



Universidade de Aveiro  
2020

**Miguel Bruno Félix  
Colaço**

Efeito da salinidade no sucesso da depuração de *Solen marginatus*.



Universidade de Aveiro  
2020

**Miguel Bruno Félix  
Colaço**

Efeito da salinidade no sucesso da depuração de *Solen marginatus*.

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Marinha Aplicada realizada sob a orientação científica da Doutora Andreia do Carmo Martins Rodrigues, Investigadora Auxiliar, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e coorientação do Doutor Rui Jorge Miranda Rocha, Professor auxiliar convidado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Este trabalho foi realizado no âmbito dos projetos:

BioDepura – Desenvolvimento de metodologias de depuração de moluscos bivalves adequadas aos requisitos fisiológicos de cada espécie (MAR-02.01.01-FEAMP-0018), financiado pelo Programa MAR2020, Portugal 2020 e União Europeia através do FEAMP - Fundo Europeu dos Assuntos Marítimos e das Pescas;

MolBiPack – Melhoramento dos processos de acondicionamento, transporte e embalagem de moluscos bivalves: da captura à comercialização (MAR-01.03.01-FEAMP-0005), financiado pelo Programa MAR2020, Portugal 2020 e União Europeia através do FEAMP - Fundo Europeu dos Assuntos Marítimos e das Pescas.



Dedico este trabalho aos meus pais, irmã, e a toda a família pelo apoio incondicional ao longo de todos estes anos, pois sem eles nada disto seria possível.

## **o júri**

Presidente: Professora Doutora Maria Marina Pais Ribeiro da Cunha, Professora Associada, Universidade de Aveiro

Vogal – Arguente: Doutora Teresa Maria Coelho Baptista, Professora Adjunta, Instituto Politécnico de Leiria

Vogal – Orientadora: Doutora Andreia do Carmo Martins Rodrigues, Investigadora Doutorada (nível 1), Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Quero começar por agradecer ao Doutor Rui Rocha por me ter proporcionado a oportunidade de participar neste projeto e um grande obrigado à Doutora Andreia Rodrigues, cuja orientação foi essencial durante este percurso.

Quero agradecer também à equipa do ECOMARE, pois sempre nos ajudámos uns aos outros desde o início. Um obrigado especial também à Sílvia e à Vitória pela ajuda que me deram nos laboratórios.

Um enorme obrigado à minha namorada por me ter aturado durante toda esta fase, e a toda a malta de Évora, que estando perto ou longe, nos apoiamos sempre no melhor e no pior.

Por fim, mas não menos importante, um sincero obrigado a toda a minha família por todo o apoio que me deram ao longo de todos estes anos e pelos esforços que fizeram para eu poder chegar a este ponto na minha vida académica e pessoal.

## palavras-chave

Bivalves, *Solen marginatus*, depuração, stresse oxidativo, alocação de energia celular, tempo de prateleira, segurança alimentar

## resumo

A produção de bivalves é uma forma de aquacultura ecológica e economicamente promissora, pois estes animais, sendo filtradores, obtêm o alimento já presente na coluna de água, não havendo assim a necessidade de suplementação nutricional adicional. No entanto, este comportamento alimentar pode ser uma desvantagem, pois acabam por reter no seu organismo substâncias possivelmente prejudiciais ao Homem, o que os poderá tornar impróprios para consumo humano. Por isso, existem zonas de captura com diferentes classificações, onde, dependendo da carga microbiológica e do conteúdo em outros contaminantes, os animais aí capturados serão ou não destinados a um processo de depuração de modo a diminuir essas substâncias. Na última década, a valorização económica do lingueirão aumentou, sendo atualmente considerada uma espécie de alto valor comercial, especialmente no nosso país. No entanto, adaptar as condições de depuração tendo em conta os requerimentos de cada espécie, poderá melhorar a própria capacidade de depuração e aumentar a qualidade do produto para o consumidor. Por isso, neste estudo decidimos expor indivíduos da espécie de lingueirão *Solen marginatus* a depuração a diferentes salinidades (25, 30, 35 e 40), seguindo-se um tempo de prateleira de 5 dias. Com este estudo, quisemos verificar se a salinidade influenciava a capacidade de depuração, o estado de stresse oxidativo e alocação de energia celular dos lingueirões após 24 horas de depuração e após 5 dias de prateleira. Numa tentativa de melhorar o embalamento e reduzir o consumo de plástico, quisemos verificar se, quando armazenados em sacos de diferentes materiais e porosidades, os sacos influenciavam o estado de stresse oxidativo, alocação de energia e sobrevivência dos lingueirões. Os resultados obtidos mostraram que os lingueirões depuraram em 24 horas em todas as salinidades testadas. Após 24 horas de depuração, observou-se um maior valor de atividade das defesas antioxidantes às salinidades de 25 e 30, embora sem se observar um aumento da peroxidação lipídica em nenhum dos tratamentos. Durante o tempo de prateleira constatou-se que a salinidade por si só não foi suficiente para que houvesse um verdadeiro caso de stresse oxidativo, mas houve sim uma ligeira alteração da alocação de energia dos lingueirões, provavelmente mais relacionada com outros fatores, como p.e. a exposição ao ar e a uma baixa temperatura durante 5 dias. Em relação à experiência de armazenamento, constatou-se que não houve mortalidade em nenhum dos tratamentos, e que foram os sacos de rede que apresentaram melhores resultados. Em conclusão, segundo os resultados obtidos, é a salinidade de 35 que vai de encontro aos requisitos fisiológicos da espécie, tanto durante a depuração, como durante o tempo de prateleira, devendo ser esta a salinidade utilizada pelas depuradoras de modo a otimizarem a comercialização desta espécie, desde o processo de depuração até ao próprio consumidor.

**keywords**

Bivalves, *Solen marginatus*, depuration, oxidative stress, cellular energy allocation, shelf life, food safety

**abstract**

The production of bivalves is an ecological and economically promising form of aquaculture, as these animals, being filters, obtain the food already present in the water column; thus, there is no need for additional nutritional supplementation. However, this feeding behavior can be a disadvantage, as they end up retaining substances possibly harmful to man, making them unfit for human consumption. Therefore, there are capture zones with different classifications, in which, depending on their microbiological load and other contaminants, the bivalves will or will not be destined for a depuration process to decrease these substances. In the last decade, the economic value of razor clams has increased, and today it is considered a species of high commercial value, especially in our country. However, adapting the conditions in which they are depurated by considering the requirements of each species can improve the depuration capacity itself and increase the quality of the product for the consumer. For this reason, in this study we decided to expose individuals of the species of razor clam *Solen marginatus* to depuration at different salinities (25, 30, 35 and 40), followed by a shelf life of 5 days. With this study, we wanted to verify whether salinity influenced the depuration capacity, the oxidative stress state and cellular energy allocation of the razor clams after 24 hours of depuration and after 5 days of shelf life. As an attempt to improve package conditions and reduce the consumption of plastic, we wanted to verify whether, when stored in bags of different materials and porosities, the bags influenced the state of oxidative stress, energy allocation and survival of the individuals. Data shows that the razor clams depurated in 24 hours in all tested salinities. After 24 hours of depuration, a higher activity of antioxidant defenses was observed at salinities of 25 and 30, although without an increase in lipid peroxidation in any of the treatments. During the shelf life, it was found that the salinity alone was not enough to increase oxidative stress status, but there was a slight change in the energy allocation of the razor clams, probably more related to other factors, such as the exposure to air and low temperature for 5 days. Regarding the storage experience, no mortality was observed in any of the treatments and were the mesh bags that showed the best results. In conclusion, the results of this study suggest that the salinity of 35 meets the physiological requirements of the species, both during depuration and during shelf life, and should be the salinity used by the depuration systems to optimize the commercialization of this species, from the depuration process to the consumer.

# Índice

Resumo

Abstract

Índice de figuras

Índice de tabelas

1. Introdução .....	1
1.1. Moluscos bivalves .....	2
1.2. <i>Solen marginatus</i> .....	5
1.3. Depuração e tempo de prateleira.....	6
1.4. Fatores de stresse durante a depuração e comercialização.....	10
1.5. Objetivos .....	12
2. Materiais e Métodos.....	13
2.1. Testes de depuração e tempo de prateleira .....	13
2.2. Análise do conteúdo microbiológico .....	15
2.3. Preparação das amostras para a análise de biomarcadores.....	16
2.4. Biomarcadores de Stress Oxidativo.....	17
2.5. Biomarcadores neurofisiológicos .....	18
2.6. Alocação de Energia Celular .....	18
2.7. Energia disponível (Ed) .....	18
2.9. Avaliação de dano genético.....	19
2.9.1 Ensaio do Cometa.....	19
2.10. Análise estatística .....	21
3. Resultados.....	21
3.1. Conteúdo microbiológico.....	21
3.2. Lípidos .....	22
3.3. Açúcares.....	23
3.4. Proteínas .....	24
3.5. Energia disponível .....	26
3.6. Produção de energia aeróbica .....	27

3.7. Alocação de energia celular .....	28
3.8. Catalase .....	30
3.9. Glutathione S-transferase .....	31
3.10. Glutathione .....	32
3.11. Peroxidação lipídica .....	34
3.12. Acetilcolinesterase .....	34
3.13. Dano oxidativo ao nível do ADN .....	36
4. Discussão .....	38
5. Conclusão .....	48
6. Referências .....	49

## Índice de figuras:

**Figura 1:** Espécie de lingueirão *Solen marginatus*. Imagem retirada de

[https://www.google.com/search?q=solen+marginatus&sxsrf=ALeKk03u2HJuYEX8SroQaEmLw96jP8mpDA:1606827394899&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwib5tnA6qztAhXGTcAKHXOcAvsQ\\_AUoAXoECAUQAw&biw=1366&bih=657#imgsrc=SIJMb\\_7Wi5dyfM](https://www.google.com/search?q=solen+marginatus&sxsrf=ALeKk03u2HJuYEX8SroQaEmLw96jP8mpDA:1606827394899&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwib5tnA6qztAhXGTcAKHXOcAvsQ_AUoAXoECAUQAw&biw=1366&bih=657#imgsrc=SIJMb_7Wi5dyfM) (Disponível em Dezembro de 2020).

**Figura 2:** Um dos sistemas de depuração utilizados com: um refrigerador (1), um tanque de 250 litros (2), um escumador de proteínas (3), um filtro UV (4) e um sistema de suporte de PVC (5) para os 5 tanques de 15 litros (6) onde se encontravam os lingueirões.

**Figura 3:** Lingueirão inteiro aberto (1) e tubo digestivo do lingueirão (2), após separar as brânquias e descartado o pé.

**Figura 4:** Trato digestivo do lingueirão triturado (1) e posteriormente homogeneizado (2), com o auxílio de um sonicador.

**Figura 5:** Imagens de cometas, corados com brometo de etídio, elucidando a classificação visual desde 0 (sem cauda) a 4 (quase todo o DNA na cauda).

**Figura 6:** Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão de lípidos (mJ/ mg tecido) dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco.

SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

**Figura 7:** Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão de açúcares (mJ/ mg tecido) dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

**Figura 8:** Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão de proteínas (mJ/ mg tecido) dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

**Figura 9:** Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão da alocação de energia dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5

dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

**Figura 10:** Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão da produção de energia aeróbica dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

**Figura 11:** Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão da alocação de energia celular dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

**Figura 12:** Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão da atividade da catalase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteína) dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

**Figura 13:** Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão da atividade da GST ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteína) dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

**Figura 14:** Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão da atividade da tGSH ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteína) dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

**Figura 15:** Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão da peroxidação lipídica ( $\text{nmol}/\text{TBARS}/\text{g}$  tecido) nos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

**Figura 16:** Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão da atividade da AChE (nmol/ min/ mg proteína) nos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

**Figura 17:** Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão do dano genético dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

## Índice de tabelas:

**Tabela I:** Valores do teor de contaminação dos lingueirões por *Escherichia coli*, antes e após depuração durante 24 horas a diferentes salinidades

## 1. Introdução

A aquacultura consiste na criação de organismos aquáticos. Esta envolve a intervenção humana no processo de criação, para aumentar a produtividade individual e em grupo da biomassa cultivada (Matias, 2013). A aquacultura continua a preencher a lacuna que existe entre a demanda global por produtos do mar e a oferta disponível dos produtos da pesca de animais selvagens (Gibbs, 2007). Nos últimos 20 anos tem havido um crescimento consistente da produção em aquacultura, sendo que em 2016, a mesma representou cerca de 41% da produção mundial de alimentos do setor das pescas e da aquacultura (van der Schatte Olivier *et al.*, 2020). Em relação aos bivalves, a indústria aquícola mundial produz anualmente mais de 15 milhões de toneladas de moluscos bivalves para consumo humano, sendo que 89% provêm de empresas de aquacultura. A Ásia, mas principalmente a China, é a maior produtora de moluscos bivalves, sendo que é responsável por cerca de 85% da produção mundial (Venier *et al.*, 2018). A produção de espécies de bivalves é uma forma atrativa de aquacultura uma vez que, não é necessária nenhuma adição de suplementos alimentícios artificiais, pois sendo animais filtradores, alimentam-se do alimento disponível no próprio ambiente aquático (Gibbs, 2007; Gallardi, 2014). Por essa mesma razão, esta forma de aquacultura acaba por ser menos prejudicial para o meio ambiente, comparando, por exemplo, com a piscicultura, assim como pelo facto de que os resíduos produzidos por estes animais devolvem os nutrientes e minerais ao ecossistema (Gallardi, 2014). Os bivalves mais produzidos no mundo são a ostra, a amêijoia, a vieira e o mexilhão (Gallardi, 2014). Em Portugal, a indústria aquícola tem aumentado gradualmente a sua relevância, atingindo em 2018 uma produção de 13 992 toneladas, o equivalente a uma receita de 96,8 milhões de euros. Dentro deste grupo, os moluscos bivalves representaram, ainda no mesmo ano, 67,2 % da produção total, face a 56,7% em 2017, sendo a amêijoia a espécie mais relevante com 3 970 toneladas (+2,1%), seguida da ostra com 3 451 toneladas, cujo volume quase triplicou (+191,2%) e do mexilhão com 1 756 toneladas (+1,4%). Este aumento da produção de moluscos resultou da substituição da prática de piscicultura

pela moluscicultura em zonas de transição (lagoas e estuários), assim como das maiores produções dos estabelecimentos localizados em mar aberto (INE 2020).

### 1.1. Moluscos bivalves:

O termo molusco bivalve designa o animal de corpo mole protegido por um exosqueleto com forma de uma concha de duas valvas, que se articulam por uma charneira e são mantidas unidas pelos músculos adutores (IPMA, 2016).

De acordo com (Lees, 2000), as espécies de bivalves variam bastante nas características e habitats, sendo que existem espécies que estão adaptadas para sobreviver em condições de seca. Estas espécies fecham as suas conchas quando ficam fora de água, prendendo assim a água dentro da concha, o que lhes permite sobreviver a estes períodos (Lees, 2000). No entanto, ao manterem as valvas fechadas, ficam sujeitos a um período de hipoxia, o que faz com que desenvolvam vias metabólicas anaeróbicas (nas mitocôndrias) para sobreviver a um período de reduzida disponibilidade de oxigénio (Sokolov *et al.*, 2019).

Sendo organismos filtradores, estes animais utilizam plâncton e detritos como fonte de alimento, alimento este que lhes é fornecido através das correntes oceânicas, sendo que se sabe que a sua capacidade de filtração lhes permite filtrar fitoplâncton, zooplâncton, detritos e bactérias coliformes (Wright *et al.* 1982), sendo que ficam suscetíveis a contaminação por bioacumulação de bactérias autóctones ou de origem antropogénica (Rees *et al.* 2010). Estas bactérias coliformes, como por exemplo a *Escherichia coli*, são utilizadas como indicadores da qualidade do marisco, onde estão incluídos os bivalves, e também são utilizadas para classificar a qualidade da água da qual estes organismos são retirados para consumo (Hood *et al.* 1983). Os bivalves têm sido largamente usados como espécies bioindicadores do estado de poluição de determinadas áreas, uma vez que em grande parte do seu ciclo de vida são espécies sedentárias, para além de terem uma ampla distribuição geográfica (Kim *et al.* 2002). Por serem sedentários e habitarem maioritariamente zonas de transição, os bivalves marinhos são constantemente submetidos a stresses no meio ambiente (Alves de Almeida *et al.* 2007). A maioria dos bivalves adultos são relativamente imóveis, e qualquer mudança no

ambiente de ocorrência transitória, recorrente ou permanente deve ser acomodado pelo animal (Akberali & Trueman, 1985). No ambiente aquático, as pequenas mudanças, sejam elas naturais ou provocadas pelo homem, estão dentro do seu alcance de adaptação e são tolerados sem consequências graves. As mudanças mais extremas podem ser temporariamente resistidas, mas podem resultar em morte de organismos (Akberali & Trueman, 1985). Algumas mudanças são, por exemplo, variações na temperatura da água devido à mudança de estações, flutuações da salinidade e do oxigênio devido às marés e exposição ao ar durante as marés baixas, onde estes fecham as suas conchas quando ficam fora de água, prendendo assim a água dentro da concha, o que lhes permite sobreviver a estes períodos (Lees, 2000). Existe ainda o problema de contaminação a que são sujeitos estes animais (Kim *et al.*, 2002). Contaminação essa que pode ser natural, como por exemplo contaminação de biotoxinas produzidas por dinoflagelados e diatomáceas associados a *blooms* de microalgas, ou antropogénica, devido à proximidade dos sistemas costeiros a urbanizações com os efluentes domésticos e de atividades industriais e agrícolas (Freitas *et al.* 2012). Nestes casos, os sedimentos destes sistemas costeiros atuam como um reservatório para os contaminantes, e o que acontece é que os bivalves que vivem em contacto com o substrato acabam por acumular certos contaminantes em concentrações muito mais elevadas àquelas que se encontram na água (Kim *et al.* 2002; Freitas *et al.* 2012). As rápidas respostas bioquímicas destes animais a impactos antropogénicos e a distúrbios naturais conjuntamente com a sua capacidade de filtração, de concentração de poluentes e de tolerância aos mesmos, faz com que sejam considerados ótimos indicadores de poluição das áreas onde se encontram (Kim *et al.* 2002; Freitas *et al.* 2012).

A avaliação das respostas bioquímicas que estes organismos apresentam ao stresse derivado de metais têm sido muito estudadas e tem vindo a tornar-se uma metodologia recorrente para avaliar os impactos dos metais no meio aquático (Freitas *et al.* 2012). Diversos estudos relacionam ainda a exposição aos metais com a produção de espécies reativas de oxigênio, que podem levar a dano celular através da carboxilação de proteínas, peroxidação lipídica e dano de ADN (Freitas *et al.* 2012). Contaminantes esses como por exemplo mercúrio, metilmercúrio, entre outros, tendo todos estas implicações

na saúde humana aquando do consumo dos bivalves contaminados (Wright *et al.* 2018). O cobre é outro dos metais que pode estar presente em efluentes domésticos e industriais que acabam por chegar aos ambientes aquáticos (El Haj *et al.* 2019). A imunidade destes animais é suportada por hemócitos presentes na hemolinfa que, para além da eliminação direta dos agentes patogénicos por fagocitose, também produzem compostos tais como enzimas lisossomais e moléculas antimicrobianas, que contribuem para a destruição patogénica (Hoffmann, 2004). Foi ainda observado que o cádmio e o cobre podem ter um efeito direto na alteração imunológica dos moluscos bivalves, tornando-os mais suscetíveis a doenças infecciosas (Correia, 2016).

