



**Gil Pereira Gonçalves**

Licenciado em Ciências de Engenharia do Ambiente

**Sistema Biológico de Alerta Precoce de  
Contaminantes nos Estuários:  
desenvolvimento e aplicação no bivalve  
marinho *Mytilus edulis***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do  
Ambiente

Orientador: Prof. Doutora Maria Helena Ferrão Ribeiro da  
Costa, Professora Associada com Agregação, Faculdade de  
Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Coorientador: Doutora Marta Susana Silvestre Gouveia  
Martins, Investigadora do Centro de Ciências do Mar e do  
Ambiente (MARE) e Professora Auxiliar Convidada da  
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de  
Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Maria Helena Ferrão Ribeiro da Costa

Arguente: Prof. Doutor Tomás Augusto Barros Ramos

Vogal: Prof. Doutor Nuno Miguel Ribeiro Videira Costa



**Gil Pereira Gonçalves**

Licenciado em Ciências de Engenharia do Ambiente

**Sistema Biológico de Alerta Precoce de  
Contaminantes nos Estuários:  
desenvolvimento e aplicação no bivalve  
marinho *Mytilus edulis***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do  
Ambiente

Orientador: Prof. Doutora Maria Helena Ferrão Ribeiro da  
Costa, Professora Associada com Agregação, Faculdade de  
Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Coorientador: Doutora Marta Susana Silvestre Gouveia  
Martins, Investigadora do Centro de Ciências do Mar e do  
Ambiente (MARE) e Professora Auxiliar Convidada da  
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de  
Lisboa

**Faculdade de Ciências e Tecnologia da  
Universidade Nova de Lisboa**

**Setembro 2016**



**Sistema Biológico de Alerta Precoce de Contaminantes nos Estuários: desenvolvimento e aplicação no bivalve marinho *Mytilus edulis***

Gil Pereira Gonçalves, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL)

Copyright

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.





## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Maria Helena Costa, como orientadora, por ter acreditado nos meus objetivos, por ter permitido explorar as possibilidades e por todos os conselhos e ânimo que transmitiu durante todo o processo.

À Doutora Marta Martins, como coorientadora que me manteve nos carris de forma a atingir os objetivos pretendidos e insistiu em acompanhar o processo de perto, e ajudando a ultrapassar os entraves encontrados.

À Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL) e ao Centro de Ciências do Mar e do Ambiente (MARE) pela adição dos conhecimentos para a realização desta dissertação, bem como por ter providenciado as infraestruturas e recursos técnicos para a execução deste trabalho.

À restante Equipa do MARE: Ana Rodrigues, Carla Martins, e Cátia Gonçalves, que sempre se demonstraram disponíveis para ajudar e realmente o tiveram de fazer por diversas vezes.

Ao Ricardo Coelho, amigo que me ajudou e acompanhou no início com as “colagens” dos mexilhões e ao David Cardoso, que mesmo estando longe deu o seu apoio.

À minha família: Mãe, Pai, Irmã e à minha namorada Sara Aparício por todo o apoio, não só moral, que me deram.



## Resumo

Os estuários são das massas de água mais sensíveis a contaminação, devido às atividades que deles dependem como agricultura e indústria. A crescente preocupação com a contaminação das massas de água conduziu ao desenvolvimento de diversos sistemas de monitorização da qualidade da água em tempo real, como sejam, os sistemas biológicos de aviso precoce (“Biological Early Warning Systems” (BEWS)). Estes sistemas baseiam-se na deteção de respostas fisiológicas e de comportamento dos organismos. No entanto, alguns demonstraram ser complexos, ao nível da sua construção e/ou utilização.

Nesta dissertação pretendeu-se desenvolver e testar um novo BEWS de baixo custo e com elevada resolução, capaz de detetar alterações do comportamento, nomeadamente, na abertura das valvas de um bivalve marinho quando sujeito à exposição a dois metais geralmente presentes no ambiente. Foi desenvolvido o *hardware* com o uso de sensores de Efeito Hall e ímanes de neodímio e um sistema de *software* para o processamento e efetuar o registo da distância das valvas de forma contínua. Posteriormente, o BEWS desenvolvido foi testado através da realização de experiências laboratoriais utilizando como modelo o mexilhão *Mytilus edulis*, que foram expostos a diferentes concentrações de Cobre (Cu) e Cádmió (Cd). Os mexilhões demonstraram ter diferente sensibilidade para os dois metais, sendo mais sensíveis ao Cu e menos ao Cd. No entanto, após um período de depuração, os organismos recuperaram da exposição a Cu, enquanto o Cd promoveu a diminuição da abertura das valvas ao longo do tempo. O sistema desenvolvido permitiu também detetar variações de temperatura, vibração e luminosidade.

O presente trabalho demonstrou que o sistema BEWS desenvolvido foi eficaz na deteção da presença de diferentes concentrações de Cd e Cu através do movimento das valvas dos mexilhões mostrando assim a sua potencialidade como ferramenta de baixo custo para monitorização da qualidade da água de um sistema estuarino.

**Palavras-chave:** Biological Early Warning System (BEWS), Cádmió (Cd), Cobre (Cu), monitorização, poluição, sistema estuarino



## Abstract

Estuaries are amongst the most sensitive water bodies regarding contamination due to activities that rely on them, like agriculture and industries. The growing concern about the water contamination led to the development of various real time monitoring techniques, such as the use of Biological Early Warning Systems (BEWS). These systems are based on the detection of physiological and behaviour responses of organisms. However, some BEWS have been proved to be complex, in terms of its construction and/or use.

This thesis aimed at the development and test of a new BEWS, capable of monitoring the opening of the bivalve valves in order to relate their behaviour to the exposure of two metals often present in the environment. The hardware was developed using Hall Effect sensors and neodymium magnets, which was complemented by the development of software capable of processing this information and register valves distance continuously. Posteriorly, the developed BEWS were tested in laboratory experiences, exposing the *Mytilus edulis* mussel to Copper (Cu) and Cadmium (Cd). The study revealed a difference in the sensitivity of the organism in the presence of the two metals. Mussels are extremely sensitive to the presence of low concentrations of Cu and less sensitive to the presence of Cd. However, after a depuration period, the organisms recovered from Cu exposure, while the ones exposed to Cd demonstrated a low valve aperture even after a depuration period. The System could also detect variations of temperature, vibration and luminosity.

This study demonstrated that the developed BEWS was effective in detecting the presence of different concentrations of Cd and Cu by the movement of the mussel's valves, thus showing its potential as a low cost tool for water quality monitoring of an estuarine system

Keywords: Biological Early Warning System (BEWS), Cadmium (Cd), Copper (Cu), monitoring, pollution, estuarine system



## Lista de abreviaturas

BEWS – Biological Early Warning System (Sistema Biológico de Alerta Precoce)

Cd – Cádmió

Cu – Cobre

ETA – Estação de Tratamento de Água

ETAR - Estação de Tratamento de Água Residual

ICES – International Corporation for the Exploration of the Seas

LSR – Light Sensitive Resistor

NTC – Negative Temperature Coefficient

PAH – Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos)

PC – Personal Computer

RNA - Ribonucleic Acid

USB – Universal Serial Bus



# Índice Geral

|  |       |
|--|-------|
| Resumo .....                                 | x     |
| Abstract.....                                | xii   |
| Lista de abreviaturas .....                  | xiv   |
| Índice Geral .....                           | xvi   |
| Índice de figuras .....                      | xviii |
| Índice de tabelas .....                      | xx    |
| 1 Introdução .....                           | 1     |
| 2 Material e métodos.....                    | 5     |
| 2.1 Software e Hardware .....                | 5     |
| 2.2 Bioensaios .....                         | 11    |
| 2.2.1 Aclimatização dos organismos.....      | 11    |
| 2.2.2 Calibração.....                        | 12    |
| 2.2.3 Exposição a metais .....               | 12    |
| 3 Resultados .....                           | 15    |
| 3.1 Exposição a Cobre e Cádmio.....          | 15    |
| 3.2 Exposição Cádmio.....                    | 19    |
| 3.3 Exposição a Cobre .....                  | 23    |
| 4 Discussão.....                             | 27    |
| 5 Conclusões e desenvolvimentos futuros..... | 29    |
| Referências Bibliográficas .....             | 30    |



# Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 2.1 Diagrama de fluxo do sistema.....  | 5  |
| Figura 2.2 Fotografia do sistema completo.....  | 6  |
| Figura 2.3 Pré definição de máximos e mínimos.....  | 7  |
| Figura 2.4 Calibração e obtenção da percentagem de abertura.....  | 7  |
| Figura 2.5 Obtenção do valor de abertura.....   | 8  |
| Figura 2.6 Registo de data e hora da última atualização de máximos e mínimos.....   | 8  |
| Figura 2.7 Acionamento do relé com temporizador.....  | 9  |
| Figura 2.8 Módulo de visualização em tempo real.....  | 9  |
| Figura 2.9 Módulos de configuração das placas controladoras.....  | 10 |
| Figura 2.10 Módulo de calibração.....   | 11 |
| Figura 3.1 Variação da percentagem de abertura das valvas dos mexilhões e dos parâmetros físicos registados ao longo do tempo durante o bioensaio de exposição a 1000 µg L <sup>-1</sup> de cobre e 1000 µg L <sup>-1</sup> de cádmio.....  | 17 |
| Figura 3.2 Variação da percentagem de abertura das valvas dos mexilhões e dos parâmetros físicos registados ao longo do tempo durante o bioensaio de exposição a um gradiente de concentração de cádmio (1.5-86 µg L <sup>-1</sup> ). ..... | 21 |
| Figura 3.3 Variação da percentagem de abertura das valvas dos mexilhões e dos parâmetros físicos registados ao longo do tempo durante o bioensaio de exposição a um gradiente de concentração de cobre (30-1000 µg L <sup>-1</sup> ). ..... | 25 |



## Índice de tabelas

|   |    |
|---|----|
| Tabela 2.1 Condições do bioensaio 1 ..... | 12 |
| Tabela 2.2 Condições do bioensaio 2 ..... | 13 |
| Tabela 2.3 Condições do bioensaio 3 ..... | 13 |



