

**Avaliação da contaminação microbiológica
e da resposta ao *stress* ambiental em moluscos
bivalves da Ria Formosa**

Marina Lameirinhas Cabral

N.º 34347

Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Doutora Florbela Soares

Professor Doutor Eduardo Esteves

Faro, 2015

**Avaliação da contaminação microbiológica
e da resposta ao *stress* ambiental em moluscos
bivalves da Ria Formosa**

Marina Lameirinhas Cabral

N.º 34347

Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Doutora Florbela Soares

Professor Doutor Eduardo Esteves

Faro, 2015

Avaliação da contaminação microbiológica e da resposta ao *stress* ambiental em moluscos bivalves da Ria Formosa

Declaração de autoria do trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.



Marina Lameirinhas Cabral

Copyright Marina Lameirinhas Cabral 2015

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o 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.

Este trabalho foi publicado parcialmente nos seguintes formatos:

✓ Em painel, com o seguinte título:

Cabral*, M., Esteves, E. & Soares, F. (2014) Updating data on the seasonal changes in the microbiological quality of clams, *Ruditapes decussatus*, cultured in the Ria Formosa (South Portugal). International Meeting on Marine Resources 2014 (IMMR'14) (Peniche), Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Instituto Politécnico de Leiria, Portugal, 10-11 de julho. (Poster) *Frontiers in Marine Science* (93) Conference Abstract: IMMR | International Meeting on Marine Research 2014. [doi:10.3389/conf.FMARS.2014.02.00093](https://doi.org/10.3389/conf.FMARS.2014.02.00093)

AGRADECIMENTOS

É com particular prazer que expresso o meu agradecimento a todos aqueles que acompanharam este trabalho e contribuíram para a sua realização.

Agradeço à Doutora Florbela Soares por me ter convidado a realizar este trabalho no IPMA e por me ter acompanhado e apoiado com interesse e motivação à sua realização, pela amabilidade, ensinamento, e encorajamento que sempre demonstrou ao longo destes 2 anos.

Ao Professor Doutor Eduardo Esteves por ter aceitado orientar este trabalho e por me ter acompanhado e apoiado com motivação e interesse.

À Direção do IPMA – Instituto Português do Mar e Atmosfera, por ter possibilitado a realização da parte prática deste mestrado no Laboratório de Microbiologia, em Olhão.

Ao Doutor Pedro Pousão por ter possibilitado a realização de análises nos laboratórios da Estação de Piscicultura de Olhão.

À Doutora Cristina Figueira um agradecimento por ter disponibilizado para a utilização do laboratório de Química do Instituto Superior de Engenharia.

À Doutora Laura Ribeiro pelo incentivo, interesse e disponibilidade para ajudar.

À Doutora Domitília Matias pela disponibilização do equipamento do laboratório da (EMMT).

A todos os que trabalham na Sede e na Estação de Aquacultura de Olhão, e em especial à Luz pela ajuda nas análises microbiológicas e ao Sr. Fernando pela ajuda na recolha das amostras e apresentação de dados no Sistema de Informação Geográfica.

Agradeço à minha mãe Joaquina a ternura, a motivação e todo o apoio e incentivo que me deu ao longo destes últimos anos, pois sem isso não seria quem sou hoje...

Ao Márcio, muito obrigada pela amizade, apoio, motivação e por me ter ajudado

A uma pessoa especial um muito obrigado pelo amor, apoio, motivação e incentivo.

Um muito obrigado a todos os amigos pelo apoio e por terem estado comigo nos bons e principalmente nos maus momentos.

O meu agradecimento final é dedicado à minha irmã Lília, pelo carinho, pela paciência, apoio, motivação e por estar sempre presente quando me vi nas situações mais variadas.

A todos, um sincero MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A Ria Formosa é a região mais importante para a produção de moluscos bivalves na costa sul de Portugal. Este estudo avalia a contaminação microbiológica e características bioquímicas indicadoras de *stress* de moluscos bivalves (*Ruditapes decussatus*) provenientes de áreas de produção de duas Zonas da Ria Formosa (uma área mais povoada, Faro-Marchil (A), e uma área menos povoada, Cacela-Vila Real de Santo António (Cacela-VRSA) (B), que foram analisadas mensalmente, entre agosto de 2012 e julho de 2013. Os níveis de *Escherichia coli*, *Vibrio* spp. e bactérias marinhas totais foram analisados e relacionados com perfis de temperatura e precipitação. Os níveis mais elevados de *E. coli* foram encontrados em bivalves provenientes de Faro-Marchil, durante períodos de temperaturas mais elevadas (verão), devido, principalmente, ao aumento da população durante o verão nessa área. Embora os valores obtidos se encontrem dentro dos valores correspondentes ao estatuto sanitário desta zona (Classe B). Os níveis mais elevados de *E. coli* em Cacela-VRSA foram observados especialmente durante o inverno, provavelmente devido a fontes difusas de descargas fecais. Para ambas as áreas, os níveis mais altos de *Vibrio* spp. foram encontradas em fevereiro e março de 2013; estes meses correspondem a um nível mais elevado de bacterioplâncton na Ria Formosa. Níveis mais baixos de *Vibrio* spp. foram encontrados em outubro de 2013 em ambas as áreas de produção de bivalves. O índice de peroxidação lipídica em amostras de amêijoas-boas em Faro-Marchil e em Cacela-VRSA foram ligeiramente mais elevados nos meses de verão e de Outono. A análise destes resultados pode ser particularmente útil para o desenvolvimento de pesquisas sanitárias e avaliar os riscos à saúde humana associados ao consumo de bivalves, com a consequente melhoria da qualidade dos bivalves comercializados, resultar em agregação de valor ao produto final.

Palavras-chave: *E. coli*, Vibrios, *Ruditapes decussatus*, Monitorização microbiológica, Saúde Pública, Peroxidação lipídica

ABSTRACT

Ria Formosa Lagoon is the most important region for bivalves' production in the South Portuguese coast. This study evaluates the microbiological and biochemistry contamination of clams *Ruditapes decussatus* originating from two bivalves production areas of Ria Formosa (a more populated area, Faro–Marchil, and a less populated area, Cacela–Vila Real de Santo António (Cacela-VRSA)) that were analyzed monthly, between August 2012 and July 2013. The levels of *Escherichia coli* and *Vibrio* spp. were monitored and related with temperature profiles. The highest levels of *E. coli* were found in bivalves collected from the Faro-Marchil area during periods of higher temperatures (summer), mainly due to the population increase during the summer in that area. Notwithstanding the current classification (Class B) of this shellfish harvesting production area should not be changed. In Cacela-VRSA, higher levels of *E. coli* were observed especially during the winter, probably due to diffuse sources of faecal discharges. For both areas, the highest levels of *Vibrio* spp. were found in February and March 2013; these months correspond to a higher level of bacterioplankton in Ria Formosa. Lower levels of *Vibrio* spp. were found in October 2013 in both bivalve production areas. The lipid peroxidation index in clam-good samples in Faro-Marchil and Cacela-VRSA were slightly higher in the months of summer and autumn. The analysis of this information can be particularly useful in the development of sanitary surveys and evaluate the human health risks associated with bivalves consumption, thence improving the quality of marketed bivalves, result in adding value to the final product.

Keywords: *E. coli*, Vibrios, *Ruditapes decussatus*, Microbiological Monitoring, Public Health, Lipid Peroxidation

ABREVIATURAS

IPMA- Instituto Português do Mar e Atmosfera

MMGB – Minerals Modified Glutamate Medium

LPO – Peroxidação Lipídica

NP- Norma Portuguesa

TBX- Agar de Triptona Bilis X- Glucoronídeo

TSA- Agar Triptona de Soja

H₂O - Água

H₂SO₄ – Sulfato de hidrogénio (Ácido sulfúrico)

HCl - Ácido clorídrico

HNO₃ - Nitrato de hidrogénio (Ácido nítrico)

K₂CO₃ - Carbonato de potássio

KOH - Hidróxido de potássio

CH₃CN - Metanol

NaCl - Cloreto de sódio

OMS - Organização Mundial de Saúde (WHO – World Health Organization)

ZPB- Zona de produção de bivalves

ETAR- Estação de tratamento de águas residuais

NMP- Numero mais provável

UFC- Unidades formadoras de colónias

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Caracterização da espécie em estudo	1
1.1.1	Taxonomia.....	1
1.1.2	Morfologia externa e interna	2
1.1.3	Distribuição geográfica e habitat.....	3
1.1.4	Reprodução e desenvolvimento	3
1.2	Consumo de moluscos bivalves e o seu valor nutricional.....	5
1.2.1	Proteínas	6
1.2.2	Lípidos.....	6
1.3	Variações bioquímicas associadas ao ciclo reprodutivo dos bivalves marinhos.....	7
1.4	Capacidade de bioacumulação de poluentes químicos e biológicos dos moluscos bivalves.....	8
1.5	Principais riscos do consumo de bivalves	8
1.5.1	Contaminantes microbiológicos.....	9
1.5.2	Contaminantes biológicos	9
1.5.3	Contaminantes químicos	10
1.6	Indicadores microbianos da qualidade dos bivalves.....	11
1.6.1	Coliformes fecais e <i>E. coli</i>	12
1.6.2	Víbrios.....	13
1.6.3	Microrganismos viáveis totais.....	15
1.7	Zonas de produção e depuração de bivalves	15
1.8	Monitorização ambiental e utilização de espécies bioindicadoras	17
2.	OBJETIVOS.....	19
3.	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Zona de amostragem	20
3.2	Periodicidade e número de amostras	21
3.3	Procedimento de amostragem.....	21
3.4	Equipamento e condições do laboratório de microbiologia	21
3.5	Parâmetros a analisar e métodos utilizados	21
3.6	Procedimento técnico	22
3.6.1	Preparação de amostras de amêijoas-boas.....	22
3.6.2	Determinação do teor de <i>E.coli</i>	23
3.6.3	Determinação do teor de <i>Vibrio</i> spp.....	24
3.6.4	Determinação do teor de bactérias marinhas totais	24

3.6.5	Quantificação de peroxidação lipídica	25
3.6.6	Quantificação das proteínas (Método de Lowry).....	26
3.7	Análise estatística dos resultados	26
4	RESULTADOS	28
4.1	Parâmetros microbiológicos.....	28
4.1.1	Teor de <i>Escherichia coli</i>	28
4.1.2	<i>Vibrio</i> spp.....	29
4.1.3	Bactérias marinhas totais.....	29
4.2	Contaminação microbiológica dos bivalves.....	30
4.3	Relação entre os parâmetros microbiológicos e as condições ambientais (temperatura e precipitação).....	31
4.4	Sazonalidade do nível de contaminação microbiológicas e dos teores em proteína e determinação de peroxidação lipídica	36
5	DISCUSSÃO.....	40
5.1	Qualidade microbiológica	41
5.2	Qualidade fisiológica.....	45
6	CONCLUSÕES.....	45
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
8	ANEXOS.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Amêijoia-boa <i>Ruditapes decussatus</i> (Linnaeus,1758).....	1
Figura 2. Morfologia interna de um molusco bivalve (Silva et al., 2008).....	3
Figura 3. Ciclo de vida da <i>Ruditapes decussatus</i>	4
Figura 4. Mapa de localização dos pontos de amostragem na Ria Formosa: A – Faro-Marchil e B – Cacela-Vila Real de Santo António.....	20
Figura 5. Esquema representativo de uma análise de <i>Escherichia coli</i> em amostras de amêijoia-boa (<i>Ruditapes decussatus</i>).....	23
Figura 6. Imagem representativa do crescimento de colônias azuis em meio TBX, que indicam presença de <i>Escherichia coli</i>	24
Figura 7. Evolução temporal do teor de <i>Escherichia coli</i> em amêijoia-boa (<i>Ruditapes decussatus</i>) de Faro-Marchil e Cacela-VRSA.....	28
Figura 8. Variação de espaço temporal de valores de <i>Vibrio spp.</i> em amêijoia-boa (<i>Ruditapes decussatus</i>) de Faro-Marchil e Cacela-VRSA.....	29
Figura 9. Variação de valores de bactérias totais marinhas, em amêijoia-boa (<i>Ruditapes decussatus</i>) de Faro-Marchil e Cacela-VRSA.....	30
Figura 10. Variação dos resultados dos parâmetros microbiológicos obtidos ao longo do estudo nas amostras de amêijoia-boa (<i>Ruditapes decussatus</i>) de Faro e Cacela-VRSA.....	31
Figura 11. Comparação da temperatura média mensal com a Variação dos resultados dos de <i>Escherichia coli</i> (A), <i>Vibrio spp</i> (B). e bactérias totais marinhas (C) ao longo do estudo nas amostras de amêijoia-boa (<i>Ruditapes decussatus</i>) de Faro-Marchil e de Cacela-VRSA.....	32
Figura 12. Comparação da precipitação média mensal com a Variação dos resultados dos de <i>Escherichia coli</i> (A), <i>Vibrio spp</i> (B). e bactérias totais marinhas (C) ao longo do estudo nas amostras de amêijoia-boa (<i>Ruditapes decussatus</i>) de Faro-Marchil e de Cacela-VRSA.....	34
Figura 13. Representação dos pesos (loadings) das variáveis no mapa bidimensional (biplot) definido pelas duas componentes (Dimensões) retidas na análise dos componentes principais (ACP), dos dados de Faro- Marchil. .	35
Figura 14. Análise dos componentes principais (ACP) para verificação da relação entre as variáveis ambientais e parâmetros microbiológicos nas amostras de amêijoia-boa (<i>Ruditapes decussatus</i>) da zona de Cacela-VRSA. ..	36
Figura 15. Variação da concentração de <i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio spp.</i> e Bactérias totais marinhas na amêijoia-boa (<i>Ruditapes decussatus</i>) de Faro-Marchil e de Cacela-VRSA, ao longo das estações do ano.....	37
Figura 16- Variação da determinação de Proteína nas brânquias de amostras de amêijoia-boa (<i>Ruditapes decussatus</i>) de Faro- Marchil e de Cacela- VRSA, ao longo das estações do ano.....	38
Figura 17 Variação da quantificação de peroxidação lipídica nas brânquias de amostras de amêijoia-boa (<i>Ruditapes decussatus</i>) da Zona Faro- Marchil e de Cacela - VRSA, ao longo das estações do ano.....	39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	5
Tabela 2	16

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização da espécie em estudo

1.1.1 Taxonomia

A Ria Formosa é um dos principais centros de produção de amêijoia-boa (*Ruditapes decussatus*). Para além da ocorrência natural na Ria, é cultivada em viveiros, atingindo assim uma grande produção anual.

A espécie *R. decussatus* (Figura 1), vulgarmente designada de amêijoia-boa ou amêijoia real foi inicialmente designada de *Venus decussata*. Atualmente a classificação taxonómica da *R. decussatus*, segundo as bases de dados NCBI Taxonomy (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>) é a seguinte:

Reino: Animalia

Filo: Mollusca

Classe: Bivalvia

Ordem: Veneroida

Família: Veneridae

Género: *Venerupis*

Sub- género: *Ruditapes*

Espécie: *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758)



Figura 1. Amêijoia-boa *Ruditapes decussatus* (Linnaeus,1758).

1.1.2 Morfologia externa e interna

A amêijoia-boia apresenta, a nível da morfologia externa, uma concha equivalve e convexa, de contorno oval mais ou menos alongada, com o bordo posterior truncado e quase vertical. A superfície externa é convexa, com duas depressões no bordo: a lúnula, de contorno fusiforme e delimitada por um sulco profundo ornado de finas estrias, e uma estrutura alongada correspondente ao ligamento, sendo os sulcos das estrias de crescimento bastante acentuados. A coloração externa das valvas é bastante variável, podendo apresentar-se esbranquiçada, amarelada, alaranjada, castanha clara ou escura; praticamente uniforme ou com motivos que podem ser compostos de pontuações, riscas ou marcas diversas em cor e número variáveis. De acordo com Royo (1985), a coloração parece estar ligada à natureza do substrato, sendo negra brilhante em indivíduos que vivem em substratos lodosos, e branca naqueles que vivem em substratos arenosos. A face interna das valvas é acentuadamente côncava e interiormente apresentam um contorno nítido da linha paleal e dos músculos adutores. Nesta linha observa-se uma reentrância (seio paleal) que se deve aos músculos retratores dos sifões (Royo, 1985).

Relativamente à morfologia interna (Figura 2), é possível observar-se no corpo da amêijoia-boia as seguintes estruturas: manto, sifões, brânquias, palpos labiais, músculos adutores e massa visceral (Vilela, 1950). O manto é constituído por uma prega de tegumento com dois lobos paleais que segregam e suportam cada uma das valvas (Banha, 1984). Os dois sifões são separados em todo o seu comprimento e pigmentados na extremidade distal. As brânquias são órgãos bastante aperfeiçoados, munidos de um conjunto de cílios cuja atividade permite ao molusco imóvel satisfazer as suas necessidades fundamentais: renovação de oxigénio e alimentação (Banha, 1984). Dois pares de órgãos lamelares – palpos labiais – fixos às paredes do corpo, encaminham as partículas alimentares pela corrente branquial, até à boca. Os músculos adutores possuem uma forma sensivelmente cilíndrica, cuja contração permite o encerramento das valvas (Vilela, 1950). Na massa visceral distinguem-se duas partes: a massa visceral propriamente dita, com os aparelhos circulatório, digestivo, nervoso e reprodutor (Vilela, 1950; Barnes, 1980), e o pé, que permite a locomoção. A maioria dos espécimes de amêijoia-boia mede 25-40 mm de comprimento, por vezes até 50 mm. Há um máximo referido de 60 mm de largura (Silva *et al.*, 2008).

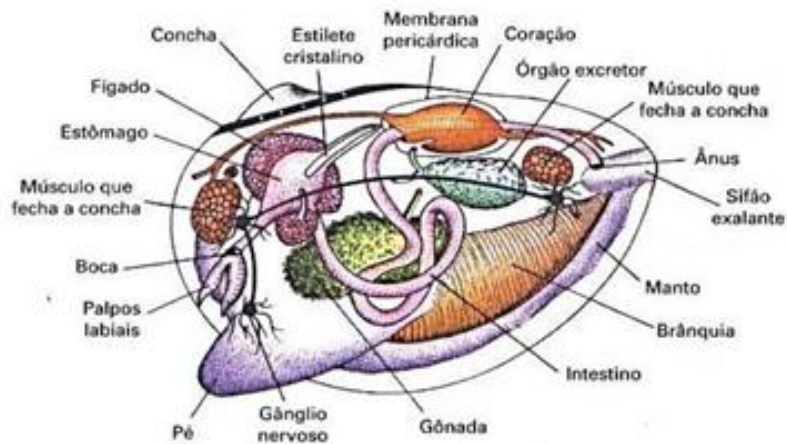


Figura 2. Morfologia interna de um molusco bivalve (Silva et al., 2008).

1.1.3 Distribuição geográfica e habitat

Em Portugal, a distribuição geográfica de *R. decussatus* inclui a Ria de Aveiro, a Lagoa de Óbidos, a margem esquerda do Tejo, Troia e imediações da Foz do Sado, o Rio Arado, a Ria de Alvor e, principalmente, a Ria Formosa.

A espécie *R. decussatus* é, segundo Vilela (1950), uma espécie que habita zonas abrigadas do litoral, como enseadas, rias, embocaduras de rios e lagoas litorais. Vive enterrada no sedimento, normalmente em zonas de areias médias e finas, mais ou menos vasosas, a uma profundidade máxima de 10 a 12 cm, conforme o seu tamanho. Fatores como a consistência do terreno, a densidade populacional, o estado fisiológico dos indivíduos, bem como o tamanho dos sifões, limita a sua distribuição vertical, enquanto a sua distribuição à superfície é influenciada pelas linhas limites das marés (Furtado, 1991; Guelorget *et al.*, 1980; Vilela, 1950).

1.1.4 Reprodução e desenvolvimento

A amêijoia-boia é uma espécie gonocórica (Camacho, 1980; Vilela, 1950), com reprodução dióica: as fêmeas produzem ovócitos e os machos espermatozoides, embora, segundo alguns autores, possa apresentar traços de hermafroditismo juvenil, que, porém desaparecem antes de atingirem o estado funcional das gónadas (Lucas, 1968; Parache, 1982). Um mesmo indivíduo pode desovar como macho numa estação e como fêmea na seguinte desova, e assim sucessivamente. A temperatura, a nutrição e o local de fixação são fatores externos que têm efeito sobre o início e duração da gametogénese. O período de postura

prolonga-se por vários meses, desde junho/julho até setembro. Após a postura, os indivíduos apresentam uma consequente debilidade, seguindo-se um período de repouso sexual até fevereiro, que se caracteriza por uma acumulação dos produtos de reservas e uma diminuição do crescimento (Banha, 1984). A libertação dos gâmetas ocorre na água, desenrolando-se a fecundação externamente, com o posterior surgimento de larvas planctónicas (Barnes, 1980). Entre 24 horas a 48 horas após a fecundação, a larva assume o estado larvar designado larva D ou velígera, caracterizada pelo aparecimento da concha bivalve, possuindo a capacidade de se alimentar e deslocar (Figura 3). No final do período larvar (com uma duração média de 2 a 4 semanas e dimensão dos indivíduos entre 300 a 400 μm), dá-se a metamorfose, o que lhes permite fixação no sedimento (Chícharo, 1996), assumindo a forma definitiva de uma amêijoia-boia, terminando o seu desenvolvimento no substrato submerso.



Figura 3. Ciclo de vida da *Ruditapes decussatus*.

O desenvolvimento bentónico da *R. decussatus* é condicionado por fatores ambientais, como sejam a salinidade, a composição do sedimento ou a concentração do oxigénio dissolvido (Parache, 1982). O crescimento desta espécie, segundo Banha (1984) é feito em dois períodos distintos, um de crescimento, de março a outubro, e outro de estagnação, de novembro a fevereiro. No entanto, o período de crescimento pode sofrer restrições ou ser dilatado, dependendo das condições ambientais. O crescimento é uniforme sendo mais

acentuado entre março e julho. O comprimento acompanha o crescimento em largura, com uma maior acentuação no início da vida bentónica, mas com uma maior taxa no aumento da largura no final da vida, que diminui regularmente à medida que os animais envelhecem, sendo o tamanho limite determinado pelo meio (essencialmente temperatura e disponibilidade de alimento) (Guelorget *et al.*, 1980; Furtado, 1991; Vilela, 1950).

