



**Diana Sofia Nunes
Gonçalves**

**Utilização da assinatura de ácidos gordos do
músculo adutor de ameijoas (*Ruditapes* spp.) para
rastrear a sua origem geográfica**

**Using fatty acid signatures of the adductor muscle
of clams (*Ruditapes* spp.) to trace their geographic
origin**

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**Diana Sofia Nunes
Gonçalves**

**Utilização da assinatura de ácidos gordos do
músculo adutor de ameijoas (*Ruditapes* spp.) para
rastrear a sua origem geográfica**

**Using fatty acid signatures of the adductor muscle of
clams (*Ruditapes* spp.) to trace their geographic
origin**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ecologia Aplicada, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Ricardo Jorge Guerra Calado, Investigador Principal do Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro e coorientação da Professora Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues, Professora Associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

o júri

Professor Doutor Carlos Manuel Martins Santos Fonseca

Professor associado com Agregação, Departamento de Biologia - Universidade de Aveiro
(Presidente)

Doutor Ricardo Jorge Guerra Calado

Investigador principal, Departamento de Biologia - Universidade de Aveiro
(Orientador)

Doutor Rui Afonso Bairrão da Rosa

Investigador Principal, Laboratório Marítimo da Guia, MARE – Marine and Environmental Sciences Centre, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
(Arguente principal)

agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus orientadores, Professor Ricardo Calado e Professora Rosário Domingues pela sua orientação, disponibilidade no esclarecimento de dúvidas e confiança. Aos meus colegas de laboratório, em especial ao Fernando Ricardo por toda a ajuda ao longo do desenvolvimento deste trabalho, e ao restante grupo de espectrometria de massa por me ter recebido da melhor forma e por proporcionarem um ótimo ambiente no laboratório. Aos meus amigos e família pela compreensão, apoio, bons conselhos e por terem acreditado em mim.

palavras-chave

Rastreabilidade, alimentos marinhos, bivalves, lípidos

resumo

O presente estudo investiga o potencial da utilização da assinatura de ácidos gordos do músculo adutor de bivalves para rastrear geograficamente os seus locais de produção. Para tal, foi determinada a assinatura de ácidos gordos do músculo adutor de ameijoas (*Ruditapes philipinarum* e *Ruditapes decussatus*) provenientes de diversos ecossistemas marinhos ao longo da costa continental portuguesa. Em três destes ecossistemas foram selecionados dois locais, um a jusante e outro a montante. Estas zonas de produção/colheita de bivalves amostradas apresentavam diferentes classificações de acordo com o conteúdo de *Escherichia coli* presente nos mesmos. A assinatura de ácidos gordos do músculo adutor permitiu distinguir locais e ecossistemas de produção, mesmo quando estes apresentavam uma classificação idêntica referente à prevalência de *E. coli*. O perfil de ácidos gordos pode assim ser utilizado com sucesso para discriminar espécimes provenientes de diferentes ecossistemas e diferentes localizações num mesmo ecossistema, reforçando o potencial desta técnica para a rastreabilidade de bivalves.

keywords

Traceability, seafood, marine bivalves, lipids

abstract

The present study evaluated the potential use of fatty acid signatures from the adductor muscle of bivalves to trace their geographic origin. We determined the fatty acid profile of the adductor muscle of clams (*Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*) collected from different ecosystems along the Portuguese coast. Selected ecosystems display different classifications concerning the production/harvest of bivalves according to the levels of *Escherichia coli* that these organisms present. Indeed, even when sampling areas displaying identical classifications for bivalve production/harvest, the fatty acid profile of the adductor muscle of clams allowed us to reliably assign the ecosystem of origin to the specimens being surveyed. The fatty acid signatures of the adductor muscle can be successfully employed to discriminate specimens from different sites and ecosystems reinforcing the potential of this method for bivalves traceability.

Índice

Introdução.....	7
Rastreabilidade.....	9
Lípidos.....	12
Ácidos gordos.....	13
Ácidos gordos essenciais.....	14
Classe Bivalvia.....	15
<i>Ruditapes phillipinarum</i> (Adams & Reeve, 1848).....	16
<i>Ruditapes decussatus</i> (Linnaeus, 1758).....	17
Objetivo.....	19
Material e métodos.....	21
Áreas de estudo.....	22
Ria de Aveiro.....	23
Estuário do Mondego.....	24
Estuário do Tejo.....	25
Estuário do Sado.....	26
Estuário de Mira.....	27
Ria Alvor.....	28
Ria Formosa.....	29
Extração lipídica.....	30
Quantificação de fosfolípidos.....	31
Quantificação de ácidos gordos.....	33
Tratamento estatístico.....	34
Resultados.....	37
Discussão.....	49
Considerações finais.....	55
Referências.....	57
Anexo.....	63