# 1 Introdução

Os estuários são dos ecossistemas mais afetados pelas atividades antropogênicas devido à sua importância para o transporte marítimo, as pescas, a agricultura, e, conseqüentemente, por estarem implementadas nestas zonas muitas indústrias e aglomerados populacionais. Desta forma, os estuários tendem a ser reservatórios de contaminantes provenientes destas atividades (por exemplo, através de escorrência de águas dos campos agrícolas e efluentes industriais). Em particular, os sedimentos estuarinos apresentam geralmente elevadas concentrações de contaminantes, como sejam metais pesados e pesticidas. Devido à topografia das bacias hidrográficas e à hidrodinâmica dos estuários, a água tende a ter um tempo de retenção elevado, por vezes dias, permitindo a precipitação de partículas e originando fundos ricos em matéria orgânica. Os contaminantes são “aprisionados” à matriz geoquímica dos sedimentos, adsorvidos à matéria orgânica e partículas finas ou simplesmente dissolvidos na água intersticial. No curso do rio, a montante, a velocidade da água é normalmente elevada para permitir que haja precipitação, sendo estes contaminantes, juntamente com outra matéria orgânica e inorgânica arrastados pelo curso do rio até à entrada do estuário. Aqui, devido à elevada carga iónica e conseqüente aumento das forças de Van der Waals, aquelas partículas tendem a flocular o que facilita a sua precipitação. No entanto, os contaminantes podem ser transferidos para a coluna de água através da ressuspensão dos sedimentos, por exemplo, através de operações de dragagem (Martins et al. 2012). Uma vez na coluna de águas, os contaminantes ficam mais disponíveis para serem assimilados pelos organismos aquáticos e eventualmente causar efeitos nefastos aos mesmos (Martins et al. 2012). As características hidrodinâmicas dos diferentes estuários levam a que a distribuição dos contaminantes seja diferente entre estuários.

A crescente preocupação com a qualidade das massas de água obriga a técnicas de monitorização mais eficientes de modo a garantir a sustentabilidade dos ecossistemas a longo prazo.

A Diretiva Quadro da Qualidade da Água recomenda o uso da biota na avaliação das tendências de contaminação nas massas de água. Os moluscos bivalves são espécies sentinela frequentemente utilizados em monitorização ambiental uma vez que apresentam várias características importantes como sejam, a vasta distribuição, serem muito abundantes, fáceis de amostrar, terem pouca mobilidade e serem económica e ecologicamente importantes. Para além disso, estes organismos são bastante sensíveis aos poluentes e têm a capacidade de os acumular nos seus tecidos (Luna-Acosta et al. 2015). Por serem organismos filtradores, estes tendem a bioacumular contaminantes presentes na coluna de água, sendo muito usados em estudos de efeitos biológicos. São por isso recomendados pela “International Corporation for the Exploration of the Seas” (ICES) (Brooks et al. 2015).

Espécies bioindicadoras, como os mexilhões, podem ser determinantes na identificação de problemas de contaminação através de ensaios bioquímicos (Catherine et al. 2016). São também habitualmente realizadas análises a parâmetros físico-químicos em amostras de água para ajudar na determinação do estado do ecossistema. No entanto, a análise de amostras periódicas não possibilita uma monitorização contínua da massa de água, sendo que a análise de biomarcadores e bioacumulação nos organismos é mais representativa do estado do ecossistema (Martins et al. 2012).

Com o avanço da tecnologia foram disponibilizados ao longo dos anos sensores capazes de monitorizar continuamente parâmetros físico-químicos como temperatura, nitratos, pH, ferro dissolvido, oxigénio, fosfatos, entre outros (Nightingale et al. 2015). Contaminantes como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)) podem também ser monitorizados de forma contínua mas limitada, metais pesados podem ser detetados *in-situ* mas não de forma contínua. (Allan et al. 2006). No entanto, a manutenção deste tipo de sensores acarreta elevados custos e não permite detetar os efeitos associados às sinergias e antagonismos resultantes da mistura de contaminantes e apenas refletem variações locais em pequenos espaços de tempo. Foram por isso

desenvolvidos Sistemas Biológicos de Alerta Precoce (Biological Early Warning Systems (BEWS)) (Bae and Park 2014).

Em 1900 foram feitas experiências que consistiam na observação direta da taxa de batimento opercular de peixes e observação do comportamento em cardume, procurando movimentos característicos para diferentes fatores ambientais. Só a partir de 1950 começou a ser possível medir a atividade de organismos, com técnicas quantitativas recorrendo ao uso de tecnologia disponível no momento (Bae and Park 2014).

Ainda segundo Bae and Park, (2014) a partir de 1980 e com a ajuda de sistemas informáticos, tornou-se possível interpretar o comportamento de organismos vivos associando os padrões de comportamento a distúrbios no ecossistema de forma contínua, a custo reduzido e extremamente eficaz em comparação com sensores físico-químicos. Foram desenvolvidos diversos sistemas recorrendo ao uso de diferentes organismos como bactérias, algas, peixes, crustáceos e bivalves.

O funcionamento destes sistemas baseados em bivalves assenta na tendência que os bivalves têm a fechar as valvas como forma de escapar a uma ameaça externa, inclusive alguns contaminantes (Bae and Park 2014).

Os primeiros BEWS a recorrer ao uso de bivalves apareceram no início da década de 90, entre eles o “Musselmonitor®” e mais tarde o “Dreissena-Monitor” (Bae and Park 2014). O primeiro cria um campo magnético numa das valvas e lê esse campo magnético na segunda valva através de duas bobines, uma em cada valva, calculando depois a percentagem de abertura das mesmas (Kramer et al. 1989). O segundo faz uso de interruptores Reed, pequenos interruptores capazes de fechar um circuito elétrico quando na presença de um íman, informando se o bivalve se encontra fechado ou aberto (Borcherding 2006). Existem também testes efetuados com um sistema semelhante ao “Dreissena-Monitor”, usando também interruptores Reed utilizando a espécie *Pinna Nobilis*, cujo comprimento da concha pode chegar a um metro. Este sistema pode distinguir entre aberto, semiaberto ou fechado (García-March et al. 2008).

De acordo com Bae and Park, (2014) são quatro as principais características aconselhadas para um BEWS:

- a) Baixo custo do sistema completo capaz de resposta rápida e precisa;
- b) Fácil de operar e baixo custo de manutenção;
- c) Passíveis de serem utilizados em mais que uma aplicação;
- d) Fácil aquisição dos organismos, de preferência endêmicos.

Estes autores referem ainda outros fatores relativamente a BEWS, como a necessidade de continuar o desenvolvimento destes sistemas de monitorização, principalmente a maneira como são tratados os dados, normalmente extensivos, provenientes da monitorização contínua. Ou mesmo a necessidade de validar repetitivamente os dados obtidos em campo com testes em laboratório.

Os BEWS com bivalves têm sido aplicados na monitorização da água em estações de tratamento de água (ETA), sistemas de distribuição de água, efluentes de estações de tratamento de água residual (ETAR) (Bae and Park 2014). Existem também testes realizados em rios para deteção de descargas ilegais (Kramer and Foekema 2001). Em nove localizações diferentes do rio Reno, estão em operação diversos BEWS de uma só espécie em conjunto com monitorização físico-química de forma a validar os alarmes gerados por estes sistemas (Bae and Park 2014). Na Bélgica foi testado um BEWS que fazia uso do mexilhão *Dreissena polymorpha* durante dez semanas, onde foram detetados diversos alarmes, alguns deles deliberadamente provocados para o estudo. O sistema estava instalado numa recente bacia artificial para recolha de água para consumo (Kramer and Foekema 2001). Pelo menos dois incidentes relativos a descargas ilegais em rios foram detetados pelo BEWS “Dreissena-Monitor” e mais tarde validados com testes em laboratório: No rio Reno, em 1994, onde através da posterior identificação das substâncias presentes em amostras de água foi possível concluir qual a empresa responsável pela contaminação e a segunda no rio Elba onde alarmes foram gerados pelo sistema consistentemente durante os fins-de-semana a uma determinada hora da manhã. No entanto não foi possível concluir a origem das substâncias contaminantes (Borcherding 2006). Relativamente

ao uso de BEWS em estuários especificamente não foi encontrada nenhuma referência, no entanto, muitos dos organismos testados encontram-se também em estuários.

Uma vez que estes dois sistemas podem ser complexos de implementar devido à tecnologia que usam ou carecer da resolução de resposta necessária para conclusões mais relevantes em monitorização, tentou-se juntar a simplicidade de tecnologia existente ao princípio utilizado por estes sistemas.

O principal objetivo do presente trabalho é desenvolver um novo sistema BEWS de baixo custo e com elevada resolução, capaz de detetar alterações do comportamento, nomeadamente, na abertura das valvas do bivalve marinho, *Mytilus edulis* (mexilhão), quando sujeito à exposição a dois metais geralmente presentes no ambiente. De forma a ser atingido este objetivo foram desenvolvidas quatro importantes tarefas:

- a) Desenvolvimento do *software* e parte do *hardware*,
- b) Construção do protótipo BEWS
- c) Avaliação da performance do protótipo BEWS desenvolvido em condições controladas.
- d) Avaliação da resposta comportamental do mexilhão *Mytilus edulis* à exposição a Cádmio (Cd) e Cobre (Cu) em condições controladas.

Foi utilizado o mexilhão *Mytilus edulis* como organismo modelo para os ensaios laboratoriais, uma vez que é um filtrador e é considerado um organismo sentinela usado frequentemente em bioensaios em laboratório e *in-situ* pela sua sensibilidade (Arnold et al. 2009). Esta espécie é também regularmente utilizada para avaliar o estado dos ecossistemas em águas salobras (Höher et al. 2013)). É sugerido ainda que o *stress* causado por toxicidade possa alterar o metabolismo dos mexilhões, o qual se espera seja refletido no seu comportamento (Yeung et al. 2016).