1.2 Consumo de moluscos bivalves e o seu valor nutricional

Os moluscos bivalves têm um importante papel na nossa indústria, pois representam uma parte significativa da pesca nacional, tanto pela produção como pelo número de pessoas que dependem da apanha e comercialização para a sua subsistência (Nunes, 2008).

Em Portugal são comercializadas cerca de 16 espécies diferentes de bivalves procedentes das zonas de produção maioritariamente nacionais. Estes animais são preferencialmente adquiridos vivos, pelo consumidor, mas a procura do produto em congelado e enlatado tem vindo a aumentar devido à comodidade que oferecem estas opções para a sua conservação (Bandarra, 2004).

Em Portugal, os moluscos bivalves são muito apreciados, fazendo eles parte integrante da gastronomia típica portuguesa. (Nunes e Campos, 2008). O interesse por estes animais deve-se também ao seu valor nutricional. Na Tabela 1 podemos encontrar uma compilação da composição química e valor energético médios da parte edível (conjunto do miolo e líquido intervalvar) dos moluscos bivalves, que são considerados de maior interesse comercial em Portugal.

Tabela 1 – Composição nutricional da amêijoia boa (*Ruditapes decussatus*) (Bandarra *et al.*, 2004).

Dados nutricionais (100g)	
Valor energético Kcal	58,1
Parte Edível (%)	27
Gordura total (g)	0,9
Saturada (g)	0,22
Ómega 3	0,19
Ómega 6	0,07
Colesterol (mg)	44,0
Proteína (g)	11,7
Vitamina A (µg)	540
Vitamina E (mg)	0,7
Potássio (mg)	33
Fosforo (mg)	162

1.2.1 Proteínas

Como a maioria dos alimentos de origem animal, o pescado contém proteínas com um excelente valor nutritivo (Nettleton, 1985; Pigott e Tucker 1990). A proteína do pescado contém todos os aminoácidos essenciais, sendo altamente digerível (Jhaveri *et al.*, 1984).

Nos bivalves, as proteínas são consumidas para se obter os aminoácidos. A proteína é digerida ou hidrolisada em aminoácidos livres, que são absorvidos a partir do trato intestinal e distribuído pelo sangue para os órgãos e tecidos. Estes aminoácidos são utilizados por vários tecidos da amêijoia para sintetizar novas proteínas. Um consumo regular de proteínas ou aminoácidos é necessária porque os aminoácidos são utilizados continuamente pelo pescado, ou para a construção de novas proteínas durante a fase de crescimento e reprodução ou para substituir as proteínas existentes (manutenção). Uma dieta inadequada, pobre em proteínas, pode resultar na redução ou cessação do crescimento e perda de peso. Isto ocorre devido à utilização das proteínas dos tecidos menos vitais para a manutenção das funções dos tecidos mais vitais. Por outro lado, uma dieta com um elevado fornecimento de proteínas, apenas uma parte destas será utilizada para fazer novas proteínas, sendo as restantes convertidas em energia (Wilson, 2002).

As funções mais importantes das proteínas no organismo humano estão relacionadas com seu papel estrutural no revestimento externo (pele e pêlos); na constituição da matéria contráctil dos músculos e da matéria conjuntiva, cartilagíneas e óssea; com a ação catalítica, pela constituição das enzimas que permitem a efetivação e a estabilidade das reações químicas internas; a formação de anticorpos; a formação de hormonas; e o transporte de diversas substâncias no interior do organismo, em particular, os lípidos (Ferreira, 1994).

O marisco contém um excelente valor nutritivo de proteínas (Nettleton, 1985; Pigott e Tucker, 1990). As proteínas do pescado contêm todos os aminoácidos essenciais e são altamente digeríveis (Jhaveri *et al.*, 1984). As necessidades diárias de proteínas, para os adultos, variam entre 0,8 a 1 g por kg de peso (Almeida e Afonso, 2001).

1.2.2 Lípidos

Os lípidos dos animais marinhos possuem um elevado grau de insaturação ao nível dos ácidos gordos, diretamente relacionados com a fluidez da membrana a baixas temperaturas (Ackman, 1995). Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) essenciais ao organismo humano encontram-se nos lípidos marinhos. Alguns ácidos gordos de cadeia n-3, tais como o ácido

linolénico (18:3n-3), ácido eicosapentaenóico (20:5n-3) e ácido docosahexaenóico (22:6n-3), são abundantes em lípidos marinhos (Chu e Greaves, 1991; Sargent *et al.*, 1988).

Estes ácidos gordos são benéficos para o sistema cardiovascular. O ácido linolénico é fundamental para a formação de prostaciclina, que também são compostos eicosanóides. São sintetizadas pelas paredes dos vasos sanguíneos e são potentes inibidores da agregação plaquetária, dificultando a coagulação do sangue. Os tromboxanos e as prostaciclina têm, portanto, efeitos antagónicos. (Almeida e Afonso, 2001; Flecher, 1989;)

O teor de lípidos da maioria do marisco varia geralmente entre 1-2 %, embora valores tão baixos como 0,5 % não são incomuns e valores de 3 % sejam descritos na literatura. A razão básica para o baixo nível de lípidos é que os bivalves armazenam o excedente de energia como reserva de glicogénio e não como depósito de gordura, enquanto os crustáceos e cefalópodes têm glândulas digestivas, onde a gordura pode ser armazenada temporariamente (Ackman, 1995).

Na produção dos bivalves os lípidos têm um papel importante uma vez que fornecem, durante o inverno, energia para o crescimento quando as reservas de hidratos de carbono se encontram esgotadas (Beninger e Lucas, 1984).

Nos bivalves, a variação sazonal dos lípidos está diretamente relacionada com a atividade reprodutiva. Em geral, a energia é armazenada antes da gametogénese, quando o alimento é abundante, sob a forma de glicogénio, lípidos e proteínas. A importância destes compostos, dos tecidos em que são armazenados e da época da sua utilização que varia entre espécies (bem como entre populações da mesma espécie), mostraram que os ciclos de armazenamento de energia e de produção podem estar intimamente ligados no tempo (Matias, 2013).

1.3 Variações bioquímicas associadas ao ciclo reprodutivo dos bivalves marinhos

Várias pesquisas estudaram as variações que ocorrem nas reservas bioquímicas dos organismos marinhos para produção de energia durante os ciclos de reprodução (Aveiro, 2007; Orban *et al.*, 2006). A composição química dos animais marinhos é sazonal e influenciada por fatores exógenos (disponibilidade de alimentos e temperatura) e por fatores endógenos (ciclo reprodutivo pelas fases de acumulação e depleção dos tecidos de reservas) aos quais podem operar juntamente (Orban *et al.*, 2002).

Variações da natureza bioquímica associada ao ciclo reprodutivo foram assinaladas para várias espécies de bivalves, sendo frequentes as variações nos teores de glúcidos, lípidos, proteínas e minerais que se relacionam com a atividade reprodutiva em determinados tecidos. O ciclo reprodutivo dos bivalves caracteriza-se por uma intensa atividade metabólica e gasto de energia, principalmente na fase da gametogénese, sendo o glicogénio a reserva mais importante. Os lípidos representam uma importante reserva de energia e são utilizados principalmente em condições crónicas de estresse. Complementarmente, as proteínas, o componente químico mais abundante nos tecidos, pode ser objeto de transformação metabólica (Marin *et al.*, 2003).

1.4 Capacidade de bioacumulação de poluentes químicos e biológicos dos moluscos bivalves

Os ecossistemas costeiros são ambientes que apresentam uma grande fragilidade e vulnerabilidade, uma vez que tendem a sofrer mudanças consideráveis sob o efeito de ação antrópica (Pereira, 2003).

Os moluscos adaptam-se facilmente às mais diversas condições ambientais, podendo inclusive desenvolver-se em águas bastante poluídas. Por se alimentarem por filtração, estes animais podem adsorver e acumular nos tecidos diversos organismos patogénos humanos, eventualmente presentes nas águas de cultivo, tais como vírus entéricos, bactérias, protozoários e helmintos (Rigotto, 2003), e contaminantes químicos, como por exemplo mercúrio, ferro, chumbo, cobre, cádmio, cromo, manganês e hidrocarbonetos de petróleo, em concentrações diretamente proporcionais às encontradas no sedimento adjacente e ao seu desenvolvimento sexual (Aveiro, 2007; Zottis, 2005).

A qualidade do ambiente onde são cultivados ou extraídos determina os requisitos de qualidade dos moluscos bivalves e a garantia de um produto saudável e seguro para o consumidor (Orban *et al.*, 2006). Assim, frequentemente, os bivalves marinhos têm sido empregados como bioindicadores de contaminação química ou biológica em programas de monitoração ambiental nas regiões oceanográficas.

1.5 Principais riscos do consumo de bivalves

Apesar da sua composição química e das suas vantagens e benefícios, o consumo de bivalves tem também alguns riscos associados. Estes riscos advêm da quantidade de contaminantes que estão associados aos locais onde os moluscos bivalves habitam, sendo que

estes podem ser contaminantes microbiológicos, biológicos e químicos. O tipo de alimentação destes animais, por filtração, acaba por ser principal responsável pela sua vulnerabilidade à contaminação (Castilho, 2010). Tendo em conta que os moluscos bivalves são consumidos inteiros (não-eviscerados) e parcialmente cozinhados (pois se forem submetidos a um prolongado tempo de cozedura ficam com uma consistência semelhante a borracha e tornam-se desagradáveis ao paladar), o risco de contágio por agentes patogénicos aumenta pois aqueles acabam por não poder ser totalmente eliminados pela temperatura e tempo de cozedura. Daí a importância de existir um apertado controlo de qualidade garantindo a segurança alimentar e salubridade destes organismos enquanto produto alimentar (CAC, 2003).

1.5.1 Contaminantes microbiológicos

A contaminação microbiológica das águas (e por consequência dos moluscos bivalves) pode resultar da atividade urbana, agroindustrial e de lazer. A contaminação mais prejudicial para os seres humanos é contaminação fecal que pode ser de dois tipos, difusa ou pontual tendo principalmente uma origem humana e/ou animal. Dentro das fontes de contaminação pontuais devem ser salientados os efluentes de estações de tratamento de águas residuais, o lixo de origem industrial, inundações de esgotos, fossas e explorações animais. Descargas de barcos, sarjetas, prados, quintas, reservas naturais, florestas, pântanos, são considerados focos de poluição difusa (Pedro *et al.*, 2008a).

A existência de microrganismos no meio aquático, a partir de fontes de contaminação, depende de vários fatores humanos e ambientais, tais como a topologia dos terrenos, a pluviosidade e as características hidrográficas. A pluviosidade é o fator que tem mais influência na contaminação do meio aquático (Pedro *et al.*, 2008a), sendo que esta pode chegar a influenciar a classificação do estatuto (de salubridade) do local (*vd.* adiante).

1.5.2 Contaminantes biológicos

Os oceanos e mares possuem uma enorme variedade de organismos de todas formas e dimensões. Alguns desses organismos possuem dimensões tão reduzidas (microscópicas) que são transportados pelas correntes marinhas de uns locais para outros. Estes organismos constituem o plâncton, que se divide em fitoplâncton e zooplâncton. As microalgas (pertencentes ao fitoplâncton), que utilizam a luz solar e dióxido de carbono para produzir matéria orgânica (de forma semelhante ao que fazem as plantas terrestres) são, então, a base

da cadeia alimentar marinha. O fitoplâncton é, por um lado, produtor de uma grande parcela do oxigénio presente na atmosfera terrestre e, por outro, serve também de alimento para o zooplâncton, pequenos peixes, e algumas espécies de baleias e bivalves (Bettencourt, 2011).

Por vezes, o fitoplâncton multiplica-se rápida e excessivamente em função de variações nas condições ambientais (seja por causas naturais ou de origem antropogénica). Estas proliferações são genericamente benéficas, mas, por vezes, este aumento exponencial de microalgas pode ser prejudicial ao nível económico para a aquacultura, pesca e turismo, devido ao facto de algumas destas espécies serem produtoras de (bio)toxinas prejudiciais à saúde humana (Pedro *et al.*, 2008a).

1.5.3 Contaminantes químicos

Outra forma de contaminação das águas e dos organismos que nelas habitam, é por contacto com substâncias (químicas) orgânicas e inorgânicas. De entre estas substâncias químicas, evidenciam-se alguns metais considerados não-essenciais (por não se conhecer nenhuma função metabólica), como por exemplo alumínio, cádmio, chumbo, lítio e mercúrio. Quantidades não apropriadas destes elementos no organismo podem provocar alterações nos sistemas nervoso central, hematopoiético, cardiovascular ou respiratório. Algumas destas substâncias podem ter implicações para os seres vivos até ao nível cancerígeno e mutagénico (Lourenço *et al.*, 2008). Ao contrário de outras substâncias tóxicas, os metais não podem ser sintetizados ou destruídos pelo ser humano, porém este ao utilizá-los e manipulá-los interfere no seu grau de toxicidade, quer por transporte ambiental, quer pela produção de compostos que não existiam naturalmente e que apresentam toxicidade superior á do produto existente na natureza.

Quando a taxa de ingestão do poluente excede a taxa de eliminação, ocorre acumulação nos tecidos das plantas e dos animais – bioacumulação – e dá origem, por via da cadeia alimentar (Pedro *et al.*, 2008a), ao aumento da concentração com o nível trófico – bioamplificação. Tendo em consideração o grau de exposição do Homem a esses elementos e os teores de metais tóxicos nos vários produtos da pesca, estão quantificadas as doses admissíveis e definidos os teores máximos permitidos nos géneros alimentícios (Anónimo, 2006, 2008).

1.6 Indicadores microbianos da qualidade dos bivalves

Os microrganismos indicadores presentes nos alimentos não representam um perigo direto para a saúde. Servem, isso sim, para assinalar a presença de um perigo potencial para a saúde, como por exemplo, a presença de microrganismos patogénicos. Os microrganismos indicadores funcionam como “sistema de alarme” e quando são detetados numa amostra de bivalves, permitem perceber a contaminação existente na zona.

Por outro lado, os microrganismos-indicadores estabelecidos para avaliar a qualidade microbiológica das águas tem sido também usados para avaliar o potencial risco para a saúde associado ao consumo de produtos marinhos contaminados (Silva, 2009).

Os requisitos que um microrganismo indicador deve reunir, foram propostos por vários investigadores ao longo dos tempos (Dionísio, 1996), e esses requisitos são;

- A metodologia para a enumeração, isolamento e identificação deve ser simples, específica, rápida e económica;
- Deve estar presente, sempre que esteja o microrganismo patogénico ou a sua fonte, e não deve ser detetado em águas/alimentos livres de contaminação;
- Devem ser facilmente distinguidos da microbiota natural de alimentos e da água;
- A sua concentração na água ou alimento deve ser muito maior que a dos microrganismos patogénicos, devendo estar estabelecida uma relação direta entre as concentrações, assim como o grau e extensão da poluição;
- Devem ser mais resistentes às condições do meio natural e aos processos de desinfeção do que os patogénicos;
- Ter características de crescimento e morte similares ao microrganismo patogénico para o mesmo tipo de alimento;
- Os indicadores não devem ser microrganismo patogénicos e devem poder aplicar-se todo o tipo de amostras;
- As suas características devem ser constantes.

No entanto, nem sempre se encontram todas estas condições reunidas no mesmo microrganismo. Mas estas características restringem os indicadores a alguns grupos de bactérias (Dionísio, 1996).

Um microrganismo indicador que seja utilizado para a classificação de águas e de bivalves deve detetar a poluição fecal, distinguir a microbiota bacteriana de maior importância

sanitária e indicar o risco para a saúde associado à presença de microrganismos patogénicos (Martinez-Manzanares *et al.*, 1991).

No entanto, nenhum grupo de microrganismos indicadores satisfaz por si só, todas as condições desejadas e por isso nenhum pode ser considerado como indicador universal da presença de organismos patogénicos. Ainda não foi estabelecida uma relação direta e consistente entre os indicadores e os microrganismos patogénicos (Dionísio *et al.*, 2000).

O controlo sanitário dos moluscos bivalves vivos baseia-se essencialmente no teor em bactérias indicadores fecais, nomeadamente *Escherichia coli*. É geralmente aceite que os coliformes fecais ou *E. coli* indicam um risco de contaminação por patogénicos entéricos, como é o caso de *Salmonella*. No entanto, o grupo de indicadores de contaminação fecal não está relacionado com a presença de varias bactérias, tais como as pertencentes ao género *Listeria* ou *Vibrio* (Pedro *et al.*, 2008a).

Na ausência de um indicador ideal, deve-se trabalhar com o(s) melhor(es) indicador(es), ou seja, aquele(s) que apresenta(m) a melhor correlação com os riscos de saúde associados com a contaminação de um determinado ambiente (Silva, 2009). No presente trabalho, foram analisados: *E. coli*, que é considerada um bom indicador de uma possível contaminação fecal, e o Regulamento (CE) nº 1441 (Anónimo, 2007) preconiza a *E. coli* como o microrganismo indicador de contaminação fecal para o controlo da salubridade dos moluscos bivalves vivos; *Vibrio* spp. e bactérias totais marinhas.

1.6.1 Coliformes fecais e *E. coli*

Os coliformes fecais são utilizados para determinar a contaminação fecal em águas superficiais e efluentes, sobretudo com contaminação recente, assim como em moluscos bivalves e zonas onde eles se desenvolvem. Contudo, a sua aplicação como indicadores de poluição fecal também tem sido questionada e o seu valor colocado em dúvida, devido à frágil definição do grupo, a algumas dificuldades de isolamento, identificação e interpretação das suas análises, à fraca sobrevivência fora do trato intestinal e ao facto de determinadas bactérias patogénicas não se relacionarem bem com os níveis de coliformes fecais (Dionísio, 1996).

A bactéria *E. coli* (família Enterobacteriaceae) é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete curto, podendo ser anaeróbia facultativa e pertencente ao grupo das bactérias coliformes. Tem como características fenotípicas: ser catalase-positiva e oxidase-negativa, fermentar a lactose, não formar esporos, e ser geralmente móvel por ação de flagelos

(Bettencourt, 2011). Tem um ótimo crescimento a uma temperatura de 44 °C, é abundante em fezes humanas e de animais correspondendo a cerca de 95 % dos coliformes existentes nas fezes, tendo somente sido encontradas em esgotos, efluentes, águas naturais e solos que tenham recebido contaminação fecal recente. Embora também possa ter origem em fontes não fecais, é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até ao momento (Bettencourt, 2011), pois satisfaz todas as exigências de um indicador ideal de poluição. De facto:

- A densidade populacional está diretamente relacionada com o grau de contaminação
- Maior sobrevivência que a dos patogênicos
- Ausência em água potável
- Fácil detecção e recuperação laboratorial
- Ocorrência e desaparecimento em simultâneo com outros agentes patogênicos
- Não prejudicial às pessoas e animais
- Manipulação segura

Por estes motivos, atualmente aposta-se na detecção específica de *E. coli*, com o desenvolvimento de diversos métodos que permitem a enumeração rápida desta espécie. A nível de contaminantes microbiológicos, o controlo de qualidade dos moluscos bivalves e das águas, provenientes das zonas de produção, baseia-se na determinação do teor de *E. coli*.

1.6.2 Vibriós

Existem cerca de 35 espécies do género *Vibrio*, das quais doze são patogênicas para o Homem. *Vibrio parahaemolyticus* é a espécie mais importante em termos de segurança alimentar. No entanto, neste documento serão referidas também com algum detalhe as espécies *Vibrio cholerae* e *Vibrio vulnificus*.

Vibrio spp. são bactérias anaeróbias facultativas, Gram-negativas pertencentes à família Vibrionaceae. As células têm a forma de bastonetes (bacilos), frequentemente curvados, e são móveis por flagelos. *V. parahaemolyticus* consegue crescer em ambientes com temperaturas entre 5 e 43 °C e tem uma temperatura ótima de crescimento (temperatura à qual a taxa específica de crescimento é máxima) de 37 °C (Anacleto *et al.*, 2013). Não é um organismo resistente a temperaturas elevadas sendo destruído durante a exposição a temperaturas superiores a 63 °C. *V. parahaemolyticus* é destruído por desidratação, é sensível à refrigeração diminuindo em número ao longo do tempo, mas não é muito sensível à congelação. *V. parahaemolyticus* consegue crescer em ambientes com valores de pH entre 5 e

11 e apresenta uma taxa específica de crescimento máxima em ambientes com valores de pH entre 7,5 e 8,5. Dependendo do soluto, este microrganismo pode crescer em ambientes com uma atividade de água (a_w) mínima tão baixa quanto 0,94. *V. parahaemolyticus* é uma bactéria halofílica (não cresce na ausência de sal) que cresce em ambientes com concentrações de NaCl entre 0,5 e 8,0 % e apresenta uma taxa específica de crescimento máxima em ambientes com concentrações de 3 %. De entre as espécies afins, *V. cholerae* consegue crescer em ambientes com temperaturas entre 10 e 43 °C e tem uma temperatura ótima de crescimento entre 30 e 37 °C. Não é um organismo resistente a temperaturas elevadas sendo destruído durante a pasteurização e a exposição a temperaturas superiores a 70 °C. Por outro lado, *V. vulnificus* consegue crescer em ambientes com temperaturas entre 8 e 43 °C e tem uma temperatura ótima de crescimento de 37 °C. Não é um organismo resistente a temperaturas elevadas. Cook e Ruple (1992) demonstraram que este organismo é destruído em ostras cozinhadas a 50 °C durante 10 minutos. *V. vulnificus* é também sensível a baixas temperaturas.

