\)90468-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(72)90468-9)
- Digka, N., Tsangaris, C., Torre, M., Anastasopoulou, A., & Zeri, C. (2018). Microplastics in mussels and fish from the Northern Ionian Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 135. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.06.063>
- Ding, J. F., LI, J. X., SUN, C. J., HE, C. F., JIANG, F. H., GAO, F. L., & ZHENG, L. (2018). Separation and Identification of Microplastics in Digestive System of Bivalves. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 46(5). [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(18\)61086-2](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(18)61086-2)
- Europa. (2015). Regulamento (UE) 2015/2285 da Comissão. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 5, 2015–2017.
- Falcão, M., Gaspar, M. B., Caetano, M., Santos, M. N., & Vale, C. (2003). Short-term environmental impact of clam dredging in coastal waters (south of Portugal): Chemical disturbance and subsequent recovery of seabed. *Marine Environmental Research*, 56(5). [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(03\)00069-2](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(03)00069-2)
- FAO Food and Nutrition Paper, Chen, J., Chevassus-Agnes, S., Gilani, G., Livesey, G., Mathioudakis, B., Munoz De Chavez, M., Devasconcellos, M. T., & Warwick, P. (2003). Food energy - methods of analysis and conversion factors. Food and Agriculture Organization of the United Nations Technical Workshop Report. *FAO Food and Nutrition Paper*, 77, 1–87.
- Fendall, L. S., & Sewell, M. A. (2009). Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Marine Pollution Bulletin*, 58(8). <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.04.025>
- Fernández, A., Grienke, U., Soler-Vila, A., Guihéneuf, F., Stengel, D. B., & Tasdemir, D. (2015). Seasonal and geographical variations in the biochemical composition of the blue mussel

- (*Mytilus edulis* L.) from Ireland. *Food Chemistry*, 177.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.062>
- Figueira, D., & Barata, M. (2007). Marine fungi from two sandy beaches in Portugal. *Mycologia*, 99(1). <https://doi.org/10.3852/mycologia.99.1.20>
- Fokina, N., Nemova, N., & Nefedova, Z. (2007). Fatty acid composition of mussels *Mytilus edulis* under short-term anoxia. *Chemistry and Physics of Lipids*, 149.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2007.06.133>
- Folch, J., Lees, M., & Sloane, G. H. (1957). A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES* Downloaded from. *J. Biol. Chem.*, 226.
- Freites, L., Fernandez-Reiriz, M. J., & Labarta, U. (2002). Fatty acid profiles of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) mussel of subtidal and rocky shore origin. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 132(2).
[https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00057-X](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00057-X)
- Fuentes, A., Fernandez-Segovia, I., Escriche, I., & Serra, J. A. (2009). Comparison of physico-chemical parameters and composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) from different Spanish origins. *Food Chemistry*, 112(2). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.064>
- Galap, C., Netchitailo, P., Leboulenger, F., & Grillot, J. P. (1999). Variations of fatty acid contents in selected tissues of the female dog cockle (*Glycymeris glycymeris* L., Mollusca, Bivalvia) during the annual cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 122(2). [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(99\)00006-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00006-9)
- Goldberg, E. D. (1975). The mussel watch - A first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 6(7). [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(75\)90271-4](https://doi.org/10.1016/0025-326X(75)90271-4)
- Gouletquer, P., Gros, P., Boeuf, G., & Weber, J. (2014). Biodiversity in the marine environment. In *Biodiversity in the Marine Environment* (Vol. 9789401785662). https://doi.org/10.1007/978-94-017-8566-2_1
- Hardin, G. (2010). The Tragedy of the Commons Garrett Hardin. *Science*, 162(3859).
- Harris, J. H. (1995). The use of fish in ecological assessments. *Australian Journal of Ecology*, 20(1).
<https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1995.tb00523.x>
- Hilty, J., & Merenlender, A. (2000). Faunal indicator taxa selection for monitoring ecosystem health.

Biological Conservation, 92(2). [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(99\)00052-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(99)00052-X)

Inácio, P. (2008). Implicações do pacote de higiene no sector da pesca. *Segurança e Qualidade Alimentar*, 4.