## 2 Material e métodos

### 2.1 Software e Hardware

O sistema de Software foi criado de forma a permitir a comunicação entre o mundo físico (*hardware*), ou seja, as placas controladoras e o mundo digital, representado pelo computador, onde o utilizador pode visualizar a informação desejada de forma intuitiva (Figura 2.1).

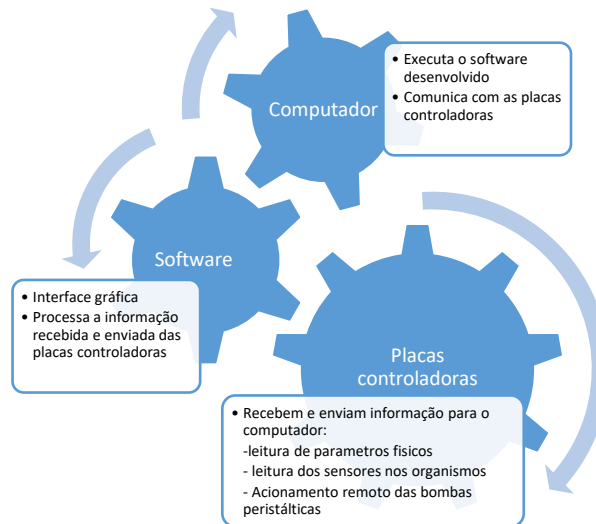


Figura 2.1 Diagrama de fluxo do sistema

O sistema responsável pela monitorização contínua foi construído a partir de duas placas controladoras, uma baseada no microcontrolador ATmega328 (14 entradas/saídas digitais e 6 entradas analógicas) e outra baseada no microcontrolador ATmega2560 (54 entradas/saídas digitais e 16 entradas analógicas). Estas duas placas foram posteriormente conectadas via USB a um computador (PC) onde foi executado um programa capaz de processar a informação recebida e enviada das placas.

A placa baseada no microcontrolador ATmega328 continha os sensores de temperatura, luminosidade e de vibração, bem como os controlos remotos das bombas peristálticas responsáveis pela introdução das soluções dos contaminantes nos bioensaios. Para o sensor de temperatura foi utilizado um termistor do tipo NTC (*Negative Temperature Coefficient*) conectado a uma das entradas analógicas. O sensor de vibração utiliza uma pequena placa controladora onde um potenciómetro regula a sensibilidade da deteção de som ou vibração por parte de um microfone, sendo esta placa conectada a uma entrada digital. O sensor de luminosidade utiliza uma foto resistência do tipo LSR (*Light Sensitive Resistor*) conectada a uma entrada analógica. Para o controlo remoto das bombas peristálticas foi usado um relé de 5V conectado a uma das saídas digitais da placa com um circuito paralelo de 220V onde se encontravam conectadas estas bombas.

A placa baseada no microcontrolador ATmega2560 foi somente responsável pela leitura analógica dos sensores ratiométricos lineares de efeito Hall A1302 conectados aos organismos. Este sensor contém três pinos, dois para alimentação de 5V e o terceiro de tensão de saída, sendo este conectado às entradas analógicas. Este sensor é sensível a campos magnéticos e a tensão de saída varia consoante a variação do campo magnético.

Às placas controladoras foram também ligados diversos cabos através de ligações do tipo Dupont para conexão em *breadboard*. Na outra ponta do cabo, soldado e revestido com cola epóxi

encontrava-se o sensor A1302 que iria depois ser colado a uma das valvas do organismo. Na outra valva seria colado com a mesma cola, um íman de neodímio cilíndrico com 5 mm de altura e 5 mm de diâmetro. O movimento das valvas foi assim medido através da variação da tensão de saída do sensor e do campo magnético deste íman sendo posteriormente enviada a informação para o computador e processada pelo *software*.

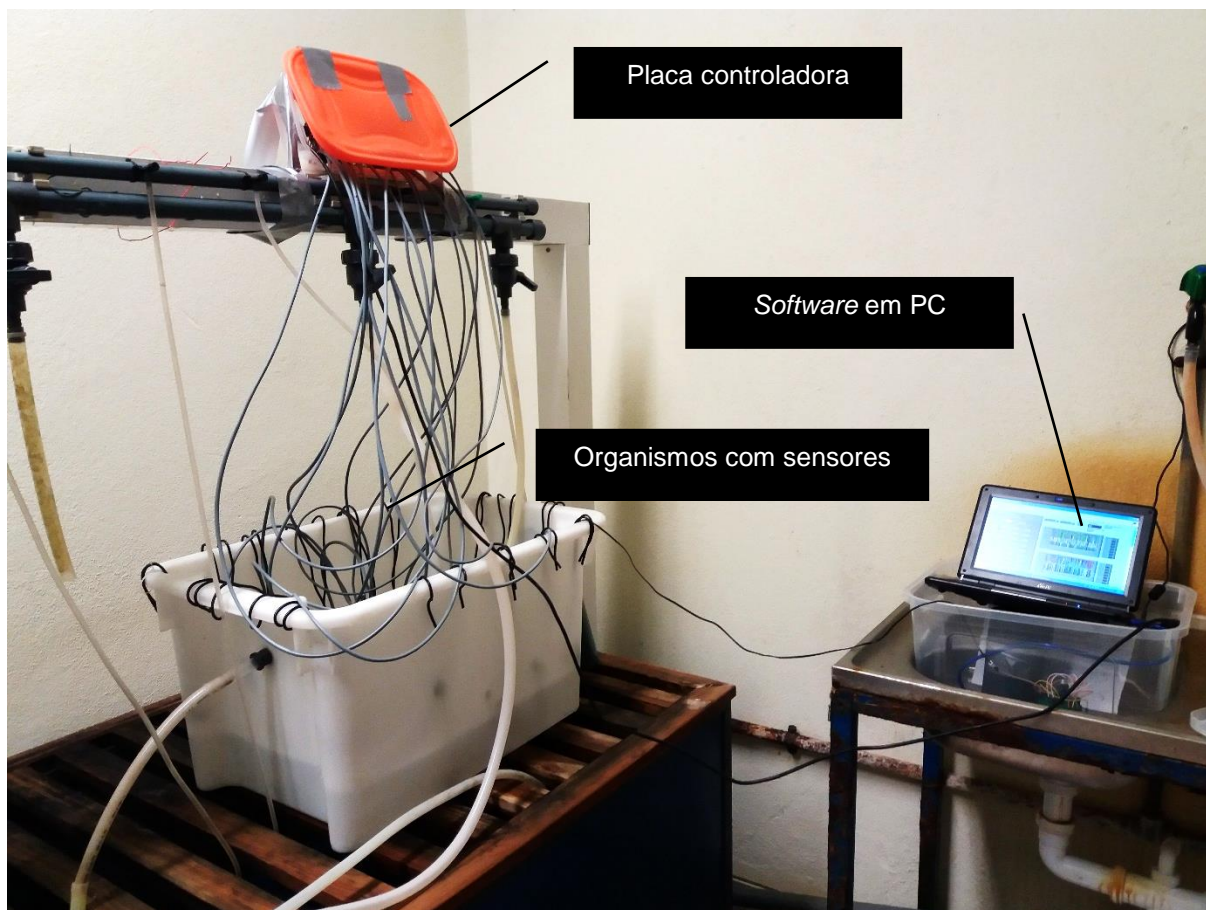


Figura 2.2 Fotografia do sistema completo

Para criação *do software* foi escolhida a ferramenta da National instruments - Labview 2015 Student Edition devido à possibilidade de criar uma interface gráfica e intuitiva e, ao mesmo, tempo facilitar a comunicação entre o computador e as duas placas controladoras acima referidas.

A calibração do sistema é iniciada ao pressionar um botão virtual na interface do operador, quando pressionado, os valores máximos de abertura são definidos como "0" e os valores mínimos são definidos como "10" (Figura 2.3), desta maneira, o programa inicia a comparação lendo o valor do sensor de cada organismo, que será sempre maior que "0" e sempre menor que "10", pois em teoria a tensão de saída do sensor A1302 varia de 0 a 2,5 V para uma polaridade magnética e de 2,5 a 5V para a outra polaridade. Na Figura 2.4 é apresentada a lógica da comparação dos valores dos diferentes canais analógicos, cada um referente a um sensor.