Os vibrios existem normalmente nas águas estuarinas, aumentando o seu número durante os meses mais quentes do ano. *V. parahaemolyticus* pode ser isolado de fezes de indivíduos em recuperação de uma gastroenterite, durante algumas semanas após o desaparecimento dos sintomas pelo que durante este período existe a possibilidade de manipuladores portadores assintomáticos contaminarem alimentos. Alguns estudos indicam que *V. vulnificus* tem sido isolado de água e de crustáceos em diferentes zonas da costa de diversos países (Anacleto *et al.*, 2013). Encontra-se geralmente em baixo número nas águas podendo, no entanto, atingir valores elevados em ostras e amêijoas, quando a temperatura da água é superior a 21 °C. É raramente isolado quando a temperatura da água é inferior a 10-15 °C (Anacleto *et al.*, 2013).

A maioria dos casos e surtos causados por vibrios são associados ao consumo de peixe, marisco e moluscos crus ou cozinhados de forma deficiente. As ostras cruas constituem o principal veículo de transmissão da infeção por *V. vulnificus*. Os frutos e os vegetais contaminados com a água de rega, com efluentes domésticos utilizados como fertilizantes, por manipuladores e ainda por insetos, e os peixes e mariscos crus capturados em zonas contaminadas são alguns dos alimentos que têm estado na origem de alguns surtos de cólera (provocada por *V. cholerae*). Em 1974, ocorreu um surto de cólera que atingiu várias zonas de Portugal (Anacleto *et al.*, 2013)

A ingestão de alimentos contaminados por *V. parahaemolyticus* causa sintomas que surgem normalmente 4 a 96 horas após a ingestão do alimento contaminado com um número

elevado de microrganismos (10^5 a 10^7). Os sintomas são os típicos de uma gastroenterite: diarreia, dores abdominais, náuseas, vômitos, dores de cabeça, febre (raramente) e arrepios. Estes duram cerca de três dias e a evolução clínica da infecção é normalmente favorável. Em situações excepcionais, foram descritas formas mais severas da infecção, nomeadamente disenteria fulminante e uma sintomatologia que se assemelha à observada nos casos de cólera (Anacleto *et al.*, 2013).

1.6.3 Microrganismos viáveis totais

Entendem-se por microrganismos viáveis totais todas as bactérias mesófilas, heterotróficas, aeróbias e anaeróbias não-estritas (NISQA, 2005). A sua determinação nas amostras de bivalves do presente trabalho constitui uma evidência complementar que fornece indicações da qualidade higiénica das amostras.

Os microrganismos viáveis totais têm origem no solo e na vegetação. São um grupo de bactérias que se multiplicam em gelose nutritiva, em aerobiose e a temperaturas de 25 °C a 40 °C, sendo a temperatura ótima, 30 °C. As colónias podem crescer em cadeia, em grupo e até mesmo isoladas. Teores elevados das mesmas indicam a presença de concentrações elevadas de matéria orgânica (Silva, 2009).

O teor de microrganismos (bactérias) totais é um indicador geral da qualidade higiénica de um produto alimentar. A microbiota total caracteriza as condições de manipulação, o estado de alteração ou o grau de frescura da maioria dos alimentos servindo para determinar a sua qualidade sanitária (Loureiro *et al.*, 2007). A contagem de bactérias totais a 22 °C (temperatura favorável ao desenvolvimento de microrganismos inofensivos à saúde pública) e a 37 °C (temperatura favorável ao desenvolvimento de microrganismos com potencial de patogenicidade em termos de saúde pública) tem, no entanto, pouca importância como indicador de poluição fecal. Porém, a sua presença em número muito elevado provoca transtornos intestinais, pelo que um alimento com contaminação superior a 10^7 é considerado impróprio para consumo humano (Bettencourt, 2011; ICMSF, 1986).

1.7 Zonas de produção e depuração de bivalves

Como já foi referido o consumo de bivalves pode trazer riscos para a saúde pública e, para que haja um controle da qualidade dos bivalves, existe um programa nacional de monitorização das zonas de produção de bivalves (ZPB) no qual se determina com regularidade a qualidade das zonas lagunares e litorais portuguesas. Em Portugal, a

monitorização das zonas de produção dos bivalves é da competência do IPMA I.P. Neste âmbito o Instituto desenvolveu desde há vários anos um programa de amostragem de moluscos bivalves para as várias zonas estuarino-lagunares e litorais (cf. Despacho n.º 4022/2015, Diário da República, 2.ª série - N.º 78 – de 22 de abril, do Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I. P.). Esta monitorização concentra-se em três parâmetros, designadamente o controlo microbiológico e deteção de fitoplâncton tóxico, a determinação dos níveis de biotoxinas marinhas e de metais tóxicos nos bivalves (Pedro *et al.*, 2008b).

Para a caracterização e classificação das zonas de produção é necessária uma avaliação das fontes e tipos de contaminação fecal (humana e animal) no espaço que rodeia os locais de produção, em conjunto com a monitorização de microrganismos indicadores de poluição fecal (como por exemplo *E. coli*). Este conjunto de informações torna possível o cálculo do risco de contaminação dos bivalves por microrganismos patogénicos para cada zona. Fica, desta forma, determinado para cada zona o potencial de utilização para a produção de moluscos bivalves e o tipo de tratamento pós-colheita a que têm de ser sujeitos para que sejam considerados confiáveis para o consumo humano (Tabela 2).

Durante a ingestão de alimentos por filtração, os bivalves vão acumulando microrganismos e outras partículas suspensas na água. Deste modo, para assegurar a comercialização e a salubridade para posterior consumo humano foram estabelecidas regras específicas de higiene aplicáveis aos alimentos de origem animal (Anónimo, 2004). Sendo assim, os lotes de moluscos bivalves vivos das zonas de produção pertencentes à Zona B (Tabela 2) têm de ser obrigatoriamente depurados.

Tabela 2 - Critérios microbiológicos para classificação das zonas de produção de moluscos bivalves vivos de acordo com o Regulamento (CE) N°854/2004 (Anónimo, 2004).

Classe	Níveis permitidos (Teor de <i>E. coli</i> /100 g)	Resultados
A	≤ 230 <i>E. coli</i> /100 g de carne e líquido intervalvar	Centro de Expedição e Consumo direto
B	$230 < E. coli \leq 4600$ /100 g de carne e líquido intervalvar em 90 % das amostras	Depuração e depois cumprir os requisitos da Classe A
C	$4600 < E. coli \leq 46\ 000$ /100 g de carne e líquido intervalvar	Indústria transformadora ou permanecer pelo menos 2 meses em zona de transposição

O processo de depuração baseia-se na capacidade de filtração dos moluscos bivalves para a sua alimentação e respiração. Os bivalves são colocados em tanques com água do mar esterilizada, filtrada e com a temperatura, nível de oxigenação e salinidade controladas

durante pelo menos 42 horas. Nestas condições os animais retomam a filtração que, consequentemente contribui para eliminar os microrganismos acumulados no seu organismo, e deste modo ficam aptos para o consumo humano. Após a depuração, verifica-se a diminuição das concentrações de bactérias para níveis admissíveis para o consumo humano. Todavia nem todos os microrganismos são eliminados durante o processo, como os vírus e as biotoxinas produzidas por microalgas (Pedro *et al.*, 2008b).

1.8 Monitorização ambiental e utilização de espécies bioindicadoras

O aumento da poluição marinha constitui um problema crescente, particularmente nos países industrializados. A elevada e crescente concentração populacional e industrial nas zonas litorais tem resultado em modificações substanciais da costa e em efeitos adversos no ambiente aquático, pelo maior impacto da contaminação nestas áreas. Estes ambientes tornam-se assim o reservatório final para um número incontável de compostos químicos libertados pelo homem, quer através de descargas diretas (efluentes municipais, industriais e domésticos), quer difusas (escorrências urbanas e agrícolas) (Almeida, 2003).

Anualmente, milhares de toneladas de compostos sintéticos são produzidos e utilizados na indústria e agricultura, acabando por ser libertados em ambientes aquáticos. Estes químicos antropogénicos juntam-se a uma multiplicidade de produtos naturais também tóxicos, normalmente presentes em misturas complexas, englobando o que se designa de xenobióticos (Pereira, 2009; Stegeman e Hahn, 1994).

Nas últimas décadas do século XX, a humanidade consciencializou-se dos efeitos adversos e prolongados de muitos xenobióticos e o risco implícito para os ecossistemas aquáticos. Estes compostos são persistentes, rapidamente bioacumulados nos tecidos dos organismos e alguns podem mesmo ser bioamplificados através da cadeia alimentar. A acumulação de contaminantes nos organismos aquáticos depende de vários fatores, mas principalmente das propriedades físico-químicas do composto xenobiótico, das características do ecossistema e da biologia do organismo recetor (Almeida, 2003).

Os organismos aquáticos entram em contacto com os xenobióticos dissolvidos ou em suspensão na água, incorporam-nos diretamente através da superfície corporal, das vias respiratórias e epitélio digestivo, ou através da alimentação, acumulando-os devido à grande afinidade destes compostos para se ligarem a inúmeras substâncias orgânicas, pelo que as concentrações de contaminantes acumuladas nos tecidos podem atingir algumas ordens de magnitude superiores às existentes no ambiente (Deudero *et al.*, 2009). A maioria dos

xenobióticos acumulados pelos organismos são biotransformados em metabolitos antes de serem excretados. Sem esta biotransformação, a sua excreção seria lenta e acumular-se-iam no organismo em quantidades incomportáveis. Todavia, como alguns xenobióticos partilham vias metabólicas com substratos endógenos dos organismos, como as hormonas, tornam-se passíveis de interferir com o metabolismo normal e despoletar alterações endócrinas (Cossu *et al.*, 2000; Pereira, 2009). Contudo, muitos organismos desenvolveram estratégias adaptativas para regular, imobilizar ou desintoxicar os contaminantes acumulados, pelo que a toxicidade destes elementos pode variar entre diferentes espécies. A concentração de um contaminante num organismo é o resultado do balanço entre a incorporação e a sua regulação (Aveiro, 2007).

A acumulação de compostos antropogénicos tóxicos nos organismos aquáticos é uma forma eficaz de avaliar a qualidade ambiental de um ecossistema, permitindo identificar a incidência de exposição e os efeitos causados pelos xenobióticos, e atuando como alerta de *stress* ambiental. Os organismos aquáticos que possuem a capacidade de acumular quantidades significativas de contaminantes nos seus tecidos em resposta às existentes no meio envolvente designam-se bioindicadores (Deudero *et al.*, 2009). De entre os organismos adequados a estudos de biomonitorização em zonas costeiras e estuarinas, os peixes e os moluscos bivalves, são os mais utilizados como espécies bioindicadoras (Deudero *et al.*, 2009). Neste contexto, os bivalves têm assumido um papel determinante, uma vez que são organismos filtradores de grandes quantidades de água para alimentação e respiração, extraindo partículas orgânicas em suspensão do habitat onde vivem.

Um biomarcador é definido como uma medida quantitativa de alterações nas respostas biológicas ao nível molecular, celular, fisiológico ou comportamental, e que pode ser interpretada como resposta à exposição e/ou a doses de substâncias xenobióticas (Bebiano *et al.*, 2003). Destas medidas, as que se processam ao nível molecular e celular são as que dão o primeiro sinal de perturbação, sendo muito sensíveis em relação a certos compostos tóxicos. Os biomarcadores permitem uma identificação antecipada de efeitos adversos em níveis superiores de organização biológica, e podem ser utilizados preventivamente em avaliações de qualidade ambiental, de modo a iniciar estratégias de biorremediação antes de existir danos irreversíveis (Zorita *et al.*, 2007).

Considerando a complexidade dos xenobióticos existentes nos ecossistemas aquáticos, as enzimas antioxidantes presentes nos organismos bioindicadores, por ex. bivalves, representam biomarcadores de interesse uma vez que a resposta não é específica para uma substância tóxica particular (Montserrat *et al.*, 2007; Pereira, 2009). Os sistemas de defesa

presentes em todas as células aeróbias, neutralizam compostos químicos reativos produzidos por vias metabólicas endógenas e/ou derivadas do metabolismo xenobiótico. Quando este sistema falha ou é incapaz de neutralizar compostos químicos reativos produzidos por vias metabólicas endógenas, podem ocorrer danos celulares, nomeadamente através da peroxidação lipídica (LPO) das membranas, muito utilizada como biomarcador de *stress* oxidativo. De facto, a LPO está associada a perturbações oxidativas nos lípidos das membranas celulares, resultando em produtos de degradação lipídica e radicais livres, extremamente tóxicos para as células (Bebianno *et al.*, 2004)

2. OBJETIVOS

Com este trabalho pretende-se, por um lado, avaliar a contaminação da amêijoia-boia de duas zonas de produção situadas na Ria Formosa, durante as diferentes estações do ano no contexto da monitorização microbiológica dos moluscos bivalves vivos na defesa da saúde pública, e, por outro lado, avaliar a resposta ao *stress* ambiental em moluscos bivalves da Ria Formosa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Zona de amostragem

Foram recolhidas mensalmente, entre agosto de 2012 e julho de 2013, amostras de amêijoas-boas (*R. decussatus*), originárias de duas zonas da Ria Formosa uma zona próxima de áreas mais povoadas e, daí, mais contaminadas Faro-Marchil; e uma zona menos influenciada por populações próximas e em consequência menos contaminada, Cacela-Vila Real de Santo António (Cacela-VRSA) (Fig.4).



Figura 4. Mapa de localização dos pontos de amostragem na Ria Formosa: A – Faro-Marchil e B – Cacela-Vila Real de Santo António.

3.2 Periodicidade e número de amostras

Com o intuito de avaliar a contaminação microbiológica e a resposta ao *stress* ambiental da amêijoia-boia de duas zonas de produção situadas na Ria formosa, procedeu-se da seguinte forma: mensalmente foram recolhidas amostras de bivalves das duas zonas de estudo, num total de 12 amostras para cada viveiro. As colheitas da amêijoia-boia foram sempre efetuadas na baixa-mar, uma vez que, só nestas condições era possível proceder à recolha dos espécimes.

3.3 Procedimento de amostragem

A recolha de amostras de amêijoia-boia foi efetuada em condições higiénicas e respeitando o procedimento interno adotado no IPMA desde 2008 para amostragem e transporte de moluscos bivalves vivos para o ensaio microbiológico.

As amostras de bivalves foram colhidas dos respetivos viveiros (A - Faro-Marchil e B-Cacela- VRSA) com uma faca de mariscar, colocadas em sacos de rede e depois em sacos de plásticos esterilizados. De seguida, as amostras de bivalves foram conservadas entre 0 e 5 °C em caixas isotérmicas e transportadas vivas para o laboratório. O tempo decorrido entre a recolha de bivalves e a análise laboratorial nunca ultrapassou as 24 horas.

3.4 Equipamento e condições do laboratório de microbiologia

O Laboratório de Microbiologia do IPMA de Olhão apresenta-se bem equipado, possuindo diferentes zonas definidas para o fim que se destinam, sendo elas; “Zona de Receção e lavagem de amostras”, “Zona de preparação de amostras”, “Zona de esterilização de material e meios de cultura”, “Zona de Preparação de meios de Cultura”, “Zona de lavagem e descontaminação do material”, Sala de “Leituras, contagens e Repicagens” e por último “Zona de Incubação” com diversas estufas de incubação.

3.5 Parâmetros a analisar e métodos utilizados

Na parte experimental do presente trabalho foram realizadas análises microbiológicas e bioquímicas às amêijoas colhidas nas duas zonas de amostragem.

A) Parâmetros microbiológicos

- *E.coli*

- *Vibrios*

- Bactérias marinhas totais que crescem a temperaturas de 22 °C.

B) Parâmetros físico-químicos

Obtiveram-se, do Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos (SNIRH, em <http://snirh.apambiente.pt/>), dados relativos à temperatura do ar (°C) e precipitação média mensal (mm) na área em estudo (estação meteorológica do Aeroporto de Faro).

C) Parâmetros bioquímicos

- Índice de peroxidação lipídica (MDA e 4-HNE)

- Teor de proteínas totais (Método de Lowry)

3.6 Procedimento técnico

3.6.1 Preparação de amostras de amêijoa-boia

Cada amostra mensal foi composta por aproximadamente 1 kg de amêijoa-boia (cerca de 50 indivíduos). Eliminaram-se as amêijoas que apresentassem as valvas partidas e/ou sinais evidentes de estarem mortas. Retiraram-se aproximadamente 24 amêijoas para a análise dos parâmetros bioquímicos e as restantes para as análises microbiológicas.

De cada zona de produção foram utilizadas 24 amêijoas para análise bioquímica, 12 para análise de peroxidação lipídica e 12 para análise do teor de proteínas.

As amêijoas para a análise dos parâmetros microbiológicos foram inicialmente lavadas em água corrente e secas com papel absorvente, para eliminar o excesso de água. Em seguida procedeu-se à preparação das amostras de acordo com a NP 1829 (IPQ, 1982).

Na Zona de Preparação do Laboratório de Microbiologia do IPMA de Olhão (LM), procedeu-se à abertura das conchas com um bisturi esterilizado e junto a um bico de Bunsen (Fireboy plus, Switzerland), por forma a trabalhar em ambiente asséptico.

O líquido intervalvar e o miolo da amêijoa foram colocados numa placa de Petri previamente tarada. Transferiram-se 100 g de amostra para um saco de Stomacher® com filtro (PE dim. 177 mm x 304 mm com tela filtrante, London, UK) devidamente esterilizado. De seguida efetuou-se a homogeneização no Stomacher® (Stomacher 400 Circulator, Seward

Limted, London, UK), durante 2 min a 200 rpm. Da solução obtida, retiraram-se 40 g de amostra para um saco estéril ao qual se adicionaram 100 ml de Solução Triptona Sal, efetuando-se novamente uma homogeneização durante 2 min a 200 rpm. Adicionou-se de seguida 260 ml de Solução Triptona Sal e homogeneizou-se novamente durante 2 min a 200 rpm. O resultado é a solução mãe (diluição 10^{-1} ou 1:10) (Fig. 5).

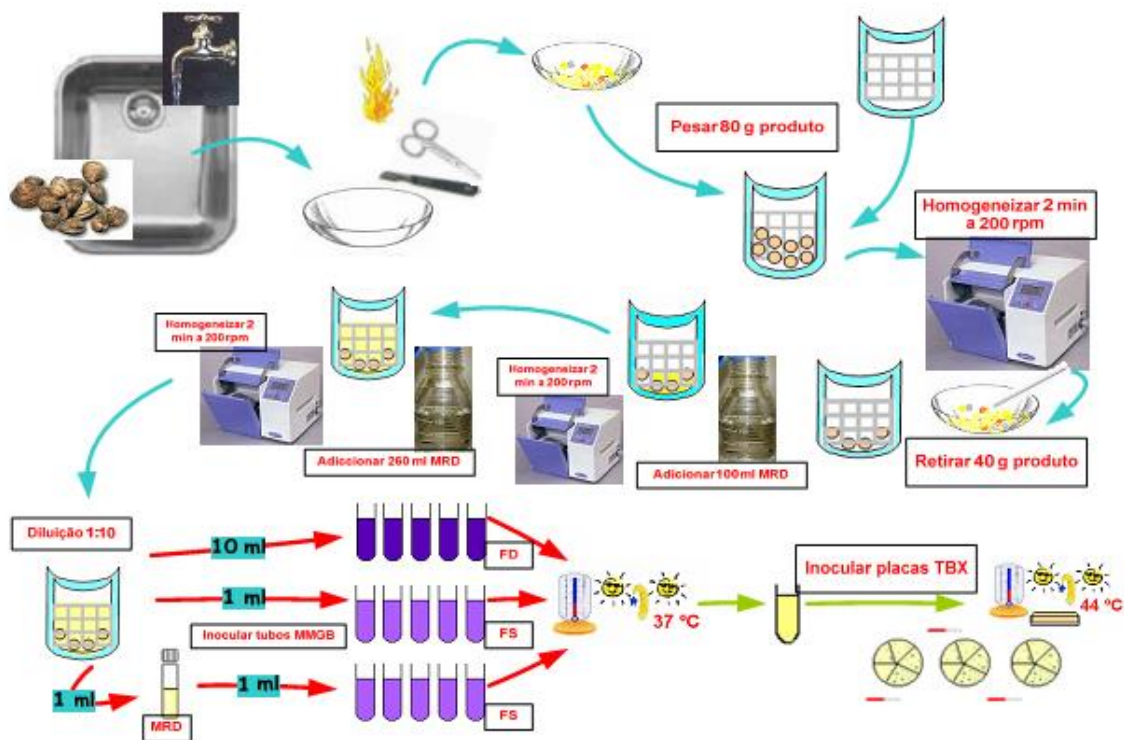


Figura 5. Esquema representativo de uma análise de *Escherichia coli* em amostras de amêijoas-boa (*Ruditapes decussatus*).

3.6.2 Determinação do teor de *E.coli*

Foi utilizada a técnica da fermentação dos tubos múltiplos com séries de 5 tubos, baseado no método descrito em Donovan *et al.* (1998) com enumeração através do NMP (Número Mais Provável). Para a prova presuntiva, colocaram-se 10 ml da suspensão-mãe em cada tubo de uma série de cinco tubos contendo meio MMGB em concentração dupla. Inoculou-se 1 ml da suspensão-mãe em cada um dos cinco tubos contendo o meio MMGB em concentração simples e inoculou-se o volume de 1 ml das diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} noutras séries de cinco tubos contendo o mesmo meio. Os tubos são colocados numa estufa a 37 °C durante 24 h. Os tubos que apresentaram turvação e alteração da cor lilás do meio para amarelo, indicando viragem do pH devido à produção de ácido. Estes tubos foram replicados

para placas que continham meio TBX. Incubaram-se as placas com meio TBX na estufa a 44 °C \pm 1 °C durante 24 h. Nas placas com meio TBX, o crescimento de colônias azuis/esverdeadas indica a presença de *E. coli*. Para isolar as colônias azuis/esverdeadas estas foram replicadas em placas de TBX e incubadas na estufa a 44 °C durante a 24 h (Fig. 6).