Índice Figuras

Figura 1. Capturas e produção em aquicultura de ameijoas em Portugal continental entre o ano 2010-2015. Dados INE (2010-2015)

Figura 2. Distribuição geográfica das pescas ilegais registadas a nível mundial. Adaptado de Petrossian, G. (2015)

Figura 3. Classificação de diversas áreas de produção de bivalves portuguesas no ano 2015. Azul- áreas classificadas como B, amarelo- áreas classificadas como C e vermelho – áreas classificadas como D. Dados IPMA (2015)

Figura 4. Membrana celular (<http://www.anatolandia.com/2014/05/membrana-plasmatica-celula.html>)

Figura 5. Estrutura molecular de ácidos gordos saturados (A), monoinsaturados (B) e polinsaturados pertencentes à família linoleica (C) e à família linolénica (D). Adaptado de <http://lipidlibrary.aocs.org/>

Figura 6. Síntese de ácidos gordos polinsaturados, *n*-6 e *n*-3, a partir de ácidos gordos essenciais. Adaptado de Venegas-Calderón, M. *et al* (2010), Adarme-Vega, T. C. *et al.*(2014)

Figura 7. Morfologia interna de bivalves. Adaptado de Macedo, M & Borges, M. (1999)

Figura 8. Ameijoas japonesas *Ruditapes philippinarum*. Adaptado FAO (2013)

Figura 9. Ameijoas de *Ruditapes decussatus*. Adaptado FAO (2013)

Figura 10. Locais amostrados ao longo da costa portuguesa. Os círculos assinalam ecossistemas onde foi amostrada *Ruditapes philippinarum* e os triângulos ecossistemas onde foi amostrada *Ruditapes decussatus*. Os ecossistemas assinalados a cor laranja encontravam-se classificados como classe B e os ecossistemas a vermelho -se classificados como classe C, segundo registo do IPMA, para a produção/colheita de bivalves. Dados IPMA (2014).

Figura 11. Local de amostragem na Ria de Aveiro (40 ° 40 ' 37 " N, 8 ° 40 ' 28.90 " W), Aveiro

Figura 12. Locais de amostragem no Estuário do Mondego (40 ° 8 ' 6 "N, 8° 51 ' 1 "W), Figueira de Foz.

Figura 13. Locais de amostragem no Estuário do Tejo (38 ° 39 ' 27 " N, 9 ° 6 ' 36 " W), Lisboa

Figura 14. Local de amostragem no Estuário do Sado (38°29 '13 "N, 8°48 '53 "W), Oeiras.

Figura 15. Local de amostragem no Estuário de Mira (37°43 '31 "N, 8°46 '15 "W), Vila Nova de Mil Fontes

Figura 16. Local de amostragem na Ria de Alvor (37°7 '56 "N, 8°37 '27 "W), Alvor

Figura 17. Locais de amostragem na Ria Formosa (37°0 '23 "N, 7°59 '28 "W), Algarve

Figura 18. Tubos de extração lipídica, após centrifugação. Fase orgânica na parte inferior, fase aquosa na parte superior.

Figura 19. Secagem de amostras através de corrente de azoto.

Figura 20. Incubação das amostras a 200 °C.

Figura 21. Amostras após incubação a 200 °C.

Figura 22. Microplaca para quantificação de fosfolípidos presentes nas amostras

Figura 23. Termoacumulador para manter as amostras refrigerados até dissolução para posterior análise no GC-MS.

Figura 24. Cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (GC-MS)

Figura 25. Abundâncias relativas de ácidos gordos entre locais a montante e jusante nos ecossistemas Estuário do Mondego, Estuário do Tejo e Ria Formosa.

Figura 26. Abundância relativa de ácidos gordos divididos segundo a sua classe nos ecossistemas Ria de Aveiro (A), Estuário do Mondego (Mond), Estuário do Sado (S) e Estuário do Tejo (T).

Figura 27. Teste de tukey entre ecossistemas onde foram recolhidas *Ruditapes philippinarum* tendo em consideração diversos grupos de ácidos gordos.

Figura 28. Análise discriminante linear dos ecossistemas Ria de Aveiro, Estuário do Mondego, Estuário do Tejo e Estuário do Sado (LD1 80.1% LD2 14.9%)

Figura 29. Abundância relativa de ácidos gordos divididos segundo a sua classe nos ecossistemas Estuário do Mira (M), Ria de Alvor (Alv) e Ria Formosa (RF)

Figura 30. Teste de tukey entre ecossistemas onde foram recolhidas *Ruditapes decussatus* tendo em consideração diversos grupos de ácidos gordos

Figura 31. Análise discriminante linear dos ecossistemas Estuário do Mira, Ria de Alvor e Ria Formosa (LD1 84.1% LD2 15.9%)

Índice Tabelas

Tabela 1. Preparação de padrões para quantificação de fosfolípidos presentes no músculo adutor de *Ruditapes* spp..