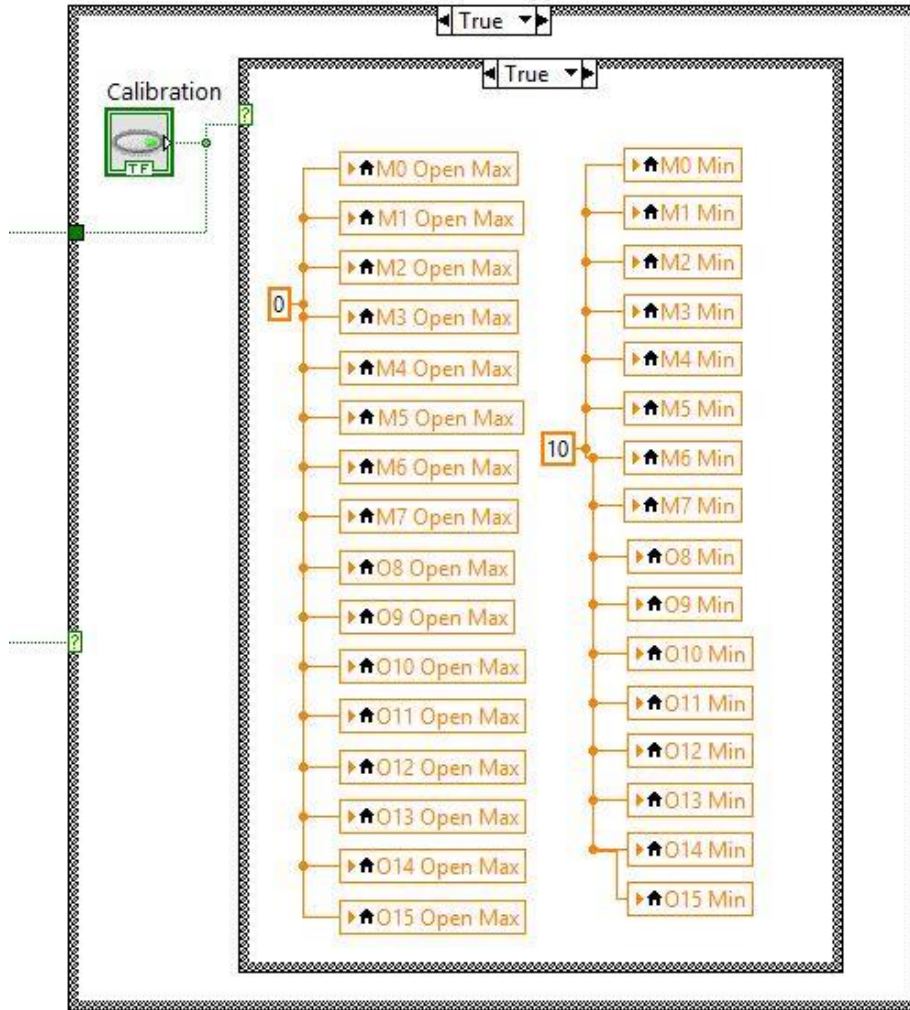


Figura 2.3 Pré definição de máximos e mínimos

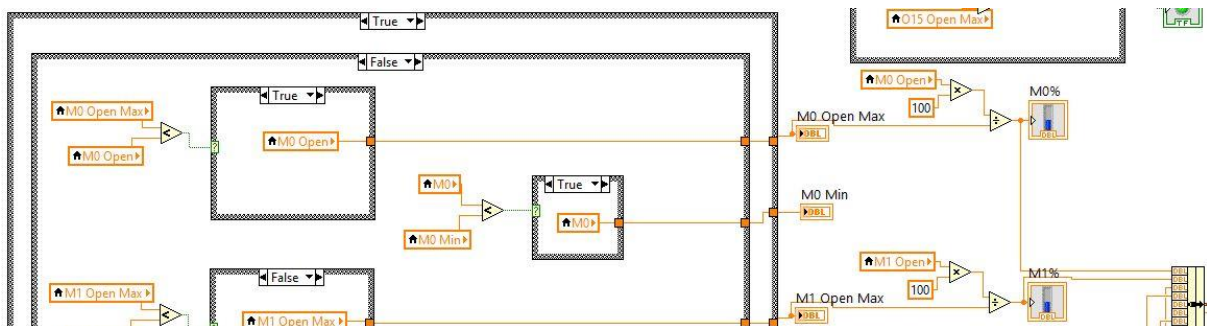


Figura 2.4 Calibração e obtenção da percentagem de abertura

Durante o modo calibração automática com tempo pré definido, o programa encontra-se dentro do *loop IF* interior (Figura 2.4), (representado por uma caixa e atual estado binário “False”) que quando “False” executa o excerto de código do lado esquerdo da mesma figura. Tomando como exemplo a leitura de M0, a execução compara inicialmente se o valor máximo registado é menor que o valor de abertura atual, se tal for verdade, esse valor de abertura passa a ser o novo máximo, sendo atualizado a cada iteração do programa, se tal não se verificar, o valor máximo registado manter-se-á o mesmo. Seguidamente o código efetua de forma semelhante a comparação para o valor mínimo registado, ou seja, se o valor de abertura atua é menor que o mínimo registado, então este passa a ser o novo mínimo. Quando o tempo de calibração termina, o estado binário contrário leva a que o *loop IF* interior seja “True”, o que tem como implicação os valores de máximo e mínimo serem agora fixos.

Posteriormente é feita a execução do próximo passo, lado direito da Figura 2.4, onde o valor máximo de abertura, é comparado com a abertura atual que já contempla a amplitude da diferença do mínimo (Figura 2.5) e através de uma regra de três simples é transformado em percentagem de abertura.

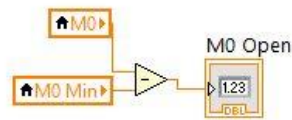


Figura 2.5 Obtenção do valor de abertura

O *loop IF* exterior, apresentando condição binária “True”, ainda na Figura 2.4, faz a distinção do modo automático de calibração e do modo manual. Quando em modo manual, os valores de máximo e mínimo são introduzidos pelo operador, passando o passo de calibração e passando diretamente à comparação desses valores com a abertura atual.

Na Figura 2.6, é apresentado o código que permite o registo da data e hora de última atualização dos valores referentes a cada sensor durante a calibração:

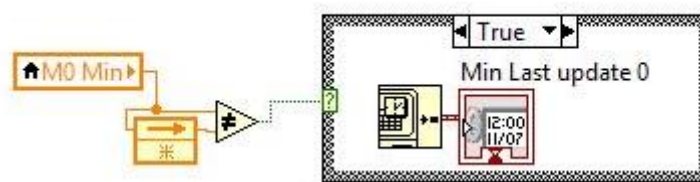


Figura 2.6 Registo de data e hora da última atualização de máximos e mínimos

Uma vez que os valores de máximo e mínimo só atualizam num sentido crescente e decrescente respetivamente, uma simples comparação do valor atual com o último valor registado permite ativar um *Loop IF* (Figura 2.6), que se “True” leva a que a data e hora dessa ocorrência fique registada e seja apresentada na interface do operador, caso contrário não faz nenhuma atualização.

Para o controlo das bombas peristálticas responsáveis pela contaminação remota nos bioensaios, foi criado um *loop IF* (Figura 2.7) que quando acionado com um valor predeterminado de tempo faz uma contagem decrescente, no fim da qual muda o estado binário de uma das saídas digitais para “True”, fazendo com que um relé fechasse o circuito paralelo de 220V no qual se encontravam as respetivas bombas peristálticas.

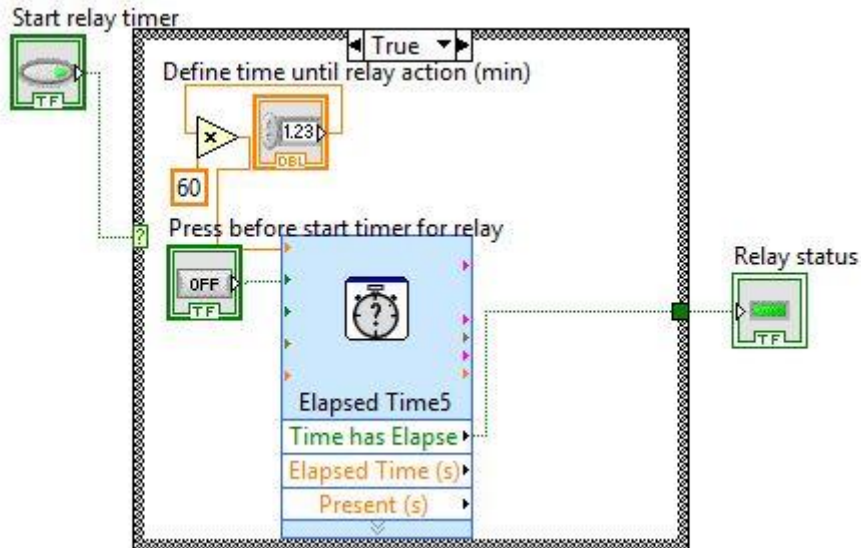


Figura 2.7 Acionamento do relé com temporizador

A interface do *software* dividiu-se em três módulos distintos mas interligados:

- Módulo de visualização em tempo real,
- Módulo de configuração do sistema
- Módulo de calibração

**Módulo de visualização em tempo real:**

Neste módulo é possível observar individualmente cada organismo através de um gráfico em tempo real, temperatura, Intensidade da luz, vibração e indicação do estado do sensor (Figura 2.8).



Figura 2.8 Módulo de visualização em tempo real

Gráfico em tempo real: São usados dois mostradores, sendo um relativo a 8 dos 16 organismos e o segundo relativo aos restantes 8. A letra “M” distingue os primeiros 8 e cada organismo conectado é identificado pela letra e número da entrada analógica da placa controladora, o mesmo se passa para o segundo mostrador identificado com a letra “O”. Cada mostrador apresenta 8 linhas, cada uma representa a abertura de um organismo sendo 0% considerado fechado e 100% considerado totalmente aberto.

Temperatura: Indicação da temperatura em graus celsius.

Intensidade luminosa: Varia entre 0 e 100, no entanto não tem unidades, uma vez que são valores da variação de uma foto-resistência, servem principalmente para indicar se houve alteração da luminosidade ao longo do tempo.

Vibração: Esta variável é lida digitalmente, sendo binária, no entanto, para ser de fácil leitura no mesmo gráfico de abertura dos organismos, apresenta os valores 0 e 80. O valor 80 é apresentado durante tempo determinado em segundos após a deteção, tal serve para garantir a visualização do evento por parte do utilizador e garantir mais tarde a visibilidade do evento num gráfico com registos intervalados.

Estado do sensor: De modo a visualizar facilmente se os organismos ou o sensor apresentam problemas, foi criado um sistema de cores (vermelho e verde) para indicar se o organismo se encontra vivo ou se se encontra morto/sem o sensor, no entanto só entra em funcionamento depois de feita a calibração, indicando vermelho caso o valor de abertura ultrapasse o máximo alguma vez registado, pois quando os bivalves morrem as valvas abrem consideravelmente mais do que o máximo aberto quando vivos, sendo a mesma situação no caso de o sensor descolar da válvula do bivalve. Caso os valores recebidos se encontrem dentro do normal calibrado então é apresentada a cor verde.

Módulo de configuração do sistema: Nestes módulos o utilizador configura as placas controladoras de modo a estabelecer a comunicação com o computador e consequentemente o *software* (Figura 2.9).