Os moluscos bivalves são um importante componente da dieta humana por vários fatores: são ricos em minerais, vitaminas e ácidos gordos polinsaturados, sendo que estes últimos são de grande importância, pois possuem a capacidade de diminuir o risco de formação de coágulos, o que permite uma proteção contra doenças cardiovasculares, bem como redução do colesterol (LDL) (Correia, 2016). O consumo destes moluscos permite ainda um correto crescimento e desenvolvimento, devido à existência de proteínas essenciais para que tal aconteça, especialmente em zonas costeiras de países em desenvolvimento onde os produtos aquáticos são geralmente a única proteína animal, podendo substituir o leite e ovos devido à semelhança no conteúdo de proteína (Oliveira *et al.* 2011; Correia, 2016) Para além de que como um componente alimentar, são caracteristicamente tenros, facilmente digeridos, livres de aditivos e minimamente processados (Oliveira *et al.* 2011). Para a realização deste estudo foi escolhida a espécie de lingueirão *Solen marginatus*.

Na última década, a valorização económica do lingueirão aumentou consideravelmente (Fernández-Tajes & Méndez, 2007), fazendo com que seja considerada uma espécie de alto valor comercial (Fernández-Tajes & Méndez, 2007). De acordo com Hmida *et al.* (2012), em 2003 houve cerca de 1300 toneladas de produção de lingueirão no mundo inteiro, sendo que este número corresponde a países como Noruega, Espanha, Escócia, Estados Unidos da América, China, Chile e outros (da Costa & Martínez-Patiño, 2009). Em 2004, o valor de importação do mercado do lingueirão

chegou a atingir os 550 milhões de euros, estando presentes no grupo dos principais países deste mercado, a Espanha, a Itália, a França, Portugal e a Holanda, sendo a Espanha o país mais importador, com uma percentagem de 43% da importação de lingueirão da União Europeia (Fernández-Tajes & Méndez, 2007). Por consequência, a espécie possui preços elevados nos mercados internacionais (da Costa & Martínez-Patiño, 2009; Hmida *et al.* 2012), nos quais a procura continua a aumentar (Hmida *et al.* 2012). Interessantemente, apesar do seu valor económico e do seu nicho ecológico específico, não existem dados disponíveis relativamente aos padrões de bioacumulação e ao risco associado ao consumo direto da espécie (Sfriso *et al.* 2018).

### 1.2. *Solen marginatus*:

*Solen marginatus* é uma espécie de lingueirão pertencente à Família Solenidae, Família esta que é constituída por um grupo de moluscos bivalves altamente especializados que formam parte da infauna marinha (López *et al.* 2005). Esta espécie vive enterrada no substrato arenoso dos bancos de areia e nas lamas das zonas intertidais e subtidais, sendo que está perfeitamente adaptada a viver neste tipo de habitat, devido a possuir um grande e poderoso pé, que permite um enterramento vertical rápido até profundidades de 60 centímetros (López *et al.* 2005; Hmida *et al.* 2012), assim como uma concha alongada, estreita e com valvas quase semicilíndricas (Fernández-Tajes & Méndez, 2007). É possível encontrar este bivalve na costa Atlântica europeia, no Noroeste da costa Africana, no Mar Mediterrâneo e no Mar Negro (da Costa & Martínez-Patiño, 2009; Hmida *et al.* 2012).



Figura 1: Espécie de lingueirão *Solen marginatus*. Imagem retirada de [https://www.google.com/search?q=solen+marginatus&sxsrf=ALeKk03u2HJuYEX8SroQaEmLw96jP8mpDA:1606827394899&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwib5tnA6qztAhXGTcAKHXOcAvsQ\\_AUoAXoECAUQAw&biw=1366&bih=657#imgrc=SIJMb\\_7Wi5dyfM](https://www.google.com/search?q=solen+marginatus&sxsrf=ALeKk03u2HJuYEX8SroQaEmLw96jP8mpDA:1606827394899&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwib5tnA6qztAhXGTcAKHXOcAvsQ_AUoAXoECAUQAw&biw=1366&bih=657#imgrc=SIJMb_7Wi5dyfM) (Disponível em Dezembro de 2020).

### 1.3. Depuração e tempo de prateleira:

Como já foi referido, os bivalves são animais filtradores, e é assim que se alimentam. Desta forma, estão mais expostos ao risco de contaminação por agentes patogénicos, biotoxinas de algas e metais, sendo que as espécies que vivem debaixo do substrato estão ainda mais expostas a agentes poluentes, pois é no sedimento onde grande parte dos poluentes se concentra (Barile *et al.* 2009).

Estes animais têm a capacidade de acumular nos seus tecidos microrganismos patogénicos para o ser humano que se encontrem no meio aquático, sejam estes de origem endémica ou derivados de contaminação fecal, podendo ser esta última devido a descargas de esgotos ou escoamentos agrícolas para o meio aquático (Leoni *et al.* 2017). Desta forma, o tradicional hábito de consumir os bivalves crus ou ligeiramente cozinhados pode resultar em doenças para o ser humano (Dore & Lees, 1995; Leoni *et al.*

2017), como por exemplo a gastroenterite que é provocada pela ingestão de bivalves contaminados com *Escherichia coli* (Pereira *et al.* 2017).

No entanto, apesar dos bivalves terem que estar vivos durante o tempo de prateleira (o período de tempo no qual o alimento apresenta e conserva as características organolépticas que o caracterizam), a viabilidade não é em si uma garantia de que os bivalves estão saudáveis, pois o produto pode ter sido contaminado durante o processo de recolha ou durante o manuseio e transporte durante as fases de distribuição (Barile *et al.* 2009). Por esse motivo, já foram implementadas várias normas e padrões de higiene e saúde para garantir a qualidade do produto e proteger a saúde pública (Barile *et al.* 2009). Exemplos desses como a classificação de zonas de produção de moluscos bivalves e a depuração obrigatória para os moluscos bivalves que não sejam considerados próprios para consumo humano (Barile *et al.* 2009).

De acordo com o despacho nº 15264/2013 da 2ª série do Diário da República de 22 de novembro de 2013, existe uma classificação das zonas de produção de moluscos bivalves em Portugal. Esta é baseada em critérios bacteriológicos, mais especificamente ao nível de contaminação pela bactéria *Escherichia coli* em 100 gramas de carne e líquido intervalvar, e está dividida em 5 classes: A, B, C, Proibida e Não Classificada.

As zonas de classe A são as zonas em que o teor da bactéria *Escherichia coli* por 100 gramas de amostra é inferior ou igual a 230. Em zonas de classe A, os bivalves podem ser imediatamente apanhados e comercializados para consumo humano direto.

As zonas de classe B são aquelas em que o teor de *E. coli* por 100 gramas de amostra, em pelo menos 90% das amostras, seja maior a 230 e inferior ou igual a 4600, sem nunca exceder os 46000. Bivalves apanhados nas zonas B têm de ser destinados a depuração, transposição ou transformação em unidade industrial.

As zonas de classe C são aquelas em que o teor de *E. coli* por 100 gramas de amostra é superior a 4600 e inferior a 46000. Em zonas de classe C, os bivalves apanhados serão destinados a transposição prolongada ou transformação em unidade industrial.

As zonas de classe Proibida são aquelas em que o teor de *E. coli* por 100 gramas de amostra é superior a 46000. Nas zonas de classe Proibida, a captura de moluscos bivalves

é interdita. Nas zonas não classificadas é interdita a captura de moluscos bivalves por insuficiência de dados.

Para além da classificação de zonas de produção, houve a necessidade da criação de um processo que permitisse reduzir o teor de conteúdo microbiológico, para consumo humano, processo esse chamado de depuração (Correia, 2016).

A depuração é a opção preferida para descontaminar bivalves e é empregada em todo o mundo (Pereira *et al.* 2017). Segundo Krus (2017), a depuração é um processo onde os moluscos bivalves vivos são mantidos em tanques de água do mar esterilizada em condições que maximizam a atividade de filtração natural, o que resulta na expulsão de conteúdo intestinal, durante o tempo necessário para reduzir a contaminação de forma a torná-los próprios para consumo humano. É geralmente realizada num período de tempo que pode durar entre 24 a 48 horas ou várias semanas/meses após a captura/colheita dos bivalves (Catarina & Jesus, 2015), sendo que intervalos de 48 horas de depuração foram universalmente aceites como referência para a depuração de todas as espécies de bivalves (Monteiro, 2004). A primeira intenção da depuração é a remoção dos contaminantes microbianos patogénicos e dos microrganismos de deterioração, aumentando o tempo de validade do produto (Lees, 2000). Esta é realizada em sistemas próprios para tal, podendo estes ser de fluxo contínuo (sistemas abertos) ou de recirculação (sistemas fechados) (Barile *et al.* 2009). Durante a depuração, a água é desinfetada por via química ou física através de químicos como o cloro e o ozono, ou através de um sistema de filtração UV durante dois dias, permitindo uma purificação dos bivalves sob condições controladas (Pereira *et al.* 2017). Em sistemas fechados, a água utilizada deve ainda ser reposta em 5-10% durante 24h (Barile *et al.* 2009). De acordo com a legislação, as depuradoras têm de cumprir duas etapas: a validação e a verificação. A primeira consiste na realização de um estudo prévio da eficácia do sistema de depuração sob determinados parâmetros; a segunda consiste na realização de análises microbiológicas a agentes patogénicos específicos, tais como as bactérias *Escherichia coli* e a *Salmonella spp.*, antes e após o processo de depuração (Castilho, 2010; Correia, 2016). Após o processo de depuração, os bivalves poderão ser destinados a consumo humano se apresentarem um número mais provável (NMP) de *E. coli* inferior a 230 por cada 100

gramas de tecido e líquido intervalvar, assim como uma ausência total de *Salmonella spp.* Durante a depuração, a temperatura e a salinidade são dois parâmetros importantes a ter em consideração (Oliveira *et al.* 2011). Uma vez colocado no sistema, as condições fisiológicas devem ser de modo a maximizar a atividade dos animais (Krus, 2017). Sabe-se que, águas mais quentes mas com temperaturas dentro dos limites fisiológicos de cada espécie, promovem um aumento da taxa metabólica dos moluscos bivalves, como a digestão e a atividade enzimática, tendo todos estes fatores um papel relevante na redução microbiana (Correia, 2016). A salinidade é também um parâmetro de grande importância para o processo de depuração, tendo em conta a reduzida capacidade de adaptação dos moluscos bivalves à sua variação (Correia, 2016). Esta é um parâmetro crítico, pois afeta o processo fisiológico dos bivalves (Monteiro, 2004). Existem limites superiores e inferiores absolutos fora dos quais os bivalves não operam adequadamente e estes limites variam consoante as espécies e a origem (Krus, 2017), recomendando-se que a salinidade das águas de depuração dos bivalves não se desvie em mais do que 20% do valor da origem (Monteiro, 2004). Por exemplo, *Venerupis pullastra* e *Ruditapes philippinarum* são as duas espécies de amêijoas produzidas no Rio Tejo mais comercializadas e no entanto, para a *V. pullastra* a salinidade ótima encontra-se entre 30 e 40 e uma temperatura 20°C e para a *R. philippinarum* a salinidade ótima é entre 20 e 26 e uma temperatura de 24°C (Anacleto *et al.* 2013). As qualidades organolépticas dos bivalves obtidos de salinidades baixas podem ser melhoradas ao depurá-los em água com maior concentração de sal, tornando-os mais palatáveis para alguns consumidores (Monteiro, 2004). Após a depuração e durante o tempo de prateleira, a conservação e armazenamento dos bivalves vivos devem ser feitas em câmaras de conservação, onde estes devem ser mantidos a uma temperatura que não seja prejudicial à sua qualidade e viabilidade (Catarina & Jesus, 2015), geralmente entre 2 e 10 °C, dependendo da espécie (FAO, 2008).

#### 1.4. Fatores de stresse durante a depuração e comercialização:

A depuração, embora garanta uma melhoria da qualidade microbiológica e do valor económico, causa stresse fisiológico que pode levar a perdas significativas e alterações na composição nutricional do produto final (Krus, 2017). Longos períodos de depuração dos bivalves estão associados à perda de uma percentagem considerável do índice corporal e das reservas lipídicas, o que se traduz numa diminuição da qualidade nutricional (Krus, 2017). Durante a depuração, a atividade metabólica dos bivalves pode ser alterada, principalmente no que diz respeito ao consumo de oxigénio, que é o primeiro indicador de stresse, pois é comum encontrar as valvas das conchas ligeiramente abertas de modo a assegurar a respiração (Cunha, 2012). Segundo o *capítulo V, da Secção VII, do Anexo III do Regulamento n.º 853/2004*, após a depuração, os bivalves devem possuir características organolépticas associadas à frescura e à viabilidade, incluindo conchas isentas de sujidade, uma reação adequada à percussão, ou seja, um som maciço quando percutidos, quantidades normais de líquido intravalvar (água limpa no seu interior), cheiro a maresia e valvas fechadas ou, quando abertas fecharem hermeticamente após serem tocadas, evidenciando vitalidade. E, durante o transporte, os bivalves não deverão ser expostos a quaisquer contaminações, esmagamento ou vibração extrema, de modo a que se mantenha a qualidade e a viabilidade do produto, mantendo, idealmente, uma temperatura entre 2 e 10°C, dependendo da espécie (FAO, 2008). Em consequência da complexidade do comércio de bivalves dos dias de hoje, os animais são sujeitos a diversos fatores de stresse durante a captura, a depuração, o transporte e o armazenamento, incluindo longos períodos de exposição ao ar e flutuações na temperatura, fazendo com que haja a possibilidade de que no final, durante o tempo de prateleira, o bivalve não atenda a um certo nível de qualidade (Anacleto *et al.* 2013; Xie *et al.* 2018). Todos estes fatores têm o seu efeito no bem-estar do bivalve, sendo que fazem com que a qualidade do produto diminua, causando mudanças significativas no metabolismo do organismo e assim contribuindo para perdas económicas (Anacleto *et al.* 2013). Por isso, para além de fazermos uma análise microbiológica aos lingueirões para percebermos se a depuração resultou, quisemos testar quais os efeitos que diferentes

salinidades na depuração teriam nos lingueirões ao nível do stresse oxidativo nos mesmos, de modo a tentar perceber qual a melhor salinidade a ser utilizada à temperatura ótima já estabelecida num estudo anterior com a mesma espécie.

O stresse oxidativo é causado pela exposição a espécies reativas de oxigénio, como o anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidróxilo ( $HO^{\cdot}$ ), que podem danificar proteínas, ácidos nucleicos, membranas fosfolipídicas e ADN (Storz & Imlay, 1999; Knight, Caseldine & Boykoff, 2010). O stresse oxidativo é um produto secundário inevitável de um estilo de vida aeróbico, pois o anião superóxido e o peróxido de hidrogénio formam-se quando o oxigénio molecular é oxidado na cadeia transportadora de eletrões (Storz & Imlay, 1999). Quando a produção de espécies reativas de oxigénio se torna excessiva, o stresse oxidativo tem um efeito prejudicial na funcionalidade e integridade estrutural do tecido biológico (Knight *et al.* 2010). Um dos maiores danos provocado por estas espécies reativas é a peroxidação lipídica, pois os ácidos gordos poli-insaturados são bastante sensíveis aos radicais livres (Michiels *et al.* 1994). Nestas reações, dá-se a formação de peróxidos lipídicos, que poderão ser modificados para diferentes moléculas que são tóxicas para as células, levando assim a mudanças profundas na estrutura biológica das membranas celulares, alterando as suas funções (Michiels *et al.* 1994).

Para contrariar o stresse oxidativo, as células produzem antioxidantes que desintoxicam o oxigénio reativo e reparam o dano que este provoca (Storz & Imlay, 1999), como por exemplo a glutathiona (GSH) e enzimas como a glutathiona S – transferase (GST), e a catalase (CAT). Como foi referido em cima, espécies reativas de oxigénio, como o aniões superóxidos e os radicais hidroxilos causam a oxidação dos fosfolípidos presentes nas membranas, nas proteínas e no ADN (Knight *et al.* 2010). No entanto, a ação de enzimas como a catalase, previne os seus efeitos tóxicos através da transformação por ação da mesma de duas moléculas de peróxido de hidrogénio em água e em oxigénio (Chelikani *et al.* 2004). Existe ainda a enzima glutathiona-S-transferase (GST), que evoluiu conjuntamente com glutathiona reduzida (GSH) (Chelikani *et al.* 2004). As GST's são uma família de enzimas de desintoxicação fase II multifuncionais envolvidas na desintoxicação celular, cuja função é proteger as macromoléculas celulares de ataques de

eletrófilos reativos (Wilce & Parker, 1994; Townsend & Tew, 2003). Estão também envolvidas na excreção de substâncias fisiológicas e xenobióticas (Wilce & Parker, 1994). Elas catalisam a adição de grupos tiol da glutatona reduzida (GSH) para centros eletrofílicos em compostos orgânicos e os conjugados da glutatona são assim tornados mais hidrossolúveis, facilitando a sua eventual eliminação, ou seja, é através desta reação que xenobióticos hidrofóbicos são eliminados do organismo através da conjugação das ações da GST e da GSH (Wilce & Parker, 1994). Especificamente, as GSTs catalisam a conjugação da glutatona com uma grande variedade de compostos eletrofílicos endógenos e exógenos (Chelikani *et al.* 2004), sendo que esta conjugação é o primeiro passo para a eliminação de compostos tóxicos (Chelikani *et al.* 2004). A glutatona oxidada (GSSG) deve ser reduzida a GSH pela glutatona redutase (GR), que usa o NADPH como dador de eletrões. Este ciclo catalítico reduz a proporção de NADPH / NADP<sup>+</sup> que, por sua vez, deve ser mantida alta para evitar danos oxidativos (Alves de Almeida *et al.* 2007). Quando a taxa de produção de espécies reativas de oxigénio excede a taxa da sua decomposição pelas enzimas antioxidantes, o stresse oxidativo estabelece-se, oxidando componentes celulares chave (Alves de Almeida *et al.* 2007).

### 1.5. Objetivos:

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar o efeito da salinidade na depuração de *Solen marginatus*, para otimizar este processo e melhorar a qualidade desta espécie durante o período de comercialização (tempo de prateleira). Para tal, foram estudados os efeitos de quatro valores de salinidade (25, 30, 35 e 40) no sucesso da depuração do molusco bivalve *S. marginatus* em sistemas fechados com recirculação de água e desinfecção por sistema de filtração UV. Este trabalho teve também como objetivo testar diferentes materiais de embalagem durante o tempo de prateleira, para encontrar alternativas à utilização de plástico. Com este estudo, pretendeu-se verificar-se: 1) a salinidade influenciou a capacidade de depuração, o estado de stresse oxidativo e alocação de energia do lingueirão durante 24h; 2) o facto de a depuração ter sido feita a

diferentes salinidades influenciou o estado de stresse oxidativo e alocação de energia durante o período de prateleira, 5 dias; E 3) o acondicionamento dos lingueirões em sacos de diferentes materiais e diferentes porosidades influenciaram o estado de stresse oxidativo, alocação de energia e a sua sobrevivência.