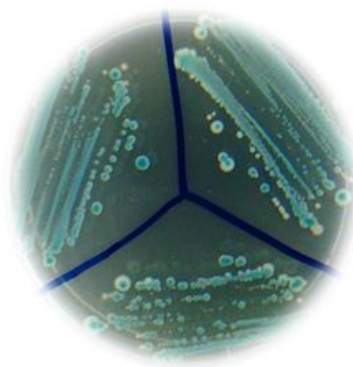


Figura 6. Imagem representativa do crescimento de colônias azuis em meio TBX, que indicam presença de *Escherichia coli*.

3.6.3 Determinação do teor de *Vibrio* spp.

Após abrir as amêijoas e as homogeneizar no Stomacher, foi pipetado 1 ml da solução de amêijoas homogeneizadas (antes de adicionar Solução de Triptona Sal para procedimento dos coliformes) num tubo de ensaio com 9 ml de solução salina 1,5 %, previamente preparado e esterilizado. Após agitação da solução até homogeneização completa, obtém-se a solução-mãe. Pipetou-se 1 ml desta solução e adicionou-se a cada um dos tubos com 9 ml de solução salina. Prepararam-se diluições até à 10^{-3} . Pipetaram-se 10 μ l de solução das diluições para as placas contendo o meio TCBS. Após espalhamento, aguardaram-se 2-3 min para que o meio absorvesse o inóculo. De seguida, colocaram-se as placas a incubar numa estufa a 24 °C durante 24 h para contar as colônias verdes/amarelas indicadoras de presença de *Vibrio* spp.

3.6.4 Determinação do teor de bactérias marinhas totais

Após abrir as amêijoas e as homogeneizar no Stomacher®, pipetar 1 ml da solução resultante (antes de adicionar Solução de Triptona Sal para procedimento dos coliformes) num tubo de ensaio com 9 ml de solução salina 1,5%, previamente preparado e esterilizado. Após agitação da solução até homogeneização completa, obtém-se a solução – mãe. Pipetou-se 1 ml desta solução e adicionou-se a cada um dos tubos com 9 ml de solução salina.

Prepararam-se diluições até à diluição 10^{-3} . Pipetaram-se 10 μ l de solução das diluições para as placas contendo o meio de TSA. Após espalhamento, aguardaram-se 2-3 min para que o meio absorvesse o inóculo. De seguida colocar as placas a incubar numa estufa a 24 °C durante 24 h.

3.6.5 Quantificação de peroxidação lipídica

O método para quantificação da peroxidação lipídica (LPO, do inglês *lipid peroxidation*) descrito por Erdelmeier *et al.* (1998) e por Gérard-Monnier *et al.* (1998) permite determinar as concentrações de malonedialdeído (MDA) e 4-hidroxiceno (4-HNE). Estes compostos são usados como marcadores da oxidação da membrana fosfolipídica, uma vez que são compostos tóxicos gerados pela degradação de peróxidos de ácidos gordos polinsaturados. Este método baseia-se no princípio da reação de 2 moles de N-metil-2-fenilindol (reagente cromogénico) com 1 mole de MDA ou 4-HNE, obtendo-se um cromóforo estável com um máximo de absorvância a 586 nm. Estes compostos são, estimados através de espectrofotometria, usando malonedialdeído-bis (tetrametoxipropano) como solução-padrão.

O procedimento foi efetuado analisando as brânquias de 12 indivíduos por local (tamanho médio = $61,8 \pm 6,5$ mm) e a peroxidação lipídica foi determinada neste tecido uma vez que as brânquias são uma importante via de entrada, de bioconcentração e de excreção de compostos em bivalves, tornando-se um tecido-alvo para contaminantes devido à ampla área de contacto e reduzida distância entre o meio interno e externo. As amostras foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas (homogeneizador IKA, modelo Ultra - Turrax T-25) num volume de solução tampão Tris-HCl (20 mM, pH 8,6) três vezes superior ao peso da amostra (mas nunca superior a 5 ml de tampão), juntamente com BHT (hidroxitolueno butilado; 10 μ l por cada 1 ml de Tris-HCl), num banho de gelo durante 2 min. Seguidamente, 3 ml do homogeneizado obtido foram centrifugados (centrífuga Beckman J2-21) a 30 000 g a 4 °C durante 45 min e o sobrenadante (fração citosólica) foi cuidadosamente separado, guardando-se uma alíquota para determinação das proteínas totais. À subamostra de 200 μ l adicionaram-se 650 μ l de N-metil-2-fenilindol (10,32 mM, diluído em 50 ml de acetonitrilo e 6 ml de metanol) e 150 μ l de 15,4 M de ácido metanossulfónico. Após incubação a 45 °C durante 60 min, quantificou-se a absorvância num espectrofotómetro (Jasco V-650) a 586 nm. As leituras obtidas foram convertidas em concentração de MDA e 4-HNE usando uma reta de calibração construída com as absorvâncias de soluções-padrão, cujas concentrações de

malonedialdeído-bis (tetrametoxipropano) eram conhecidas. A concentração de MDA e 4-HNE em cada amostra foi normalizada com a quantidade total de proteínas, obtida pelo método de Lowry (v. a seguir), e expressa em micromoles de MDA e 4-HNE por grama de proteína total ($\mu\text{mol g}^{-1}$ prot).

3.6.6 Quantificação das proteínas (Método de Lowry)

A quantidade total de proteínas de cada amostra foi determinada de acordo com o método de Lowry (1951) a partir de alíquotas guardadas de sobrenadante num passo do método descrito acima para LPO. Prepararam-se as soluções A (Carbonato de Sódio Anidro [Na_2CO_3] a 2% e 2,5 mM Hidróxido de Sódio [NaOH]), B1 (20 mM Sulfato de Cobre pentahidratado [$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$]), B2 (35 mM Tartarato de Sódio/potássio tetrahidratado [$\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$]) e C (100 ml sol. A + 2 ml sol. B1 + 2 ml sol. B2) e diluíram-se as amostras (1:30) em água bidestilada. Adicionaram-se 2,5 ml de solução C a 0,5 ml de amostra, incubou-se durante 10 minutos e juntou-se 0,25 ml de reagente de Folin-Ciocalteau, diluído num volume igual de água bidestilada; incubou-se novamente durante 90 min. Leram-se as absorvâncias das amostras num espectrofotómetro (Jasco V-650) a 750 nm. As leituras obtidas foram convertidas em concentração de proteínas através de uma reta de calibração construída com as absorvâncias de soluções-padrão de albumina (BSA – Bovine Serum Albumin) cujas concentrações eram conhecidas. A concentração de proteínas foi expressa em miligramas de proteína total por grama de tecido (mg g^{-1}).

3.7 Análise estatística dos resultados

Para a análise estatística dos dados utilizaram-se o Excel 2013 (Microsoft) e o SPSS 21.0 (IBM Co.). No cálculo das estatísticas amostrais, tais como a média e o desvio-padrão, e na realização dos testes estatísticos, *i.e.* a ANOVA e a Análise de Componentes Principais (ACP), consideraram-se os resultados sob a forma de logaritmo decimal (\log_{10}).

Realizou-se ANOVA com 1 fator para verificar se existiam diferenças significativas (considerando um nível de significância de 0,05) entre os parâmetros microbiológicos dos dois locais em estudo

Utilizou-se a Análise de Componentes Principais (ACP), técnica estatística multivariada que permite resumir a informação de várias variáveis correlacionadas, consideraram-se as seguintes variáveis: teores de *E. coli*, de *Vibrio* spp. e de bactérias totais marinhas; e fatores

ambientais, temperatura e precipitação. Usou-se com critério de retenção das componentes a regra do *eigenvalue* (ou valor próprio) superior a 1, em consonância com *scree plot*. A consistência de cada componente foi medida com α de Cronbach. A adequabilidade dos dados à análise efetuada foi avaliada utilizando a medida de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) e o teste de esfericidade de Bartlett (considerando $\alpha < 0,05$), bem como a variância total explicada.

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros microbiológicos

Os resultados dos parâmetros microbiológicos, das amostras de bivalves originárias de duas zonas da Ria Formosa, Faro-Marchil e Cacela-VRSA, que se descrevem nas secções seguintes encontram-se expressos em \log_{10} NMP/100 g.

4.1.1 Teor de *Escherichia coli*

Na figura 7 apresentam-se os valores do teor de *E. coli* obtidos para as amostras de amêijoas-boas dos dois locais de amostragem, (A) Faro-Marchil e (B) Cacela-VRSA. De um modo geral, é notório que o teor de *E. coli* é geralmente superior nas amostras de amêijoas-boas colhidas em Cacela-VRSA. Essa diferença foi significativa (ANOVA, $F=9,76$, $p<0,05$). Nesses bivalves, os níveis mais elevados do teor de *E. coli* foram determinados no inverno e no verão, apresentando valores de 3,7 \log NMP/100g e 3,5 \log NMP/100g, respetivamente. Nos bivalves da Zona de Faro-Marchil, os níveis mais elevados do teor de *E. coli* foram observados particularmente durante períodos de temperaturas mais elevadas (verão). Neste período, contaram-se 3,0 \log NMP/100 g. A classificação destas zonas de estudo variou ao longo destes meses entre as classes A e B, tendo maioritariamente sido classificada como A.

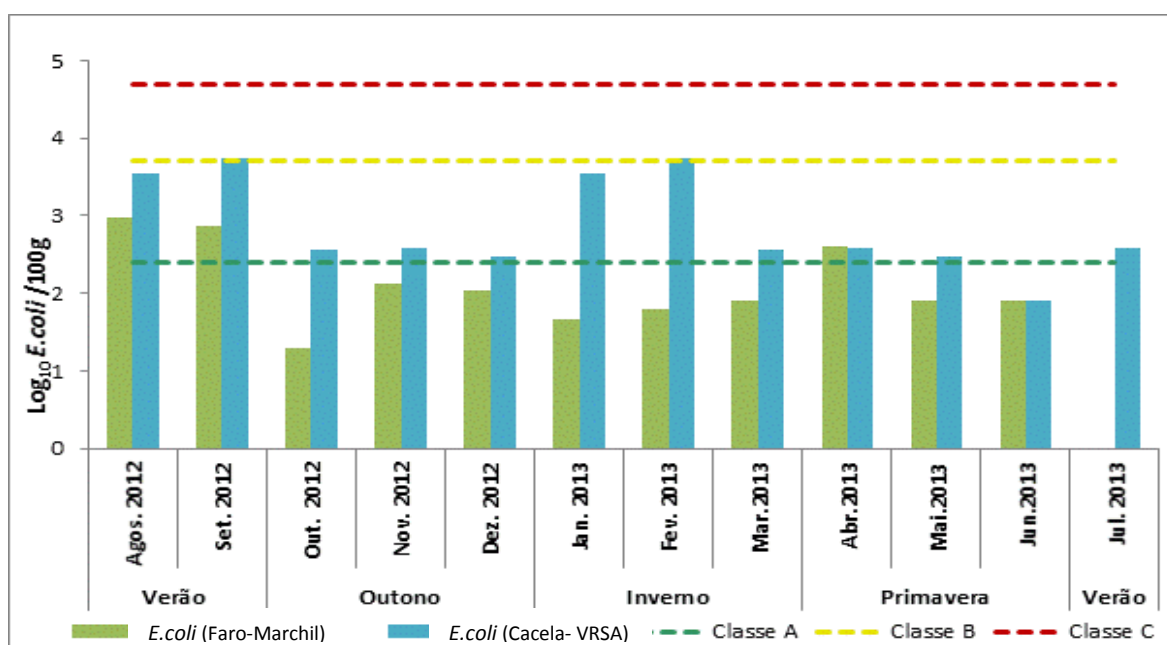


Figura 7. Evolução temporal do teor de *Escherichia coli* em amêijoas-boas (*Ruditapes decussatus*) de Faro-Marchil e Cacela-VRSA.

4.1.2 *Vibrio* spp.

Na figura 8, pode observar-se que os valores máximos de *Vibrio* spp. das amostras de amêijoia-boia de Faro-Marchil ocorreram no mês de fevereiro de 2013, com 3,0 log NMP/100 g. Para os víbrios das amostras de amêijoia-boia colhidas da zona de Cacela-VRSA, obtiveram-se valores máximos nos meses de março e de maio de 2013 (2,6 log NMP/100 g e 2,4 log NMP/100 g, respetivamente). Contudo, não existem diferenças significativas (ANOVA, $F=0,065$, $p>0,05$) entre as concentrações de víbrios nas duas zonas.

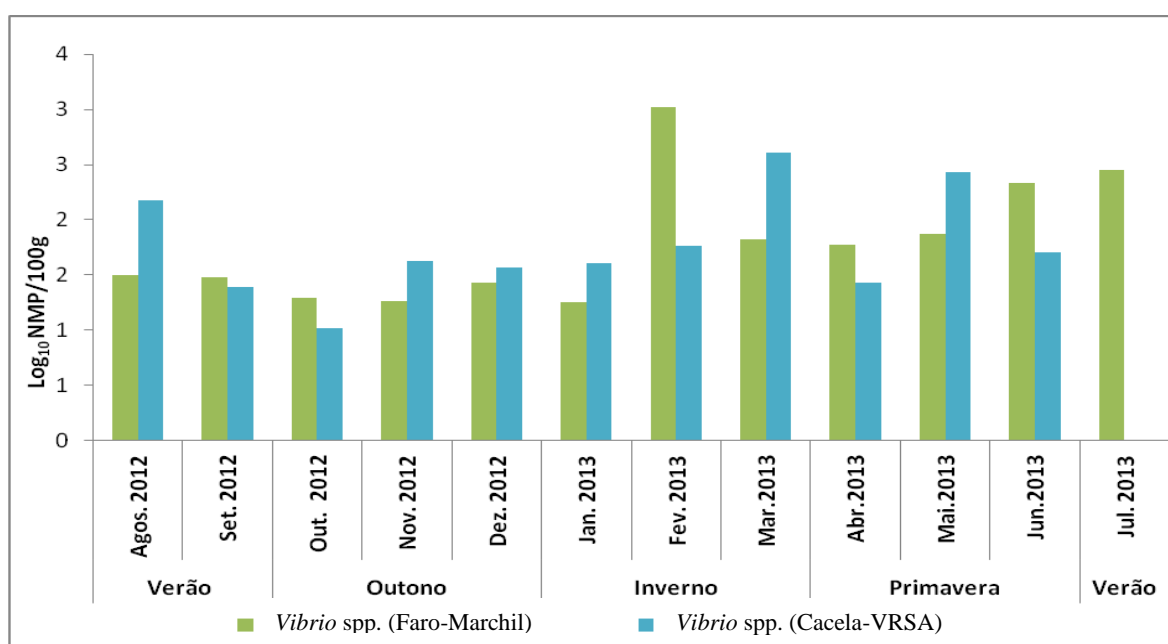


Figura 8. Variação de espaço temporal de valores de *Vibrio* spp. em amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*) de Faro-Marchil e Cacela-VRSA.

4.1.3 Bactérias marinhas totais

Analisando os resultados das análises relativas às bactérias marinhas totais (Figura 9), pode-se observar que os valores mínimos em amostras de amêijoia-boia da zona de Faro-Marchil se verificaram no mês de setembro de 2012 (2 log NMP/100g). O valor mais baixo de bactérias marinhas totais para as amostras de amêijoia-boia colhidas na zona de Cacela-VRSA foi observado no mês de abril de 2013 (1,5 log NMP/100g). Os valores de bactérias marinhas totais para a zona de Faro-Marchil são quase-constantes de outubro 2012 a junho 2013. Em todo caso, não se verificou existir diferença significativa (ANOVA, $F=1,300$, $p<0,05$) entre os valores de bactérias totais marinhas entre zonas.

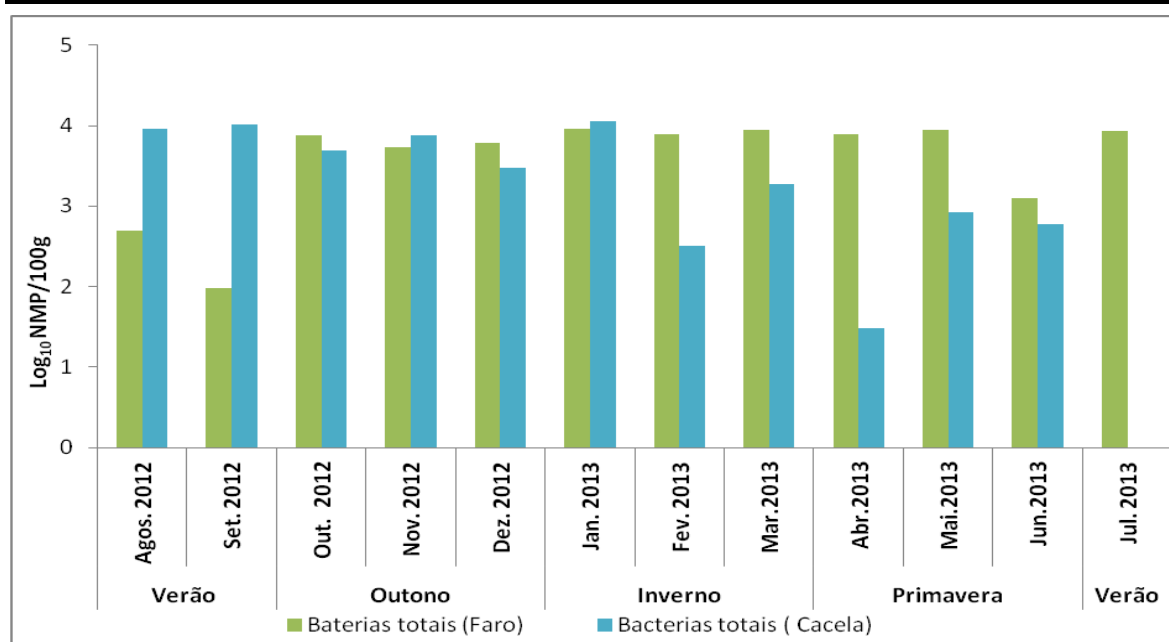
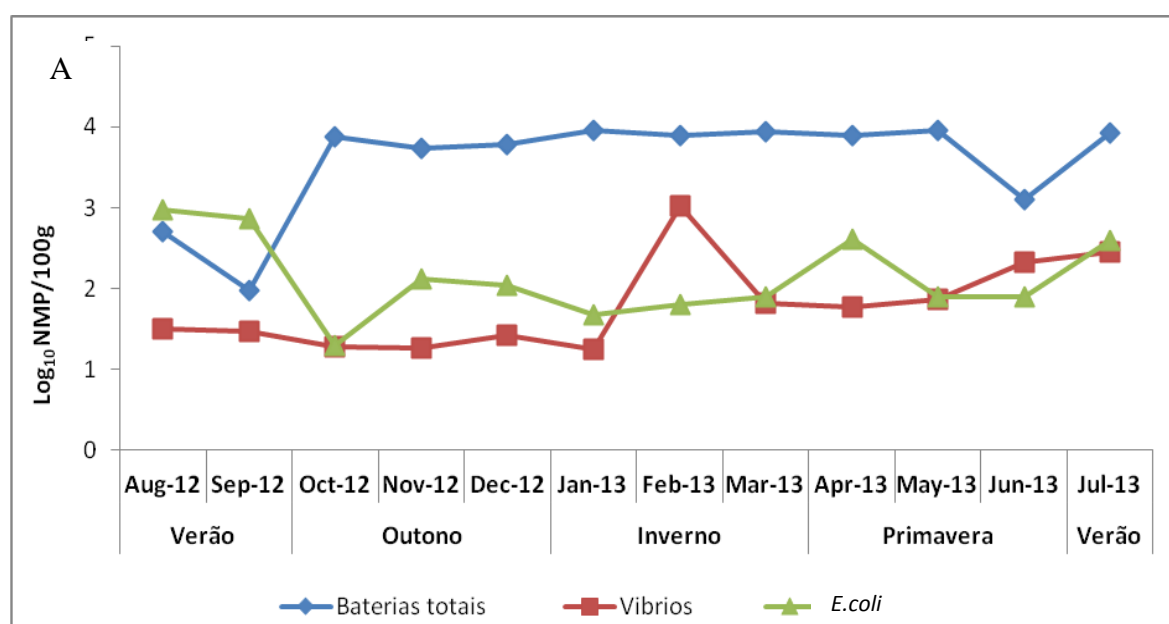


Figura 9. Variação de valores de bactérias totais marinhas, em amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*) de Faro-Marchil e Cacela-VRSA

4.2 Contaminação microbiológica dos bivalves

Por forma a avaliar de forma mais integrada a contaminação microbiológica dos bivalves nos locais de amostragem, Faro-Marchil e Cacela-VRSA, integraram-se na Figura 10 os resultados dos parâmetros microbiológicos analisados, abundâncias de *E. coli*, de *Vibrio* spp. e de bactérias marinhas totais, ao longo do período estudado, agosto de 2012 a julho de 2013.



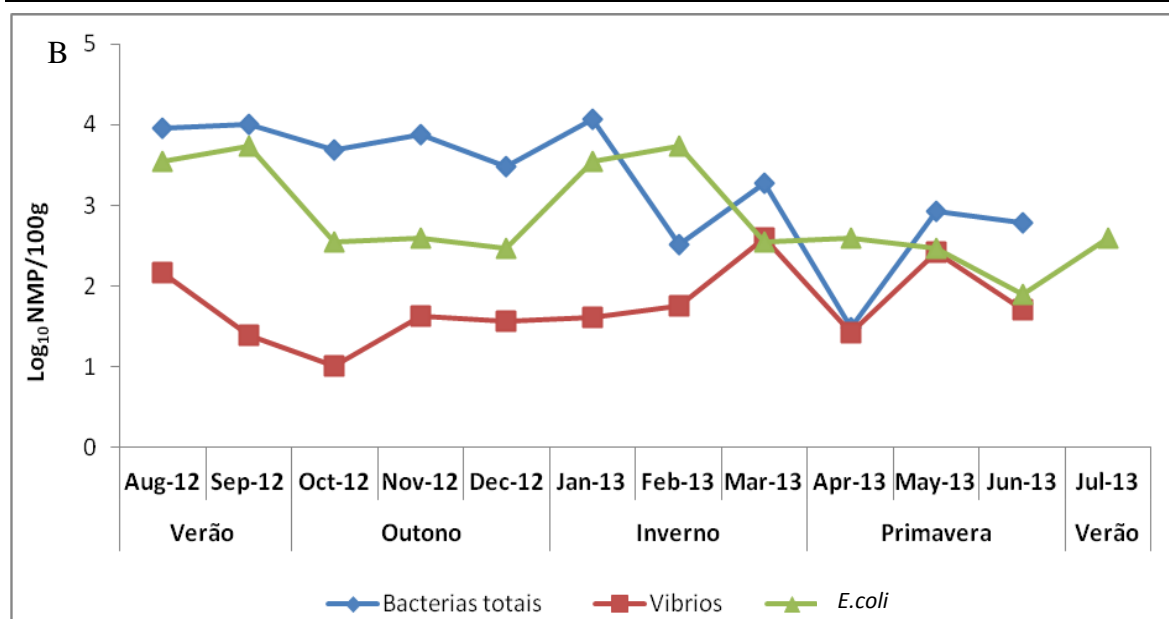


Figura 10. Variação dos resultados dos parâmetros microbiológicos obtidos ao longo do estudo nas amostras de amêijoas-boa (*Ruditapes decussatus*) de Faro e Cacela-VRSA

Observa-se que os microrganismos com concentração mais elevada são as bactérias marinhas totais (4 log NMP/100g e 4,1 log NMP/100g), particularmente no caso de Faro-Marchil. De um modo geral, é notório que para ambos os locais apresentam um perfil de contaminação de vibrios muito semelhante ao longo do período de amostragem.