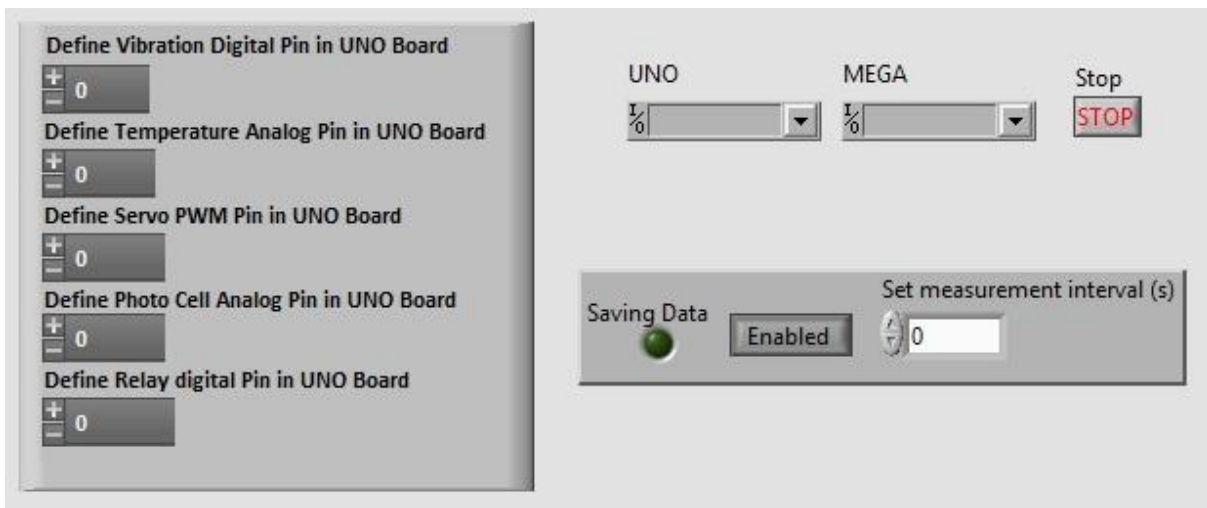


Figura 2.9 Módulos de configuração das placas controladoras

Definição dos pinos: O valor refere-se ao número do pino ao qual está ligado o respetivo sensor

Definição da porta COM das placas controladoras: O utilizador deve definir que porta COM corresponde à placa controladora UNO (ATmega328) e que porta corresponde à placa MEGA (ATmega2560)

Guardar os dados em folha de dados: O utilizador pode aqui definir os intervalos de medição em segundos, bem como desativar ou ativar a gravação dos dados para um diretório previamente definido em diferentes formatos.

## Módulo de calibração:

Módulo onde o utilizador pode configurar a calibração ou inserir valores de organismos pré-calibrados (Figura 2.10).

Figura 2.10 Módulo de calibração

**Calibração automática:** Separador onde o utilizador define por quanto tempo deve ser feita a calibração, os valores máximos e mínimos registados vão sendo atualizados durante esse tempo. Pode ser visualizado o tempo decorrido desde o início da calibração. No final do tempo de calibração espera-se que o valor mínimo registado corresponda ao valor lido pelo sensor quando o organismo se encontra completamente fechado e o valor máximo corresponda ao valor lido quando o organismo se encontra no seu máximo de abertura.

**Calibração manual:** Neste caso é apresentada uma tabela semelhante à que mostra os valores máximos e mínimos de cada organismo na qual o utilizador deve introduzir valores correspondentes a organismos pré-calibrados. Tal opção permite ter diversos organismos em espera para poder prosseguir com a monitorização sem esperar o tempo para calibração dos mesmos.

**Última atualização:** Nestas tabelas ficam registadas as datas e hora a que cada valor foi atualizado por último, tal permite estimar o tempo mínimo necessário para calibração.

## 2.2 Bioensaios

### 2.2.1 Aclimatização dos organismos

Aproximadamente 150 mexilhões *Mytilus Edulis* foram recolhidos na zona costeira de Aljezur (SO Portugal) uma zona considerada pouco impactada por poluentes ambientais (Serafim et al. 2013). Os organismos foram aclimatizados em condições laboratoriais durante 4 semanas antes do início dos bioensaios, com recirculação de água salgada e arejamento constante. Os parâmetros temperatura e salinidade foram monitorizados diariamente e a alimentação foi exclusivamente feita com a microalga *Isochysis galbana* uma vez por dia, salvo exceções durante os bioensaios.

## 2.2.2 Calibração

Previamente à realização dos bioensaios foram colados os sensores e os ímanes nas valvas de cada mexilhão. Após a secagem da cola, os organismos, foram colocados novamente nos tanques de aclimatização, distanciados uns dos outros de forma garantir que não ocorressem interferências entre os sensores. Deu-se início ao sistema no modo de calibração automática. Cada valor de abertura foi registado a cada iteração do programa e, o sistema, através da programação definida (ver Calibração e obtenção da percentagem de abertura (Figura 2.4)) foi constantemente atualizando os valores máximos e mínimos de abertura do mesmo organismo – calibração. Os organismos foram calibrados por um mínimo de 60h. Este tempo de calibração foi estimado tendo em conta a atualização dos valores mínimos e máximos no sistema.

## 2.2.3 Exposição a metais

Foram realizados 3 bioensaios independentes utilizando como organismo modelo o mexilhão *Mytilus edulis*. Foram testadas as respostas comportamentais dos organismos (variação da abertura das valvas) na presença de diferentes concentrações de dois metais, o cobre (Cu) e o cádmio (Cd), geralmente encontrados em sedimentos estuarinos (Yeung et al. 2016). Estes metais foram selecionados tendo em conta a sua relevância ambiental enquanto potenciais poluentes e, ao mesmo tempo, por serem detentores de características toxicológicas distintas. O cobre é um metal essencial para funções fisiológicas do mexilhão e por isso pode constituir um estímulo à atividade metabólica dos organismos em concentrações pouco elevadas. No entanto, em concentrações elevadas pode tornar-se tóxico para os organismos (Smith 2008).

O cádmio é um metal pesado, tóxico para os organismos, mesmo em concentrações baixas (Pytharopoulou et al. 2013).

Os bioensaios foram realizados em condições de temperatura, salinidade e luminosidade controladas. A introdução dos contaminantes no sistema foi efetuada remotamente através de bombas peristálticas, de forma a evitar qualquer perturbação devido a ruído ou sombras resultantes da movimentação do operador na sala. As soluções de ensaio foram preparadas com água ultra pura a partir de uma solução *stock* de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Cu e Cd), recorrendo a material de vidro descontaminado.

Os organismos foram alimentados antes da exposição aos contaminantes de modo a promover a abertura das valvas e nos testes de maior duração foram também alimentados em intervalos diferentes. Foram efetuadas mudanças de água totais durante os bioensaios de forma a serem garantidas as condições físico-químicas da água e para promover períodos de depuração dos organismos e posterior avaliação comportamental.

### Bioensaio 1 - Exposição a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd

Oito organismos previamente calibrados foram distribuídos por 8 gobelés que continham 1 L de água salgada e arejamento constante. Posteriormente e através de uma bomba peristáltica quatro réplicas foram contaminadas com 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Cu e quatro com 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Cd (Tabela 2.1). Após 4 horas da contaminação foi efetuada a mudança de água. O bioensaio teve a duração de 34 horas.

Tabela 2.1 Condições do bioensaio 1

| Bioensaio | Nº de organismos | Identificação do indivíduo | Contaminantes | Dia | Hora de contaminação | Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) |
|-----------|------------------|----------------------------|---------------|-----|----------------------|---------------------------------------|
| 1         | 3                | M3, M4, M6                 | Cu            | 1   | 11:51                | 1000                                  |
|           | 3                | O8, O9, O12                | Cd            |     | 11:51                | 1000                                  |

Durante o bioensaio foram registados a cada 15 segundos os valores de, temperatura, ocorrência de vibração, alteração de luminosidade, e os valores de abertura dos organismos. Segundo Smith, (2008), em testes com a espécie de mexilhão *Perna canaliculus*, a concentração de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Cu causa a mortalidade 100% ao fim de três dias, e a concentração de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Cd tem efeitos significativos para o mexilhão.

Bioensaio 2 - Exposição a duas concentrações de Cd (9 e 86 µg L<sup>-1</sup>)

Oito organismos previamente calibrados foram colocados num aquário de 12 L contendo divisões interiores em rede plástica de modo a prevenir possíveis interferências entre os diferentes sensores. Os organismos foram expostos a duas concentrações de Cd: 9 µg L<sup>-1</sup> e 86 µg L<sup>-1</sup> com um intervalo de 5h (

Tabela 2.2). Após 3 horas da primeira contaminação foi mudada a água e passados cerca de 40 minutos foi feita a contaminação da água com 86 µg L<sup>-1</sup>. O bioensaio teve a duração total cerca de 24 horas.

Tabela 2.2 Condições do bioensaio 2

| Bioensaio | Nº de organismos | Identificação do indivíduo           | Contaminantes | Dia | Hora de contaminação | Concentração (µg L <sup>-1</sup> ) |
|-----------|------------------|--------------------------------------|---------------|-----|----------------------|------------------------------------|
| 2         | 8                | O8, O9, O10, O11, O12, O13, O14, O15 | Cd            | 1   | 14:51                | 9                                  |
|           |                  |                                      |               |     | 19:40                | 86                                 |

Uma vez mais foram registados a cada 15 segundos os valores de temperatura, ocorrência de vibração e alteração de luminosidade assim como os valores de abertura das valvas de cada organismo. Segundo Kraak et al., (1992), uma concentração de 9 µg/L afeta a taxa de filtração sem afetar a sobrevivência do mexilhão da espécie *Dreissena polymorpha*, embora seja uma espécie diferente, foi por essa razão escolhida tal concentração de Cd.

Bioensaio 3 - Exposição a um gradiente de concentração de Cu (30-1000 µg L<sup>-1</sup>)

Foram escolhidos 8 organismos para exposição a um gradiente de concentração de Cu entre os 30 e os 1000 µg L<sup>-1</sup> (Tabela 2.3).