Kacar, A. (2011). Some microbial characteristics of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in coastal city area. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(8). <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0487-3>

Kanda, J. (1995). Determination of ammonium in seawater based on the indophenol reaction with o-phenylphenol (OPP). *Water Research*, 29(12). [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00149-F](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00149-F)

Kitching, J. A., Sloane, J. F., & Ebling, F. J. (1959). The Ecology of Lough Ine: VIII. Mussels and Their Predators. *The Journal of Animal Ecology*, 28(2). <https://doi.org/10.2307/2087>

Koehler, A., Marx, U., Broeg, K., Bahns, S., & Bressling, J. (2008). Effects of nanoparticles in *Mytilus edulis* gills and hepatopancreas - A new threat to marine life? *Marine Environmental Research*, 66(1). <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.02.009>

Laitano, M. V., & Fernández-Gimenez, A. V. (2016). Are Mussels Always the Best Bioindicators? Comparative Study on Biochemical Responses of Three Marine Invertebrate Species to Chronic Port Pollution. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 97(1). <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1839-y>

Lévesque, B., Barthe, C., Dixon, B. R., Parrington, L. J., Martin, D., Doidge, B., Proulx, J. F., & Murphy, D. (2010). Microbiological quality of blue mussels (*Mytilus edulis*) in Nunavik, Quebec: A pilot study. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(11). <https://doi.org/10.1139/W10-078>

Li, J., Lusher, A. L., Rotchell, J. M., Deudero, S., Turra, A., Bråte, I. L. N., Sun, C., Shahadat Hossain, M., Li, Q., Kolandhasamy, P., & Shi, H. (2019). Using mussel as a global bioindicator of coastal microplastic pollution. In *Environmental Pollution* (Vol. 244). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.032>

Madden, R. H., Buller, H., & McDowell, D. W. (1986). *Clostridium perfringens* as an indicator of hygienic quality of depurated shellfish. *Journal of Food Protection*, 49(1). <https://doi.org/10.4315/0362-028X-49.1.33>

Markert, B. A., & Breure, A. M. (2003). book Bioindicators and Biomonitors. In *Elsevier Science Ltd* (Vol. 6).

- Marques, F., Vale, C., Rudnitskaya, A., Moreirinha, C., Costa, S. T., & Botelho, M. J. (2021). Major characteristics of microplastics in mussels from the Portuguese coast. *Environmental Research*, 197. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110993>
- Merdzhanova, A., Dobрева, D. A., & Georgieva, S. (2016). Nutritional evaluation of aquaculture mussels (*M. galloprovincialis*) from the Black Sea, Bulgaria. *Ovidius University Annals of Chemistry*, 27(1). <https://doi.org/10.1515/auoc-2016-0007>
- Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27(C). [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- Neves, M., Antunes, M., Fernandes, W., Campos, M. J., Azevedo, Z. M., Freitas, V., Rocha, J. M., & Tecelão, C. (2021). Physicochemical and nutritional profile of leaves, flowers, and fruits of the edible halophyte chorão-da-praia (*Carpobrotus edulis*) on Portuguese west shores. *Food Bioscience*, 43. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101288>
- Newton, A., Icely, J. D., Falcao, M., Nobre, A., Nunes, J. P., Ferreira, J. G., & Vale, C. (2003). Evaluation of eutrophication in the Ria Formosa coastal lagoon, Portugal. *Continental Shelf Research*, 23(17–19). <https://doi.org/10.1016/j.csr.2003.06.008>
- NP-3006. (1985). *Norma Portuguesa-3006, Preparação da amostra para análise microbiológica, 1985.*
- NP 2262, 1986. (n.d.). *NP 2262, 1986. Microbiologia alimentar. Regras gerais para a pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores.*
- NP 2308, 1986. (1986). *Microbiologia alimentar, Regras gerais para a pesquisa de Escherichia coli.*
- NP 3278, 1986. (n.d.). *NP 3278, 1986. Pescado e derivados. Contagem de microrganismos a 30°C. Lisboa, Direção geral da Qualidade, 6p.*
- Oficial, J., & Europeias, C. (1998). Convenção das Nações Unidas sobre o direito do mar e acordo relativo à aplicação da parte XI da Convenção. *Jornal Oficial Da União Europeia, L 179, 3–134.*
- Okumuş, İ., & Stirling, H. P. (1998). Seasonal variations in the meat weight, condition index and biochemical composition of mussels (*Mytilus edulis* L.) in suspended culture in two Scottish sea lochs. *Aquaculture*, 159(3–4). [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00206-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00206-8)
- Olalemi, A., Baker-Austin, C., Ebdon, J., & Taylor, H. (2016). Bioaccumulation and persistence of faecal bacterial and viral indicators in *Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas*. *International*

Journal of Hygiene and Environmental Health, 219(7).