## **2. Materiais e Métodos:**

### **2.1. Testes de depuração e tempo de prateleira:**

Montaram-se 6 sistemas de depuração (4 para a experiência das salinidades e 2 para a experiência dos sacos de armazenagem) com um tanque com uma capacidade de 250 L por sistema. Cada sistema foi equipado com um escumador de proteínas para remoção de matéria orgânica, um sistema de filtração UV, um refrigerador para controlo da temperatura da água (15°C) e uma bomba de recirculação. Para a montagem de todo o circuito e conexões, utilizaram-se tubos e peças de cloreto de polivinil (PVC), bem como mangueiras de plástico de cloreto de polivinil de diferentes tamanhos consoante as especificidades de cada equipamento. Em cima de cada tanque, foi ainda colocado um sistema de suporte, sem circulação de água e feito de PVC, onde se colocaram 5 pequenos tanques onde a água circulada caía através da abertura de 5 torneiras (uma para cada tanque pequeno). Em cada uma destas caixas foi encaixado um tubo de PVC de modo a que a água das mesmas caísse de volta para o tanque principal e a água circulasse. Para a realização da experiência, optou-se pelo uso de água salgada sintética, resultante da mistura de água doce purificada por um sistema de osmose inversa e sal sintético adequado para manutenção de invertebrados marinhos.

Os ensaios de depuração foram realizados durante 24h a quatro salinidades diferentes, sendo recolhidas amostras às 0h e às 24h para análise do conteúdo microbiológico. Foram ainda recolhidas amostras para análise de biomarcadores bioquímicos nos bivalves às 24h e passados 5 dias para verificar o stresse oxidativo e a alocação de energia resultantes de diferentes salinidades e tempo de prateleira.

Para a experiência da salinidade foram escolhidas as salinidades 25, 30, 35 e 40, sendo utilizada apenas uma em cada sistema. Na experiência dos sacos de armazenagem a salinidade utilizada nos dois sistemas foi de 35. Foi escolhida a salinidade de 35 por esta ser a salinidade média da água dos oceanos (NOAA, 2017) e também a que é usada nas depuradoras.

Os lingueirões foram capturados na zona da Ria Formosa, em Março de 2020. Quando estes chegaram a Aveiro, foram escolhidos 15 exemplares aleatoriamente e foram embalados e selados numa caixa de esferovite com gelo e enviados por correio para o IPMA (Instituto Português do Mar e da Atmosfera), em Olhão, para que procedessem à análise microbiológica dos lingueirões (T0). De seguida, foram colocados os restantes lingueirões nos sistemas de depuração, onde foram distribuídos por igual número pelos 5 tanques pequenos de cada sistema, onde ficaram durante 24 horas (T24h). Após as 24 horas, escolheram-se 15 lingueirões de cada tratamento, que foram colocados numa caixa de esferovite com gelo e selados para serem enviados para o IPMA, em Olhão, para que procedessem à análise biológica dos lingueirões após a depuração. Os restantes lingueirões foram embalados e levados para o laboratório para a análise de biomarcadores, onde alguns foram imediatamente dissecados, preservados em azoto líquido e usados para a experiência de T24h, e outros foram embalados em sacos de rede e colocados numa câmara a  $5\pm 1^{\circ}\text{C}$  para simular o tempo de comercialização, tendo sido amostrados ao final de 5 dias (T5d). É de realçar que foram feitas exatamente as mesmas análises e utilizados os mesmos procedimentos para as amostras T24h e T5d. Para a experiência dos sacos, os lingueirões foram colocados também numa câmara de  $5^{\circ}\text{C}$ , mas estes foram divididos e embalados durante os 5 dias em sacos de rede, de serapilheira e de algodão (T5d sacos).



Figura 2: Um dos sistemas de depuração utilizados com: um refrigerador (1), um tanque de 250 litros (2), um escumador de proteínas (3), um filtro UV (4) e um sistema de suporte de PVC (5) para os 5 tanques de 15 litros (6) onde se encontravam os lingueirões.

## 2.2. Análise do conteúdo microbiológico:

O conteúdo de *Escherichia coli* nos bivalves foi determinado de acordo com o método de Donovan *et al.* (1998) seguindo o ISO/DIS 16649-3:2005. Para cada amostra, aproximadamente 40 gramas de tecido e líquido intravalvar do lingueirão foram diluídos (1:10) numa solução de peptona e homogeneizados. A determinação de *E. coli* foi feita num meio de glutamato modificado com minerais e os resultados expressos como o número mais provável (NMP). A confirmação de *E. coli* foi obtida através da deteção da atividade da  $\beta$ -glucuronidase, usando um procedimento de sub-cultura em 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronídeo . Os valores de *E. coli* foram convertidos em 100 gramas de líquido intravalvar fresco e expressos na forma NMP/ 100 g.

### 2.3. Preparação das amostras para a análise de biomarcadores:

Em cada momento de amostragem, 10 indivíduos foram recolhidos por grupo experimental (N = 110). Para T24h foram 10 indivíduos de cada salinidade, sendo os restantes guardados numa arca frigorífica a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  para posterior uso em T5d e na experiência dos sacos de armazenamento, também apenas ao fim de 5 dias. Cada lingueirão foi aberto, o seu pé separado do tubo digestivo e descartado, e as brânquias removidas e congeladas lentamente numa solução anticongelante de PBS e DMSO (9:1, v:v) e mantidas em material de isolamento térmico, inicialmente a  $-20^\circ\text{C}$  por uma semana e depois a  $-80^\circ\text{C}$ , para a análise do dano genético (teste cometa). O tubo digestivo foi separado da concha e cortado em pequenos pedaços com um bisturi, de modo a facilitar a homogeneização do mesmo, sendo então colocados em tubos de 15 ml devidamente numerados e imediatamente congelados em azoto líquido e armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$ , até à análise dos biomarcadores. As amostras de lingueirões foram homogeneizadas individualmente em gelo, utilizando 4000 $\mu\text{l}$  de água ultra-pura, usando um sonicador (250 Sonifier, Brandon Ultrasonics) no modo de pulsos de 10% durante 30 segundos. Para cada amostra, foram retirados 3 alíquotas para análise do conteúdo de lípidos, açúcares, proteínas e da atividade de ETS (sistema de transporte de eletrões). Foi utilizado uma alíquota contendo 4% de hidroxitolueno butilado (BHT) em metanol para a determinação de LPO (peroxidação lipídica). O homogeneizado restante foi diluído em tampão 0.2 M K-fosfato, com um pH de 7.4 e centrifugado durante 10 minutos a 10,000 g (a  $4^\circ\text{C}$ ). O sobrenadante pós-mitocondrial (PMS) foi dividido em microtubos e mantido a  $-80^\circ\text{C}$  até voltar a ser utilizado em análises de biomarcadores relativos ao stresse oxidativo.

Todas as determinações de biomarcadores foram realizadas espectrofotometricamente, em micro-ensaios em placas de 96 poços com um leitor de microplacas MultiSkan Spectrum (Thermo Fisher Scientific, USA).



Figura 3: Lingueirão inteiro aberto (1) e tubo digestivo do lingueirão (2), após separar as brânquias e descartado o pé.

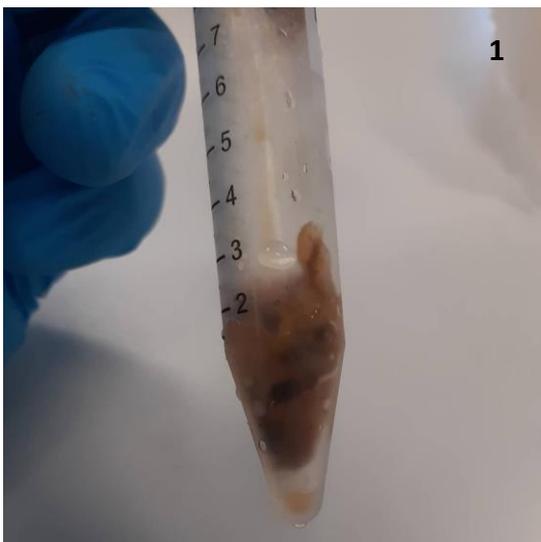


Figura 4: Trato digestivo do lingueirão triturado (1) e posteriormente homogeneizado (2), com o auxílio de um sonicador.

#### 2.4. Biomarcadores de Stress Oxidativo:

A concentração de proteínas de PMS foi determinada de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando  $\gamma$ -globulina bovina como padrão. A atividade da catalase (CAT) foi determinada no PMS através da medição da decomposição do

substrato de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240nm (Clairborne, 1985). A atividade da glutathione-S-transferase foi determinada no PMS após a conjugação da GSH com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) a 340 nm (Habig et al., 1974). O conteúdo total de glutathione (tGSH) foi determinado com fração de PMS a 412nm, utilizando uma reação de reciclagem de glutathione reduzida (GSH) com 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) na presença de excesso de glutathione redutase (GR) (Tietze, 1969; Baker, Cerniglia and Zaman, 1990). O conteúdo de TG foi calculado como a taxa de formação de TNB<sup>2-</sup> com um coeficiente de extinção do cromóforo de DTNB formado,  $\epsilon = 14.1 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Baker, Cerniglia and Zaman, 1990; Rodrigues *et al.*, 2017). A LPO foi determinada através da medição de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) a 535 nm (Bird and Draper, 1984).

## 2.5. Biomarcadores neurofisiológicos:

Mediu-se a atividade da acetilcolinesterase (AChE) utilizando o PMS, seguindo o método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961) adaptado para microplacas (Guilhermino *et al.*, 1996). O método utiliza acetiltiocolina como substrato após o aumento de absorvância a 412 nm.

## 2.6. Alocação de Energia Celular:

A energia disponível (estimada como a soma de açúcares, lípidos e proteínas) e o consumo de energia (estimado através da medição da atividade da ETS) foram determinados pelos métodos descritos por De Coen & Janssen (1997), com algumas modificações para microplacas (Rodrigues *et al.*, 2015). O valor final de CEA foi calculado como:  $\text{CEA} = \text{Ed} / \text{Ec}$  (Verslycke, Ghekiere and Janssen, 2004).

## 2.7. Energia disponível (Ea):

O conteúdo total lipídico de cada organismo foi determinado por adição de clorofórmio, methanol e água ultra-pura numa proporção de 2:2:1. Após a centrifugação,

a fase orgânica de cada amostra foi transferida para tubos de vidro e foi adicionado ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) antes de ser feita a incubação a 200°C durante 15 minutos. A absorvância foi medida a 375 nm e a tripalmitina foi usada como um padrão de lípidos. A quantificação de carboidratos foi realizada através da adição de fenol 5% e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> às amostras, com a glucose como padrão e a leitura da absorvância a 492 nm. Para a quantificação do conteúdo proteico, utilizou-se o método de Bradford (Bradford, 1976), usando albumina de soro bovino como padrão e a absorvância medida a 520 nm. As frações de energia disponível foram convertidas em valores energéticos equivalentes utilizando a energia de combustão correspondente: 39500 mJ/ g lípidos, 17500 mJ/ g glicogénio, 24000 mJ/ g proteínas (Gnaiger, 1983).

## 2.8. Produção de Energia Aeróbica:

A atividade do sistema de transporte de eletrões (ETS) foi medida utilizando o ensaio de redução de INT (Iodonitrotetrazólio), no qual a ETS é medida como a taxa de redução de INT na presença do detergente não-iónico Triton X-100, com a absorvância lida a 490 nm. A taxa de consumo de oxigénio celular foi calculada com base na relação estequiométrica, na qual em que para 2 µmol de formazan formadas, 1 µmol de oxigénio é consumida. O valor final foi obtido através da conversão para valores energéticos usando o equivalente específico para uma mistura comum/média de lípidos, proteínas e carboidratos de 480 kJ/ mol O<sub>2</sub> (Gnaiger, 1983).

## 2.9. Avaliação de dano genético:

### 2.9.1 Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com a técnica descrita por (Collins, 2004) e adaptado por (Guilherme *et al.* 2010), com os devidos ajustes no procedimento. Foi adotado um sistema de dez mini-géis por lâmina, baseado em um modelo criado por (Shaposhnikov *et al.* 2010), a fim de aumentar o rendimento do ensaio. Cada indivíduo foi

representado por 2 mini-géis replicados, sendo 5 indivíduos diferentes representados em cada lâmina. Assim, a suspensão de células branquiais foi obtida através de alguns cortes efetuados numa pequena porção de tecido em, 1 mL de PBS. Posteriormente, adicionou-se 0,07 mL de 1% agarose de baixo ponto de fusão a 0,02 mL da suspensão anterior, resultando dez mini-géis colocados em lâminas previamente tratadas com agarose de ponto de fusão normal em duas linhas de 5, sem lamelas. Os mini-géis foram deixados por  $\pm 5$  min, a 4°C, a fim de solidificar a agarose, e em seguida imersos em solução de lise (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 0,01 M Tris, 1% Triton X-100, pH 10), a 4°C, durante 1 hora, no escuro. Depois da lise, as lâminas foram lavadas 3x em Buffer F (0,1 M KCl, 0,0005 M EDTA, 0,04 M HEPES, 200 mg L<sup>-1</sup> albumina de soro bovino, pH 8), a 4°C, e colocadas na tina de eletroforese, imersas em solução de eletroforese (20 min) para tratamento alcalino. Permitiu-se que o ADN migrasse a uma voltagem fixa de 25 V, com 1,04 V/cm e uma corrente de 300 mA (conseguida ajustando o volume da solução na tina de eletroforese), durante 15 min. Posteriormente, as lâminas foram coradas com brometo de etídio (0,0875 mL distribuídos pela lâmina), cobertas com uma lamela, e cinquenta nucleoides foram observados e classificados por mini-gel, utilizando um microscópio de fluorescência Zeiss Axio Scope.A1 (ampliação de 400×). O dano no ADN foi quantificado pela classificação visual dos nucleoides em cinco classes de cometas, de acordo com a intensidade e o comprimento da cauda, ou seja, de 0 (sem cauda) a 4 (quase todo o ADN na cauda) (Collins, 2004).



Figura 5: Imagens de cometas, corados com brometo de etídio, elucidando a classificação visual desde 0 (sem cauda) a 4 (quase todo o DNA na cauda).

A classificação total, expressa como Indicador de Dano Genético (IDG), foi calculada multiplicando-se a percentagem de nucleoides em cada classe pelo fator correspondente, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{IDG} = [(\% \text{ classe de nucleoides } 0) \times 0] + [(\% \text{ classe de nucleoides } 1) \times 1] + [(\% \text{ classe de nucleoides } 2) \times 2] + [(\% \text{ classe de nucleoides } 3) \times 3] + [(\% \text{ classe de nucleoides } 4) \times 4]$$

Os valores de IDG foram expressos como unidades arbitrárias numa escala de 0 a 400, por 100 nucleoides classificados (valor médio para os 2 mini-géis observados por indivíduo).

### 2.10. Análise estatística:

Para cada tabela de dados, utilizou-se o Teste de D'Agostino-Pearson para avaliar a distribuição normal dos dados. Se as diferentes colunas, sendo cada coluna uma salinidade ou um tipo de saco utilizado, passassem no teste de normalidade, procedia-se então à realização de uma análise ANOVA de modo a perceber-se se se rejeitava ou não a hipótese nula ( $H_0$  = As diferentes salinidades/sacos não alteraram o parâmetro em análise dos lingueirões), tendo sido estabelecida a significância para  $p < 0,05$ . Caso não passassem no teste de normalidade, procedia-se primeiramente à transformação dos dados, e só depois, à realização de uma ANOVA nos dados transformados. Posteriormente, fazia-se a realização de uma análise ANOVA de comparações múltiplas de modo a perceber-se se houve ou não diferenças significativas nos lingueirões a diferentes salinidades e em diferentes sacos. Para a realização destas análises estatísticas recorreu-se à utilização do programa GraphPad Prism versão 7.03.

## 3. Resultados

Durante este estudo, não foi registada qualquer mortalidade (0%) dos lingueirões nas três experiências realizadas.

### 3.1. Conteúdo microbiológico:

Os resultados das análises do conteúdo microbiológico dos lingueirões às 0 horas ( $T_0$ ) e após um período de depuração de 24 horas ( $T_{24h}$ ) encontram-se na tabela I. Na

tabela 1 podemos verificar que, às 0 horas, os lingueirões analisados mostraram um teor de contaminação por *E. coli* inferior a 230 NMP/ 100 gramas de tecido e líquido intravalvar. Após 24 horas de depuração, podemos verificar que todos os lingueirões, independentemente da salinidade a que foram depurados, apresentaram um teor de *E. coli* inferior a 18 NMP/ 100 gramas de tecido e líquido intravalvar.

Tabela I: Valores do teor de contaminação dos lingueirões por *Escherichia coli*, antes e após depuração durante 24 horas a diferentes salinidades

<b>Tempo / Salinidade</b>	<b><i>E. coli</i> (NMP/100g)</b>
T0 / -	110
T0 / -	45
T24h / 25	< 18
T24h / 25	< 18
T24h / 30	<18
T24h / 30	<18
T24h / 35	< 18
T24h / 35	< 18
T24h / 40	< 18
T24h / 40	< 18

### 3.2. Lípidos:

A diferentes salinidades, houve uma alteração do conteúdo de lípidos dos lingueirões após 24 horas de depuração ( $F_{(3,36)} = 2,93$  ;  $p = 0,047$ ). Verificou-se que, após 24 horas, o valor do conteúdo de lípidos dos lingueirões depurados à salinidade de 30 foi significativamente inferior ao dos lingueirões depurados a 40 (Figura 6).

Após os 5 dias de tempo de prateleira, observou-se uma alteração marginalmente significativa no conteúdo de lípidos dos lingueirões depurados a diferentes salinidades ( $F_{(3,36)} = 2,64$  ;  $p = 0,065$ ). As análises mostraram ainda que houve uma diferença significativa do conteúdo de lípidos dos lingueirões depurados à salinidade 25 quando comparados com os lingueirões depurados a 40 (Figura 6). Após os 5 dias de tempo de prateleira e armazenamento em sacos de diferentes tipos, houve uma alteração significativa no conteúdo de lípidos dos lingueirões ( $F_{(2,27)} = 4,11$  ;  $p = 0,028$ ). As análises mostraram que os lingueirões armazenados em sacos de serapilheira apresentaram um valor de lípidos significativamente inferior ao dos lingueirões armazenados em sacos de rede, como mostra a figura 6.