A exposição foi cumulativa de hora à hora durante 8 horas, sendo que a primeira exposição foi de 30 µg L<sup>-1</sup>, a segunda foi de 50 µg L<sup>-1</sup> e até à sexta hora novamente 30 µg L<sup>-1</sup> perfazendo um total de concentração de 240 µg L<sup>-1</sup> em cada gobelé. A estes foram adicionados nas duas horas seguintes 240 µg L<sup>-1</sup> e 250 µg L<sup>-1</sup> aumentando a concentração de cada gobelé para 750 µg L<sup>-1</sup>. Em seguida foi mudada a água e os organismos depuraram por 21 horas, sendo novamente expostos a 250 µg L<sup>-1</sup> no segundo dia do bioensaio. Foi novamente efetuada mudança de água permitindo aos organismos depurar por mais 21 horas e finalmente expostos à última concentração de 1000 µg L<sup>-1</sup> no terceiro dia do bioensaio. O ensaio teve a duração total de 63 horas.

Tabela 2.3 Condições do bioensaio 3

| Bioensaio | Nº de organismos | Identificação do indivíduo | Contaminantes | Dia | Hora de contaminação | Concentração (µg L <sup>-1</sup> ) |
|-----------|------------------|----------------------------|---------------|-----|----------------------|------------------------------------|
| 3         | 6                | M0, M1, M2, M4, M5, M6     | Cu            | 1   | 09:47                | 30                                 |
|           |                  |                            |               |     | 10:47                | +50                                |
|           |                  |                            |               |     | 11:49                | +30                                |
|           |                  |                            |               |     | 12:47                | +30                                |
|           |                  |                            |               |     | 13:50                | +30                                |
|           |                  |                            |               |     | 14:48                | +30                                |
|           |                  |                            |               |     | 15:47                | +30                                |
|           |                  |                            |               |     | 16:47                | +30                                |
|           |                  |                            |               |     | 17:47                | +240                               |
|           |                  |                            |               |     | 18:47                | +250                               |
|           |                  |                            |               | 2   | 11:40                | +250                               |
|           |                  |                            |               | 2   | 16:00                | 500                                |
|           |                  |                            |               | 3   | 14:05                | 1000                               |

\*O símbolo "+" implica ser cumulativo ao anterior.

À semelhança dos bioensaios anteriores, foram registado em intervalos de 15 segundos os valores de temperatura, ocorrência de vibração e alteração de luminosidade e os valores de abertura de cada organismo. Os valores cumulativos pretendem simular um aumento gradual da concentração de Cu, como se esperaria numa situação de monitorização real durante um acidente de descarga industrial por exemplo.



## 3 Resultados

### 3.1 Exposição a Cobre e Cádmiio

Devido a problemas nos sensores foram retirados 2 dos organismos.

Imediatamente após a exposição a Cd, os organismos apresentaram um comportamento individual diferente, observando-se simultaneamente, tanto a diminuição da abertura das valvas, como a não alteração do seu comportamento (Figura 3.1 (A)). Por outro lado, é possível observar na Figura 3.1 (B), o fecho imediato de todos os organismos imediatamente após serem expostos a  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cu (sombreado vermelho). As variações entre indivíduos foram observadas durante todo o bioensaio. No entanto, através das médias dos registos de variação de abertura das valvas (Figura 3.1 (C)) pode-se observar uma clara diferença de comportamento dos mexilhões quando expostos a dois metais diferentes: fecho abrupto das valvas dos organismos expostos a Cu em comparação com a ausência de qualquer reação imediata por parte dos organismos expostos a Cd. Esta diferença manteve-se até à mudança de água. Após a renovação da água verificou-se um aumento dos valores de abertura das valvas dos mexilhões expostos a Cu atingindo valores superiores aos mexilhões expostos a Cd que, por sua vez, mantiveram o mesmo padrão comportamental anterior. Durante o período de depuração (18h), os valores de abertura das valvas voltaram a atingir os valores verificados antes da contaminação com estes contaminantes. Os valores de temperatura variaram entre 16 e 17 °C ao longo do bioensaio, não se tendo encontrado qualquer relação com os períodos de contaminação ou mudança de água (Figura 3.1 (D)). Os registos de vibração foram constantes tendo apenas sido detetados alguns picos por volta das 11:20 e na altura da renovação da água. Não existiram alterações bruscas de luminosidade.



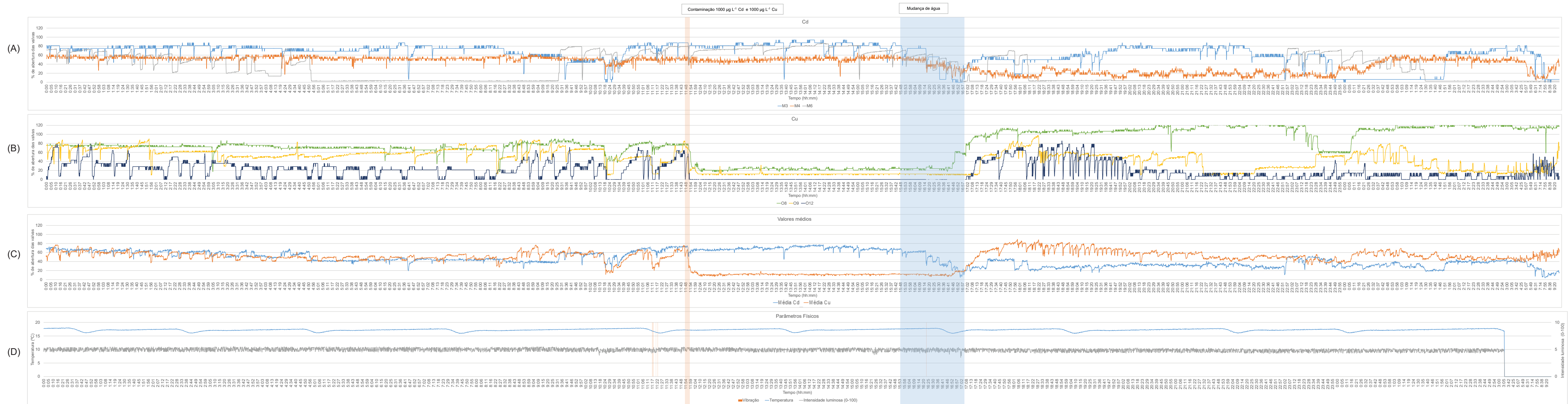


Figura 3.1 Variação da percentagem de abertura das valvas dos mexilhões e dos parâmetros físicos registados ao longo do tempo durante o bioensaio de exposição a 1000 µg L<sup>-1</sup> de cobre e 1000 µg L<sup>-1</sup> de cádmio.

(A) Percentagem (%) de abertura das valvas dos mexilhões (por indivíduo) expostos ao longo do tempo a 1000 µg L<sup>-1</sup> de Cd;

(B) Percentagem (%) de abertura das valvas dos mexilhões (por indivíduo) expostos ao longo do tempo a 1000 µg L<sup>-1</sup> de Cu;

(C) Média das percentagens (%) de abertura das valvas dos organismos expostos a 1000 µg L<sup>-1</sup> de Cu e 1000 µg L<sup>-1</sup> de Cd

(D) Registo da Temperatura (°C), vibração e alteração da luminosidade ao longo do tempo de exposição.

Sombreado vermelho indica o intervalo durante o qual se deu a contaminação, o sombreado azul indica o intervalo durante o qual se efetuou a mudança de água.



### 3.2 Exposição Cádmio

Foram eliminados dois organismos deste ensaio devido a problemas com os sensores. Os valores de O13 foram substituídos pela média dos restantes durante um período de 4h, tal deveu-se a um erro de inserção dos valores de calibração, no entanto a informação obtida nos períodos de correto funcionamento foi utilizada.

Na Figura 3.2 (A) é possível observar-se um decréscimo ligeiro da abertura das valvas na maioria dos mexilhões logo após a introdução de  $9 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd na água. Este decréscimo foi também observado quando utilizadas as médias dos valores (Figura 3.2 (B)). Embora se tenha registado uma falha no registo (sombreado cinzento) de cerca de 1 hora, o padrão de comportamento manteve-se semelhante durante 3 horas verificando-se um ligeiro aumento nos últimos 30 min. Após a introdução de  $86 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd registou-se nova falha no sistema de registo que teve a duração de uma hora. No entanto, verificou-se que os valores de abertura após a falha mantiveram-se semelhantes verificados antes desta contaminação. O ensaio continuou por mais 17h tendo-se verificado que os valores no final do bioensaio diminuíram ligeiramente, cerca de 20%, relativamente aos verificados no início. Não se observam alterações significativas no comportamento antes e depois de efetuada a mudança de água (Figura 3.2 (B) sombreado azul). Na Figura 3.2 (C) verifica-se que a temperatura manteve-se entre os 17 e os 19 °C e houve registo de vibrações no período 16:40 - 17:40 e no período de mudança de água. Não existiram alterações bruscas de luminosidade.



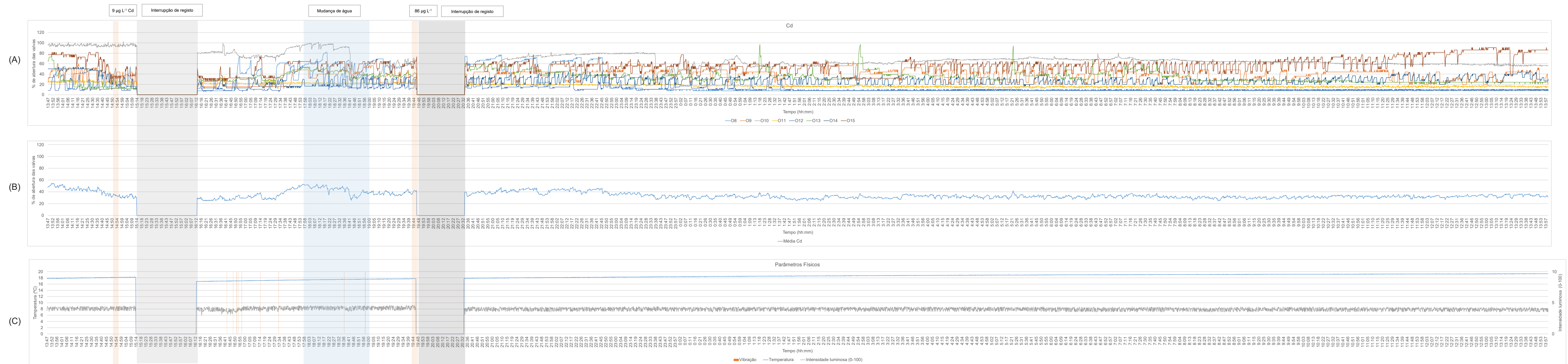


Figura 3.2 Variação da percentagem de abertura das valvas dos mexilhões e dos parâmetros físicos registados ao longo do tempo durante o bioensaio de exposição a um gradiente de concentração de cádmio (1.5-86 µg L<sup>-1</sup>).