Verifica-se também que os valores de *E. coli* foram mais constantes em Faro-Marchil quando comparados com Cacela-VRSA, sendo nestes últimos mais evidente o efeito das estações do ano.

4.3 Relação entre os parâmetros microbiológicos e as condições ambientais (temperatura e precipitação)

Ao longo do estudo, foi possível observar que a variação nos parâmetros microbiológicos (descrita acima) esteve relacionada com os parâmetros ambientais considerados (temperatura e precipitação). Na Figura 11 apresenta-se a variação mensal do teor de *E. coli*, *Vibrio* spp. e bactérias totais marinhas nas amostras de amêijoas-boa e, simultaneamente, da temperatura do ar média mensal. Pode-se observar que não existe relação entre os parâmetros microbiológicos analisados, *E. coli*, *Vibrio* spp. e bactérias totais marinhas, e a temperatura.

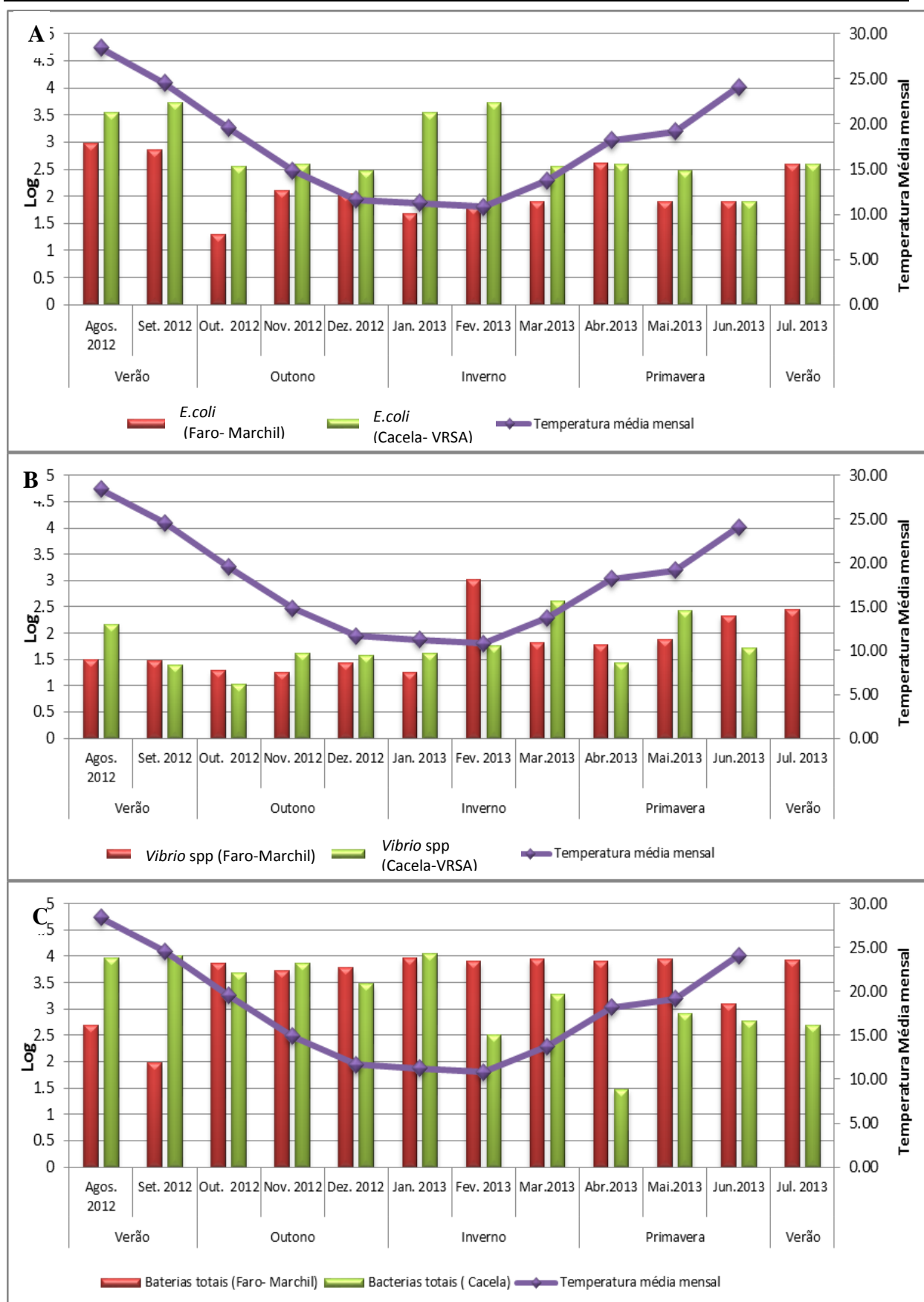
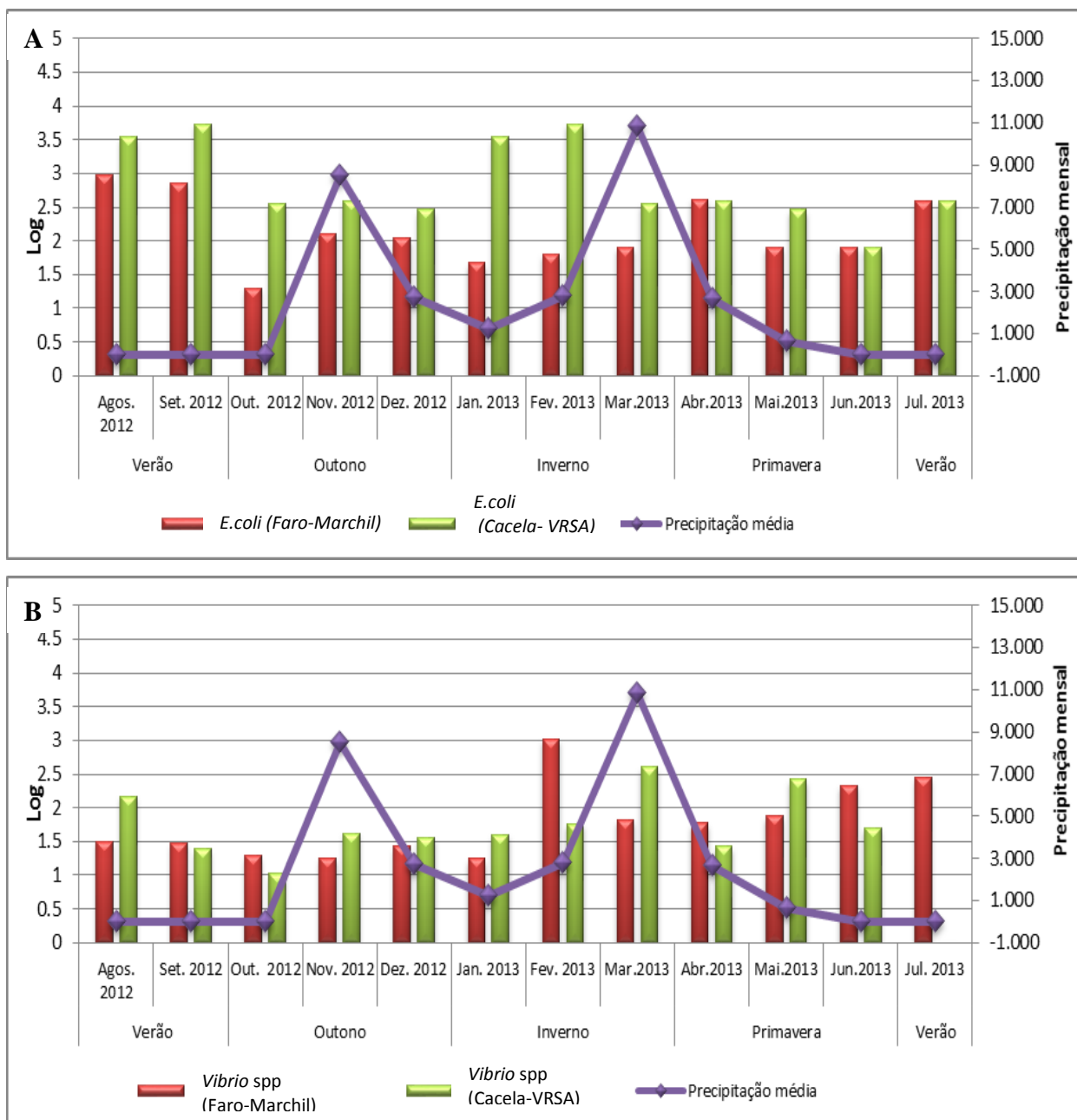


Figura 11. Comparação da temperatura média mensal com a Variação dos resultados dos de *Escherichia coli* (A), *Vibrio* spp (B). e bactérias totais marinhas (C) ao longo do estudo nas amostras de amêijoia-boa (*Ruditapes decussatus*) de Faro-Marchil e de Cacela-VRSA.

Na Figura 12 apresenta-se a variação mensal do teor de *E. coli*, *Vibrio* spp. e bactérias totais marinhas nas amostras de amêijoas-boas e, simultaneamente, a precipitação média mensal. Pode-se observar que não existe relação entre os parâmetros microbiológicos analisados, *E.coli*, *Vibrio* spp. e bactérias totais marinhas, e a precipitação



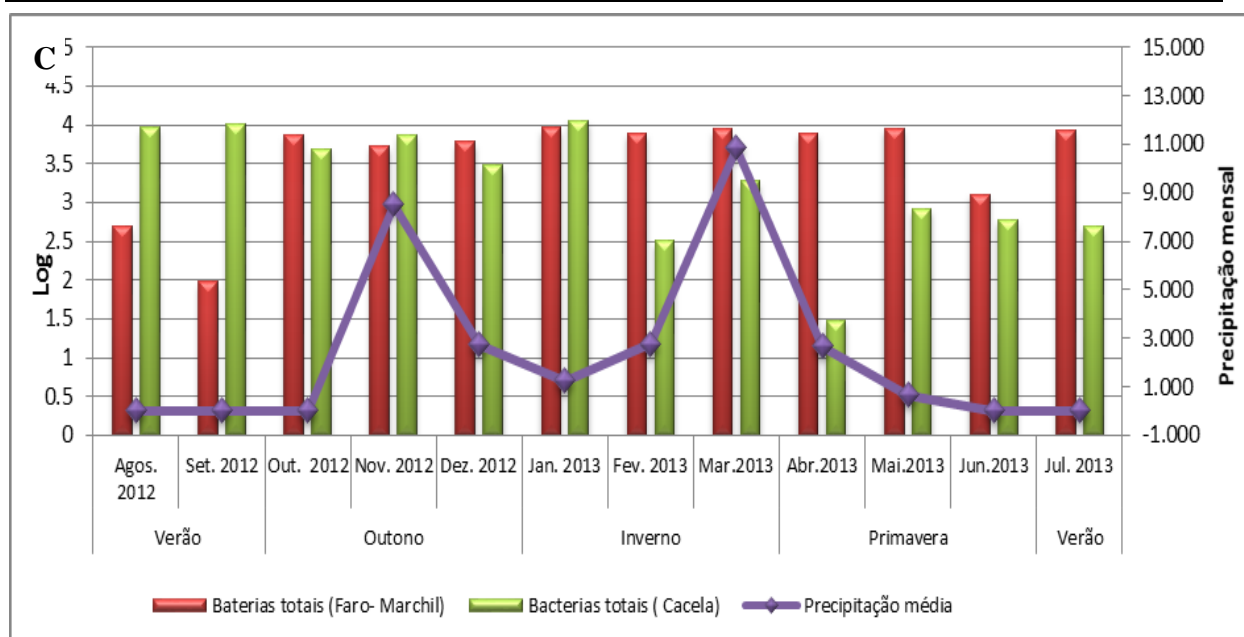


Figura 12. Comparação da precipitação média mensal com a Variação dos resultados dos de *Escherichia coli* (A), *Vibrio* spp (B) e bactérias totais marinhas (C) ao longo do estudo nas amostras de amêijoas-boas (*Ruditapes decussatus*) de Faro-Marchil e de Cacela-VRSA.

Da análise de componentes principais (ACP) aplicada aos dados dos parâmetros microbiológicos relativos às amêijoas e condições ambientais (temperatura e precipitação) de Faro-Marchil, e considerando que $KMO=0,686$ e que o teste de esfericidade de Bartlett ($\chi^2(10)=13,676$, $p<0,05$), foi possível resumir a informação das variáveis em duas componentes. O modelo do ACP explica 79,09% da variância total dos dados, sendo que 57,47% é explicada pela 1ª componente (Dimensão 1) e 21,62 % é explicada pela segunda componente (Dimensão 2). A consistência interna da 1ª componente é muito elevada ($\alpha=0,815$) comparativamente à 2ª componente ($\alpha=0,094$). As variáveis *E. coli* e temperatura têm pesos (ou *loadings*) elevados nesta componente (-0,820 e -0,942) e opostos àqueles das restantes variáveis com pesos relevantes, bactérias totais marinhas e precipitação (cujos pesos são +0,833 e +0,780 respetivamente). Relativamente à 2ª componente, resume-se à variável *vibrios* cujo peso é de +0,967. Na Figura 12 representam-se os pesos (*loadings*) das variáveis no mapa bidimensional (*biplot*) resultante das componentes retidas pela ACP.

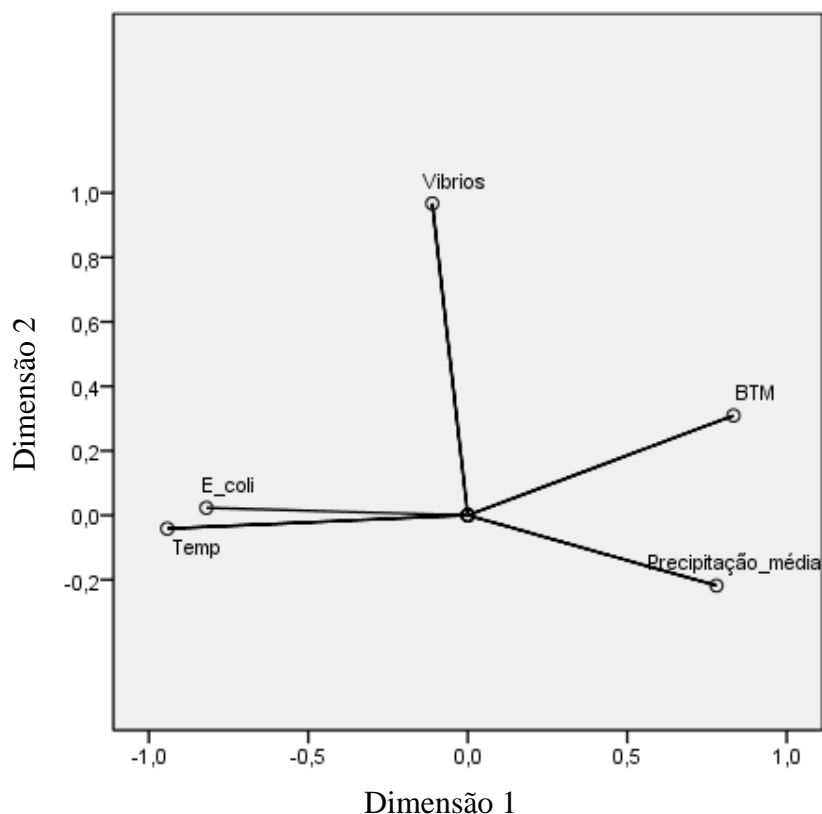


Figura 13. Representação dos pesos (*loadings*) das variáveis no mapa bidimensional (*biplot*) definido pelas duas componentes (*Dimensões*) retidas na análise dos componentes principais (ACP), dos dados de Faro- Marchil.

Legenda: Temp- Temperatura; BTM- bactérias totais marinhas

No caso dos dados obtidos para Cacela-VRSA, tendo em atenção que $KMO=0,429$ e que o teste de esfericidade de Bartlett ($\chi^2(10)=8,221$, $p<0,05$), a ACP permitiu resumir a informação das variáveis em duas componentes. O modelo da ACP explica 71,98% da variância total dos dados, sendo que 45,05% é explicada pela 1ª componente (Dimensão 1) e 26,93% é explicada pela segunda componente (Dimensão 2). A consistência interna da 1ª componente é de $\alpha=0,695$ e a da 2ª componente de $\alpha=0,321$. Relativamente à 1ª dimensão, os pesos (ou *loadings*) das variáveis *vibrios* e *precipitação*, respetivamente +0,790 e +0,978, são elevados mas contrários ao peso da variável *temperatura* (-0,813). As variáveis *E. coli* e *bactérias totais marinhas* têm pesos bastante elevados na 2ª componente (+0,832 e +0,721). Na Figura 14 representam-se os pesos (*loadings*) das variáveis no mapa bidimensional (*biplot*) resultante das componentes retidas pela ACP.

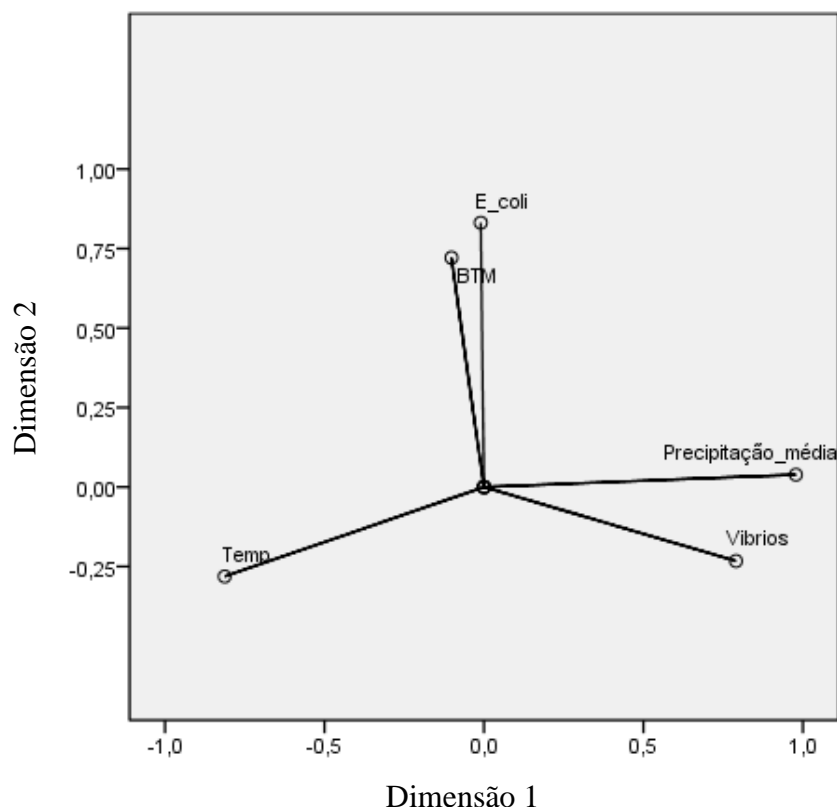


Figura 14. Análise dos componentes principais (ACP) para verificação da relação entre as variáveis ambientais e parâmetros microbiológicos nas amostras de amêijoas-boa (*Ruditapes decussatus*) da zona de Cacela-VRSA.

Legenda: Temp- Temperatura; BTM- bactérias totais marinhas

4.4 Sazonalidade do nível de contaminação microbiológicas e dos teores em proteína e determinação de peroxidação lipídica

A variação sazonal do teor de *E. coli*, de *Vibrio* spp. e de bactérias marinhas totais nas amostras de amêijoas-boa ao longo das diferentes estações do ano para a Faro-Marchil e Cacela-VRSA (Figura 15) revela que a maior concentração de *E. coli* ocorre no verão, enquanto as maiores concentrações de *Vibrio* spp. e de bactérias totais marinhas foram observadas no inverno. Pelo contrário, as menores abundâncias de *E. coli* foram determinadas em pleno inverno, enquanto os mínimos de víbrios e de bactérias totais marinhas foram contabilizados no outono e verão, respetivamente. Verifica-se que a maior concentração de bactérias totais marinhas corresponde ao verão e a menor concentração corresponde à primavera. Em relação à concentração de vibrios nas amostras de amêijoas-boa podemos observar que o valor superior foi no inverno e o valor de menor concentração corresponde à estação do outono. Analisando o gráfico acima referido podemos observar que é na estação

do inverno que as amostras de amêijoia-boia apresenta maior teor de *E. coli*. e que é na primavera que obtemos menor concentração de *E. coli*.