<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.06.002>

Orban, E., Di Lena, G., Navigato, T., Casini, I., Marzetti, A., & Caproni, R. (2002). Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. *Food Chemistry*, 77(1). [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00322-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00322-3)

Otles, S., & Sengor, G. (2005). Effect of Various Technological Processes on the Fatty Acid Composition of Mussel (*Mytilus galloprovincialis*, L.). *International Journal of Food Engineering*, 1(3). <https://doi.org/10.2202/1556-3758.1011>

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. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.579127>

Perry, G. J., Volkman, J. K., Johns, R. B., & Bavor, H. J. (1979). Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 43(11). [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(79\)90020-6](https://doi.org/10.1016/0016-7037(79)90020-6)

Pleissner, D., Eriksen, N. T., Lundgreen, K., & Riisgård, H. U. (2012). Biomass Composition of Blue Mussels, *Mytilus edulis*, is Affected by Living Site and Species of Ingested Microalgae. *ISRN Zoology*, 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/902152>

Qu, X., Su, L., Li, H., Liang, M., & Shi, H. (2018). Assessing the relationship between the abundance and properties of microplastics in water and in mussels. *Science of the Total Environment*, 621. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.284>

Ross, A. H., & Nisbet, R. M. (1990). Dynamic Models of Growth and Reproduction of the Mussel *Mytilus edulis* L. *Functional Ecology*, 4(6). <https://doi.org/10.2307/2389444>

Santos, C., Santos-Ferreira, A., & Dias, E. (2015). A coastal cliff stability study in Peniche (Portugal). In *Engineering Geology for Society and Territory - Volume 2: Landslide Processes*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09057-3_336

Scheer, R. (1990). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1. Aufl. (engl.) Vol. 1: J. G. Holt und N. R. Krieg (Hrsg.), Seite 1–964; Vol. 2: J. G. Holt, P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe (Hrsg.), Seite 965–1599; Williams & Wilkins, Baltimore 1984 (Vol. 1: US \$87.95) und 1986 (Vol. 2: US \$71.95). *Pharmazie in Unserer Zeit*, 19(4). <https://doi.org/10.1002/pauz.19900190410>

- Seed, R. (1969). The ecology of *Mytilus edulis* L. (Lamellibranchiata) on exposed rocky shores - I. Breeding and settlement. *Oecologia*, 3(3–4). <https://doi.org/10.1007/BF00390380>
- Sheppard, C. (2001). Marine Pollution by RB Clark, Fifth Edition, Oxford University Press, ISBN 019 8792921. *Marine Pollution Bulletin*, 42(9). [https://doi.org/10.1016/s0025-326x\(01\)00138-2](https://doi.org/10.1016/s0025-326x(01)00138-2)
- Signa, G., Di Leonardo, R., Vaccaro, A., Tramati, C. D., Mazzola, A., & Vizzini, S. (2015). Lipid and fatty acid biomarkers as proxies for environmental contamination in caged mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Ecological Indicators*, 57. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.05.002>
- Silva, C. O., Simões, T., Novais, S. C., Pimparel, I., Granada, L., Soares, A. M. V. M., Barata, C., & Lemos, M. F. L. (2017). Fatty acid profile of the sea snail *Gibbula umbilicalis* as a biomarker for coastal metal pollution. *Science of the Total Environment*, 586. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.015>
- Skibinski, D. O. F., Beardmore, J. A., & Cross, T. F. (1983). Aspects of the population genetics of *Mytilus* (Mytilidae; Mollusca) in the British Isles. *Biological Journal of the Linnean Society*, 19(2). <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1983.tb00782.x>
- Slabyj, Eoh Dan M. Carpenter, P. N. (1977). PROCESSING EFFECT ON PROXIMATE COMPOSITION AND MINERAL CONTENT OF MEATS OF BLUE MUSSELS (*Mytilus edulis*). *Journal of Food Science*, 42(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb14448.x>
- Stabili, L., Acquaviva, M. I., & Cavallo, R. A. (2005). *Mytilus galloprovincialis* filter feeding on the bacterial community in a Mediterranean coastal area (Northern Ionian Sea, Italy). *Water Research*, 39(2–3). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.10.010>
- Stockley, L. (2017). Enumeration of *Escherichia coli* in bivalve molluscan shellfish by the most probable number (MPN) technique (based on ISO 16649-3), *Cefas*. 14, 1–19.
- Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1972). A practical handbook for seawater analysis. Second Edition. In *Fisheries Research Board of Canada. Ottawa, Canada*.
- Suchanek, T. H. (1981). The role of disturbance in the evolution of life history strategies in the intertidal mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*. *Oecologia*, 50(2). <https://doi.org/10.1007/BF00348028>
- Sumampouw, O. J., & Risjani, Y. (2014). Bacteria as Indicators of Environmental Pollution: Review. *International Journal of Ecosystem*, 4(6). <https://doi.org/10.5923/j.ije.20140406.03>
- ter Braak, C. J. F., & Šmilauer, P. (2002). CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows

- User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (Version 4.5). *Section on Permutation Methods. Microcomputer Power, Ithaca, New York.* <https://doi.org/citeulike-article-id:7231853>
- The International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF): update. (1996). *Food Control*, 7(2). [https://doi.org/10.1016/s0956-7135\(96\)90007-9](https://doi.org/10.1016/s0956-7135(96)90007-9)
- Thompson, R. J. (1979). Fecundity and Reproductive Effort in the Blue Mussel (*Mytilus edulis*), the Sea Urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*), and the Snow Crab (*Chionoecetes opilio*) from Populations in Nova Scotia and Newfoundland . *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 36(8). <https://doi.org/10.1139/f79-133>
- Thompson, R. J., & Bayne, B. L. (1974). Some relationships between growth, metabolism and food in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 27(4). <https://doi.org/10.1007/BF00394367>
- Vaughn, C. C. (2018). Ecosystem services provided by freshwater mussels. In *Hydrobiologia* (Vol. 810, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3139-x>
- Viarengo, A., & Canesi, L. (1991). Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture*, 94(2–3). [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90120-V](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90120-V)
- Wai, H. W., & Levinton, J. S. (2004). Culture of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) fed both phytoplankton and zooplankton: A microcosm experiment. *Aquaculture Research*, 35(10). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01107.x>
- Waldichuk, M. (1977). Intergovernmental Oceanographic Commission Global Marine Pollution : An Overview. In *Health (San Francisco)*.
- Walker, T. R., Macaskill, D., & Weaver, P. (2013). Blue mussels (*Mytilus edulis*) as bioindicators of stable water quality in Sydney Harbour during remediation of the Sydney Tar Ponds, Nova Scotia, Canada. *Water Quality Research Journal of Canada*, 48(4). <https://doi.org/10.2166/wqrjc.2013.014>
- Widdows, J. (1978). Physiological indices of stress in *mytilus edulis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 58(1). <https://doi.org/10.1017/S0025315400024450>
- Widdows, J., Fieth, P., & Worrall, C. M. (1979). Relationships between seston, available food and feeding activity in the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 50(3). <https://doi.org/10.1007/BF00394201>
- Widdows, J., & Johnson, D. (1988). Physiological energetics of *Mytilus edulis*: Scope for Growth.

Marine Ecology Progress Series, 46. <https://doi.org/10.3354/meps046113>

Widdows, John, & Donkin, P. (1988). Interpretation of relationship between growth and concentration of aromatic hydrocarbons in the tissue of *Mytilus edulis*: Mechanisms of toxicity and ecological consequences. *Marine Environmental Research*, 24(1–4).
[https://doi.org/10.1016/0141-1136\(88\)90313-3](https://doi.org/10.1016/0141-1136(88)90313-3)

Winterbourn, J. B., Clements, K., Lowther, J. A., Malham, S. K., McDonald, J. E., & Jones, D. L. (2016). Use of *Mytilus edulis* biosentinels to investigate spatial patterns of norovirus and faecal indicator organism contamination around coastal sewage discharges. *Water Research*, 105.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.09.002>

Zandee, D. I., Kluytmans, J. H., Zurburg, W., & Pieters, H. (1980). Seasonal variations in biochemical composition of *mytilus edulis* with reference to energy metabolism and gametogenesis. In *Netherlands Journal of Sea Research* (Vol. 14, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(80\)90011-3](https://doi.org/10.1016/0077-7579(80)90011-3)

Zar. J. H. (2010). Biostatistical analysis 5th. In *5th edn Practice Hall*. New Jersey.

<https://www.ipma.pt/pt/bivalves/index.jsp>, consultado em fevereiro de 2022.

Anexos

Anexo I- Características das amostras recolhidas na Marina em julho

julho				
pull 1	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	60,88	17,63	12,07	5,56
2	60,71	18,32	12,96	5,36
3	49,10	15,08	10,02	5,06
4	48,31	12,62	7,51	5,11
5	46,87	8,69	5,85	2,84
6	44,92	7,74	5,41	2,33
7	39,69	6,23	4,15	2,08
pull 2	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	54,62	18,02	10,88	7,14
2	52,95	19,27	11,96	7,31
3	47,99	10,71	6,83	3,88
4	51,88	11,82	8,16	3,66
5	47,11	8,04	5,30	2,74
6	41,75	6,06	4,26	1,80
7	44,27	6,94	4,41	2,53
pull 3	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	58,26	18,39	12,03	6,36
2	57,31	14,61	9,17	5,44
3	55,12	13,15	9,08	4,07
4	46,34	10,92	7,59	3,33
5	46,79	10,27	6,81	3,46
6	47,72	7,95	5,28	2,67
7	48,32	7,83	5,18	2,65