- (A) Percentagem (%) de abertura das valvas dos mexilhões (por indivíduo) expostos ao longo do tempo a Cd;
- (B) Média das percentagens (%) de abertura das valvas dos organismos expostos a Cd;
- (C) Registo da Temperatura (°C), vibração e alteração da luminosidade ao longo do tempo de exposição.

Sombreado vermelho indica o intervalo durante o qual se deu a contaminação, o sombreado cinzento indica o intervalo durante o qual houve interrupção do registo, o sombreado azul indica o intervalo durante o qual se efetuou a mudança de água.



### 3.3 Exposição a Cobre

Devido a irregularidades da resposta do sensor, foram retirados dois organismos (M3 e M7) e o M1 foi substituído em dois segmentos de monitorização pela média dos restantes devido a má conexão do sensor.

Após a primeira contaminação com  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cu, não se observaram variações nos valores médios de abertura das valvas (Figura 3.3 (B)). No entanto, a nível individual essas variações foram mais significativas e observando-se inclusive variações comportamentais entre os diferentes indivíduos (Figura 3.3 (A)). Uma hora passada a primeira contaminação e após introdução de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cu, verificou-se uma falha no registo que teve a duração de 15 minutos (sombreado cinzento). Após esta interrupção verificou-se que os valores individuais e da média da abertura das valvas diminuíram. No entanto, os valores mantiveram-se durante o período seguinte onde se introduziram mais 5 vezes  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cu, com intervalos de uma hora. Após a quinta contaminação verificou-se nova diminuição da abertura das valvas. Após as três contaminações seguintes ( $30$ ,  $240$  e  $250 \mu\text{g L}^{-1}$ ) os níveis mantiveram-se constantes. O ensaio foi mantido nestas condições por mais 16h, durante as quais a média de abertura aumentou ligeiramente. Os valores obtidos para cada indivíduo seguiram, em geral, o mesmo padrão embora se tenham obtido respostas comportamentais diferentes entre indivíduos comparando o mesmo tempo de exposição.

Após este período e depois de nova contaminação com  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  a média dos valores de abertura das valvas voltaram a diminuir em 10%. Posteriormente e após a mudança da água dos aquários (sombreado azul) verificou-se um aumento de 50% dos valores médios que se mantiveram durante 3 h. Este aumento imediato foi observado em todos os organismos individuais. A posterior contaminação com  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  teve um efeito bastante visível, verificando-se nova diminuição da abertura das valvas em cerca de 40%. Os valores médios estabilizaram depois entre os 40 e 50% durante 19 horas. A posterior mudança de água promoveu o aumento de 40% na abertura das valvas. Imediatamente após a introdução da última concentração de Cu ( $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ), verificou-se um efeito imediato com a redução da abertura das valvas em 20%.

Na Figura 3.3 (A) é possível observar-se um aumento da abertura dos organismos M4 e M6, a partir da última mudança de água, que culminou na morte destes dois indivíduos. Na Figura 3.3 (C) verifica-se que temperatura se entre os  $16$  e os  $18 \text{ }^\circ\text{C}$ , havendo registos de vibração significativos apenas nos períodos de mudança de água. Houve um ligeiro aumento da luminosidade a seguir à primeira contaminação de  $250 \mu\text{g L}^{-1}$ , no entanto este aumento não é significativo.



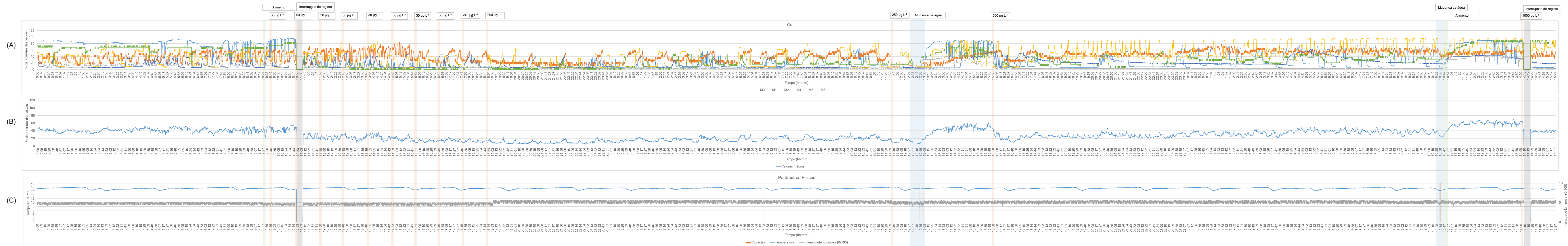


Figura 3.3 Variação da percentagem de abertura das valvas dos mexilhões e dos parâmetros físicos registados ao longo do tempo durante o bioensaio de exposição a um gradiente de concentração de cobre (30-1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

- (A) Percentagem (%) de abertura das valvas dos mexilhões (por indivíduo) expostos ao longo do tempo a Cu;
- (B) Média das percentagens (%) de abertura das valvas dos organismos expostos a Cu;
- (C) Registo da Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), vibração e alteração da luminosidade ao longo do tempo de exposição.

Sombreado verde indica a adição de alimento, sombreado vermelho indica o intervalo durante o qual se deu a contaminação, o sombreado cinzento indica o intervalo durante o qual houve interrupção do registo, o sombreado azul indica o intervalo durante o qual se efetuou a mudança de água.



## 4 Discussão

Durante os ensaios ocorreram problemas técnicos devido a subtensões que ocorriam na rede elétrica do edifício derivadas do arranque de equipamentos elétricos, nomeadamente das bombas peristálticas usadas nos bioensaios, criando falhas de comunicação entre as placas controladoras alimentadas por USB e o computador. Por tal motivo, convém que o sistema possua proteções para este tipo de ocorrências.

Segundo Kramer et al., (1989) oito organismos são suficientes como amostra de forma a cobrir a variabilidade natural dos indivíduos. Embora a calibração tenha sido realizada para todos os organismos utilizados, por vezes esta parecia não estar correta, tal pode ser devido ao facto das condições de estabulação serem pouco dinâmicas, levando a que os organismos não necessitem de abrir o máximo ou fechar completamente as valvas, pelo que durante os processos de calibração os organismos devem ser sujeitos a situações propícias a obrigar a que exista a amplitude máxima das valvas, por exemplo, com alimentação dos organismos (Kramer et al. 1989). Para testes *in-situ* é de esperar que os organismos levem vários dias para calibrar, devendo ser verificado no final da calibração o seu estado de saúde, mais concretamente se estão vivos ou mortos, pois só depois da calibração o sistema pode alertar para a morte de um organismo ou mal funcionamento de um sensor.

A variabilidade do comportamento dos diferentes organismos pode dificultar a leitura dos dados por parte do operador, pelo que é necessário que o programa possa concluir incidentes de forma independente e ao mesmo tempo enviar a informação recolhida para o operador para que este possa validar ou não o incidente detetado pelo sistema.

O uso das médias é essencial para a visão geral do sistema, uma vez que existe muita variabilidade de resposta entre indivíduos, uma vez que a abertura das valvas resultante da mortalidade ou desconexão do sensor pode afetar as médias, o *software* tem de eliminar esse indivíduo assim que deteta o incidente.

A resposta comportamental testada nos organismos foi bastante diferente quando estes estavam expostos a Cu ou a Cd. Observou-se uma resposta imediata dos mexilhões na presença de Cu e uma resposta mais lenta na presença de Cd. Este facto pode dever-se ao facto do Cu ser reconhecido pelo mexilhão, uma vez que o Cu é um metal essencial para as funções das células, nomeadamente, afeta o processo de transcrição de RNA (Pytharopoulou et al. 2013), enquanto o Cd é um metal tóxico para os organismos em concentrações ambientais muito baixas (Bakhmet et al. 2012). Esta resposta imediata foi também verificada após exposição à concentração cumulativa de Cu (bioensaio 3). No entanto, foi possível observar que a abertura das valvas foi diminuindo ao longo do tempo e com o aumento progressivo dos níveis de contaminação. Foi ainda possível observar, através dos registos de cada indivíduo (Figura 2-3 (A)) que os ciclos de abertura e fecho foram mais reduzidos do que anteriormente à contaminação. Este comportamento pode estar relacionado com o facto de os mexilhões estarem expostos a concentrações de Cu progressivas e de forma permanente. Nestas condições de ensaio, os mexilhões estão a promover a abertura e imediato fecho das valvas de forma a poderem testar a qualidade da água ou ainda pelo seu metabolismo estar alterado (Kramer and Foekema 2001). Interessante foi verificar que nos períodos de depuração (mudança de água) todos os organismos promoveram a abertura das valvas e após nova contaminação com Cu diminuírem para níveis mínimos essa abertura. No entanto, a resposta à exposição prolongada ao Cu expressou-se no final do bioensaio com ciclos de abertura e fecho bastante acentuados nos organismos, tendo esta exposição provocado a mortalidade de dois indivíduos. Estes resultados evidenciaram mais uma vez a sensibilidade deste organismo e, ao mesmo tempo, a eficácia do BEWS desenvolvido na deteção deste metal na água.