Tabela 2. Abundância relativa de ácidos gordos presentes no músculo adutor de *Ruditapes phillipinarum* da Ria de Aveiro, Estuário do Mondego, montante e jusante, Estuário do Sado e estuário do Tejo, montante e jusante. Os valores presentes são a média entre 5 réplicas \pm desvio padrão

Tabela 3. Abundância relativa de ácidos gordos presentes no músculo adutor de *Ruditapes decussatus* da Ria de Alvor, Estuário de Mira e Ria Formosa (Faro e Olhão). Os valores presentes são a média entre 5 (4 no ecossistema Estuário de Mira) réplicas \pm desvio padrão.

Tabela 4. Anova de uma via entre locais (montante e jusante) dos ecossistemas Estuário do Tejo e Ria Formosa tendo em consideração a formação de grupos de ácidos gordos baseados nas suas abundâncias.

Tabela 5. Anova de uma via entre ecossistemas onde foram coletados exemplares de *Ruditapes phillipinarum*, tendo em consideração a formação de grupos de ácidos gordos baseados nas suas abundâncias.

Tabela 6. Anova de uma via entre ecossistemas onde foram coletados exemplares de *Ruditapes decussatus*, tendo em consideração a formação de grupos de ácidos gordos baseados nas suas abundâncias.

Abreviaturas

A- Ria de Aveiro

Alv- Ria de Alvor

ANOVA- Análise de variância univariada

BCFA- Ácido gordo ramificado

Mond- Estuário do Mondego

Mond_m- Estuário do Mondego montante

Mond_j- Estuário do Mondego jusante

GC-MS- Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

HUFA- Ácidos gordos altamente insaturados

LDA- Análise de discriminantes lineares

M- Estuário de Mira

MANOVA- Análise de variância multivariada

MPN- Número mais provável

MUFA- Ácido gordo monoinsaturado

PUFA- Ácido gordo polinsaturado

RF- Ria Formosa

S- Estuário do Sado

SFA- Ácido gordo saturado

T- Estuário do Tejo

Tm- Estuário do Tejo montante

Tj- Estuário do Tejo jusante

Introdução

De acordo com dados das Nações Unidas, é previsível que a população mundial continue a aumentar, sendo esperado que em 2030 atinja os 8.5 mil milhões de habitantes¹. Esta tendência terá de ser acompanhada por um aumento da produção de alimentos, podendo a produção dos sectores agrícolas e de pesca atingir o dobro da eficiência económica atual^{2,3}.

Os sectores como a agricultura e pescas vão ser de extrema importância no fornecimento de proteínas de origem animal, devido à escassez de produtos alimentares provenientes de meios aquáticos – sendo estimado que 85% do stock mundial de produtos marinhos se encontrem já no limite de exploração, tendo tido já como consequência uma diminuição no sector das pescas de aproximadamente 1.2% entre 2007 e 2012³. A aquicultura surge naturalmente como solução para a produção destes produtos de forma mais sustentável, tendo esta atividade vindo a aumentar ao longo dos últimos anos e representado em 2013, 43.1% do total de produção mundial de produtos de origem marinha; este registo traduz-se numa produção de 97.2 milhões de toneladas, num valor de aproximadamente 139 mil milhões de euros^{4,5}.

Em Portugal, a captura de peixe e de moluscos registou um aumento durante o ano de 2015 em relação ao ano anterior de 5.6% e 3.6%, respetivamente. A atividade de aquicultura também registou um aumento, representando os bivalves 45% da produção total aquícola em Portugal, sendo a ameijoia a espécie economicamente mais relevante⁶⁻¹¹ (Figura 1).