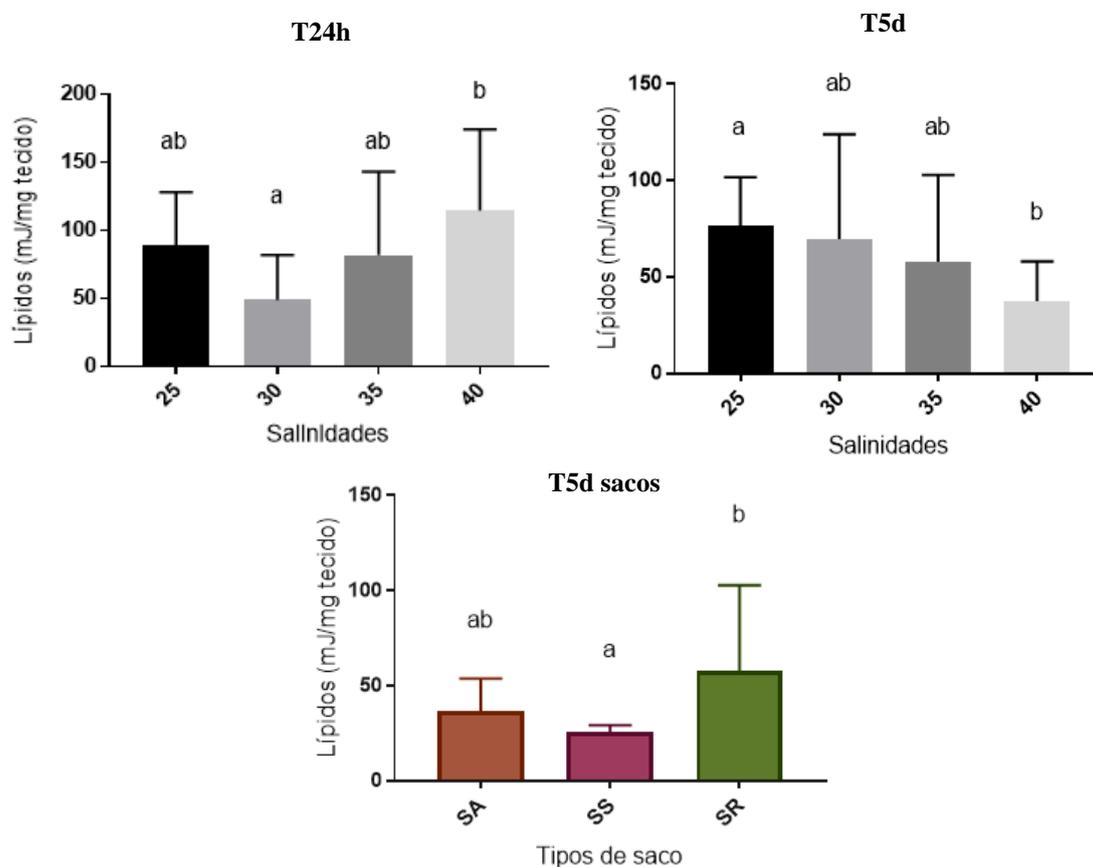


Figura 6: Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão de lípidos (mJ/ mg tecido) dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

Quanto ao conteúdo de açúcares, as análises a diferentes salinidades mostraram que não houve nenhuma alteração significativa no conteúdo de açúcares dos lingueirões após as 24 horas de depuração a diferentes salinidades ( $F_{(3,36)} = 1,013$  ;  $p = 0,3982$ , Figura 7). As análises a diferentes salinidades mostraram que não houve nenhuma alteração significativa no conteúdo de açúcares dos lingueirões após 5 dias de tempo de prateleira ( $F_{(3,36)} = 0,619$  ;  $p = 0,61$ ). Por sua vez, as análises dos diferentes sacos mostraram que houve uma alteração significativa no conteúdo de açúcares dos lingueirões após 5 dias de tempo de prateleira armazenados em diferentes tipos de saco ( $F_{(2,27)} = 5,535$  ;  $p = 0,0097$ ). Análises mostraram também que o valor do conteúdo de açúcares dos lingueirões armazenados em sacos de algodão, foi significativamente inferior do que o dos lingueirões armazenados em sacos de rede.

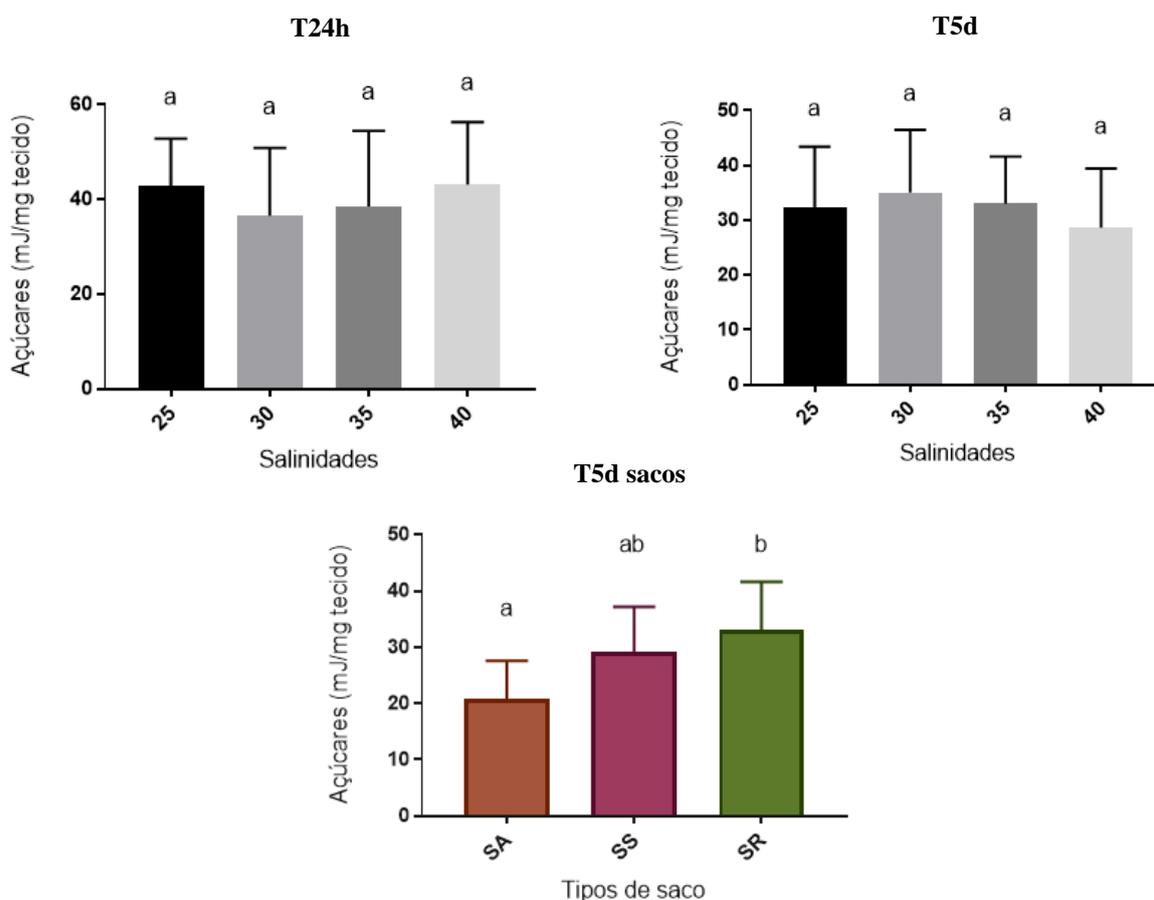


Figura 7: Gráficos de valores médios e respectivo desvio padrão de açúcares (mJ/ mg tecido) dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

### 3.4. Proteínas:

As análises a diferentes salinidades mostraram que não houve alterações significativas no conteúdo de proteínas dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas ( $F_{(3,36)} = 0,57$  ;  $p = 0,64$ , Figura 8). Quanto ao conteúdo de proteínas dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados em diferentes tipos de saco durante 5 dias de tempo de prateleira, não houveram quaisquer alterações significativas no conteúdo de proteínas dos mesmos (T5d:  $F_{(3,36)} = 1,39$  ;  $p = 0,26$ , T5d sacos:  $F_{(2,27)} = 0,24$  ;  $p = 0,79$ , Figura 8)

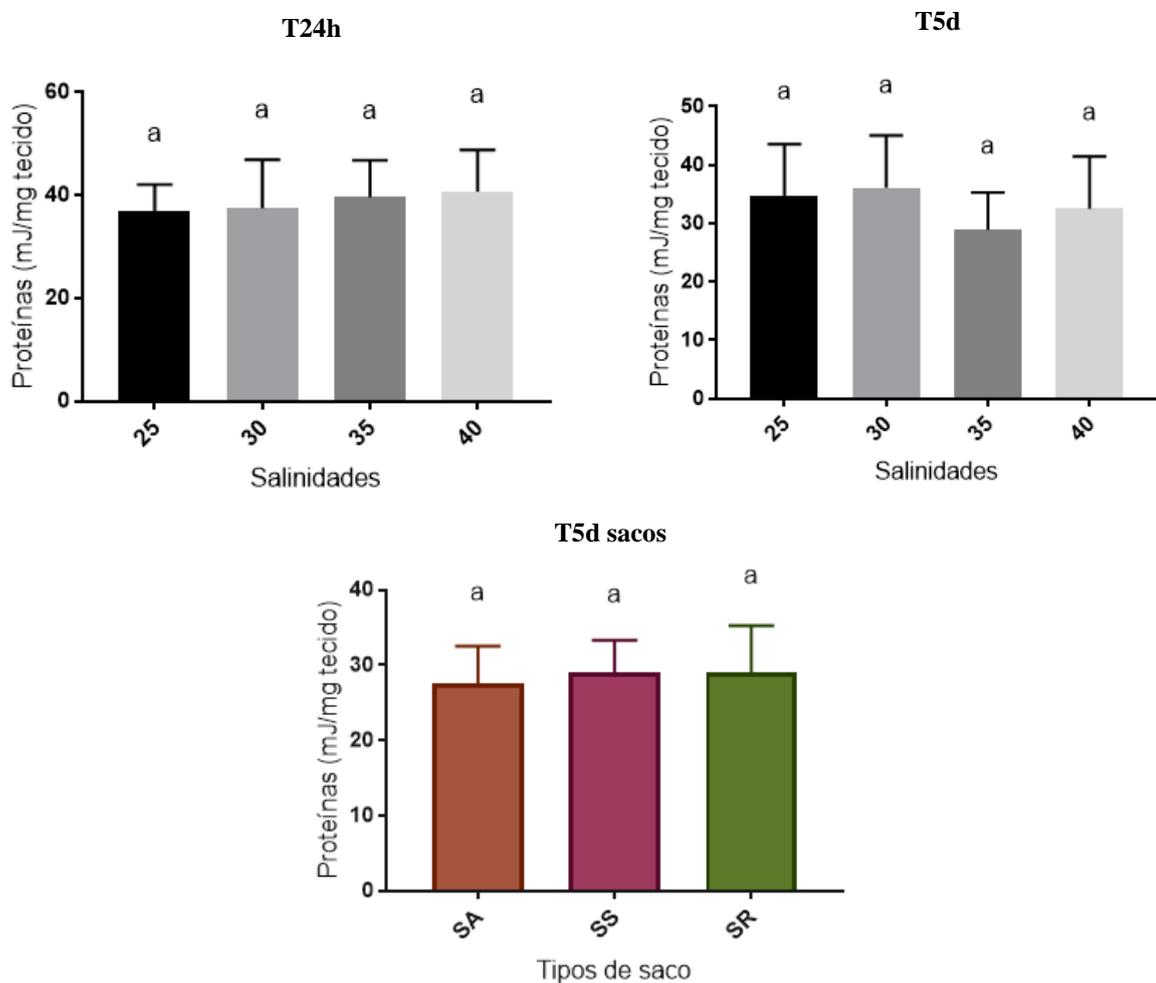


Figura 8: Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão de proteínas (mJ/ mg tecido) dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

### 3.5. Energia disponível:

As análises a diferentes salinidades mostraram que houve uma alteração significativa na alocação de energia dos lingueirões após 24 horas ( $F_{(3,36)} = 3,56$  ;  $p = 0,024$ ). Estas análises mostraram que os valores de alocação de energia foram significativamente inferiores nos lingueirões depurados à salinidade de 30, em relação aos lingueirões depurados à salinidade 40 (Figura 9).

Após 5 dias, houve uma alteração marginalmente significativa na alocação de energia dos lingueirões ( $F_{(3,36)} = 2,55$  ;  $p = 0,07$ ). Observou-se também que não existiram diferenças significativas na alocação de energia dos lingueirões depurados a diferentes salinidades, após os 5 dias de tempo de prateleira. A figura 9 mostra os valores médios de alocação de energia nos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 5 dias, onde se pode verificar uma tendência para um menor valor da alocação de energia nestes lingueirões com o aumento da salinidade.

As análises da alocação de energia, mostraram também que após 5 dias armazenados em sacos de diferentes tipos, houve uma alteração significativa na alocação de energia dos lingueirões ( $F_{(2,27)} = 4,38$  ;  $p = 0,02$ ). Na figura 9 pode verificar-se que o valor da alocação de energia dos lingueirões armazenados em sacos de rede foi significativamente superior em comparação com os restantes.

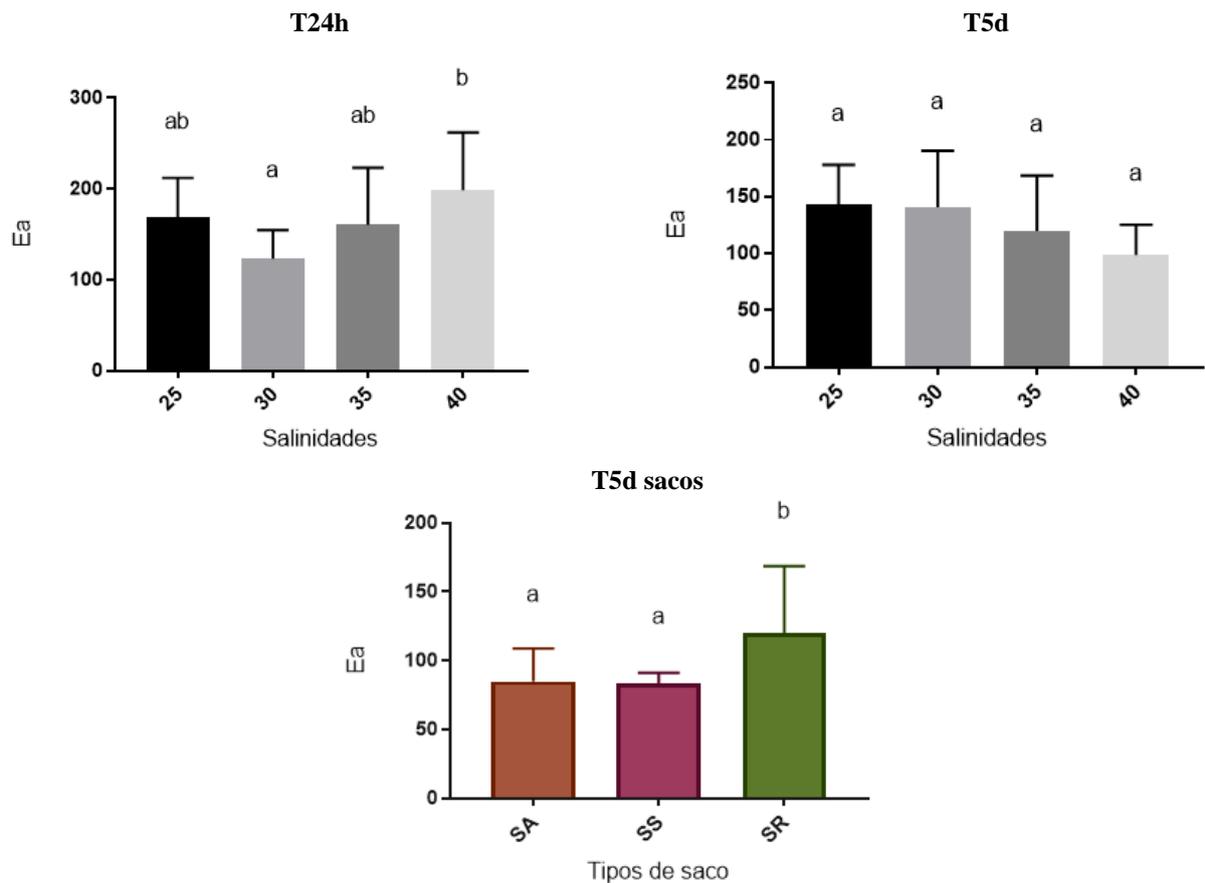


Figura 9: Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão da energia disponível dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

### 3.6. Produção de energia aeróbica:

A análise de produção de energia aeróbica ( $E_c$ ) nos lingueirões depurados a diferentes de salinidades mostraram que, após 24 horas, não houve nenhuma alteração significativa nos mesmos ( $F_{(3,36)} = 1,43$  ;  $p = 0,25$ , Figura 10). Tanto na experiência dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 5 dias de tempo de prateleira como na experiência de armazenamento dos lingueirões em diferentes tipos de saco durante 5 dias de tempo de prateleira, não houve quaisquer alterações na produção de energia aeróbica por parte dos mesmos (T5d:  $F_{(3,36)} = 0,96$  ;  $p = 0,42$  , T5d sacos:  $F_{(2,27)} = 0,33$  ;  $p = 0,72$ , Figura 10)

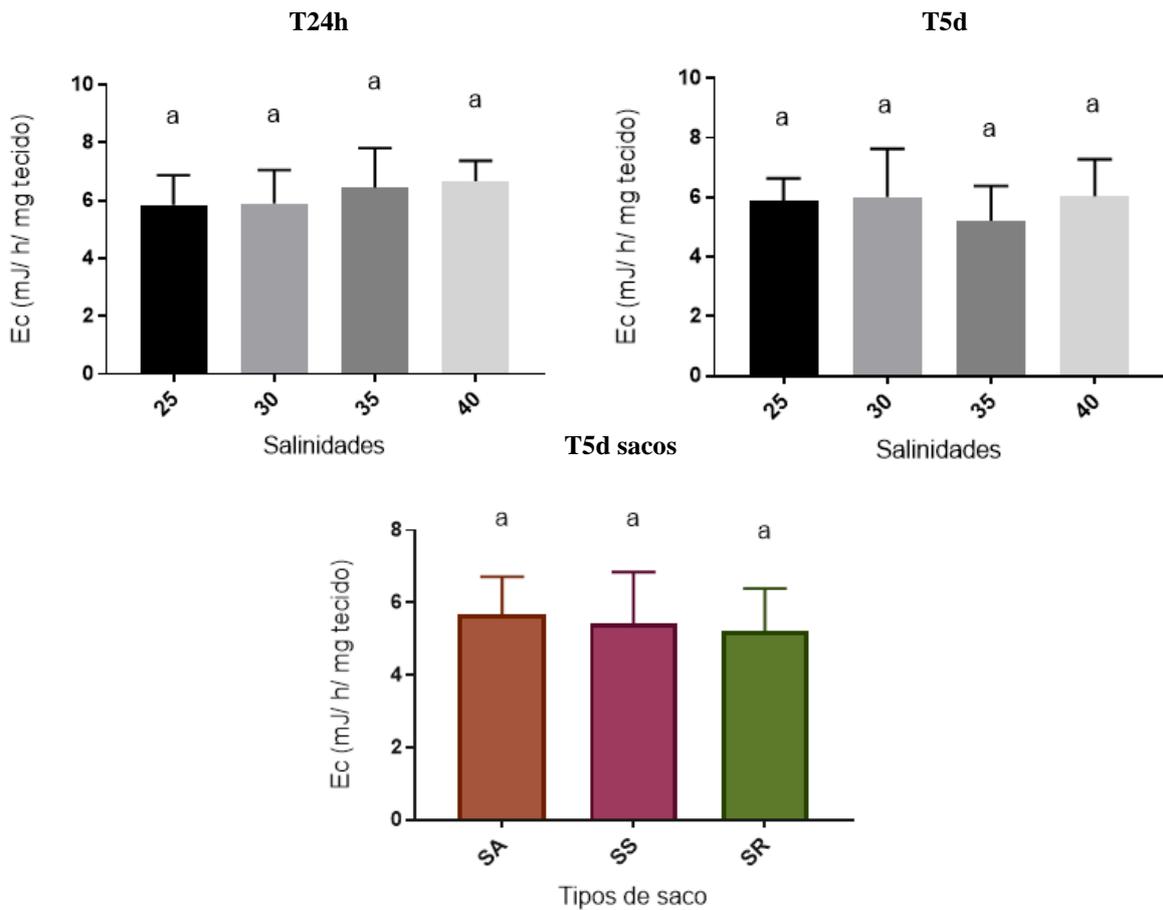


Figura 10: Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão da produção de energia aeróbica dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

### 3.7. Alocação de energia celular:

A análise aos lingueirões depurados a diferentes salinidades mostrou que não houve nenhuma alteração significativa na alocação de energia celular (CEA) nos lingueirões após 24 horas ( $F_{(3,36)} = 1,97$  ;  $p = 0,14$ , Figura 11).