Pelo contrário, a presença de Cd parece não ser imediatamente detetada pelos mexilhões, no entanto, foi possível verificar uma progressiva diminuição da abertura das valvas com o tempo de exposição (bioensaio 1) e com o aumento da concentração (bioensaio 2). Este efeito pode estar relacionado com a alteração do metabolismo causado pela toxicidade do Cd, que resulta em lipólise

nos organismos (Yeung et al. 2016). Mesmo quando expostos a concentrações mais baixas de Cd este atraso é verificado (bioensaio 2) e os efeitos na abertura das valvas são apenas visíveis ao final de 4h, para a concentração de  $86 \mu\text{g L}^{-1}$ . No entanto, desde o início do ensaio até ao final há um decréscimo de 25%, sugerindo que é possível detetar este metal pesado embora não de forma imediata. Assim, o alarme do BEWS terá possivelmente horas de atraso relativamente à hora da contaminação mas, por outro lado, mostrou-se sensível a concentrações ambientalmente relevantes.

O BEWS foi também eficaz na deteção de variações de luminosidade e vibração. Observou-se uma redução da abertura das valvas dos mexilhões quando ocorreram variações repentinas da luminosidade ou ruído dentro da sala, tal como constatado por Kramer and Foekema, (2001). Estes autores verificaram também que quando os mexilhões estavam expostos a uma vibração constante, acabavam por adaptar-se a essas condições ao fim de algum tempo e que os organismos apresentavam uma maior abertura das valvas durante a noite em comparação com o dia. Desta forma, a monitorização destes parâmetros é de extrema importância para evitar falsos alarmes.

Referente à adaptação dos organismos, Kramer and Foekema, (2001) referem ainda que não negam a existência da adaptação. Organismos que estejam habituados a águas poluídas podem ter menos sensibilidade, razão pela qual é aconselhável a utilização de organismos de ecossistemas limpos. Referem ainda que é aconselhável a substituição dos organismos de 2 em 2 meses para prevenir efeitos da adaptação, embora tenham provado que é possível manterem os mesmos organismos até 10 meses.

## 5 Conclusões e desenvolvimentos futuros

O sistema desenvolvido cumpriu com os objetivos propostos, sendo capaz de detetar em tempo real e com precisão os movimentos das valvas do bivalve marinho *Mytilus edulis* quando exposto a dois metais diferentes e a vários estímulos como alimentação, vibração e luminosidade. Ao mesmo tempo, BEWS desenvolvido é de baixo custo, quer ao nível da sua construção quer ao nível da sua manutenção, uma vez que em termos de *hardware* (excluindo PC) os custos se mantiveram nas dezenas de euros.

O *software* criado no programa Labview 2015 Student Edition da National Instruments apresentado é apenas uma ferramenta para um propósito, sendo um software pago para o uso comercial. Na eventualidade deste sistema ser desenvolvido nesse âmbito, o uso de outras ferramentas de programação para fazer uso destas placas controladoras é possível.

Utilizando *software open-source*, o sistema pode ainda ser adaptado para enviar os dados a partir de uma conexão à internet diretamente para um computador, bastando para tal a programação específica, *hardware* e um cartão SIM com capacidade de transmissão de dados, eliminando assim a necessidade de conexão por USB. Esta configuração pode ser útil numa rede de monitorização ao longo de um estuário, onde cada estação seria alimentada por um painel solar e bateria, uma vez que todo o sistema pode funcionar a 5V DC e o consumo de corrente é reduzido. Os pontos de contacto do sensor e do íman com os organismos são reduzidos, permitindo a aplicação em espécies variadas não estando inevitavelmente limitado pela sua dimensão.

Em funcionamento real, a resposta tardia na presença de certos contaminantes, pode ser usada para retirar conclusões determinantes, eliminando as hipóteses de contaminação da água por contaminantes detetados mais rapidamente. É necessário um estudo extenso sobre a resposta de diferentes organismos a diferentes contaminantes e misturas de contaminantes. Desta forma poderão ser criadas curvas de resposta conhecidas que facilitarão a determinação do contaminante presente na água. O uso de diferentes espécies de bivalves pode também contribuir para a diminuição das hipóteses de contaminantes presentes na água, e inclusivamente poderiam ser criadas curvas de resposta para efluentes de indústrias conhecidas na região. O sistema deve ser testado *in-situ* e em laboratório para validar conclusões como referido por Kramer and Foekema, (2001), e todas as conclusões finais *in-situ* devem ser suportadas por testes em laboratório. Ainda segundo estes autores, um fator a considerar é o facto de os mexilhões mostrarem também sensibilidade à ausência de alimento, reagindo quando a alimentação é interrompida.

O sistema tem potencial para ser aplicado *in-situ*, no entanto necessita de ser adaptado para as condições marinhas e para os diferentes requisitos de quem o opera.

Embora os BEWS não forneçam informação quantitativa sobre os metais, mas sim qualitativa, a diferença de comportamento quando os organismos estão expostos a Cu ou Cd evidencia o potencial deste sistema na deteção de diferentes metais geralmente presentes em mistura no ambiente aquático. Desta forma, é importante integrar estes alarmes biológicos com monitorização química de forma a aumentar a precisão de episódios de contaminação no sistema estuarino.

Este BEWS distingue-se dos já existentes por fazer uso de *hardware* (sensores e placas controladoras) de baixo custo e no entanto ser capaz de conseguir uma resolução de leitura suficiente para a deteção de pequenas variações na abertura das valvas. A facilidade de aplicação devido ao baixo consumo energético do sistema, permite também uma adaptação rápida deste sistema para ser utilizado *in-situ* recorrendo ao uso de baterias e painéis solares.

## Referências Bibliográficas

- Allan, Ian J. et al. 2006. "A 'toolbox' for Biological and Chemical Monitoring Requirements for the European Union's Water Framework Directive." *Talanta* 69(2 SPEC. ISS.): 302–22.
- Arnold, W. Ray et al. 2009. "A Comparison of the Copper Sensitivity of Two Economically Important Saltwater Mussel Species and a Review of Previously Reported Copper Toxicity Data for Mussels: Important Implications for Determining Future Ambient Copper Saltwater Criteria in the USA." *Environmental Toxicology* 24(6): 618–28.
- Bae, Mi Jung, and Young Seuk Park. 2014. "Biological Early Warning System Based on the Responses of Aquatic Organisms to Disturbances: A Review." *Science of the Total Environment* 466–467: 635–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.075>.
- Bakhmet, Igor N, Nadezhda P Kantserova, Liudmila a Lysenko, and Nina N Nemova. 2012. "Effect of Copper and Cadmium Ions on Heart Function and Calpain Activity in Blue Mussel *Mytilus Edulis*." *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering* 47(January 2013): 1528–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22702812>.
- Borcherding, Jost. 2006. "Ten Years of Practical Experience with the Dreissena-Monitor, a Biological Early Warning System for Continuous Water Quality Monitoring." *Hydrobiologia* 556(1): 417–26.
- Brooks, Steven J. et al. 2015. "Differences in Copper Bioaccumulation and Biological Responses in Three *Mytilus* Species." *Aquatic Toxicology* 160: 1–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.12.018>.
- Catherine, Tsangaris et al. 2016. "Biochemical Biomarker Responses to Pollution in Selected Sentinel Organisms across the Eastern Mediterranean and the Black Sea." *Environmental Science and Pollution Research* 23(2): 1789–1804.
- García-March, José Rafael, M. Á Sanchís Solsona, and a. M. García-Carrascosa. 2008. "Shell Gaping Behaviour of *Pinna Nobilis* L., 1758: Circadian and Circalunar Rhythms Revealed by in Situ Monitoring." *Marine Biology* 153(4): 689–98.
- Höher, Nicole et al. 2013. "Immunomodulating Effects of Environmentally Realistic Copper Concentrations in *Mytilus Edulis* Adapted to Naturally Low Salinities." *Aquatic Toxicology* 140–141: 185–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.06.001>.
- Kraak, Michiel H S, Daphna Lavy, Wilma H M Peeters, and C Davids. 1992. "Chronic Ecotoxicity of Copper and Cadmium to the Zebra Mussel & Dreissena Polymorpha." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 23(3): 363–69. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00216246>.
- Kramer, Kees J M, and Edwin M Foekema. 2001. "The 'Musselmonitor®' as Biological Early Warning System." In *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2: A Handbook*, eds. Frank M Butterworth, Amara Gunatilaka, and Maria Eugenia Gonsebatt. Boston, MA: Springer US. inbook, 59–87. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-1305-6\\_4](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-1305-6_4).
- Kramer, Kees J M, Henk a. Jenner, and Dick de Zwart. 1989. "The Valve Movement Response of Mussels: A Tool in Biological Monitoring." *Hydrobiologia* 188–189(1): 433–43.
- Luna-Acosta, A. et al. 2015. "Persistent Organic Pollutants in a Marine Bivalve on the Marennes-Oliron Bay and the Gironde Estuary (French Atlantic Coast)-Part 2: Potential Biological Effects." *Science of the Total Environment* 514: 511–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.050>.
- Martins, Marta et al. 2012. "Impact of Remobilized Contaminants in *Mytilus Edulis* during Dredging Operations in a Harbour Area: Bioaccumulation and Biomarker Responses." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 85: 96–103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.08.008>.
- Nightingale, Adrian M, Alexander D Beaton, and Matthew C Mowlem. 2015. "Trends in Microfluidic

- Systems for in Situ Chemical Analysis of Natural Waters.” *Sensors and Actuators, B: Chemical* 221: 1398–1405. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.07.091>.
- Pytharopoulou, S et al. 2013. “Cadmium versus Copper Toxicity: Insights from an Integrated Dissection of Protein Synthesis Pathway in the Digestive Glands of Mussel *Mytilus Galloprovincialis*.” 260 OP-I: 263. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&site=eds-live&db=edselp&AN=S0304389413003476>.
- Serafim, A. et al. 2013. “Evaluation of Sediment Toxicity in Different Portuguese Estuaries: Ecological Impact of Metals and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.” *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 130(May): 30–41.
- Smith, Frantz E. 2008. “Physiological Effects of Copper , Cadmium and Reduced Salinity on Intertidal and Cultivated *Perna Canaliculus* Mussels.”
- Yeung, Jamius W.Y., Guang-Jie Zhou, and Kenneth M.Y. Leung. 2016. “Sub-Lethal Effects of Cadmium and Copper on RNA/DNA Ratio and Energy Reserves in the Green-Lipped Mussel *Perna Viridis*.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 132: 59–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.05.023>.