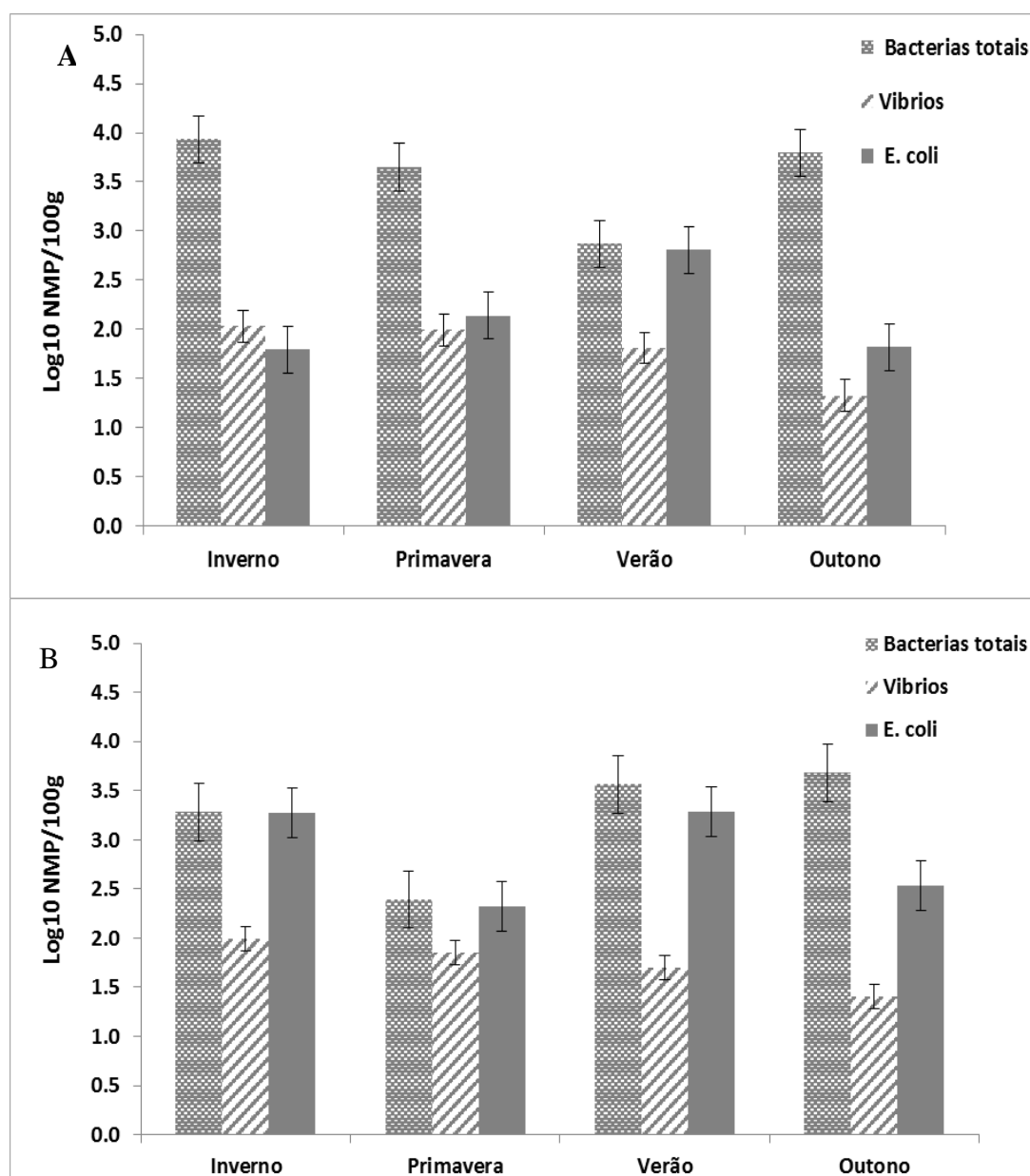


Figura 15.Variação da concentração de *Escherichia coli*, *Vibrio* spp. e Bactérias totais marinhas na amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*) de Faro-Marchil e de Cacela-VRSA, ao longo das estações do ano.

Relativamente à variação sazonal do teor de proteína total nas amostras de amêijoia-boia para Faro-Marchil e Cacela-VRSA (Figura 16), pode-se observar que são muito similares. Todavia, as amostras provenientes de Cacela-VRSA apresentam valores de proteína ligeiramente mais elevados (verão – $31,48 \pm 9,11 \text{ mg g}^{-1}$; outono – $22,08 \pm 8,56 \text{ mg g}^{-1}$; inverno – $36,81 \pm 10,04 \text{ mg g}^{-1}$; primavera- $47,11 \pm 12,33 \text{ mg g}^{-1}$) do que os valores de

proteínas das amostras de amêijoia-boia de Faro-Marchil (verão – $29,61 \pm 5,92 \text{ mg g}^{-1}$; outono- $20,21 \pm 6,84 \text{ mg g}^{-1}$; inverno – $36,59 \pm 10,45 \text{ mg g}^{-1}$; primavera- $43,40 \pm 10,47 \text{ mg g}^{-1}$).

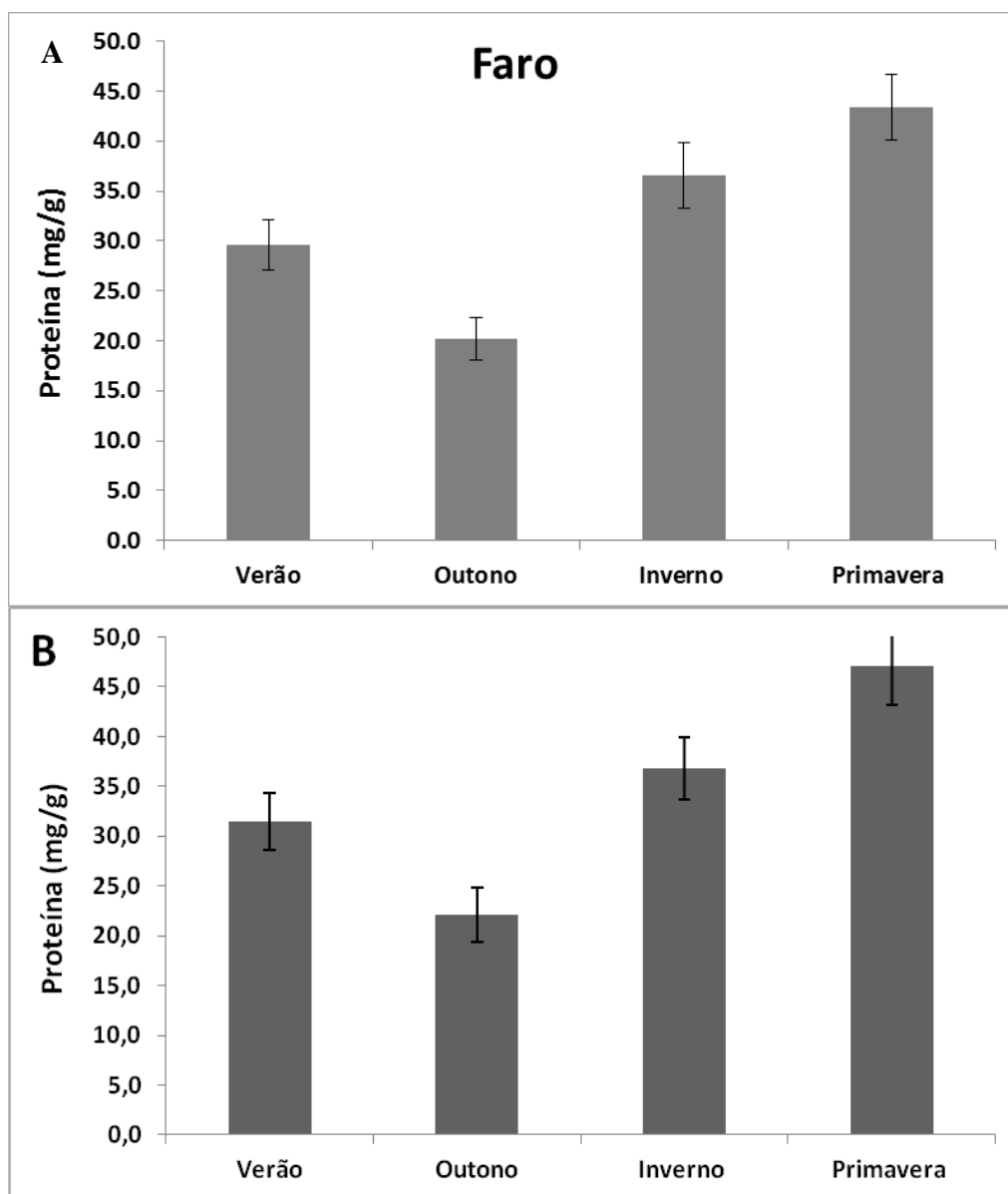


Figura 16- Variação da determinação de Proteína nas brânquias de amostras de amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*) de Faro- Marchil e de Cacela- VRSA, ao longo das estações do ano.

No que diz respeito à variação sazonal dos valores médios do teor de peroxidação lipídica em amostras de amêijoia-boia em Faro-Marchil e em Cacela-VRSA (Figura 17), os valores daquele índice observados na zona de Cacela-VRSA foram ligeiramente mais elevados nos meses de verão e de outono ($597,96 \pm 239,39 \text{ mg g}^{-1}$ e $709,63 \pm 245,14 \text{ mg g}^{-1}$, respetivamente) relativamente aos valores do índice de peroxidação lipídica das amostras de

amêijoas colhidas na zona de Faro-Marchil nas mesmas estações do ano (verão – $29,61 \pm 5,92 \text{ mg g}^{-1}$; outono- $20,21 \pm 6,84 \text{ mg g}^{-1}$).

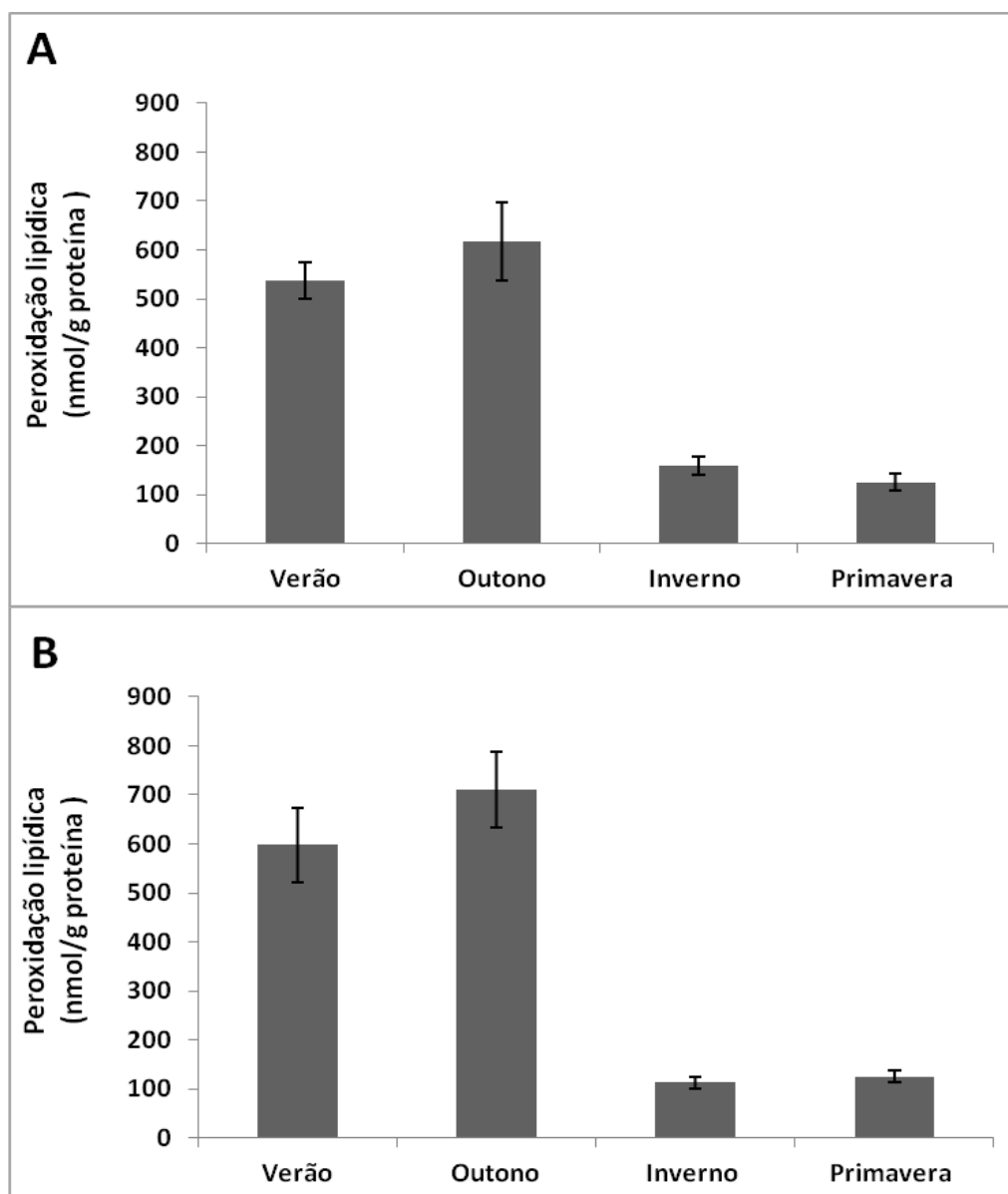


Figura 17 Variação da quantificação de peroxidação lipídica nas brânquias de amostras de amêijoas (*Ruditapes decussatus*) da Zona Faro- Marchil e de Cacela - VRSA, ao longo das estações do ano.

Pelo contrário, analisando os resultados do teor de peroxidação lipídica das amostras de bivalves colhidas no inverno e na primavera constata-se que os valores da zona de Faro-Marchil (inverno: $159,16 \pm 61,06 \text{ mg g}^{-1}$; primavera: $125,44 \pm 55,65 \text{ mg g}^{-1}$) são ligeiramente superiores aos valores determinados na zona de Cacela-VRSA (inverno: $112,87 \pm 39,57 \text{ mg g}^{-1}$; primavera: $125,03 \pm 36,63 \text{ mg g}^{-1}$).

5 DISCUSSÃO

O ambiente marinho possui capacidade de autodepuração, permitindo-lhe restabelecer o seu próprio equilíbrio. No entanto, em sistemas (semi)fechados, como são lagoas, baías, estuários e rias, esta capacidade de depuração e renovação da água do mar, muitas vezes não é suficientemente forte para neutralizar as alterações produzidas pelas contínuas descargas de efluentes (Dionísio *et al.*, 2000). As contribuições externas de águas residuais aumentam a carga microbiana, mas a sua persistência é local e transitória, dependendo de vários fatores, de origem físico-química, biológica e hidrológica. Estes fatores contribuem para a redução dos microrganismos telúricos em função da sua resistência específica a determinadas condições ambientais (Bettencourt, 2011; Kay *et al.*, 2008; Rheinheimer, 1992).

A qualidade microbiológica dos moluscos bivalves vivos está diretamente relacionada com a qualidade da água onde vivem. A sua contaminação ocorre quando se encontram em meios que contêm microrganismos patogénicos, como por exemplo águas poluídas por águas residuais entre outros focos de contaminação. De notar que as fontes de contaminação fecal nas áreas de produção de bivalves são maioritariamente de origem humana. Para além disso, os microrganismos patogénicos e os indicadores bacterianos podem sobreviver mais tempo no interior dos bivalves do que na água do mar. Mais ainda, nos bivalves, estes microrganismos encontram condições para se poderem reproduzir. A acumulação dos microrganismos, nos bivalves depende da sua resistência à ação digestiva das enzimas presentes nos moluscos e das suas diferentes taxas de sobrevivência. Por sua vez, estas derivam da seleção dos diferentes microrganismos no interior dos espécimes, que depende da forma e do tamanho das células microbianas. Estas características sustentam o facto de os bivalves serem considerados como «amostradores» biológicos e bioacumuladores de matéria e substâncias pré-existentes na água (Bettencourt, 2012).

A amêijoia-boia é cultivada em zonas sujeitas a vários focos de contaminação microbiológica derivada da atividade humana. O facto de o consumo de bivalves apresentar um risco para a saúde pública, associado à contaminação microbiológica das zonas onde é produzido, conduziu ao estabelecimento de um plano de monitorização que envolve o controlo microbiológico, nomeadamente dos teores de *E. coli*. Desde 2006 que *E. coli* é usada como indicador da qualidade microbiológica dos bivalves destinados ao consumo humano, substituindo a quantificação do grupo designado por coliformes fecais, que é um grupo mais heterogéneo de bactérias.

5.1 Qualidade microbiológica

Em ecossistemas do tipo estuarino-lagunar como é a Ria Formosa, é importante estudar a influência dos fatores ambientais sobre a população microbiana, as relações que se estabelecem entre si e a forma como os sistemas biológicos são afetados (Dionísio *et al.*, 2000). A abundância de bactérias de origem fecal em águas costeiras varia sobretudo com as alterações nas condições ambientais, como por exemplo, a precipitação, a temperatura, a humidade, a ondulação e a maré, entre outros.

O presente estudo mostrou não existirem diferenças significativas entre as duas zonas de amostragem, Faro-Marchil e Cacela-VRSA relativamente à contaminação microbiológica. O grupo das bactérias marinhas totais inclui *E. coli* e *Vibrio* spp. Por isso todas as amostras analisadas apresentam valores mais elevados de bactérias marinhas totais comparativamente com os valores de *E. coli* e *Vibrio* spp. Isto vai ao encontro dos resultados obtidos por Bettencourt (2012), com amêijoas da Ria Formosa.

A zona de Cacela-VRSA apresentou uma concentração de *E. coli* mais elevada do que na zona de Faro-Marchil. Considerando que a área de Cacela-VRSA é uma zona com baixa renovação da água causada pelo assoreamento da barra de Cacela e a zona de Faro-Marchil está mais exposta à influência do mar, os resultados obtidos neste trabalho não estão de acordo com os reportados por outros autores para a mesma área de estudo (Barbosa, 1989; Bettencourt, 2012; Nunes, 1984, 2000). Estes investigadores demonstraram existir uma diminuição no número de microrganismos mesófilos e de coliformes fecais em zonas mais próximas do oceano. Esta diminuição pode ser devida a diferentes fatores abióticos e bióticos que exercem um efeito negativo, quer individualmente quer por sinergismo, sobre os microrganismos alóctones do ambiente marinho (Martin e Bonnefort, 1986). Campos e Cachola (2007) acrescentam que a acumulação de *E. coli* pelos bivalves depende, entre outros fatores, da distância relativamente à localização da descarga de efluentes e/ou escorrências, do valor de concentração dessas descargas e do tempo de exposição dos bivalves à *E. coli* presente na água. Pelo contrário, Almeida e Soares (2012) obtiveram resultados que, de certa forma, contradizem os obtidos neste estudo. Tendo reunido e analisado dados de 20 anos, concluíram que os níveis mais elevados de *E. coli* foram encontrados em bivalves recolhidos em Faro, a maior cidade do Algarve e onde existem várias fontes de contaminação pontuais e difusas. Nesse estudo, os bivalves provenientes de Cacela-VRSA apresentaram uma menor contaminação microbiana, pois era uma zona que apresentava maior recirculação de água,

sendo um ambiente menos eutrófico. Sendo a Ria Formosa caracterizada pela constante movimentação das ilhas barreira/barras, como por exemplo a barra de Cacela, que depois de 2010 tem vindo a ficar assoreada, sendo a causa da diminuição da renovação de água nesta zona da Ria Formosa.

A análise dos dados de abundâncias dos microrganismos estudados nas amostras de bivalves permitiu verificar que não existem correlações significativas entre as bactérias totais marinhas e os vibrios e o microrganismo indicador de contaminação fecal *E. coli*. Resultados semelhantes foram relatados por diversos autores (e.g. Morinigo *et al.*, 1989; Bettencourt, 2012). As diferenças observadas poderão dever-se a diferentes capacidades de sobrevivência dos microrganismos, as diferentes abordagens metodológicas utilizadas para cada indicador microbiológico estudado (*E. coli* é quantificada em termos de NMP/100 g e os víbrios são avaliados como UFC/ml, por exemplo) e a presença de outros microrganismos nas descargas de esgotos. Alguma variabilidade que se possa observar na leitura de resultados poderá ter sido introduzida pela utilização da água intervalvar para a determinação dos diferentes parâmetros microbiológicos. Esta pode concentrar ou diluir as contagens consoante a qualidade das águas circundantes. Contudo, a água intervalvar pode ser muito importante na transmissão de doenças infecciosas uma vez que faz parte da componente edível do produto e, por isso, é necessário incluí-la nas amostras para análise (Volterra *et al.*, 1991).

Confirmou-se que existem diferenças significativas entre a contaminação microbiológica de amostras de amêijoas-boas dos dois locais de amostragem e as estações do ano. De facto, parece ocorrer sazonalidade, dado que a contaminação microbiológica em bivalves da Ria Formosa em geral é maior no outono e inverno e menor na primavera e verão (Almeida e Soares, 2012). No verão, caracterizado por elevadas temperaturas e forte radiação solar, obtiveram-se maiores abundâncias de *E. coli* nos bivalves de Faro-Marchil. Estatisticamente, obteve-se uma forte associação entre a temperatura e o teor de *E. coli*. Além disso, a zona de estudo está sujeita a uma forte afluência turística no verão, o que faz aumentar os níveis de contaminação pelo aumento de circulação de pessoas e embarcações na zona. Estimativas quanto à variação sazonal do número de habitantes na cidade de Faro, indicam um aumento substancial na chamada época alta, que corresponde ao período do verão, e que origina um aumento da carga microbiana descarregada nesta área da Ria. Para além disso, e embora a estação de tratamento de águas residuais (ETAR) de Faro Noroeste disponha de um tratamento terciário, pontualmente poderão ocorrer descargas, devido a um maior volume de efluentes no período do verão, podendo a ETAR funcionar como uma das maiores fontes de contaminação microbiológica da Ria Formosa (Almeida e Soares, 2012)

neste local. Por outro lado, e de acordo com um estudo que avaliou o efeito das descargas de esgotos nas zonas de produção de bivalves (ZPB) da Ria Formosa (Cravo, 2003), a área mais impactada pode abranger 300 a 400 m desde o ponto de descarga. Este não é o caso do local de amostragem de bivalves de Faro-Marchil, que se encontra entre 800 a 1000 m de distância da (ETAR) de Faro Noroeste. No entanto, e mediante certas condições hidrográficas, áreas que distam até 1000-2000 m do ponto de descarga podem também ser seriamente afetadas (Martins *et al.*, 2004, 2006), o que pode explicar os resultados obtidos para *E. coli* neste trabalho.