As análises a diferentes salinidades de alocação de energia celular após 5 dias mostraram que houve uma alteração marginalmente significativa nos níveis de CEA nos lingueirões ( $F_{(3,36)} = 2,56$  ;  $p = 0,07$ ). Também após 5 dias armazenados em diferentes sacos, houve uma alteração da CEA nos lingueirões ( $F_{(2,27)} = 5,23$  ;  $p = 0,01$ ). Se após 5 dias de tempo de prateleira não houve nenhuma diferença na produção de CEA entre os

lingueirões depurados a diferentes salinidades, após 5 dias armazenados em diferentes tipos de sacos já houve, nomeadamente a diferença na CEA dos lingueirões armazenados em sacos de rede em relação aos armazenados em sacos de algodão e de serapilheira. Como consta na figura 11, foram os lingueirões armazenados durante 5 dias em sacos de rede que apresentaram os maiores valores de CEA, em comparação com os lingueirões dos restantes tratamentos de armazenamento.

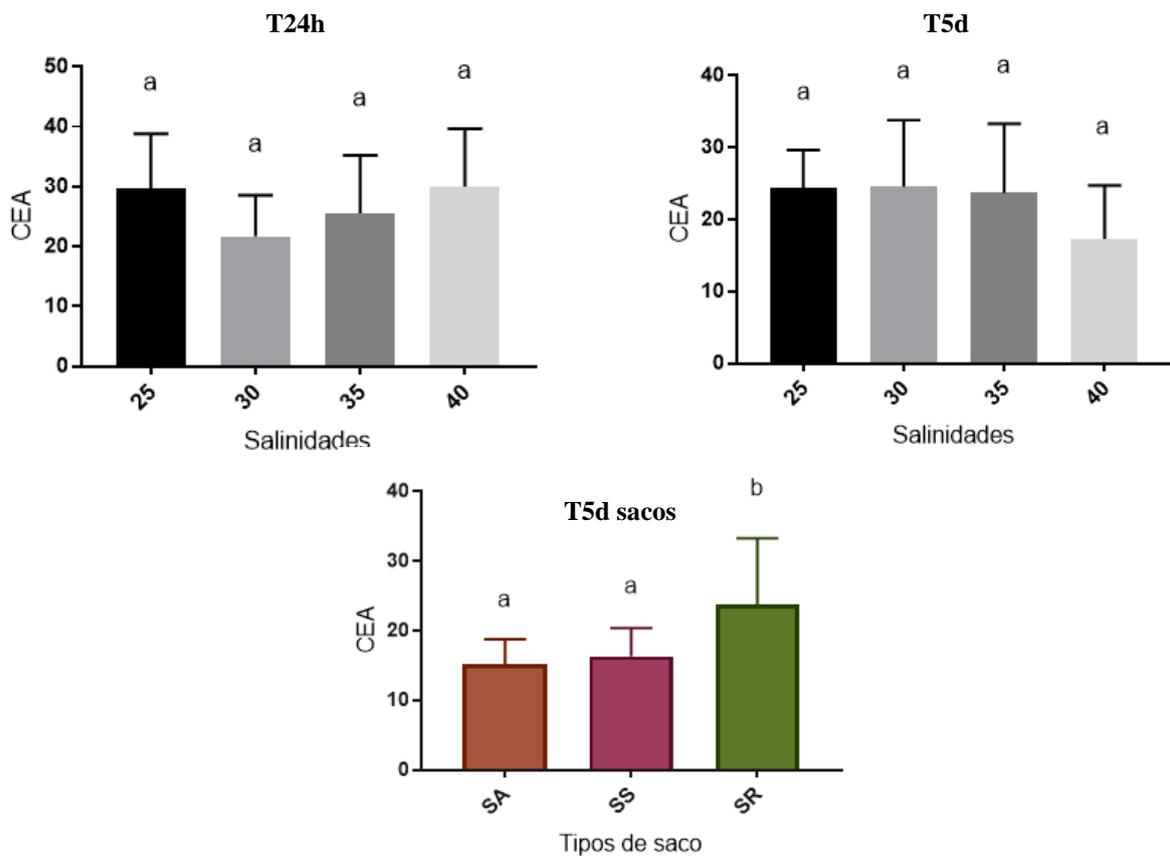


Figura 11: Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão da alocação de energia celular dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

### 3.8. Catalase:

As análises da atividade da enzima catalase (CAT) revelaram que, após uma depuração de 24 horas a diferentes salinidades, houve uma alteração significativa da atividade da mesma nos lingueirões ( $F_{(3,36)} = 6,03$  ;  $p = 0,002$ ). As análises mostraram que após 24 horas a diferentes salinidades, os lingueirões depurados à salinidade de 35, apresentaram uma atividade da CAT significativamente inferior aos lingueirões depurados nas salinidades de 25 e 30 (figura 12). O menor valor da atividade da CAT nos lingueirões previamente depurados a diferentes salinidades após 24 horas pertence ao tratamento de salinidade 30, como está constatado na Figura 12.

As análises da atividade da CAT nos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de sacos, mostraram que, em ambas as experiências, houve uma alteração da atividade de CAT (T5d:  $F_{(3,36)} = 12,33$  ;  $p < 0,0001$  , T5d sacos:  $F_{(2,27)} = 18,76$  ;  $p < 0,0001$ ). Em cada uma destas experiências houve diferenças na atividade da CAT entre os lingueirões dos diferentes tratamentos. Após 5 dias de tempo de prateleira a diferentes salinidades, os lingueirões que foram depurados a 25 e 40 apresentaram valores de atividade de CAT significativamente mais elevados que os restantes. Após 5 dias de armazenamento em diferentes tipos de saco, houve uma diferença significativa na atividade da enzima CAT entre os lingueirões armazenados em sacos de rede e os lingueirões armazenados em sacos de algodão e serapilheira. Olhando para a figura 12, observa-se que os menores valores da atividade da CAT dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 5 dias e dos lingueirões armazenados em diferentes tipos de saco durante 5 dias, pertencem aos lingueirões depurados à salinidade de 30 e aos lingueirões armazenados em sacos de rede, respetivamente.

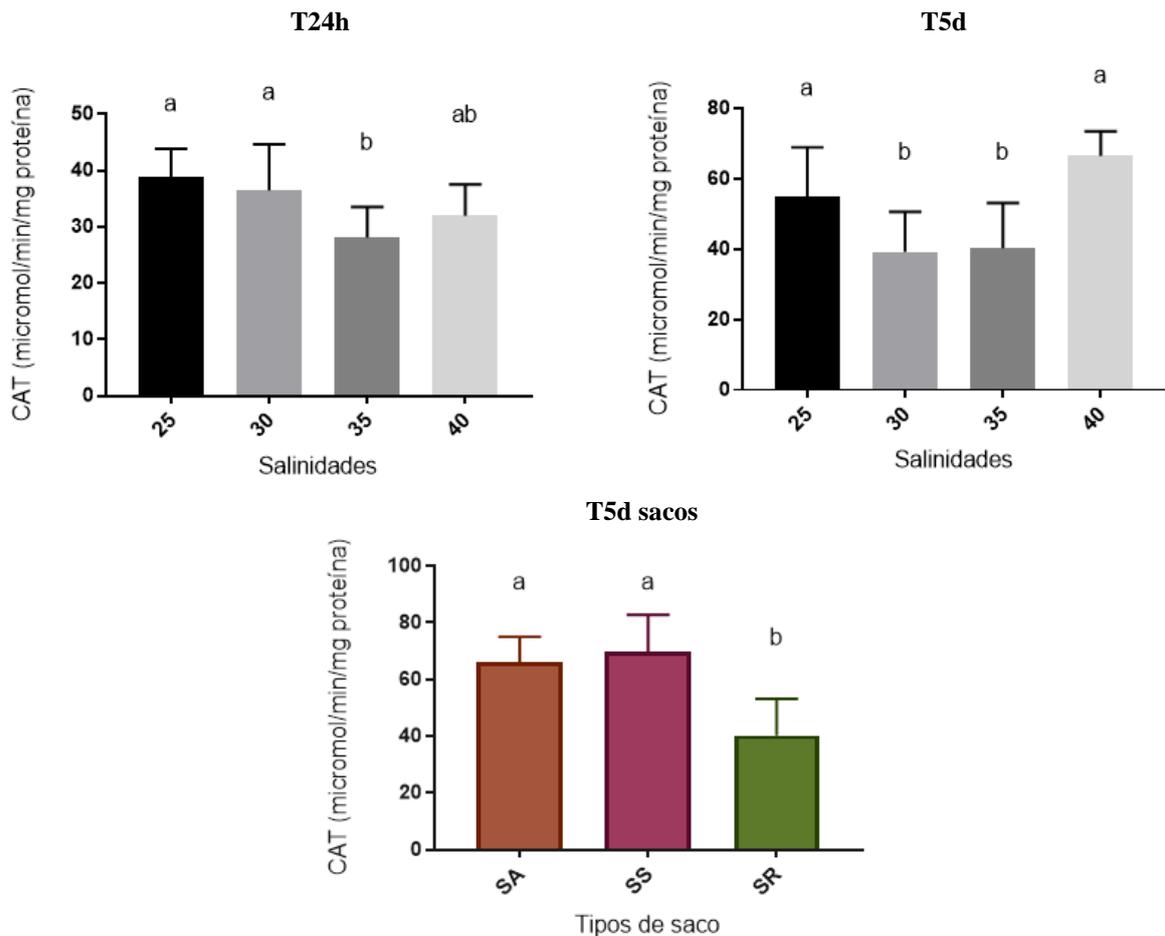


Figura 12: Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão da atividade da catalase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteína) dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

### 3.9. Glutathiona S-transferase:

A análise a diferentes salinidades mostrou que após 24 horas de depuração houve uma alteração significativa na atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST) nos lingueirões ( $F_{(3,36)} = 11,25$  ;  $p < 0,0001$ ). A análise mostrou ainda que os lingueirões previamente depurados às salinidades de 35 e 40, apresentaram valores de GST significativamente inferiores do que os restantes lingueirões (Figura 13).

As análises da atividade da GST nos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 5 dias mostraram a ausência de uma alteração significativa na atividade desta

enzima. No entanto, nos lingueirões armazenados durante 5 dias em sacos de diferentes tipos, existiu uma alteração marginalmente significativa na atividade desta enzima (T5d:  $F_{(3,36)} = 1,28$  ;  $p = 0,29$  , T5d sacos:  $F_{(2,27)} = 2,81$  ;  $p = 0,08$ ). Tanto nos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 5 dias de tempo de prateleira, como nos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco, não houve qualquer diferença significativa da atividade da GST nestes animais, como consta na figura 13.

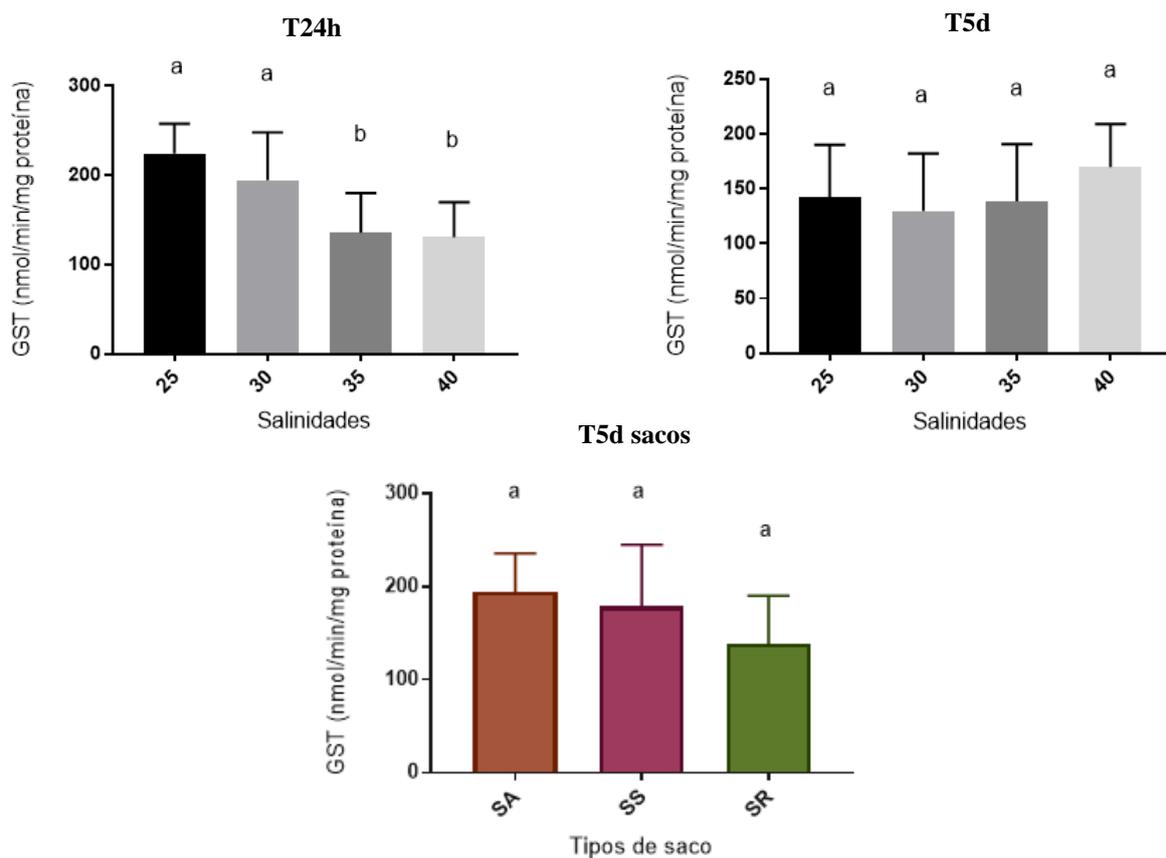


Figura 13: Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão da atividade da GST ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteína) dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

### 3.10. Glutaciona:

As análises da atividade da glutaciona (tGSH) nos lingueirões depurados a diferentes salinidades mostraram que após 24 horas, houve uma alteração significativa na produção

desta enzima ( $F_{(3,36)} = 30,31$  ;  $p < 0,0001$ ). As análises mostraram ainda que após 24 horas, os lingueirões depurados às salinidades 25 e 30 apresentaram valores de tGSH significativamente superiores aos restantes lingueirões (figura 14).

As análises de produção de tGSH a diferentes salinidades após 5 dias de tempo de prateleira e após 5 dias de armazenamento em diferentes sacos mostraram que não houve nenhuma alteração da atividade desta enzima nos lingueirões de nenhuma destas experiências (T5d:  $F_{(3,36)} = 0,73$  ;  $p = 0,54$  , T5d sacos:  $F_{(2,27)} = 1,22$  ;  $p = 0,31$ ). Também as análises mostraram que não houve nenhuma diferença significativa entre os lingueirões depurados a diferentes salinidades após 5 dias de tempo de prateleira nem entre os lingueirões armazenados em diferentes tipos de sacos, como se pode verificar na figura 14.

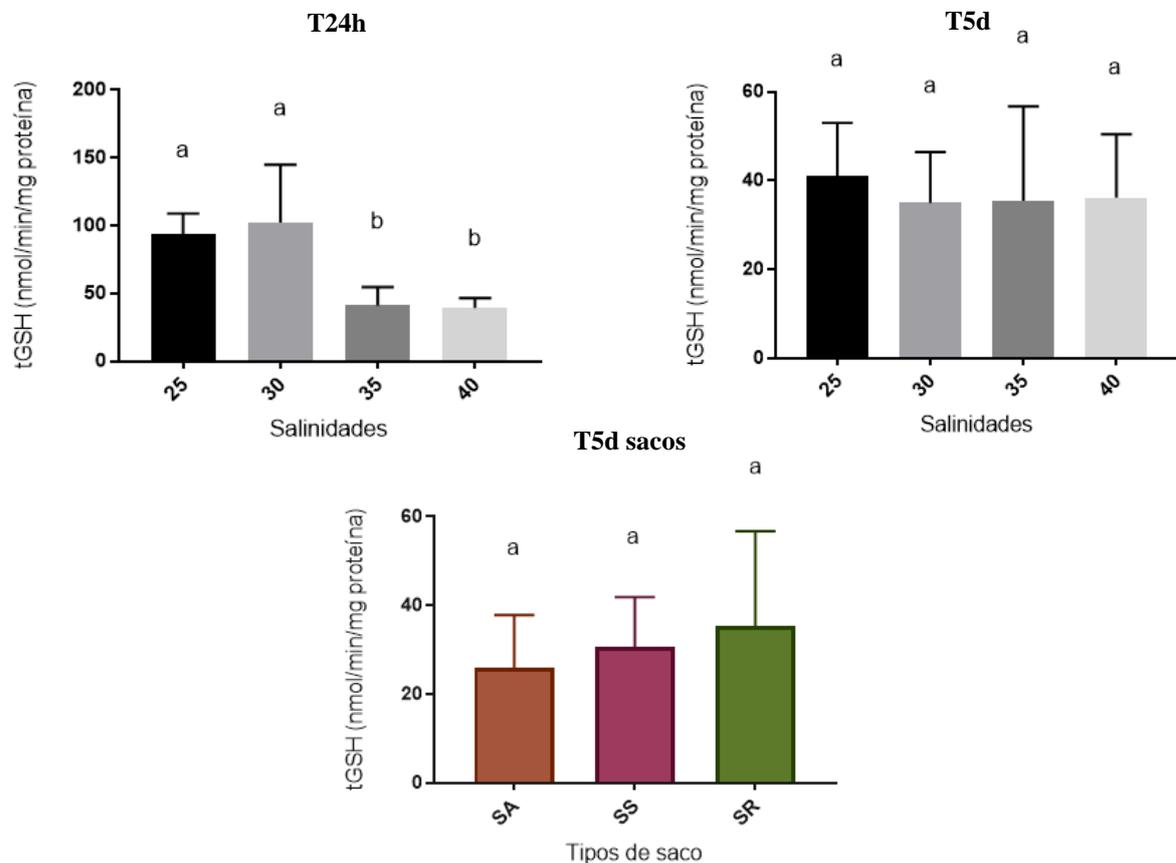


Figura 14: Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão da atividade da tGSH ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteína) dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