Anexo II- Características das amostras recolhidas na Marina em setembro

setembro					
pull 1	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)	
1	72,39	40,30	18,70	21,60	
2	78,91	43,19	19,70	23,49	
3	69,67	38,69	19,62	19,07	
4	70,84	39,99	18,57	21,42	
5	80,75	42,81	22,27	20,54	
6	68,40	27,10	11,93	15,17	
pull 2	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)	
1	73,37	35,16	17,80	17,36	
2	71,31	33,35	16,43	16,92	
3	74,16	27,75	13,25	14,50	
4	65,70	20,79	9,27	11,52	
pull 3	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)	
1	70,03	30,30	16,64	13,66	
2	69,11	28,88	13,95	14,93	
3	67,42	19,96	11,51	8,45	
4	62,60	23,34	10,76	12,58	

setembro					
pull 1	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)	
1	72,39	40,30	18,70	21,60	
2	78,91	43,19	19,70	23,49	
3	69,67	38,69	19,62	19,07	
4	70,84	39,99	18,57	21,42	
5	80,75	42,81	22,27	20,54	
6	68,40	27,10	11,93	15,17	
pull 2	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)	
1	73,37	35,16	17,80	17,36	
2	71,31	33,35	16,43	16,92	
3	74,16	27,75	13,25	14,50	
4	65,70	20,79	9,27	11,52	
pull 3	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)	
1	70,03	30,30	16,64	13,66	
2	69,11	28,88	13,95	14,93	
3	67,42	19,96	11,51	8,45	
4	62,60	23,34	10,76	12,58	

Anexo III- Características das amostras recolhidas na Marina em novembro

novembro

pull 1	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	58,00	24,22	12,40	11,82
2	58,20	25,82	12,80	13,02
3	58,20	22,63	13,55	9,08
4	50,40	17,42	9,02	8,39
5	55,80	18,40	9,07	9,32
6	49,20	15,25	7,00	8,25
7	56,80	18,02	8,54	9,48
8	50,30	10,65	5,59	5,06
9	47,00	14,11	7,49	6,63
10	53,50	19,07	10,38	8,69
pull 2	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	50,40	15,76	8,27	7,49
2	52,50	24,66	8,81	15,85
3	48,00	12,87	6,31	6,56
4	44,60	10,90	6,75	4,15
5	48,10	15,56	9,13	6,43
6	41,40	9,21	4,75	4,46
7	40,30	7,66	4,50	3,17
8	44,70	12,04	6,49	5,55
9	38,00	7,05	3,83	3,22
10	51,40	18,60	10,08	8,51
11	30,90	4,80	3,03	1,78
12	40,80	6,28	4,06	2,22
13	46,80	13,00	6,60	6,40
14	54,60	18,27	9,08	9,19
15	45,80	10,89	6,85	4,04
16	44,70	9,58	5,19	4,40
pull 3	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	52,50	17,66	9,02	8,65
2	50,40	18,61	10,32	8,29
3	47,90	10,93	6,28	4,65
4	43,60	9,05	5,49	3,56
5	44,80	11,48	6,71	4,77
6	42,50	9,44	9,06	0,39
7	49,20	16,43	4,70	11,73
8	48,20	9,78	5,32	4,46
9	38,20	6,62	3,71	2,92
10	36,90	5,16	3,22	1,95
11	45,90	12,62	6,62	6,01
12	40,30	7,27	4,34	2,93
13	37,90	5,67	2,67	3,00
14	38,10	7,05	3,69	3,36
15	50,30	16,07	8,36	7,71
16	48,10	12,15	6,57	5,58

17	39,20	6,95	3,75	3,20
18	47,00	11,47	5,72	5,75
19	35,90	5,97	3,07	2,89
20	36,90	5,72	3,01	2,71
21	38,00	7,91	4,81	3,10
22	43,60	8,74	4,42	4,32
23	43,60	9,30	4,28	5,03
24	36,90	5,89	2,84	3,05

novembro

pull 1	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	58,00	24,22	12,40	11,82
2	58,20	25,82	12,80	13,02
3	58,20	22,63	13,55	9,08
4	50,40	17,42	9,02	8,39
5	55,80	18,40	9,07	9,32
6	49,20	15,25	7,00	8,25
7	56,80	18,02	8,54	9,48
8	50,30	10,65	5,59	5,06
9	47,00	14,11	7,49	6,63
10	53,50	19,07	10,38	8,69
pull 2	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	50,40	15,76	8,27	7,49
2	52,50	24,66	8,81	15,85
3	48,00	12,87	6,31	6,56
4	44,60	10,90	6,75	4,15
5	48,10	15,56	9,13	6,43
6	41,40	9,21	4,75	4,46
7	40,30	7,66	4,50	3,17
8	44,70	12,04	6,49	5,55
9	38,00	7,05	3,83	3,22
10	51,40	18,60	10,08	8,51
11	30,90	4,80	3,03	1,78
12	40,80	6,28	4,06	2,22
13	46,80	13,00	6,60	6,40
14	54,60	18,27	9,08	9,19
15	45,80	10,89	6,85	4,04
16	44,70	9,58	5,19	4,40
pull 3	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	52,50	17,66	9,02	8,65
2	50,40	18,61	10,32	8,29
3	47,90	10,93	6,28	4,65
4	43,60	9,05	5,49	3,56