Na zona de Cacela-VRSA, registaram-se valores de abundância de *E. coli* mais elevados no inverno, que corresponderam a um período de aumento da precipitação e uma diminuição da temperatura. Estes resultados estão em linha com outros estudos realizados na Ria Formosa (Almeida e Soares, 2012; Bettencourt, 2012), e com trabalhos realizados em águas balneares, que comprovam a existência de um aumento de contaminação fecal após aumento de precipitação (Neill, 2004; Silva, 2009). Mais ainda, os resultados obtidos neste trabalho são corroborados por diversos autores, que demonstraram que a sazonalidade e os parâmetros ambientais (como precipitação e temperatura da água) são os principais fatores que influenciam a concentração bacteriana em bivalves (Anacleto *et al.*, 2013; Derolez *et al.*, 2012; Farias *et al.*, 2010; Sasikumar e Krishnamoorthy, 2010).

Entre os parâmetros ambientais, a pluviosidade é o fator mais relevante para a introdução de microrganismos no meio aquático particularmente no caso da contaminação de águas conquícolas (Campos e Cachola, 2007). As escorrências provenientes das chuvas alimentam as diversas linhas de água, consoante a topologia dos terrenos e as suas características hidrográficas. Estas arrastam sujidade, causam lixiviação das terras e areias em redor da Ria Formosa, aumentando assim as escorrências de resíduos sólidos e efluentes e, por conseguinte, causando o aumento da contaminação fecal das zonas de produção de bivalves. Campos e Cachola (2007) verificaram que os efluentes descarregados pelas águas pluviais causaram um aumento dos níveis de contaminação da água e de bivalves da Ria Formosa, originando concentrações microbianas muito elevadas. Strickland e Parsons (1968) e Raveendran *et al.* (1990) reportam uma correlação positiva entre a introdução de águas pluviais e um aumento da sobrevivência de coliformes fecais. Além disso, ao longo da costa existem ainda algumas pequenas áreas urbanizadas que não têm redes de esgoto adequadas e usam fossas sépticas instaladas no subsolo (PROT-Algarve, 2007). Estas permitem a infiltração de efluentes no subsolo, que podem promover as fontes difusas de poluição (POPNERF, 2007). Estes fatores podem originar a descida de uma a duas classes de estatuto

sanitário (cf. Despacho n.º 4022/2015, Diário da República, 2.ª série - N.º 78 – de 22 de abril, do Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I.P.) (Pedro *et al.*, 2008). A pluviosidade, por via dos conceitos descritos acima, pode explicar a variação dos valores de abundância de *E. coli* observados neste trabalho para bivalves colhidos na zona de Cacela-VRSA.

Várias estirpes de *Vibrio* spp. constituem um perigo para a saúde pública, sendo responsáveis por várias doenças (otite, faringite, infeções de feridas, etc.), bem como por toxinfecções com origem alimentar, e.g. gastroenterite. Uma vez que a atual legislação europeia não especifica limites para estes organismos, devem ser implementadas medidas preventivas para os *Vibrio* spp. tendo em conta que eles são indígenas de ambientes estuarinos e das regiões costeiras, são constituintes normais da população microbiana dos moluscos bivalves e são “resistentes” ao processo de depuração (Desmarchelier, 2000; Barile *et al.*, 2009). Atualmente, a única maneira de proteger os consumidores da contaminação por estirpes patogénicas de *Vibrio* spp. é a recomendação de que os bivalves sejam consumidos cozinhados (Anacleto *et al.*, 2013). Por isso, será particularmente útil o desenvolvimento de estratégias de acompanhamento de contaminação microbiológica litoral pelas autoridades competentes, incluindo a adaptação/atualização da legislação a fim de incorporar novas estirpes de *Vibrio*. De facto, os microrganismos deste género podem representar um perigo para a saúde pública no futuro, especialmente nos períodos mais quentes que são esperados para ser mais frequente devido às alterações climáticas (Anacleto *et al.*, 2013).

Em relação à análise de víbrios, comprovou-se não existirem diferenças significativas entre as abundâncias de *Vibrio* spp. em bivalves provenientes dos locais de estudo, Faro-Marchil e Cacela-VRSA. Aqueles microrganismos apresentam um padrão de variação muito semelhante ao longo do ano, registando um aumento no inverno (fevereiro e março). Segundo Barbosa (1991), nestes meses existe um aumento de bacterioplâncton na Ria Formosa. Dado que os víbrios constituem o género bacteriano mais abundante do bacterioplâncton, poderá existir uma relação positiva entre o aumento do bacterioplâncton e de víbrios na água. Outros fatores como a temperatura, salinidade, precipitação e oxigénio dissolvidos são também fatores que influenciam a sazonalidade observada na concentração de víbrios na água (Baffone *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2003). De facto, vários autores (Lhafi e Kühne, 2007; Ripabelli *et al.*, 1999;) observaram uma correlação positiva entre a ocorrência de víbrios em bivalves e a temperatura da água. Por outro lado, a falta de correlação entre os indicadores de poluição fecal (neste caso, abundância de *E. coli*) e a abundância de *Vibrio* spp. mostra que a sua variação é independente; a concentração de víbrios não parece fornecer indicação acerca da presença e/ou quantidade de bactérias fecais na água do mar e, conseqüentemente, em

bivalves. Resultados similares foram obtidos por Thompson *et al.* (1976) e Hackney *et al.* (1980).

Pelo facto de os bivalves serem organismos filtradores, apresentam maior abundância de microrganismos do que o meio onde se desenvolvem. Por esta razão, o controlo higio-sanitário dos moluscos bivalves está relacionado com a qualidade microbiológica das áreas de produção. Todavia, os parâmetros ambientais temperatura e salinidade entre outros podem limitar a atividade filtrante, condicionando a capacidade de filtração e a retenção dos microrganismos pelos bivalves.

5.2 Qualidade fisiológica

Neste trabalho, constatou-se que existe uma variação sazonal no teor de proteínas e no nível de peroxidação de lípidos das brânquias das amêijoas provenientes dos dois locais da Ria Formosa estudados.

Em termos de concentração de proteínas totais nas brânquias de bivalves, observaram-se diferenças entre as diferentes estações do ano estudadas, sendo a primavera a estação com teor de proteínas mais elevado para os dois pontos de amostragem. Também Serdar e Lok (2009) observaram que o teor de proteínas em *R. decussatus* variou entre 25 %-55 % ao longo do ano. Naquele trabalho, o teor de proteína começou a aumentar a partir de janeiro, atingindo um pico em março e diminuindo acentuadamente em abril, antes da desova. Aqueles autores sugeriram que a proteína armazenada no inverno pode estar associada à maturação dos gâmetas. Quando as amêijoas se encontravam em fase ativa entre janeiro e março, os teores de proteína atingiam o máximo (Matias, 2013). As proteínas podem ser utilizadas como uma fonte alternativa de energia em épocas de menor disponibilidade de alimento (Matias, 2013). Pelo contrário, neste trabalho verificou-se que a concentração de proteínas foi mais elevada nos meses de março, maio e julho. De facto, a variação do teor de proteínas poderá estar associada ao ciclo reprodutivo, que influencia o índice de condição dos bivalves e o estado metabólico dos animais que, por sua vez, estão relacionados com fatores como a maturação das gónadas e a disponibilidade de alimento (Hamza-Chaffai *et al.*, 2003). Assim, estes fatores podem provocar flutuações no teor de proteínas dos tecidos (Matias *et al.*, 2013).

Segundo vários autores (Ojea *et al.*, 2004; Pérez Camacho *et al.*, 2003), a variação sazonal da composição bioquímica da amêijoas está relacionada com o ciclo reprodutivo, o índice de condição e o armazenamento de energia. De facto, as reservas de energia são de uma importância considerável na reprodução e no armazenamento de energia sazonal

(Delgado *et al.*, 2004). O alimento disponível e a temperatura água parecem ser os principais fatores que regulam o tempo e a taxa de armazenamento de energia, particularmente sob a forma de glicogénio, nos bivalves. A amêijoia-boia acumula glicogénio antes da gametogénese, no outono e no início do inverno. O glicogénio é usado como fonte de energia para o desenvolvimento das gónadas e, depois, no período da desova que ocorre no verão (Ojea *et al.*, 2004).

Os contaminantes presentes no ambiente aquático podem conduzir a uma diminuição do sistema antioxidante dos organismos, causando excesso de produção de espécies (químicas) oxidativas reativas (ROS) e tornando-os, dessa forma, mais suscetíveis a danos por *stress* oxidativo. Esses danos incluem a peroxidação lipídica, considerada como um biomarcador de danos oxidativos (Bebiano *et al.*, 2004; Viarengo *et al.*, 2007). Neste trabalho, a LPO foi determinada nas brânquias da amêijoia-boia, primeiro e principal local de contacto e entrada de possíveis contaminantes na fase aquosa, de modo a refletir essa exposição num curto prazo de tempo. Verificou-se que o outono é a estação do ano com maior índice de peroxidação lipídica para os dois locais de estudo. No estudo de Cravo (2013), que analisou o índice de peroxidação nos bivalves na Ria Formosa, aquela autora obteve valores mais elevados de peroxidação lipídica no inverno e sugeriu que seriam devidos a uma redução da atividade do sistema de defesa antioxidante. Esta diminuição na atividade pode ser diretamente responsável por uma maior suscetibilidade de amêijoas ao *stress* oxidativo, levando a níveis mais elevados de peroxidação lipídica.

As concentrações de peroxidação lipídica mostram um padrão mais evidente quando analisadas sazonalmente, indicando que estes organismos filtradores são mais influenciados por variações sazonais de determinados fatores ambientais na coluna de água, nomeadamente aumento de temperatura, da disponibilidade de alimento. Estas variações estão diretamente ligadas a um aumento da capacidade oxidante do meio, que pode comprometer a eficácia do sistema antioxidante dos organismos e levar a um aumento de danos oxidativos, tal como o teor de peroxidação lipídica (Cravo, 2013).

Nos estudos de diversos autores (Barber e Blake, 1985; Bayne e Newell, 1983; Gabbott, 1976; Giese, 1969; Sastry, 1979), a variação sazonal do teor de lípidos está relacionada com o ciclo produtivo, uma vez que a energia é armazenada, sob a forma de glicogénio, lípidos e proteínas, durante gametogénese e quando o alimento é abundante (Hamza-Chaffai *et al.*, 2003). Sendo assim, os fatores ambientais desempenham, aparentemente, um papel dominante na determinação de eventos nos ciclos de armazenamento/utilização das reservas energéticas. Paralelamente, as flutuações do estado metabólico dos animais, que também estão

relacionados com maturação das gónadas e disponibilidade de alimento (Hamza-Chaffai *et al.*, 2003). Poderá também estar associada a uma maior disponibilidade de contaminantes devido à intensa remobilização dos sedimentos durante os períodos de maior hidrodinamismo (Hamza-Chaffai *et al.*, 2003). Supõe-se que a(s) diferença(s) sazonal(is) nos resultados de composição química, em termos de teor de proteínas e índice de peroxidação lipídica, entre o presente trabalho e os estudos na literatura possa ser justificada em razão da diferença das espécies de bivalves, do local de cultivo ou extração, do ciclo reprodutivo e de fatores ambientais.

6 CONCLUSÕES

Este estudo permitiu avaliar a contaminação microbiológica e características bioquímicas indicadoras de *stress* de moluscos bivalves (*R. decussatus*) provenientes de áreas de produção de duas zonas da Ria Formosa, uma área mais povoada, Faro-Marchil, e uma área menos povoada, Cacela-VRSA.

Em Faro-Marchil, o teor de *E.coli* foi mais elevado no verão porque o volume de efluentes das ETAR aumenta devido à pressão do turismo. No caso de Cacela-VRSA, o teor de *E. coli* foi mais elevado no inverno, devido ao aumento da precipitação que leva ao transporte de vários tipos de contaminantes através das escorrências que vão desaguar na Ria Formosa, aumentando a contaminação fecal. Tendo em conta, todos os factos analisados, podemos concluir que a contaminação microbiológica demonstrou uma forte sazonalidade. Este estudo vem reforçar a importância da monitorização eficaz dos níveis de *E. coli*, para a redução de riscos de saúde pública associados ao consumo de bivalves.

Relativamente aos vibrios apresentam um padrão de variação muito semelhante ao longo do ano em ambos os locais, registando um aumento no inverno (fevereiro e março), independente da ocorrência da contaminação fecal.

Para além disso os resultados obtidos a nível de *stress* oxidativo são bastantes interessantes dado que apresentam um padrão sazonal do teor de peroxidação lipídica, sendo o outono a estação do ano com maior índice de peroxidação lipídica para os dois locais de estudo indiciando uma redução da atividade do sistema de defesa antioxidante. Recomenda-se uma melhor avaliação deste parâmetro para verificar se poderá servir como indicador de qualidade ambiental dos bivalves, podendo funcionar como complemento às análises microbiológicas e físicas químicas da água (temperatura, salinidade, oxigénio).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackman, R. G. (1995). *Composition and Nutritive Value of Fish and Shellfish Lipids*. Canadian Institute of Fisheries Technology, Technical University of Nova Scotia, Halifax, Nova Scotia, Canada, 29, 117-146.
- Almeida, A. C., Soares, F., (2012). *Microbiological monitoring of bivalves from the Ria Formosa lagoon (south coast of Portugal): a 20 years of sanitary survey*. Marine Pollution Bulletin. 64, 252 – 262.
- Almeida, A. E., (2003). *Avaliação das variações bioquímicas em moluscos bivalves em resposta ao estresse ambiental*. Dissertação para a obtenção do grau de Doutor em Ciências – área: Bioquímica. Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 271 p.
- Almeida, M.D.V., Afonso C.I.P.N. (2001). *Princípios Básicos de Alimentação e Nutrição*. Universidade Aberta. Lisboa, pp. 47-86.
- Anacleto P., Sónia P., Nunes M. L., Rosa R, Marques A (2013). *Microbiological composition of native and exotic clams from Tagus estuary: Effect of season and environmental parameters*. Marine Pollution Bulletin n 74, 116 – 124.
- Anónimo (2004) Regulamento (CE) nº 854/2004 de 29 de Abril, estabelece regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano. Jornal Oficial da União Europeia, L139/206, Parlamento Europeu e Conselho, Bruxelas.
- Anónimo (2006). Regulamento (CE). nº 1881/2006 da Comissão. JO L364,20,12.2006, 19 pp. 5-24.
- Anónimo (2007) Regulamento (CE) nº 1441/2007 de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) nº 2073/2005 relativo a critério microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, Jornal Oficial da União Europeia, L322/12, Comissão Europeia, Bruxelas.
- Anónimo (2008). Regulamento (CE). nº 629/2008 da Comissão. JO L173,30,07.2008.
- Aveiro, V. M., (2007). *Análise Nutricional, Microbiológica e histológica do berbigão Anomalocardia brasiliana da reserva extractivista marinha do pirajubaé (remapi), florianópolis/sc*. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Nutrição no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, 77 p.
- Baffone, W., Tarsi, R., Pane, L., Campana, R., Repetto, B., Mariottini, G.L., Pruzzo, C., (2006). *Detection of free-living and plankton-bound vibrios in coastal waters of the Adriatic Sea (Italy) and study of their pathogenicity-associated properties*. Environ. Microbiol. 8, 1299 – 1305.
- Bandarra, N. M.; Calhau, M.A; Oliveira, L.; Ramos, M.; Dias, M.G. Bártolo, H; Faria, M.R; Fonseca, M.C. Gonçalves, J.; Batista, I. Nunes, M. L. (2004). *Composição e valor nutricional dos produtos da pesca mais consumidos em Portugal*. Publicações Avulsas do IPIMAR, nº 11, 103 p.
- Banha, M.L. (1984). *Aspetos da Biologia (Crescimento a Reprodução) de Ruditapes decussatus Lineu, 1789 (Mollusca, Bivalvia) na Ria Formosa – Algarve*, Instituto de Investigação das Pescas, Lisboa.
- Baptista, T. (1990). *Avaliação da Contaminação de Ordem Fecal na Amêijoia-boia da Costa Algarvia*, Universidade do Algarve, Faro, 78 p.
- Barber, B.J., Blake, N.J. (1985). *Intra-organ biochemical transformations associated with oogenesis in the bay scallop, Argopecten irradians concentricus (Say), as indicated by 14 C incorporation*. Biological Bulletin. 168, 39-49.

- Barbosa, A.M.B. (1989). *Variação espaço temporal da abundância e biomassas bacterianas no sistema lagunar Ria Formosa*, Relatório de Estágio do curso de Licenciatura em Biologia Marinha e Pescas, Universidade do Algarve, Faro, 95 p.
- Barile, N.B., Scopa, M., Nerone, E., Mascilongo, G., Recchi, S., Cappabianca, S., Antonetti, L., (2009). *Study of the efficacy of closed cycle depuration system on bivalve molluscs*. Veterinaria Italiana. 45, 555– 566.
- Barnes RSK (1980). *Coastal lagoons. The natural history of have suffered the effects of any 84 unnatural long term dis-a neglected habitat*. Cambridge studies in modern Biology: turbance due to oil pollution from the incident, Cambridge University Press, 106 p.
- Bayne, B.L.; Newell, R.C. (1983). *Physiological energetics of marine molluscs*. In: Saleuddin, A.S.M.; Wilbur, K.M. (eds). The mollusca. Vol. 4. New York: Academic Press. 407-515.
- Bebianno M.J., Géret F., Hoarau P., Serafim M.A., Coelho M.R., Gnassia-Barelli M., Roméo M. (2004). *Biomarkers in Ruditapes decussatus: a potential bioindicator species*. Biomarkers 9 (4- 5): 305-330.
- Beninger, P.G.; Lucas, A. (1984). *Seasonal variations in condition, reproductive activity and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: Tapes decussatus L. (Jeffreys) and Tapes philippinarum (Adams & Reeve)*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 79, 19-37.
- Bettencourt, F. M., (2011). *Avaliação da contaminação fecal da amêijoa-boa (Ruditapes decussatus) e respetiva zona de produção - Ria Formosa - Faro: influência na saúde pública*. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar e Saúde Pública. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Núcleo de Investigação e Formação em Segurança e Qualidade Alimentar, 188 p.
- Bettencourt, F., Matias, D., Soares, F. (2012). *Microbiological monitoring of bivalve molluscs growing areas: a food safety and public health approach*. Aquaculture Europe, 37 (3), 11 – 15.
- Cachola, R.A. (1996). *Viveiros de Amêijoa-boa Ruditapes decussatus da Região Algarvia*, Instituto de Investigação das Pescas e do Mar, Lisboa.
- Cachola, R.A., Campos, C.J.A., (2006). *Redefinição das zonas de produção de bivalves nos sistemas lagunares do Algarve no âmbito do programa de monitorização microbiológica*. Relatórios Científicos e Técnicos, Série Digital, IPIMAR, Lisboa, 37 p.
- Cachola, R.A. (2007). *O SIG como Ferramenta de Apoio na Moluscicultura*, Relatório do Programa Maris, Olhão, 10 p.
- Camacho AP (1980). *Biología de Venerupis pullastra (Montagu, 1803) y Venerupis decussata (Linne, 1767), com especial referência a los factores determinantes de la produccion*. Boletim Instituto. Espanhol de Oceanografia. 5, 43-76.
- Campos, C, Cachola, R., (2007). *Contaminação Microbiana num Porto de Recreio próximo de Viveiros de Bivalves na Ria Formosa*. Relatório do Programa Maris, Olhão, 20 p.
- Castilho, F. (2010). *Controlo de Qualidade de Moluscos Bivalves Vivos*, Monografia, Matosinhos, 32 p.
- Chícharo, L. (1996). *The usefulness of biometric characteristics for the identification of bivalve larvae*. Ciência biológica (Ecology and Systematics).16, 95-109.
- Chu, F. E.; Greaves, J. (1991). *Metabolism of palmitic, linoleic, and linolenic acids in adult oysters, Cmsostrea virginicn*. Marine Biology. 110, 229-236.
- Codex Alimentarius Commission (2003). *Recommended International Code of Practice – General Principles of Food Hygiene*, CAC/RCP 1, ultima atualização em 2003. [consultado em outubro de 2013], Disponível em www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=23.