### 3.11. Peroxidação lipídica:

Quanto às análises da peroxidação lipídica (LPO), quer a diferentes salinidades após 24 horas, a diferentes salinidades após 5 dias de tempo de prateleira, ou após 5 dias de armazenamento em diferentes tipos de saco, não houve nenhuma alteração significativa no valor da peroxidação lipídica dos lingueirões (T24h:  $F_{(3,36)} = 1,56$  ;  $p = 0,22$  , T5d:  $F_{(3,36)} = 2,28$  ;  $p = 0,096$  , T5d sacos:  $F_{(2,27)} = 0,25$  ;  $p = 0,78$ , Figura 15)

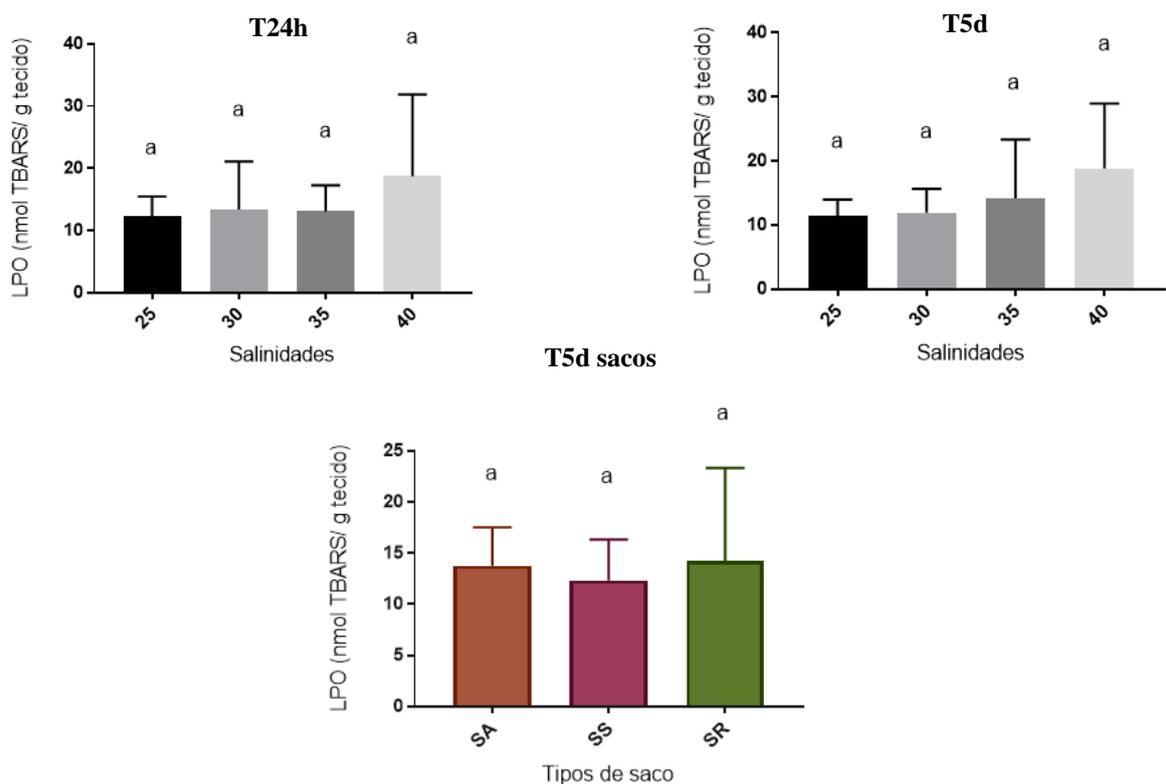


Figura 15: Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão da peroxidação lipídica (nmol/ TBARS/ g tecido) nos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

### 3.12. Acetilcolinesterase:

As análises da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) a diferentes salinidades após 24 horas de depuração mostraram que houve uma alteração significativa

da atividade da mesma nos lingueirões ( $F_{(3,36)} = 3,17 ; p = 0,036$ ). As análises permitiram ainda perceber que os lingueirões depurados à salinidade de 40 apresentaram valores da atividade da AChE significativamente inferiores aos dos lingueirões depurados à salinidade de 25 (Figura 16).

As análises da atividade da AChE nos lingueirões a diferentes salinidades após 5 dias de tempo de prateleira mostraram que houve uma alteração significativa da atividade da AChE nestes lingueirões ( $F_{(3,36)} = 5,25 ; p = 0,004$ ). Estas análises mostraram ainda que a atividade desta enzima foi significativamente inferior nos lingueirões depurados na salinidade de 40, em relação aos lingueirões depurados à salinidade de 25. A figura 16 mostra que o menor valor da atividade da AChE nos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 5 dias de tempo de prateleira pertenceu aos lingueirões do tratamento de depuração à salinidade de 40, tendo a atividade desta enzima diminuído com o aumento das salinidades.

Após 5 dias de armazenamento em diferentes tipos de saco, as análises revelaram que não houve quaisquer alterações significativas na atividade da AChE nos lingueirões depurados a diferentes salinidades ( $F_{(2,27)} = 0,77 ; p = 0,47$ ).

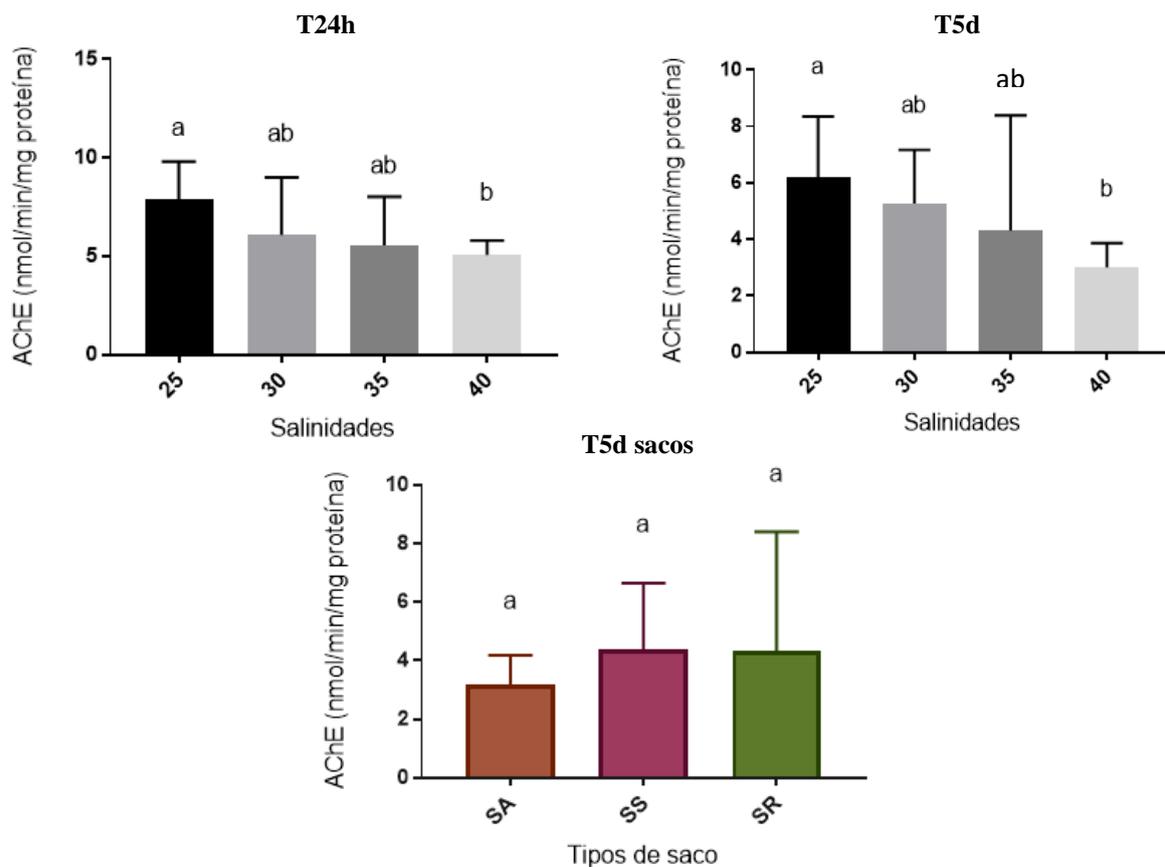


Figura 16: Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão da atividade da AChE (nmol/min/mg proteína) nos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

### 3.13. Dano oxidativo ao nível do ADN:

As análises do dano genético dos lingueirões depurados a diferentes salinidades mostram que após 24 horas houve um aumento significativo do dano genético nos lingueirões, assim como também houve nos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 5 dias de tempo de prateleira e também nos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco (T24h:  $F_{(3,36)} = 34,42$  ;  $p < 0,0001$  , T5d:  $F_{(3,36)} = 11,16$  ;  $p < 0,0001$  , T5d sacos:  $F_{(2,27)} = 186,1$  ;  $p < 0,0001$ ). As análises revelaram que após 24 horas, os lingueirões depurados à salinidade 40 apresentaram um valor de dano genético significativamente superior ao dos restantes (Figura 17). As análises revelaram

também uma diferença significativa no dano genético após 5 dias de tempo de prateleira entre os lingueirões depurados à salinidade de 30 e os restantes, e entre os lingueirões depurados a 35 e 40, tendo o maior valor de dano genético pertencido aos lingueirões depurados à salinidade 30 (Figura 17). Em relação aos lingueirões armazenados em diferentes tipos de saco durante 5 dias de tempo de prateleira, houve diferenças significativas do valor de dano genético entre os lingueirões dos três tipos de tratamento, tendo o maior valor pertencido aos lingueirões armazenados em sacos de serapilheira e o menor aos lingueirões armazenados em sacos de rede.

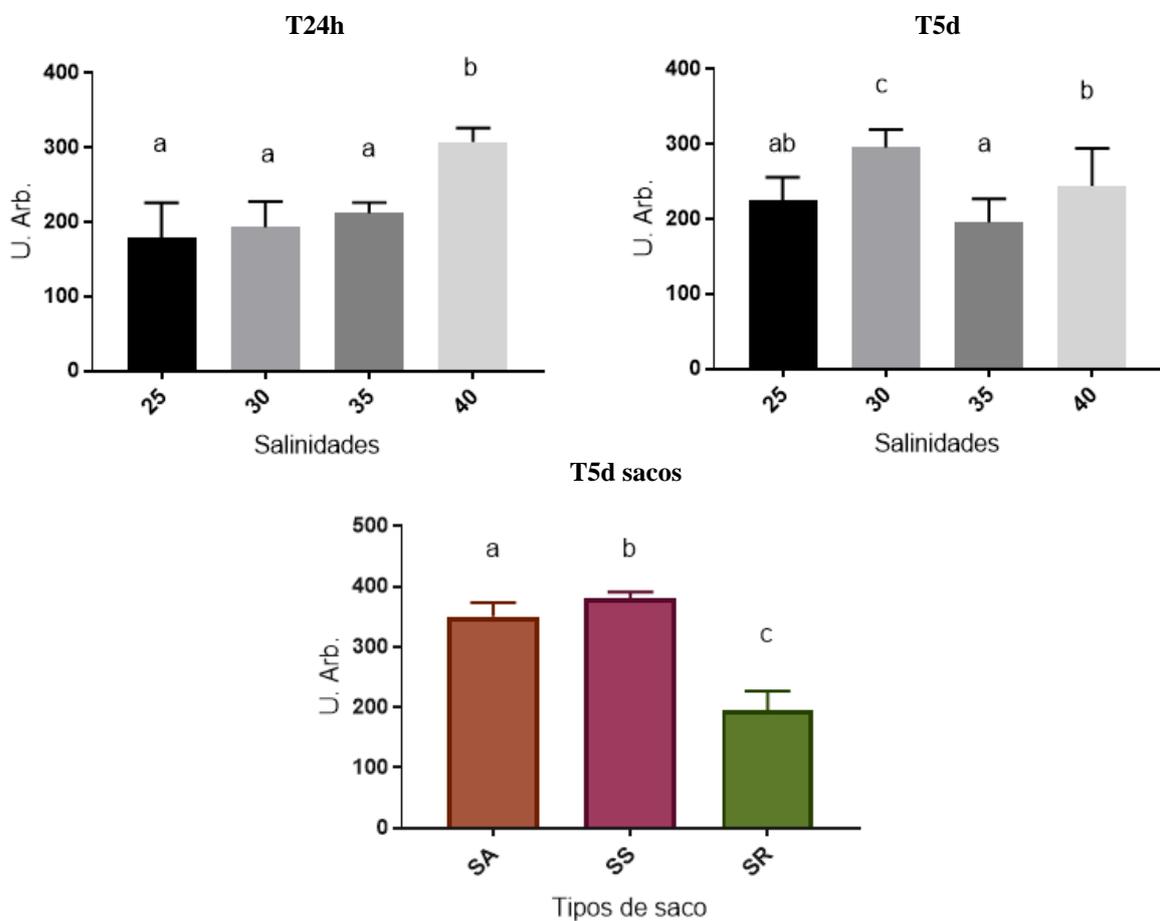


Figura 17: Gráficos de valores médios e respetivo desvio padrão do dano genético dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas de depuração, após 5 dias de tempo de prateleira e dos lingueirões armazenados durante 5 dias em diferentes tipos de saco. SA: Saco de algodão; SS: Saco de serapilheira; SR: Saco de rede

#### 4. Discussão:

A salinidade é o principal fator de controlo dos sistemas estuarinos devido à sua rápida mudança, que provoca alterações drásticas nas comunidades aquáticas, ao promover um ambiente fisiologicamente stressante (Gonçalves *et al.* 2017). A flutuação extrema da salinidade prejudica os fatores fisiológicos dos moluscos marinhos e pode resultar em grandes mortalidades e perdas económicas (Gajbhiye & Khandeparker, 2017). O fechamento das valvas e o encerramento dentro da concha são as respostas vitais a uma salinidade stressante (Pourmozaffar *et al.* 2020). Ao fazer isto, o bivalve faz com que a salinidade na cavidade palial se mantenha constante, separando o fluído interno do ambiente externo, protegendo-o assim num curto espaço de tempo do stresse osmótico (Pourmozaffar *et al.* 2020).

As análises do conteúdo microbiológico dos lingueirões mostraram que, após as 24 horas de depuração, todos os lingueirões depuraram eficazmente, independentemente da salinidade a que foram depurados.

Observaram-se alterações significativas no conteúdo de lípidos dos lingueirões após 24 horas, após 5 dias de tempo de prateleira e após 5 dias de tempo de prateleira armazenados em sacos de diferentes tipos. Verificou-se que foram os lingueirões depurados à salinidade mais elevada que apresentaram o maior valor do conteúdo de lípidos. No entanto, após 5 dias de tempo de prateleira, denotou-se uma clara diferença entre o conteúdo lipídico dos lingueirões depurados à salinidade mais baixa e mais elevada, com os lingueirões depurados a 40 a apresentarem os valores mais baixos de lípidos. Esta alteração do conteúdo lipídico sugere a existência de um stresse moderado nestes animais, pois são as reservas lipídicas umas das primeiras a ser utilizadas quando um animal começa a entrar em estado de stresse (Sokolova, 2013). Estes resultados sugerem que, embora uma depuração a uma salinidade mais elevada possa ser um pouco melhor inicialmente do que a salinidades mais baixas, pois existe uma clara diferença entre o conteúdo lipídico dos lingueirões depurados a 30 e a 40, à medida que o tempo avança e se encontram expostos ao ar e a uma baixa temperatura, estes animais vão utilizando maiores quantidades das suas reservas lipídicas, podendo levar a perdas de algumas das suas qualidades organolépticas. Ran *et al.* (2017) utilizou no seu estudo a

espécie *Sinonovacula constricta*, onde coletou exemplares da espécie e os criou em tanques com água com salinidade de 23, 13 e outros exemplares foram colocados em tanques de salinidade 13, onde essa mesma salinidade foi aumentada gradualmente até 23, sendo sempre alimentadas, com o objetivo de verificar se a salinidade é um fator determinante na composição nutricional desta espécie. O estudo mostrou que o conteúdo da maioria dos vários tipos de lípidos encontrados nestes animais diminuía com o aumento da salinidade, mas que, no entanto, isso não se observava nas espécies coletadas do seu habitat natural, sugerindo que isso estivesse relacionado com as diferentes dietas, pois as dietas podem impactar significativamente a composição lipídica dos organismos marinhos. Fokina *et al.* (2007) utilizou exemplares da espécie *Mytilus edulis* apanhados numa zona sublitoral e numa zona litoral para o seu estudo, onde os colocou durante 14 dias expostos a diferentes salinidades, observando que nesta espécie, mudanças na composição de lípidos envolvem principalmente lípidos das membranas (fosfolípidos e colesterol), o coeficiente de Georgyi (rácio de colesterol/fosfolípidos) e o conteúdo de ácidos gordos. Para a espécie de caranguejo *Chasmagnathus granulata*, existiu uma clara diferença no conteúdo lipídico no Inverno e no Verão, sendo os valores mais baixos no Verão, segundo Luvizotto-Santos *et al.* (2003).

A análise do conteúdo de açúcares nos nossos lingueirões mostrou que nem após 24 horas nem passados 5 dias a diferentes salinidades houve alterações significativas no conteúdo de açúcares dos lingueirões, sugerindo que as diferentes salinidades não causaram stresse intenso o suficiente para que estes animais utilizassem as suas reservas de açúcares durante o tempo das experiências. Já na experiência de armazenamento, foi constatada uma alteração no conteúdo de açúcares nos lingueirões, mostrando que houve uma clara diferença na utilização de sacos de rede e de algodão. Não foram encontrados quaisquer estudos que relacionassem o teor de salinidade com o conteúdo de açúcares em bivalves. Porém, o estudo de (Verslycke & Janssen, 2002) mostrou que na espécie de camarão *Neomysis integer*, quando exposta às salinidades 5 e 25 durante 4 dias sem alimento, as reservas de açúcar foram principalmente usadas como fonte de energia, e as salinidades mais elevadas (25) estavam associadas a um maior consumo de açúcares. Utilizando a espécie de caranguejo *Chasmagnathus granulata* sob as condições

de salinidades de 0, 10, 20, 30 e 40 (sendo a salinidade 30 o controlo) sem alimentação durante 168h, após 15 dias de aclimação numa salinidade de 30 e temperatura 20°C com alimentação, o estudo de Santos & Nery (1987) mostrou que, apesar de terem aclimatado a uma salinidade relativamente alta (30), estes animais nunca recuperaram os seus níveis de glucose no sangue do choque para a salinidade mais elevada, ao contrário de quando foram expostos a todas as outras salinidades mais baixas, onde recuperaram inteiramente os seus níveis de glucose no sangue, o que era esperado pelos autores, pela razão de que as salinidades do seu habitat se encontrarem entre 0 e 26.