5	44,80	11,48	6,71	4,77
6	42,50	9,44	9,06	0,39
7	49,20	16,43	4,70	11,73
8	48,20	9,78	5,32	4,46
9	38,20	6,62	3,71	2,92
10	36,90	5,16	3,22	1,95
11	45,90	12,62	6,62	6,01
12	40,30	7,27	4,34	2,93
13	37,90	5,67	2,67	3,00
14	38,10	7,05	3,69	3,36
15	50,30	16,07	8,36	7,71
16	48,10	12,15	6,57	5,58
17	39,20	6,95	3,75	3,20
18	47,00	11,47	5,72	5,75
19	35,90	5,97	3,07	2,89
20	36,90	5,72	3,01	2,71
21	38,00	7,91	4,81	3,10
22	43,60	8,74	4,42	4,32
23	43,60	9,30	4,28	5,03
24	36,90	5,89	2,84	3,05

Anexo IV- Características das amostras recolhidas na Marina em dezembro

dezembro				
pull 1	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	56,50	26,02	12,30	13,72
2	62,40	26,31	11,98	14,33
3	56,40	19,41	8,90	10,51
4	55,80	18,89	8,87	10,02
5	50,30	15,79	8,10	7,69
6	57,80	27,34	13,57	13,77
7	51,70	17,85	8,86	8,99
8	59,60	26,87	11,97	14,90
9	52,00	19,30	9,64	9,66
pull 2	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	55,20	22,28	11,42	10,86
2	51,40	17,67	8,22	9,45
3	55,80	20,46	10,51	9,95
4	31,90	20,77	11,42	9,35
5	60,30	25,25	12,71	12,54
6	55,90	22,62	11,08	11,54
7	54,60	18,74	9,44	9,29
8	55,40	18,45	9,54	8,91
9	60,30	24,21	11,87	12,34
10	51,40	18,67	9,83	8,84
pull 3	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	58,20	27,01	11,65	15,35
2	56,30	23,33	12,20	11,13
3	53,90	19,92	10,31	9,61
4	54,80	16,24	7,78	8,46
5	51,50	19,14	10,41	8,73
6	54,50	20,62	12,09	8,53
7	50,50	12,56	6,72	5,84
8	49,50	12,97	7,58	5,39
9	40,80	15,58	8,04	7,54
10	50,30	17,11	9,15	7,96
11	50,20	16,12	8,53	7,59
12	49,30	13,18	6,69	6,50

Anexo V- Características das amostras recolhidas no Fosso em julho

julho				
pull 1	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	71,02	30,36	19,72	10,64
2	66,30	31,52	19,28	12,24
3	62,73	24,07	14,95	9,12
4	58,20	23,75	16,55	7,20
pull 2	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	69,10	30,75	18,42	12,33
2	65,70	21,17	12,68	8,49
3	66,01	34,54	15,90	18,64
4	62,60	20,10	10,60	9,50
pull 3	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	77,03	37,74	22,78	14,96
2	72,40	25,74	16,19	9,55
3	67,02	28,72	17,32	11,40
4	63,41	17,38	13,85	3,53

Anexo VI- Características das amostras recolhidas no Fosso em setembro

setembro				
pull 1	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	85,38	40,49	16,65	23,84
2	83,93	39,28	17,15	22,13
3	86,87	41,21	13,17	28,04
4	76,08	24,44	11,66	12,78
pull 2	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	85,51	33,13	15,08	18,05
2	92,31	33,83	13,26	20,57
3	87,75	31,13	12,58	18,55
4	81,96	27,87	11,45	16,42
pull 3	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	101,82	59,70	26,06	33,64
2	96,21	38,13	18,64	19,49
3	88,53	33,52	13,03	20,49
4	91,43	31,43	14,17	17,26