- Cossu C., Doyotte A., Babut A., Exinger A., Vasseur P. (2000). *Antioxidant Biomarkers in Freshwater Bivalves, Unio tumidus, in Response to Different Contamination Profiles of Aquatic Sediments*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 106-121.
- Cravo, A., (2003). *Avaliação de Efeito das Descargas de Águas Residuais Urbanas na Ria Formosa (DRAOT/UA1g) – Relatório Final - Análises de Maio de 2001 a Dezembro de 2002*, Faro, Universidade do Algarve, 131 p.
- Delgado, M., Pérez-Camacho, A., Labarta, U., Fernández-Reiriz, M.J. (2004). *The role of lipids in the gonadal development of the clam Ruditapes decussatus (L.)*. *Aquaculture*. 241 (1–4), 395-411.
- Derolez, V., Soudant, D., Fiandrino, A., Cesmat, L., Serais, O., (2012). *Impact of weather conditions on Escherichia coli accumulation in oysters of the Thau lagoon (the Mediterranean, France)*. *Journal of Applied Microbiology*. 516 – 525.
- Desmarchelier, P.M., (2000). *Vibrio*. In: Robinson, R., Batt, C., Patel, P. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, USA, 2237 – 2242.
- Despacho n.º 4022/2015, Diário da República, 2.ª série - N.º 78 – de 22 de abril, do Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I. P.
- Deudero, S, Box, A., Tejado, S., Tintoré, J. (2009). *Stable Isotopes and metal contamination in caged marine mussels Mytilus galloprovincialis*. *Marine Pollution Bulletin*, volume 58, 1025-1031 (doi: 10.1016/j.marpolbul.2009.02.011).
- Dionísio, L.P.C., Rheinheimer, G., Borrego, J.J., (2000). *Microbiological pollution of Ria Formosa (South of Portugal)*. *Marine Pollution Bulletin*, 40 (2), 186-193.
- Dionísio, L. A.P.C (1996). *Estudo Microbiológicos da Ria Formosa. Qualidade Sanitária de Águas e Moluscos Bivalves*. Tese de Doutoramento. Universidade de Algarve, Faro, 272 p.
- Donovan, T.J., Gallacher, S., Andrews, N.J., Greenwood, M.H., Graham, J., Russell, J.E., Roberts, D., Lee, R. (1998). *Modification of the standard method used in the United Kingdom for counting Escherichia coli in live bivalve molluscs*. *Communicable Disease and Public Health*, 1 (3), 188-196.
- Farias, M.F., Rocha-Barreira, C.A., Carvalho, F.C.T., Silva, C.M., Reis, E.M.F., Costa, R.A., Vieira, R.H.S.F., (2010). *Microbiological conditions of Tagelus plebeius (Lightfoot, 1786) (Mollusca: Bivalvia: Solecurtidae) and the water in the Ceará river estuary in Fortaleza – CE*. *Boletim do Instituto de Pesca* 36 (2), 135 – 142.
- Ferreira, F. A.G. (1994). *Nutrição Humana*. 2ª Edição. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- Fletcher, A. M. (1989). *Eat Fish, Live Better*. Harper & Row, Publishers, New York. 378 p.
- Furtado A (1991). *Influência do sedimento no crescimento de três espécies de bivalves na fase de pre-engorda*. Relatório de Licenciatura em Biologia Marinha e Pescas, Universidade do Algarve Faro, 45 p.
- Gabbott, P.A. (1976). *Energy metabolism*. In: Bayne, B.L. (Ed.), *Marine Mussels: Their Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge. 29 p.
- Giese, A.C. (1969). *A new approach to the biochemical composition of the mollusc body*. *Oceanography Marine Biology*. 7, 229.3- 335.
- Guelorget O, Mayere C and Amanieu M (1980). *Croissance, biomasse et production de Venerupis decussata et Venerupis aurea dans une lagune méditerranéenne l'étang du Prevot à Palavas (Hérault, France)*. *Vie Marine* 2, 25-38.
- Hackney, C.R., Ray, B., Speck, M.L., (1980). *Incidence of Vibrio parahaemolyticus in and the microbiological quality of seafood in North Carolina*. *Journal Food Protect.* 43, 769–773.
- Hamza-Chaffai A., Pellerin J., Amiard J.C. (2003). *Health assessment of a marine bivalve Ruditapes decussatus from the Gulf of Gabès (Tunisia)*. *Environ. Int.* 28, 609-617.

- ICMSF, (1986). *Microorganisms in Foods*, 2. Sampling for Microbiological Analysis. Principles and Specific Applications, 2nd Edition, Blackwell Scientific Publications, 278 p.
- IPQ (1982) NP 1829 (1ª edição) – “*Microbiologia alimentar. Preparação da amostra para análise microbiológica*”, Instituto Português da Qualidade, Ministério da Economia e Inovação, Lisboa.
- IPQ (1989) NP 2079 (2ª edição) – “*Microbiologia alimentar. Regras gerais para análise microbiológica*”, Instituto Português da Qualidade, Ministério da Economia e Inovação, Lisboa.
- IPQ (1998) NP 4346 (1ª edição) – “*Qualidade da água. Regras gerais para a quantificação de microrganismos em meio de cultura*”, Instituto Português da Qualidade, Ministério da Economia e Inovação, Lisboa.
- Jhaveri, S.N., Karakoltsidis, P.A., Montecalvo, J. and Constatinides, S.M. (1984). *Chemical composition and protein quality of some Southern New England marine species*. Journal of Food Science. 49, 110-113.
- Kay, D., Crowther, J., Stapleton, C.M., Wyer, M.D., Fewtrell, L., Edwards, A., Francis, C.A., McDonald, A.T., Watkins, J., Wilkinson, J., (2008). *Faecal indicator organisms concentrations in sewage and treated effluents*. Water Research. 42, 442–454.
- Kennish, J., (2001). *Practical Handbook of Marine Science*. 3rd ed., CCR Press, Boca Raton 876 p.
- Lhafi, S.K., Kühne, M., (2007). *Occurrence of Vibrio spp. in blue mussels (Mytilus edulis) from the German Wadden Sea*. Int. J. Food Microbiology. 116 pp. 297 – 300.
- Loureiro, V. Ferreira, M.A.S.S. e Malfeito Fereira, M. (2007). *Análise Microbiológica de Alimentos- Manual de Laboratório*, Lisboa, 49 p.
- Lucas A (1968). *Mise en évidence de l'hemaphrodisme juvénile chez Venerupis decussata (L.) (Bivalvia: Veneridae)*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Paris 267, 2332-2333.
- Marin, M.G.; Moschino, V.; Deppieri, M. & Lucchetta, L. (2003). *Variations in gross biochemical composition, energy value and condition index of T. philippinarum from the Lagoon of Venice*. Aquaculture, 219, 859-871.
- Martinez-Manzanares, E., Morinigo M.A., Cornax, R., Egea, F. e Borrego, J. (1991). *Relationships between classical indicators and several pathogenic microorganism's involved in shellfish-borne diseases*. Journal of Food protection 54, 711-717.
- Martin, Y.P., Bonnefont, J.L., (1986). *Conditions de décroissance en milieu marin des bacteries fecales des eaux usees urbaines*. Oceanis 12, 403–418.
- Martins, F., Neves, R., Brito, A., Venâncio, A., (2004). *Análise do impacte das características microbiológicas dos Efluentes Urbanos na Atividade Conquícola da Ria Formosa: Relatório da Tarefa de Modelação da Acumulação de Coliformes em Bivalves*. CCDRAI/IMAR, 37 p.
- Matias, M. A.G. (2013). *Influência da variação sazonal no valor nutricional e avaliação da estabilidade da amêijoia-boa produzida em aquacultura*. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Politécnico de Leiria, 100 p.
- Monserrat JM, Martínez PE, Geracitano LA, Amado LL, Martins CM, Pinho GL, Chaves IS, Ferreira-Cravo M, Ventura-Lima J, Bianchini A (2007). *Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives*. Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicol Pharmacol, 234, 146:221.
- Morinigo, M.A., Cornax, R., Munoz, M.A., Romero, P. e Borrego, J.J. (1989). *Viability of Salmonella species in natural waters*. Current Microbiology. 267-273.
- Neill, M. (2004) *Microbiological Indices for total coliform and E.coli bacteria in estuarine waters*. Marine Pollution Bulletin. 49, 754-760.

- Nettleton, J. A. (1985). *Seafood Nutrition: Facts, Issues and Marketing of Nutrition in Fish and Shellfish*. Osprey Books, Huntington, New York. 26.
- NISQA (2005). *Perigos Alimentares*, Dossier Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar, Monte da Caparica, 228 p.
- Nunes, M.C., (1984). *Ria de Faro-Olhão: Estudo bacteriológico da água*. Cuadernos da Área de Ciências Mariñas, 1, 357-364.
- Nunes, M. L. (2008). *Composição química e Valor nutricional dos Bivalves*, in Silva H.A., Batista I. (Eds.). (2008). Produção, salubridade e comercialização dos moluscos bivalves em Portugal, Publicações avulsas do IPIMAR, Nº20, Lisboa.
- Nunes, M.L, e Campos, C. C. (2008). *Qualidade e Segurança dos Moluscos Bivalves*, INIAP/IPIMAR, Texto de Comunicação, Lisboa, 5 p.
- Ojea, J., Pazos, A.J., Martínez, D., Novoa, S., Sánchez, J.L., Abad, M. (2004). *Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of Ruditapes decussatus in relation to the gametogenic cycle*. Aquaculture. 238, 451-468.
- Orban, E.; Lena, G.; Nevigato, 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, 57-65.
- Orban, E.; DI Lena, G.; Nevigato, T.; Casini, I.; Caproni, R.; Santaroni, G. & Giulini, G. (2006). *Nutritional and commercial quality of the striped venus clam, Chamelea gallina, from the Adriatic sea*. Food Chemistry, 101, 1063-1070.
- Parache, A. (1982) *La Peche maritime*, pp. 496-507.
- Pedro, S., Castilho, M.F. e Silva, H.A., (2008a). *Principais perigos associados aos bivalves; contaminantes microbiológicos; generalidade*. In H. A. Silva & I. Baptista (Eds.), Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal, Publicações avulsas do IPIMAR, Nº20, Lisboa: pp. 74-75.
- Pedro, S., Cachola, M.F. e Sobral, M. (2008b). *Monitorização Sanitária e Classificação das Zonas de Produção*, in Silva, H.A. e Batista, I. (Eds.) Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal, Publicações avulsas do IPIMAR, Nº 20, Lisboa, pp. 102-107.
- Pereira, N. C. (2003). *Diagnóstico da Lagoa da Conceição utilizando o berbigão Anomalocardis brasiliiana (GMELIN, 1791) como bioindicador de poluição aquática*. Dissertação (Mestrado em engenharia ambiental), Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 93 p.
- Pereira P, Pablo HD, Subida DM, Vale C, Pacheco M (2009). *Biochemical responses of the shore crab (Carcinus maenas) in a eutrophic and metal-contaminated coastal system (Obidos lagoon, Portugal)*. Ecotoxicol Environ Saf 72, 1471 – 1480.
- Pérez Camacho, A., Delgado, M., Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U. (2003). *Energy balance, gonad development and biochemical composition in the clam Ruditapes decussatus*. Marine Ecology Progress Series. 258, 133-145.
- Pigott, G.M. and Tucker, B.W. (1990). *Seafood Effects of Technology on Nutrition*. Marcel Dekker, Inc., New York. 41 – 42.
- POPNERF, (2007). Revisão do Plano do Ordenamento do Parque Natural da Ria Formosa
- PROT-Algarve, (2007). *Plano Regional do Ordenamento do Território do Algarve*. Volume III- Elementos Complementares. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do Algarve, 127 p.

- Raveendran, O., Gore, P.S., Iyer, T.S.G., Varma, P.R.G., Sankaranarayanan, V.N., (1990). *Occurrence of enteric bacteria in seawater and mussels along the southwest coast of India*. Indian Journal of Geo-Marine Sciences. 82 – 284.
- Rheinheimer, G., (1992). *Aquatic Microbiology*, fourth ed. Wiley, London.
- Rigotto, C. (2003). *Proposta da utilização de adenovírus como indicadores de contaminação viral humana em ostras de cultivo*. Dissertação de Mestrado (biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina. 116 p.
- Ripabelli, G., Sammarco, M.L., Grasso, G.M., Fanelli, I., Caprioli, A., Luzzi, I. (1999). *Occurrence of Vibrio and other pathogenic bacteria in Mytilus galloprovincialis (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy*. International Journal of Food Microbiology, 49, 43 – 48.
- Royo A., (1986). *Estúdios sobre el cultivo de Ruditapes decussatus (Linné, 1758) (Mollusca, Bivalvia) en la zona intermareal de la provincia de Huelva*. PhD Thesis. University of Sevilla: 298 pp. (In spanish).
- Sargent, J.; Henderson, R. J.; Tocher, D. R. (1988). *The Lipids*. In: Halver, J. E., ed. Fish Nutrition. London: Academic Press, 154 – 218.
- Sasikumar, G., Krishnamoorthy, M., (2010). *Faecal indicators and sanitary water quality of shellfish-harvesting environment: influences of seasonal monsoon and river-runoff*. Indian Journal of Geo-Marine Sciences. 39, 434– 444.
- Sastry, A.N. (1979). *Pelecypoda (excluding Osteidae)*. In: Giese, A.C., Pearse, J.S. (Eds.), *Reproduction of Marine Invertebrates*, vol. 4. Academic Press, New York. 113-292.
- Serdar, S. & A. Lök. (2009). *Gametogenic cycle and biochemical composition of the transplanted carpet shell clam Tapes decussatus, Linnaeus 1758 in Sufa (Homa) Lagoon, Izmir, Turkey*. Aquaculture. 293, 81-88.
- Silva, A.R.R. (2009). *Avaliação das Fontes de Contaminação Fecal em Zona Conquícola de Lisboa e Vale do Tejo*. Tese de Mestrado. Universidade do Algarve, Faro, 99 p.
- Silva, H.A., Costa, P. e Rodrigues, S. (2008). *Morfologia, biologia e Ecologia dos Moluscos Bivalves, in Silva H.A., Batista I. (Eds.). (2008). Produção, salubridade e comercialização dos moluscos bivalves em Portugal, Publicações avulsas do IPIMAR, Nº20, Lisboa*.
- Stegeman, J. J. and Hahn, M.E. (1994). *Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species*. In *Aquatic Toxicology* (ed. D. C. Malins and G. K. Ostrander), Boca Raton: Lewis Publishers, pp. 87-204.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., (1968). *A practical handbook of seawater analysis*. Bull. Fish. Res. Board Can. 167, 311.
- Thompson, C.A., Vanderzant, C., Ray, S.M., (1976). *Relationship of Vibrio parahaemolyticus in oysters, water and sediment and bacteriological indices*. Journal of Food Science. 41, 117– 122.
- Thompson, J.R., Randa, M.A., Marcelino, L.A., Tomita-Mitchell, A., Lim, E., Polz, M.F., (2003). *Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal Vibrio community*. Applied and Environmental Microbiology. 70, 4103 – 4110.
- Vale, P. (2008). *Biotoxinas Marinhas, in Silva, H.A. e Batista, I. (Eds.) Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal, Publicações avulsas do IPIMAR, Nº20, Lisboa, pp. 86-95*.
- Viarengo A., Lowe D., Bolognesi C., Fabbri E., Koehler A. (2007). *The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms*. Comparative Biochemistry and Physiology. C 146, 281-300.

- Vilela, H. (1950). *Vida Betónica de Tapes decussatus L.*, Travaux de la Station de Biologie Maritime de Lisbonne 13, 1-120.
- Volterra, L. (1991). *Comparison of methods for enumeration of fecal in seawater. Development and testing of sampling and analytical techniques for monitoring of marine pollutants*. UNEP, Athens, MAP Technical Reports series. 54, 61-73.
- Wilson, R.P. (2002). *Amino Acids and Proteins*. Fish Nutrition, Thrid Edition. Elsevier Science. USA. 144-179.
- Zonita, I., Apraiz, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Orbea, A., Carcio I., Soto, M., Marigomez, I., Cajaville, M.P. (2007). *Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Meditteranean Sea using mussels as sentinel organism*. Environmental Pollution 148, 236-250
- Zottis, A. A. (2005). *Uso de biomarcadores de estresse oxidativo no diagnóstico ambiental em ostras, Crassostrea gigas e mexilhão, Perna em estações de malacocultura da Ilha de Santa Catarina*. Dissertação (Mestrado de Biotecnologia), Centro de Ciência Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, 124 p.

8 ANEXOS

Anexo I - Meios de cultura e soluções

Para a realização das análises microbiológicas foram utilizados vários meios de cultura, as formulações e modos de preparação encontram-se descritas a seguir.

Meios de cultura usados para determinação do teor de *E. coli*

- ***Caldo de Minerals Modified Glutamate Medium Base***

O caldo de *Minerals Modified Glutamate Medium Base* (MMGB) (OXOID) é um meio de cultura usado na quantificação de coliformes totais e *E. coli*. Este meio contém glutamato de sódio, cloreto de amônia e minerais que são a base do meio para a determinação de coliformes. Este meio contém também lactose que será fermentada pelos microrganismos coliformes com produção de ácido e gás. O meio MMGB preenche os requisitos nutricionais dos microrganismos coliformes e da *E. coli* e permite a técnica da fermentação de tubos múltiplos para determinação dos mesmos.

- ***Meio de Triptona Bilis X- Glucoronídeo***

O meio Triptona Bilis X- Glucoronídeo (TBX) (OXOID) é um meio de cultura seletivo para a determinação e confirmação de *E. coli* nas amostras de amêijoas pela técnica de sementeira em placa. Este meio contém sais biliares que inibem o crescimento de bactérias Gram positivas e um substrato (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-Glucoronidase), que é degradado pela enzima β -D-glucoronidase, produzida pela maior parte das estirpes de *E. coli*, por quebra da ligação do açúcar com o cromogénico. O açúcar é metabolizado pela bactéria e o cromogénico vai-se aglomerar no interior da célula, conferindo a cor azul/esverdeada às colônias de *E. coli*.

Meio de Cultura usado para determinação das bactérias marinhas totais

- ***Agar Triptona de Soja***

O meio de cultura Tryptone Soya Agar (TSA) (OXOID), é um meio não seletivo usado para contagem de microrganismos totais marinhos pela técnica de plaqueamento. É um meio

rico em nutrientes e é adequado para crescimento de microrganismos marinhos presentes nos bivalves.

Meio de Cultura usado para quantificação de *Vibrio* spp

- ***Agar Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose***

O meio de cultura Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose Agar (TCBS) (OXOID) é um meio seletivo para o isolamento de *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus* bem como outros vibrios presentes nas amostras de amêijoas-boas. Este meio contém elevadas concentrações de tiosulfato de sódio e citrato de sódio que proporcionam um pH alcalino para inibir o crescimento de organismos Gram-positivos e suprimir coliformes. O aumento de pH é utilizado para aumentar o crescimento de *V. cholerae*, porque este organismo é sensível a ambientes ácidos. O cloreto de sódio estimula o crescimento do organismo e mantém o equilíbrio osmótico do meio. Por outro lado o tiosulfato de sódio é uma fonte de enxofre, e age com o citrato de ferro produzindo sulfureto de ferro, reagente responsável pelas colônias de cor preta. A sacarose é o carboidrato fermentável e esta fermentação origina um ácido, o qual converte a cor azul de bromotimol azul para cor verde ou amarelo, responsável pela coloração das colônias que permite uma diferenciação dos *Vibrio* spp.

Soluções

- ***Solução de Triptona Sal***

A solução Triptona Sal é a solução usada na preparação da amostra e nas diluições decimais realizadas na determinação de coliformes totais de *E. coli*, de bactérias marinhas totais e *Vibrios*. Esta solução fornece nutrientes essenciais ao crescimento e a sobrevivência dos agentes microbianos.

Anexo II - Anova (fator único) para testar diferenças entre o teor de *E. coli* de Faro-Marchil e de Cacela-VRSA

Foi realizado para testar estatisticamente se existem diferenças significativas entre a *E. coli* de Faro-Marchil e *E. coli* de Cacela-VRSA.

SUMÁRIO				
<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
<i>E. coli</i> Faro	12	25.67638146	2.139698455	0.259213238
<i>E. coli</i> Cacela-VRSA	12	34.27008766	2.855840638	0.371180062

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	3.077157764	1	3.077157764	9.76	0.0049	4.301
Dentro de grupos	6.934326299	22	0.31519665			
Total	10.01148406	23				

Anexo III - Anova (fator único) para testar diferenças entre o teor de *Vibrio* spp. de Faro-Marchil e de Cacela-VRSA

Foi realizado para testar estatisticamente se existem diferenças significativas entre *Vibrio* spp. de Faro- Marchil e *Vibrio* spp. de Cacela-VRSA.

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
<i>Vibrio</i> spp. Faro	12	21.48114354	1.790095295	0.307956856
<i>Vibrio</i> spp. Cacela-VRSA	12	20.8478935	1.737324458	0.204365525

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0.016708567	1	0.016708567	0.065	0.8008	4.301
Dentro de grupos	5.635546193	22	0.256161191			
Total	5.65225476	23				

Anexo IV - Anova (fator único) para testar diferenças entre o teor de Bactérias marinhas totais de Faro-Marchil e de Cacela-VRSA

Foi realizado para testar estatisticamente se existem diferenças significativas entre Bactérias totais marinhas de Faro- Marchil e bactérias totais marinhas de Cacela-VRSA.

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Baterias totais	12	42.74932	3.562443366	0.405828807
Bactérias totais	12	38.77301	3.231084229	0.604884259

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0.658793	1	0.658793267	1.300	0.2658	4.30
Dentro de grupos	11.11784	22	0.505356533			
Total	11.77664	23				

Anexo V – Análise de Componentes Principais (ACP)

Realizada para descrever a correlação entre os parâmetros temperatura e precipitação e a sua relação com o teor de *E. coli*, *Vibrios* e bactérias totais marinhas para os bivalves de Faro-Marchil e Cacela-VRSA.

Faro-Marchil

Model Summary

Dimension	Cronbach's Alpha	Variance Accounted For	
		Total (Eigenvalue)	% of Variance
1	,815	2,874	57,471
2	,094	1,081	21,618
Total	,934 ^a	3,954	79,089

a. Total Cronbach's Alpha is based on the total Eigenvalue.

Component Loadings

	Dimension	
	1	2
Temp	-,942	-,041
Precipitação_média	,780	-,218
Vibrios	-,111	,967
BTM	,833	,309
E_coli	-,820	,023

Variable Principal Normalization.

Cacela- VRSA**Model Summary**

Dimension	Cronbach's Alpha	Variance Accounted For	
		Total (Eigenvalue)	% of Variance
1	,695	2,252	45,047
2	,321	1,346	26,928
Total	,903 ^a	3,599	71,975

a. Total Cronbach's Alpha is based on the total Eigenvalue.

Component Loadings

	Dimension	
	1	2
Temp	-,813	-,281
Precipitação_média	,978	,039
Vibrios	,790	-,233
BTM	-,102	,721
E_coli	-,010	,832

Variable Principal Normalization.

Anexo VI – Teste KMO e teste de esfericidade de Bartlett**Faro-Marchil****KMO and Bartlett's Test**

Kaiser-Meyer-Olkin Measure of Sampling Adequacy.		,686
Approx. Chi-Square		13,676
Bartlett's Test of Sphericity	df	10
Sig.		,188

Cacela-VRSA**KMO and Bartlett's Test**

Kaiser-Meyer-Olkin Measure of Sampling Adequacy.		,429
Approx. Chi-Square		8,221
Bartlett's Test of Sphericity	df	10
Sig.		,607