As análises de proteínas mostraram que em nenhuma das três experiências deste estudo houve alterações significativas no conteúdo de proteínas dos lingueirões, sugerindo que estes animais não chegaram a utilizar as reservas proteicas para sua sobrevivência, sendo que as proteínas são as últimas reservas a serem mobilizadas pelos animais, pois são somente utilizadas quando o animal se encontra já num estado de stresse crítico (Sokolova, 2013). Freitas *et al.* (2016) mostrou no seu estudo com a espécie *Ruditapes philippinarum* exposta a diferentes salinidades (14, 21, 28, 35 e 42) durante 96 horas, após um período de aclimação de duas semanas à salinidade de 28 (salinidade do local de amostragem), que ao longo do gradiente de salinidades, esta espécie tendeu a manter o seu conteúdo proteico, com o conteúdo mais elevado a ser observado na salinidade mais elevada (42) em comparação com a salinidade controlo de 28. O estudo revelou que a salinidade influenciou as reservas energéticas das amêijoas, uma vez que os organismos expostos a salinidades fora do seu nível ótimo (28), apresentaram alterações no conteúdo de proteínas e de glicogénio. Carregosa *et al.* (2014), ao avaliar os efeitos de uma faixa de salinidade (0, 14, 21, 28, 35 e 42 g / L) em *R. philippinarum*, revelou que esta espécie tende a aumentar o teor de proteína ao longo do gradiente crescente de salinidade, o que foi especialmente notado em salinidades superiores a 21 g / L, mas apresentou conteúdo de glicogénio significativamente menor em salinidades inferiores a 28 g / L e numa salinidade de 42 g / L. Os resultados do nosso estudo estão, apenas em parte, de acordo com o estudo de Freitas *et al.* (2016), quando verificamos que, de facto, não houve nenhuma alteração no conteúdo de proteínas dos lingueirões depurados a diferentes salinidades em nenhum dos tempos.

No nosso estudo, as análises mostraram que após 24 horas houve uma alteração significativa na alocação de energia nos lingueirões, assim como também houve após 5 dias de tempo de prateleira e após 5 dias de tempo de prateleira armazenados em diferentes sacos. Estes resultados mostram mais uma vez a existência de um estado de stresse moderado nos lingueirões. O estudo de Yuan *et al.* (2010) observou, utilizando a espécie de pepino do mar *Apostichopus japonicus*, sob as condições de temperatura 15°C, e de salinidades 22, 27, 31,5 e 36 (após duas semanas de aclimatização) e com alimentação, que à salinidade 22, que estes animais gastavam mais energia consumida em alimento nas fezes, na respiração e na excreção, mas menos no seu crescimento, em comparação com os indivíduos sujeitos às outras salinidades. Nos grupos de salinidade 27, 31,5 e 36, não houve nenhuma diferença significativa no crescimento destes animais. Bai *et al.* (2015), utilizando também a mesma espécie a diferentes salinidades (22, 26, 30, 34 e 38) durante 60 dias com alimentação, observou resultados semelhantes a (Yuan *et al.* 2010).

Em relação à produção de energia aeróbica, as análises mostraram que não houve quaisquer alterações significativas nos valores da mesma, quer às 24 horas, após 5 dias ou após 5 dias de armazenamento em diferentes tipos de saco, sugerindo mais uma vez a ausência de um stresse intenso dos lingueirões. Caso contrário, deveria haver uma alteração significativa na produção de energia aeróbica, que coincidiria com o início de produção de energia anaeróbica devido a um stresse elevado nos lingueirões.

Quanto à alocação de energia celular, no presente estudo não houve quaisquer alterações significativas às 24 horas. Houve sim, no entanto, uma alteração marginalmente significativa nos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 5 dias de tempo de prateleira, embora não tenham existido diferenças entre os diferentes grupos de diferentes salinidades. Houve sim uma alteração significativa na CEA dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 5 dias de armazenamento em diferentes tipos de saco, tendo-se verificado que o valor da CEA dos lingueirões armazenados em sacos de rede foi superior ao dos lingueirões dos outros dois tratamentos. Os resultados obtidos mostram-nos que durante o tempo de prateleira os lingueirões sofreram de facto algum tipo de stresse, pois quando em stresse, dá-se uma

alteração da alocação ótima de energia (Sokolova, 2013), podendo isto estar relacionado com, por exemplo, a exposição dos lingueirões ao ar e também a uma baixa temperatura. Ivanina *et al.* (2020) estudou os efeitos de diferentes salinidades (30, 18 e 10) e pHs na alocação de energia celular na espécie de amêijoia *Mercenaria mercenaria* e na ostra-do-pacífico *Crassostrea gigas* durante 14 dias, sendo que no seu habitat natural, estas espécies crescem em condições de salinidade entre 10 - 35 e de pH entre 8,4 - 7,2. De acordo com este estudo, a salinidade por si só teve, de um modo geral, pouco efeito no metabolismo celular e atividades enzimáticas em *M. mercenaria*. Na ostra *C. gigas*, uma salinidade baixa aumentou o metabolismo celular, síntese de proteínas e custo de transporte de iões H<sup>+</sup>, sugerindo elevados custos de osmorregulação desta espécie. Um estudo realizado por Erk *et al.* (2008) expôs indivíduos da espécie *Neomysis integer* a várias salinidades (5, 16 e 25) e a uma concentração de cádmio durante 7 dias, tendo-se observado que não houve diferenças significativas entre o grupo controlo e os grupos expostos ao cádmio. A CEA foi afetada pela salinidade e pela duração da experiência, sendo que a todas as salinidades diminuiu com o passar do tempo, podendo isto ser explicado pelo aumento do consumo de energia (Erk *et al.* 2008). No nosso estudo, verificou-se que a CEA foi afetada sim pela duração da experiência, mas não pela salinidade. A metodologia do uso da CEA pode ser muito útil como uma ferramenta de pesquisa fisiológica aplicada para estudar o metabolismo energético de um organismo (Verslycke & Janssen, 2002).

Como já foi referido, a influência da salinidade nas respostas dos biomarcadores relacionados com a biotransformação de xenobióticos e mecanismos de excreção é especialmente relevante em moluscos eurihalinos (Da Silva *et al.* 2005) Defesas celulares antioxidantes, como a enzima CAT e a GSH, protegem a célula do stresse oxidativo, inativando a espécies reativas de oxigénio ou reparando as biomoléculas (Da Silva *et al.* 2005). Os resultados obtidos da atividade da enzima CAT mostram alterações significativas nas várias experiências e diferenças significativas entre os próprios tratamentos. Durante a exposição a um stresse moderado, antioxidantes e outros mecanismos de proteção celular são ainda mais expressados, impedindo a ocorrência de stresse oxidativo através da manutenção do balanço do estado de redox (Sokolova, 2013).

Verificamos que, quer após 24 horas, quer após os 5 dias de tempo de prateleira, os valores da atividade CAT dos lingueirões depurados à salinidade de 35 encontraram-se sempre entre os mais baixos. Ao contrário, os valores da atividade da CAT dos lingueirões depurados à salinidade de 25 e 40 encontraram-se sempre entre os maiores, sugerindo que, salinidades baixas e elevadas causam diferentes níveis de resposta de stresse a estes animais. Da Silva *et al.* (2005) estudou o efeito da salinidade na resposta de biomarcadores bioquímicos da espécie de ostra *Crassostrea rhizophorae*, exposta a óleo diesel. Exemplares da espécie foram aclimatados durante 16 dias a diferentes salinidades (35, 25, 15 e 9), de seguida expostos a diferentes concentrações de diesel durante 7 dias, seguindo-se uma depuração de 24h ou de 7 dias, tendo havido grupos controlo que não foram expostos ao diesel. Durante toda a experiência as ostras foram alimentadas. O estudo observou que o maior valor de atividade desta enzima foi à salinidade de 15, no entanto não houve alterações na atividade desta enzima após os dois períodos de depuração. Freitas *et al.* (2016) utilizou exemplares da espécie de amêijoas *Ruditapes philippinarum* no seu estudo, onde os colocou em tanques com uma salinidade de 28 durante duas semanas para aclimação, e, posteriormente, os expôs a diferentes salinidades (14, 21, 28, 35 e 42) e a diferentes concentrações de arsénico (0, 4 e 17 mg/L) durante 96 horas a 18°C, sem alimento. Observou-se nas amêijoas que não foram expostas ao arsénico, que a atividade desta enzima foi mais elevada na salinidade 28 (salinidade controlo), em comparação com salinidades mais baixas e mais elevadas, sendo que foi na salinidade mais elevada (42) que se registou a menor atividade desta enzima. Foi ainda verificado que a atividade da CAT diminuiu bastante aquando da exposição das amêijoas às salinidades 35 e 42, o que se pode relacionar com o facto de que, a salinidades mais elevadas, a atividade desta enzima mostrou ser severamente inibida. No estudo de Khessiba *et al.* (2005), utilizando a espécie de mexilhão-do-mediterrâneo (*Mytilus galloprovincialis*) durante 4 dias com fotoperíodos de 12h e sem alimentação, observou-se que salinidades mais elevadas aumentavam a atividade da CAT. Os nossos resultados estão parte de acordo com estes estudos, sendo que às 24 horas a maior atividade desta enzima ocorreu nos dois tratamentos de salinidades mais baixas, mas também na salinidade mais alta.

A glutathione S-transferase (GST) é da família de enzimas fase-II, que conjuga compostos eletrofílicos com a glutathione (GSH), e participa na proteção celular contra os efeitos tóxicos de xenobióticos e subprodutos metabólicos oxidativos (Zanette *et al.*, 2011). Após as análises à atividade da GST nos lingueirões, observou-se uma alteração significativa na atividade da mesma nos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas, observando-se que foram os tratamentos das duas salinidades mais baixas que apresentaram um maior valor da atividade desta enzima. Isto sugere que o stresse nos lingueirões foi menor quando depurados à salinidade de 25 e de 30. No entanto, após 5 dias de tempo de prateleira não se registou qualquer alteração na atividade desta enzima. Após 5 dias de armazenamento em sacos, denotou-se uma alteração marginalmente significativa na atividade da GST, mas não foi possível distinguir diferenças entre os diferentes grupos de lingueirões armazenados em diferentes tipos de saco. Da Silva *et al.* (2005) mostrou na sua experiência que depois de 16 dias de aclimatização a diferentes salinidades (9, 15, 25 e 35) e 7 dias de exposição a concentrações diferentes de diesel, as ostras deste estudo (*Crassostrea rhizophorae*) do tratamento controlo (não expostas a diesel) apresentavam uma atividade da GST significativamente mais baixa GST comparativamente às ostras que ficaram a aclimatizar apenas durante os 16 dias. Este estudo mostrou ainda um menor valor de GST nas ostras dos tratamentos de salinidades mais elevadas, em relação à salinidade mais baixa, sendo o tratamento de salinidade 25 o que apresentou um menor valor de GST após 24 horas de depuração e igualmente após 7 dias de depuração. É importante ter em conta que durante este tempo, as ostras foram alimentadas todos os dias. Foi realizado ainda outro estudo bastante parecido a este último, por autoria de Zanette *et al.* (2011), onde a espécie em questão é também uma ostra (*Crassostrea gigas*), onde realizaram experiências de depuração a diferentes salinidades (9, 15, 25 e 30) e concluíram que as salinidades por si só não causaram alterações significativas na atividade da GST. Gonçalves *et al.* (2017) mostrou que, para a espécie de berbigão *Cerastoderma edule*, a atividade desta enzima aumentava consoante o aumento de salinidade a que o animal era exposto, contrariando os resultados obtidos

no presente estudo em T24h, onde a atividade da GST diminuiu consoante o aumento da salinidade às 24 horas.

Em relação à enzima tGSH, verificou-se uma alteração significativa da atividade desta enzima nos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas. Após 24 horas é possível denotar claramente uma grande diferença entre as duas salinidades mais baixas e as duas mais elevadas, tal como aconteceu com a GST. E igual à GST, não houve qualquer alteração na atividade da tGSH dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 5 dias de tempo de prateleira e após 5 dias de tempo de prateleira armazenados em sacos. Isto porque, como já foi referido, estas duas enzimas trabalham em conjunto no combate ao stresse oxidativo. O estudo de Freitas *et al.* (2016), utilizando a amêijoia japonesa, onde revelou que os valores da tGSH eram maiores em salinidades mais elevadas do que 28 (salinidade ótima da espécie), sendo que o valor maior pertenceu ao tratamento de maior salinidade (42). Carregosa *et al.* (2014) utilizou três espécies de amêijoia diferentes (*Venerupis corrugata*, *Venerupis philippinarum* e *Venerupis decussata*) em ensaios de 144h a diferentes salinidades (0, 7, 14, 21, 35 e 42), após 48 horas de depuração, e com uma salinidade controlo (28). Carregosa *et al.* (2014) observou que as duas espécies nativas (*V. corrugata* e *V. decussata*) apresentaram os menores valores de tGSH na salinidade 28, sabendo-se que a sua salinidade fisiológica se encontra entre 21 e 28. Tendo em conta a fisionomia e o habitat da espécie de lingueirão do nosso estudo, e comparando os nossos resultados com os resultados dos destes estudos, existe de facto a possibilidade de que a salinidade ótima para este animal seja de facto uma salinidade mais elevada e próxima à salinidade da água do mar.

Condições fisiologicamente stressantes podem aumentar o dano celular em invertebrados marinhos devido a um aumento de produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), levando à oxidação das membranas lipídicas (Carregosa *et al.* 2014). A peroxidação lipídica é um marcador de dano oxidativo nas membranas celulares em invertebrados, e é um dos maiores contribuidores na perda de função da célula em função de uma situação de stresse oxidativo (Zanette *et al.* 2011) No presente estudo, observou-se que não houve alterações significativas nos níveis de LPO em nenhuma das três experiências. O estudo de Zanette *et al.* (2011) corrobora os resultados de LPO

obtidos neste estudo, pois também não houve alterações significativas nos níveis de LPO na ostra-do-pacífico (*Crassostrea gigas*) quando exposta a diferentes salinidades durante 6 dias. No entanto, o estudo Carregosa *et al.* (2014), mostrou, utilizando diferentes espécies de amêijoas expostas a diferentes salinidades, que os valores de peroxidação lipídica tinham tendência a aumentar significativamente aquando da exposição das amêijoas a salinidades fora dos seus valores ótimos (entre 21 e 28). Já o estudo de Freitas *et al.* (2016), utilizando a espécie *Ruditapes philippinarum*, obteve níveis de LPO mais elevados às mais elevadas salinidades (35 e 42) e o valor mais baixo equivalente à salinidade mais baixa, de 14. Pode concluir-se que diferentes salinidades, o tempo de prateleira e os diferentes tipos de saco não foram fatores que causassem stresse suficiente nos lingueirões para que houvesse alterações nos valores de peroxidação lipídica dos mesmos.

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela quebra da acetilcolina em sinapses colinérgicas, impedindo impulsos nervosos contínuos, o que é vital para o funcionamento normal do neurotransmissor celular. Esta enzima é bastante utilizada na deteção de poluição ambiental causada por componentes neurotóxicos (Cailleaud *et al.* 2007). Neste estudo, a atividade da AChE sofreu alterações significativas dos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 24 horas e nos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 5 dias de tempo de prateleira. Verificou-se que nos lingueirões depurados a diferentes salinidades, tanto após 24 horas como após 5 dias de tempo de prateleira, houve sempre uma diferença evidente entre os valores da AChE dos lingueirões depurados a 25 e a 40, sendo que os maiores valores pertenceram sempre aos lingueirões depurados a 25. Pfeifer *et al.* (2005) utilizaram *Mytilus spp.* para testar a atividade de AChE a diferentes salinidades (2, 7, 16 e 20) e numa salinidade controlo, natural do seu habitat (11,4) durante 240h, sendo que foi analisada a atividade da AChE às 2h, 5h, 10h, 24h, 48h, 120h e 240h. A experiência revelou que em *Mytilus sp.* as diferentes salinidades tiveram efeito na atividade da AChE. À salinidade de 7, a atividade da AChE aumentou à medida do decorrer da experiência. O estudo sugere que a diminuição significativa da atividade desta enzima à medida que a salinidade aumenta pode estar relacionado com o facto destes bivalves serem iso-osmóticos com o ambiente

que os rodeia. Ou seja, esta diminuição da atividade relacionada com o aumento da salinidade pode ser resultante de uma mudança na concentração extra e intracelular de iões inorgânicos, como consequência de uma adaptação osmótica, pois um aumento de salinidade causa um aumento simultâneo de solutos osmóticos ativos, incluindo iões inorgânicos (Pfeifer *et al.* 2005). Cailleaud *et al.* (2007) observou que os níveis de AChE no copépode *Eurytemora affinis* aumentavam à medida do decorrer da experiência (72 horas), sendo que os valores mais distintos foram medidos à exposição da salinidade 10. O nosso estudo corrobora em parte os resultados do estudo de Pfeifer *et al.* (2005), pois nos lingueirões depurados a diferentes salinidades após 5 dias de tempo de prateleira, os menores valores desta enzima pertenceram de facto aos lingueirões depurados às duas salinidades mais elevadas.

As análises ao dano genético revelaram um aumento bastante significativo do dano genético nos lingueirões nas três experiências. A experiência das diferentes salinidades após 24 horas revelou diferenças entre o dano genético dos lingueirões depurados à salinidade 40 e os restantes. Houve também diferenças deste biomarcador entre os lingueirões depurados a 30, 35 e 40 durante o tempo de prateleira, assim como entre os lingueirões armazenados nos três tipos de saco. Rank *et al.* (2005) propôs que a salinidade pode influenciar o dano genético obtido através do teste de cometa, e assim subestimando o verdadeiro impacto de contaminantes, pelo facto de que o seu estudo explicar que os mexilhões do local de amostragem são mais pequenos que o normal devido à instabilidade da salinidade do local, observando posteriormente uma correlação entre as quebras das cadeias do ADN e o tamanho dos mexilhões. Em relação ao dano genético, existe bastante informação que relaciona aumento do mesmo com a exposição dos bivalves a certos tipos contaminantes. No entanto, não foi encontrada informação que pudesse corroborar ou contrariar os resultados do presente estudo.

## 5. Conclusão:

Os resultados deste estudo mostraram que os lingueirões depuraram em 24 horas em todas as salinidades testadas. Mostraram também que as diferentes salinidades provocaram nos lingueirões stresse oxidativo moderado. No entanto, não foi o suficiente para que a capacidade de depuração dos lingueirões fosse comprometida. Durante o tempo de prateleira constatou-se que a salinidade por si só não foi suficiente para que houvesse um verdadeiro caso de stresse oxidativo, mas houve sim uma ligeira alocação de energia dos lingueirões, provavelmente mais relacionada também com outros fatores, como por exemplo a exposição ao ar e a uma baixa temperatura durante 5 dias. Com base nos resultados obtidos dos diferentes biomarcadores, pode afirmar-se que a melhor salinidade para depurar esta espécie de lingueirão para posterior comercialização encontra-se na gama entre os 25 e 30. Em relação ao acondicionamento dos lingueirões em diferentes tipos de saco, de uma maneira geral, comparando os resultados dos biomarcadores testados, continuam a ser os sacos de rede os melhores sacos a utilizar para armazenar estes animais. Nesta experiência de acondicionamento em sacos de diferentes materiais e porosidades, os sacos não influenciaram o estado de stresse oxidativo nem de mortalidade, mas influenciaram sim a alocação de energia.

Sendo este um estudo inovador, conclui-se que, apesar de resultados promissores, são necessários mais estudos que relacionem o efeito da salinidade por si só no estado de stresse oxidativo em lingueirões, assim como estudos que aprofundem no efeito que diferentes salinidades têm sobre a alocação de energia e os custos de manutenção energéticos destes animais quando sujeitos a stresses na depuração e durante o tempo de prateleira. Isto para que, no futuro, seja possível depurar e manter em prateleira estes animais da melhor forma possível, de modo a que não percam as qualidades nutritivas e organolépticas que lhes são tão características, e que a tantos consumidores agradam.