Anexo VII- Características das amostras recolhidas no Fosso em novembro

novembro				
pull 1	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	68,10	30,58	12,04	18,54
2	5,36	12,56	5,48	7,08
3	5,81	20,23	8,76	11,47
4	6,25	21,45	9,72	11,73
5	4,82	9,99	4,65	5,34
6	6,03	9,95	5,04	4,91
7	5,03	11,84	5,18	6,67
8	3,36	2,77	1,67	1,11
9	6,04	25,51	10,53	14,98
10	5,02	10,62	4,70	5,92
11	5,92	15,64	9,29	6,36
pull 2	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	6,92	38,44	17,07	21,37
2	5,47	15,59	6,59	9,00
3	5,47	14,83	6,38	8,45
4	5,25	14,35	6,20	8,15
5	6,80	31,49	12,92	18,58
6	4,70	9,99	6,11	3,88
7	4,47	8,68	3,89	4,78
8	4,69	9,07	5,27	3,79
9	4,70	10,12	4,39	5,73
10	5,57	16,65	6,89	9,76
11	4,92	10,93	4,67	6,26
pull 3	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	4,81	11,10	4,53	6,57
2	4,81	10,51	4,66	5,85
3	4,57	9,40	4,17	5,23
4	4,81	10,90	4,60	6,30
5	4,68	10,09	4,34	5,75
6	4,69	10,37	4,43	5,94
7	4,35	9,62	4,46	5,16
8	5,47	16,38	6,82	9,56
9	5,14	12,71	5,44	7,27
10	4,47	7,88	3,77	4,11
11	4,70	7,69	5,08	2,61
12	5,14	15,63	7,73	7,91
13	6,03	21,05	9,44	11,61
14	6,03	22,53	10,08	12,45
15	6,14	28,47	12,02	16,45
16	5,81	15,56	8,12	7,44

Anexo VIII- Características das amostras recolhidas no Fosso em dezembro

dezembro				
pull 1	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	66,90	31,73	14,69	17,04
2	69,20	37,12	16,27	20,85
3	56,90	18,30	8,05	10,26
4	62,50	27,37	11,74	15,63
5	56,90	18,04	7,51	10,52
6	52,50	16,47	7,35	9,11
7	52,50	16,00	7,60	8,40
8	6,35	27,35	11,56	15,79
pull 2	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	67,00	19,00	8,24	10,76
2	62,50	20,88	8,36	12,52
3	54,70	14,99	6,16	8,83
4	49,20	14,18	6,38	7,80
5	43,70	8,97	4,12	4,85
6	49,30	14,01	6,11	7,90
7	48,20	12,28	5,05	7,22
8	62,50	22,82	9,34	13,48
9	55,80	17,44	7,46	
10	59,20	19,68	8,24	11,44
11	66,90	25,12	10,85	14,27
pull 3	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	54,80	16,25	7,72	8,53
2	503,00	11,70	5,03	6,66
3	51,40	12,21	4,85	7,36
4	58,20	20,47	8,84	11,63
5	56,90	20,26	9,37	10,89
6	50,40	13,78	6,53	7,26
7	49,90	13,33	5,81	7,53
8	58,10	17,18	7,68	9,50
9	52,40	14,00	6,10	7,91
10	50,30	14,22	6,14	8,08
11	52,40	12,49	5,63	6,87
12	38,20	5,12	2,91	2,21
13	4,24	8,48	3,81	4,67

Anexo IX- Características das amostras recolhidas na ETAR em julho

julho				
pull 1	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	19,08	0,59	0,45	0,14
2	18,39	0,6	0,36	0,24
3	22,43	0,92	0,63	0,29
4	18,55	0,6	0,33	0,27
5	16,96	0,49	0,24	0,25
6	18,19	0,47	0,31	0,16
7	16,77	0,34	0,21	0,13
8	19,41	0,59	0,35	0,24
9	18,02	0,36	0,28	0,08
10	18,19	0,59	0,4	0,19
11	19,44	0,5	0,37	0,13
12	16,73	0,44	0,31	0,13
13	18,45	0,5	0,35	0,15
14	17,26	0,63	0,36	0,27
15	16,27	0,44	0,33	0,11
16	15,74	0,36	0,22	0,14
17	12,64	0,59	0,35	0,24
18	10,92	0,32	0,14	0,18
19	12,72	0,37	0,24	0,13
20	11,37	0,32	0,18	0,14
21	12,84	0,43	0,29	0,14
22	14,9	0,45	0,28	0,17
23	10,15	0,24	0,17	0,07
24	14,9	0,53	0,37	0,16

Anexo X- Características das amostras recolhidas na ETAR em setembro

setembro				
pull 1	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	53,6	2,52	1,08	1,44
2	51,7	1,99	0,93	1,06
3	53,2	2,17	0,93	1,24
4	50,8	1,97	0,89	1,08
5	53,6	2,29	1,13	1,16
6	47,8	1,74	0,92	0,82
7	50	1,57	0,9	0,67
8	52,8	2,19	1,14	1,05
9	50,79	1,56	0,86	0,7
10	52,9	1,54	0,99	0,55
11	52,4	2,52	1,33	1,19
12	50,6	1,78	0,95	0,83
13	50,3	1,74	0,99	0,75
14	51,2	1,82	0,89	0,93
15	53	1,89	1,05	0,84
16	48,5	1,31	0,69	0,62
17	52,3	2,14	1,01	1,13
18	50,2	1,64	0,89	0,75
19	49,1	1,42	0,66	0,76
20	50,2	1,6	0,8	0,8
21	50,9	1,83	0,89	0,94
22	49,4	1,33	0,64	0,69
23	47,7	1,44	0,79	0,65
24	49,3	2,3	1,33	0,97
25	49,6	1,66	0,72	0,94
26	48,9	1,16	0,59	0,57
27	48,9	1,47	0,8	0,67
28	49,2	1,49	0,76	0,73
29	50	1,27	0,75	0,52
30	47,6	1,42	0,76	0,66
31	46,1	1,67	0,8	0,87
32	45,1	1,48	0,67	0,81
33	42,5	1,29	0,7	0,59
pull 2	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	46,3	2,74	1,15	1,59
2	48,8	2,49	1,13	1,36
3	47,7	2,23	1,12	1,11
4	47,1	1,53	0,88	0,65
5	44	1,43	0,71	0,72
6	46,1	2,02	0,94	1,08
7	47,6	1,98	0,99	0,99
8	45,7	1,74	0,94	0,8

9	47,1	1,97	1	0,97
10	44	1,58	0,86	0,72
11	45,6	2,45	1,31	1,14
12	45,4	1,67	0,89	0,78
13	46,1	1,49	0,9	0,59
14	44,3	1,46	0,86	0,6
15	43,1	1,51	0,7	0,81
16	46,27	2,14	1,14	1
17	44,5	1,67	1,02	0,65
18	44,4	1,76	1	0,76
19	44,2	1,57	0,78	0,79
20	42,8	1,2	0,65	0,55
21	44,8	2,3	1,26	1,04
22	44,2	1,41	0,57	0,84
23	43,8	1,36	0,71	0,65
24	43,5	1,35	0,69	0,66
25	42,8	1,86	1,09	0,77
26	43,8	1,45	0,93	0,52
27	42,4	1,08	0,5	0,58
28	44,5	1,93	1,05	0,88
29	41,1	1,2	0,74	0,46
30	43,27	1,37	0,65	0,72
31	43,1	1,26	0,7	0,56
32	42,8	1,19	0,59	0,6
33	44,5	1,34	0,71	0,63

pull 3	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	55	4,42	2,1	2,32
2	52	3,08	1,35	1,73
3	49,8	2,69	1,38	1,31
4	51,3	3,37	1,68	1,69
5	45,7	1,64	1	0,64
6	52,7	3,16	1,59	1,57
7	49,1	2,9	1,58	1,32
8	47,9	2,64	1,3	1,34
9	51,2	2,22	1,14	1,08
10	49	1,64	0,87	0,77
11	50,2	1,9	0,97	0,93
12	44,4	1,79	0,92	0,87
13	43,8	1,36	0,77	0,59
14	45	1,57	0,79	0,78
15	44,1	2,08	1,11	0,97
16	45,34	1,65	0,84	0,81
17	43,5	1,29	0,69	0,6
18	44,9	1,7	0,87	0,83
19	44,2	1,63	1,01	0,62
20	43,9	1,68	0,96	0,72

21	43,7	1,93	1,07	0,86
22	43,1	1,31	0,67	0,64
23	43,3	1,4	0,76	0,64
24	44,4	1,35	0,75	0,6
25	44,2	1,43	0,74	0,69
26	44	1,55	1,4	0,15
27	44,1	1,41	0,6	0,81

Anexo XI- Características das amostras recolhidas na ETAR em novembro

novembro				
pull 1	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	20,30	24,22	12,40	11,82
2	5,82	25,82	12,80	13,02
3	5,82	22,63	13,55	9,08
4	5,04	17,42	9,02	8,39
5	5,58	18,40	9,07	9,32
6	4,92	15,25	7,00	8,25
7	5,68	18,02	8,54	9,48
8	5,03	10,65	5,59	5,06
9	4,70	14,11	7,49	6,63
10	5,35	19,07	10,38	8,69

Anexo XII- Características das amostras recolhidas na ETAR em dezembro

dezembro				
pull 1	Comprimento (mm)	Peso total (g)	Peso concha (g)	Peso mexilhão (g)
1	21,50	0,94	0,51	0,43
2	23,50	1,29	0,73	0,56
3	20,30	0,86	0,46	0,40
4	20,30	0,90	0,44	0,46
5	17,00	0,52	0,31	0,21
6	14,70	0,25	0,14	0,11
7	23,60	1,30	0,71	0,59
8	19,20	0,81	0,44	0,37
9	20,40	0,88	0,46	0,42
10	20,30	0,84	0,39	0,45
11	18,10	0,56	0,29	0,27
12	17,00	0,54	0,36	0,18
13	13,70	0,31	0,18	0,12

14	19,20	0,73	0,37	0,35
15	22,50	0,82	0,54	0,28
16	199,20	0,50	0,28	0,22
17	19,10	0,62	0,35	0,28
18	13,60	0,24	0,16	0,08
19	14,80	0,38	0,22	0,16
20	14,70	0,28	0,16	0,12