## 6. Referências:

- Akberali, H. B., & Trueman, E. R. (1985). Effects of Environmental Stress on Marine Bivalve Molluscs. *Advances in Marine Biology*, 22(C), 101–198. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60051-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60051-6)
- Alves de Almeida, E., Celso Dias Bainy, A., Paula de Melo Loureiro, A., Regina Martinez, G., Miyamoto, S., Onuki, J., Di Mascio, P. (2007). Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 146(4), 588–600. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.040>
- Anacleto, P., Maulvault, A. L., Barrento, S., Mendes, R., Nunes, M. L., Rosa, R., & Marques, A. (2013). Physiological responses to depuration and transport of native and exotic clams at different temperatures. *Aquaculture*, 408–409, 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.05.035>
- Bai, Y., Zhang, L., Liu, S., Ru, X., Xing, L., Cao, X., Zhang, T. & Yang, H. (2015). The effect of salinity on the growth, energy budget and physiological performance of green, white and purple color morphs of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture*, 437, 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.020>
- Baker, M., Cerniglia, G., & Zaman, A. (1990). Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Analytical Biochemistry*, 190(2), 360–5.
- Barile, N. B., Scopa, M., Nerone, E., Mascilongo, G., Recchi, S., Cappabianca, S., & Antonetti, L. (2009). Study of the efficacy of a closed cycle depuration system on bivalve molluscs. *Veterinaria Italiana*, 45(4), 555–55566.
- Bird, R. P., & Draper, H. H. (1984). [35] Comparative Studies on Different Methods of Malonaldehyde Determination. *Methods in Enzymology*, 105(C), 299–305. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05038-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05038-2)

- Bolognesi, C., Cirillo, S., & Chipman, J. K. (2019). Comet assay in ecogenotoxicology: Applications in *Mytilus* sp. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842(May), 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.05.004>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Cailleaud, K., Maillet, G., Budzinski, H., Souissi, S., & Forget-Leray, J. (2007). Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 147(4), 841–849. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.09.012>
- Carregosa, V., Velez, C., Soares, A. M. V. M., Figueira, E., & Freitas, R. (2014). Physiological and biochemical responses of three Veneridae clams exposed to salinity changes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 177–178, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.08.001>
- Castilho, F. (2010). *Controlo de Qualidade de Moluscos Bivalves Vivos*. Monografia. Matosinhos.
- Catarina, L., & Jesus, A. (2015). *Implementação da Norma NP EN ISO 22000 : 2005 em centros de depuração de bivalves: Estudo de caso*. 1–66. Retrieved from <https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/8101>
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(2), 192–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
- Clairborne, A., 1985. Catalase activity, in: Greenwald, R.A. (Ed.), *CRC Handbook of Methods in Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, pp. 283–284.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications,

and limitations. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>

Correia, M. H. O. C. (2016). *Otimização do processo de depuração de moluscos bivalves*. 1–56. Retrieved from [https://ria.ua.pt/bitstream/10773/17150/1/Dissertação\\_Maria\\_Helena\\_Correia.pdf](https://ria.ua.pt/bitstream/10773/17150/1/Dissertação_Maria_Helena_Correia.pdf)

Cunha, V. D. A. C. (2012). *Redução do teor de contaminantes químicos provenientes do Estuário do Tejo*. (Dissertação de mestrado, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal). Disponível a partir de <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/5326/1/final%20tese%201%20%281%29.pdf>

Da Costa, F., & Martínez-Patiño, D. (2009). Culture potential of the razor clam *Solen marginatus* (Pennánt, 1777). *Aquaculture*, 288(1–2), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.11.001>

Da Silva, A. Z., Zanette, J., Ferreira, J. F., Guzinski, J., Freire Marques, M. R., & Dias Bainy, A. C. (2005). Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62(3), 376–382. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.12.008>

De Coen, W., & Janssen, C. R. (1997). The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6, 43–55. <https://doi.org/10.1023/A:1008228517955>

Diário da República, 2ª série – Nº 227 – Despacho nº 15264/2013. Instituto Português do Mar e da Atmosfera. Disponível em [https://www.ipma.pt/export/sites/ipma/bin/docs/institucionais/desp.15264.2013\\_zonas.pdf](https://www.ipma.pt/export/sites/ipma/bin/docs/institucionais/desp.15264.2013_zonas.pdf).

Dore, W. J., & Lees, D. N. (1995). Behavior of *Escherichia coli* and male-specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalve molluscs before and after deputation. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 2830–2834.

<https://doi.org/10.1128/aem.61.8.2830-2834.1995>

- El Haj, Y., Bohn, S., & Souza, M. M. (2019). Tolerance of native and invasive bivalves under herbicide and metal contamination: an ex vivo approach. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(30), 31198–31206. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06256-x>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Erk, M., Muysen, B. T. A., Ghekiere, A., & Janssen, C. R. (2008). Metallothionein and cellular energy allocation in the estuarine mysid shrimp *Neomysis integer* exposed to cadmium at different salinities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 357(2), 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.01.015>
- FAO (2008). Disponível em <http://www.fao.org>.  
<http://www.fao.org/3/i0201e/i0201e.pdf>.
- Fernández-Tajes, J., & Méndez, J. (2007). Identification of the razor clam species *Ensis arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus*, *E. macha*, and *Solen marginatus* using PCR-RFLP analysis of the 5S rDNA region. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(18), 7278–7282. <https://doi.org/10.1021/jf0709855>
- Fokina, N. N., Nefedova, Z. A., Nemova, N. N., & Khalaman, V. V. (2007). Modulating role of lipids and their fatty acids in adaptation of the White Sea mussels *Mytilus edulis* to environmental salinity change. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 43(4), 379–387. <https://doi.org/10.1134/S0022093007030023>
- Freitas, R., Costa, E., Velez, C., Santos, J., Lima, A., Oliveira, C., Rodrigues, A. M., Quintino, V. & Figueira, E. (2012). Looking for suitable biomarkers in benthic macroinvertebrates inhabiting coastal areas with low metal contamination: Comparison between the bivalve *Cerastoderma edule* and the Polychaete *Diopatra neapolitana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 75(1), 109–118.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.08.019>

- Freitas, R., Salamanca, L., Velez, C., Wrona, F. J., Soares, A. M. V. M., & Figueira, E. (2016). Multiple stressors in estuarine waters: Effects of arsenic and salinity on *Ruditapes philippinarum*. *Science of the Total Environment*, 541, 1106–1114. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.149>
- Gajbhiye, D. S., & Khandeparker, L. (2017). Immune response of the short neck clam *Paphia malabarica* to salinity stress using flow cytometry. *Marine Environmental Research*, 129, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.04.009>
- Gallardi, D. (2014). Effects of Bivalve Aquaculture on the Environment and Their Possible Mitigation: A Review. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 05(03). <https://doi.org/10.4172/2150-3508.1000105>
- Gibbs, M. T. (2007). Sustainability performance indicators for suspended bivalve aquaculture activities. *Ecological Indicators*, 7(1), 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2005.10.004>
- Gnaiger, E. (1983). Calculation of Energetic and Biochemical Equivalents of Respiratory Oxygen Consumption. In E. Gnaiger & H. Forstner (Eds.), *Polarographic Oxygen Sensors. Aquatic and Physiological Applications*. (pp. 337–345). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-81863-9\\_30](https://doi.org/10.1007/978-3-642-81863-9_30)
- Gonçalves, A. M. M., Barroso, D. V., Serafim, T. L., Verdelhos, T., Marques, J. C., & Gonçalves, F. (2017). The biochemical response of two commercial bivalve species to exposure to strong salinity changes illustrated by selected biomarkers. *Ecological Indicators*, 77, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.01.020>
- Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M. A., & Pacheco, M. (2010). European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup® - A glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis*, 25(5), 523–530. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq038>
- Guilhermino, L., Lopes, M. C., Carvalho, A. P., & Soares, A. M. V. M. (1996).

- Acetylcholinesterase activity in juveniles of *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57(6), 979–985.  
<https://doi.org/10.1007/s001289900286>
- Habig, W.H.H., Pabst, M.J.J., Jacoby, W.B., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249, 7130–7139.
- Hmida, L., Fassatoui, C., Ayed, D., Ayache, N., & Romdhane, M. S. (2012). Genetic characterization of the razor clam *Solen marginatus* (Mollusca: Bivalvia: Solenidae) in Tunisian coasts based on isozyme markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 40, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.10.016>
- Hoffmann, J. A. (2004). Primitive immune systems. *Immunological Reviews*, 198, 5–9.  
<https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0134.x>
- Hood, M. A., Ness, G. E., & Blake, N. J. (1983). Relationship among fecal coliforms, *Escherichia coli*, and *Salmonella spp.* in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(1), 122–126. <https://doi.org/10.1128/aem.45.1.122-126.1983>
- INE. (2020). Portal do Instituto Nacional de Estatística. <http://www.ine.pt/>. Disponível em dezembro de 2020
- IPMA. (2016). Instituto Português do Mar e da Atmosfera. <http://ipma.pt/>. Disponível em dezembro de 2020
- Ivanina, A. V., Jarrett, A., Bell, T., Rimkevicius, T., Beniash, E., & Sokolova, I. M. (2020). Effects of seawater salinity and pH on cellular metabolism and enzyme activities in biomineralizing tissues of marine bivalves. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 248(June).  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110748>
- Khessiba, A., Roméo, M., & Aïssa, P. (2005). Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environmental Pollution*, 133(2), 275–281.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.05.035>

- Kim, S. K., Oh, J. R., Shim, W. J., Lee, D. H., Yim, U. H., Hong, S. H., Shin, Y. B. & Lee, D. S. (2002). Geographical distribution and accumulation features of organochlorine residues in bivalves from coastal areas of South Korea. *Marine Pollution Bulletin*, 45(1–12), 268–279. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00279-X](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00279-X)
- Knight, J., Caseldine, C., & Boykoff, M. (2010). Forum review: Forum review. *Geographical Journal*, 176(3), 267–269. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4959.2010.00371.x>
- Krus, P. (2017). *Faculdade de Medicina Veterinária Instituto Superior de Agronomia Caracterização Microbiológica de Bivalves Vivos: Efeito do Transporte e Variação Temporal Entre Espécies* Patrícia Krus Policarpo DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA-PRODUÇÃO AN. Retrieved from [https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/15226/1/Caracterização Microbiológica de Bivalves Vivos\\_Efeito do Transporte e Variação Temporal Entre Espécies.pdf](https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/15226/1/Caracterização%20Microbiológica%20de%20Bivalves%20Vivos_Efeito%20do%20Transporte%20e%20Variação%20Temporal%20Entre%20Espécies.pdf)
- Lees, D. (2000). Viruses and bivalve shellfish. *International Journal of Food Microbiology*, 59(1–2), 81–116. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00248-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00248-8)
- Leoni, F., Chierichetti, S., Santarelli, S., Talevi, G., Masini, L., Bartolini, C., Rocchegiani, E., Haouet, M. N. & Ottaviani, D. (2017). Occurrence of *Arcobacter spp.* and correlation with the bacterial indicator of faecal contamination *Escherichia coli* in bivalve molluscs from the Central Adriatic, Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 245, 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.006>
- López, J., Rodríguez, C., & Carrasco, J. F. (2005). Comparación del ciclo reproductor de *Solen marginatus* (Pulteney, 1799) (Mollusca: Bivalvia) en las rías del Eo y Villaviciosa (Asturias, noroeste de España): Relación con las variables ambientales. *Boletín - Instituto Espanol de Oceanografía*, 21(1–4), 317–327.
- Luvizotto-Santos, R., Lee, J. T., Branco, Z. P., Bianchini, A., & Nery, L. E. M. (2003). Lipids as Energy Source during Salinity Acclimation in the Euryhaline Crab *Chasmagnathus*

*granulata* Dana, 1851 (Crustacea-Grapsidae). *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 295(2), 200–205.  
<https://doi.org/10.1002/jez.a.10219>

Monteiro, L. M. P. S. (2004). Estudo da eficácia da depuração na redução da contaminação bacteriológica do mexilhão (*Mytilus spp.*) e sua viabilidade (Dissertação de mestrado, Universidade do Porto, Portugal).

Matias, M. A. G. (2013). *Influência da variação sazonal no valor nutricional e avaliação da estabilidade da amêijoabo produzida em aquacultura*. (Dissertação de mestrado, Instituto Politécnico de Leiria, Portugal). Disponível a partir de <https://iconline.ipleiria.pt/bitstream/10400.8/1062/1/Projeto%20Marta%20Matias.pdf>.

Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., & Remacle, J. (1994). Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and CU/ZN-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(3), 235–248. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90079-5)

NOAA (2017). [www.noaa.gov](http://www.noaa.gov). Disponível a dezembro de 2020

Oliveira, J., Cunha, A., Castilho, F., Romalde, J. L., & Pereira, M. J. (2011). Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives - A mini-review. *Food Control*, 22(6), 805–816.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.032>

Pereira, C., Moreirinha, C., Teles, L., Rocha, R. J. M., Calado, R., Romalde, J. L., Nunes, M. L. & Almeida, A. (2017). Application of phage therapy during bivalve depuration improves *Escherichia coli* decontamination. *Food Microbiology*, 61, 102–112.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.003>

Pfeifer, S., Schiedek, D., & Dippner, J. W. (2005). Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus sp.* from the south-western Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*,

320(1), 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.12.020>

- Pourmozaffar, S., Tamadoni Jahromi, S., Rameshi, H., Sadeghi, A., Bagheri, T., Behzadi, S., Gozari, M., Zahedi, M. R. & Abrari Lazarjani, S. (2020). The role of salinity in physiological responses of bivalves. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1548–1566. <https://doi.org/10.1111/raq.12397>
- Ran, Z., Li, S., Zhang, R., Xu, J., Liao, K., Yu, X., Zhong, Y., Ye, M., Yu, S., Ran, Y., Huang, W. & Yan, X. (2017). Proximate, amino acid and lipid compositions in *Sinonovacula constricta* (Lamarck) reared at different salinities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(13), 4476–4483. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8311>
- Rank, J., Jensen, K., & Jespersen, P. H. (2005). Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled from coastal sites in Denmark. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 585(1–2), 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.04.008>
- Rees, G., Pond, K., & Kay, D. (2010). *Safe management of shellfish and harvest waters*. World Health Organization.
- Rodrigues, A. C. M., Gravato, C., Quintaneiro, C., Bordalo, M. D., Golovko, O., Žlábek, V., Barata, C., Soares, A. M. V. M. & Pestana, J. L. T. (2017). Exposure to chlorantraniliprole affects the energy metabolism of the caddisfly *Sericostoma vittatum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(6), 1584–1591. <https://doi.org/10.1002/etc.3684>
- Rodrigues, A. C. M., Gravato, C., Quintaneiro, C., Golovko, O., Žlábek, V., Barata, C., Soares, A. M. V. M. & Pestana, J. L. T. (2015). Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment*, 508, 506–513. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.021>
- Santos, E. A., & Nery, L. E. M. (1987). Blood glucose regulation in an estuarine crab, *Chasmagnathus Granulata* (Dana, 1851) exposed to different salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 87(4), 1033–1035.

[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(87\)90033-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(87)90033-8)

- Sfriso, A. A., Chiesa, S., Sfriso, A., Buosi, A., Gobbo, L., Boscolo Gnolo, A., & Argese, E. (2018). Spatial distribution, bioaccumulation profiles and risk for consumption of edible bivalves: a comparison among razor clam, Manila clam and cockles in the Venice Lagoon. *Science of the Total Environment*, 643, 579–591. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.057>
- Shaposhnikov, S., Azqueta, A., Henriksson, S., Meier, S., Gaivão, I., Huskisson, N. H., Smart, A., Brunborg, G., Nilsson, M. & Collins, A. R. (2010). Twelve-gel slide format optimised for comet assay and fluorescent in situ hybridisation. *Toxicology Letters*, 195(1), 31–34. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.02.017>
- Sokolov, E. P., Markert, S., Hinzke, T., Hirschfeld, C., Becher, D., Ponsuksili, S., & Sokolova, I. M. (2019). Effects of hypoxia-reoxygenation stress on mitochondrial proteome and bioenergetics of the hypoxia-tolerant marine bivalve *Crassostrea gigas*. *Journal of Proteomics*, 194(October), 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.009>
- Sokolova, I. M. (2013). Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integrative and Comparative Biology*, 53(4), 597–608. <https://doi.org/10.1093/icb/ict028>
- Storz, G., & Imlay, J. A. (1999). Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology*, 2(2), 188–194. doi:10.1016/s1369-5274(99)80033-2
- Tietze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*, 27, 502–22.
- Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22(47), 7369–7375. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940>
- van der Schatte Olivier, A., Jones, L., Vay, L. Le, Christie, M., Wilson, J., & Malham, S. K. (2020). A global review of the ecosystem services provided by bivalve aquaculture.

*Reviews in Aquaculture*, 12(1), 3–25. <https://doi.org/10.1111/raq.12301>

- Venier, P., Gerdol, M., Domeneghetti, S., Sharma, N., Pallavicini, A., & Rosani, U. (2018). Biotechnologies from marine bivalves. In *Goods and Services of Marine Bivalves*. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-96776-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-96776-9_6)
- Verslycke, T., Ghekiere, A., & Janssen, C. R. (2004). Seasonal and spatial patterns in cellular energy allocation in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) of the Scheldt estuary (The Netherlands). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 306(2), 245–267. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.01.014>
- Verslycke, T., & Janssen, C. R. (2002). Effects of a changing abiotic environment on the energy metabolism in the estuarine mysid shrimp *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 279(1–2), 61–72. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(02\)00339-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00339-8)
- Wilce, M. C. J., & Parker, M. W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, 1205(1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)90086-8)
- Wright, A. C., Fan, Y., & Baker, G. L. (2018). Nutritional Value and Food Safety of Bivalve Molluscan Shellfish. *Journal of Shellfish Research*, 37(4), 695–708. <https://doi.org/10.2983/035.037.0403>
- Wright, R. T., Coffin, R. B., Ersing, C. P., & Pearson, D. (1982). Field and laboratory measurements of bivalve filtration of natural marine bacterioplankton. *Limnology and Oceanography*, 27(1), 91–98. <https://doi.org/10.4319/lo.1982.27.1.0091>
- Xie, H., Zhou, D., Hu, X., Liu, Z., Song, L., & Zhu, B. (2018). Changes in Lipid Profiles of Dried Clams (*Macra chinensis* and *Ruditapes philippinarum*) during Accelerated Storage and Prediction of Shelf Life [Research-article]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(29), 7764–7774. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03047>
- Yuan, X., Yang, H., Wang, L., Zhou, Y., & Gabr, H. R. (2010). Effects of salinity on energy budget in pond-cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka)

(Echinodermata: Holothuroidea). *Aquaculture*, 306(1–4), 348–351.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.04.026>

Zanette, J., de Almeida, E. A., da Silva, A. Z., Guzenski, J., Ferreira, J. F., Di Mascio, P., Marques, M. R. F. & Bainy, A. C. D. (2011). *Salinity influences glutathione S-transferase activity and lipid peroxidation responses in the Crassostrea gigas oyster exposed to diesel oil. Science of the Total Environment*, 409(10), 1976–1983.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.048>