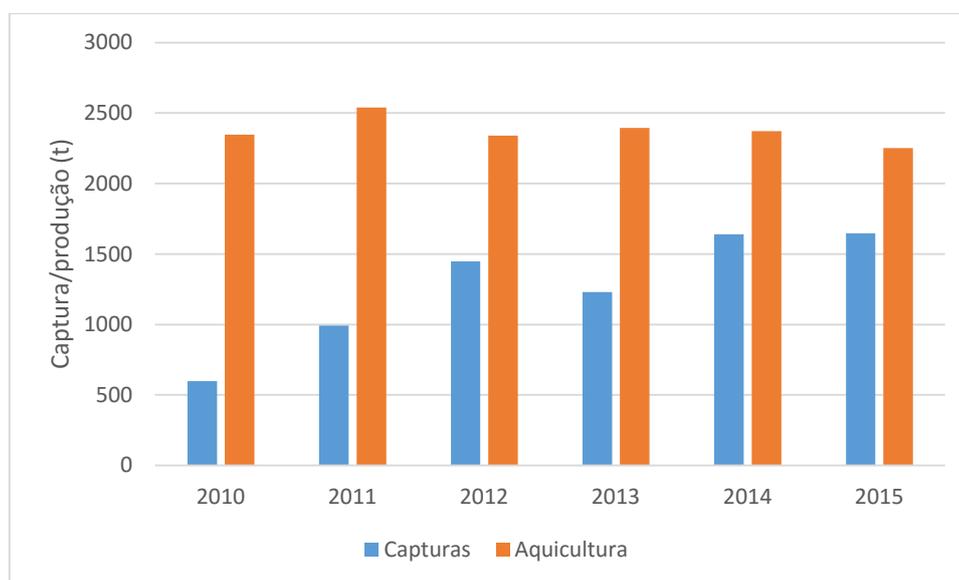


Figura 1. Capturas e produção em aquicultura de ameijoia em Portugal continental entre o ano 2010-2015. Dados INE (2010-2015)

Paralelamente, as pescas ilegais, não declaradas e não reguladas representam 25% do total de pescado capturado mundialmente, sendo consideradas uma das maiores ameaças ao stock natural de produtos marinhos e à segurança alimentar do consumidor¹². Esta atividade leva a perdas anuais de 9-20 milhões de euros e 11-26 toneladas de produtos marinhos, tendo

consequências negativas na economia e desenvolvimento dos países, sendo que a maior incidência desta prática ilegal ocorre em países asiáticos (Figura 2)^{12,13}.

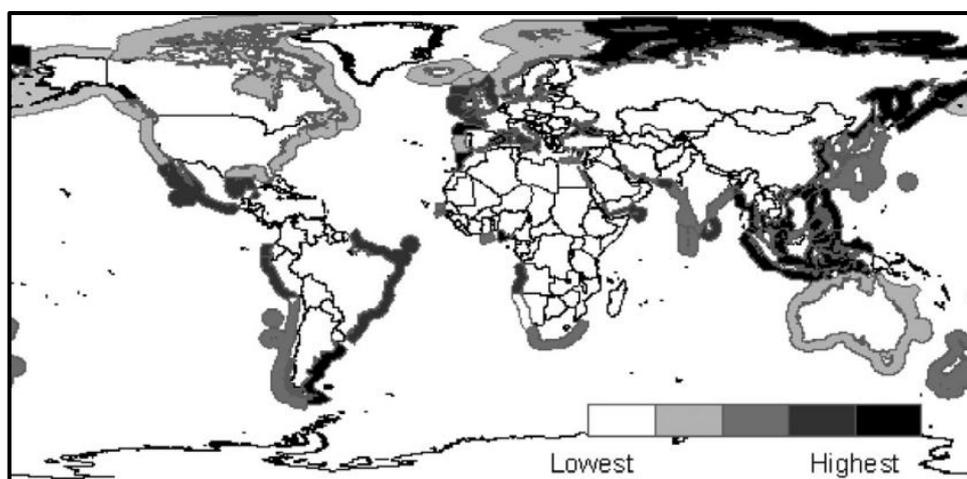


Figura 2. Distribuição geográfica das pescas ilegais registradas a nível mundial. Adaptado de Petrossian, G. (2015)

O aumento da procura de alimentos de origem marinha registada nos últimos anos pode estar diretamente relacionado com a crescente informação sobre os benefícios dos alimentos de origem marinha para a saúde humana o que leva a um aumento do seu consumo.

Vários estudos verificaram que os bivalves são ricos em ácidos gordos polinsaturados, nomeadamente os da família *n*-3 (também designados por ómega 3), uma vez que estes são benéficos para a saúde humana e diminuem o risco de doenças cardiovasculares, oncológicas e autoimunes¹⁴⁻¹⁶. Estes contêm ainda baixa percentagem de ácidos gordos saturados, relativamente a outros produtos de origem animal. Os bivalves são também uma excelente fonte de proteína, zinco e vitamina B12¹⁷.

Para garantir que estes alimentos não constituem um risco para a saúde do consumidor é necessário garantir uma colheita/produção correta, assim como transporte e tratamento após serem capturados ou produzidos em aquacultura, uma vez que podem acumular microrganismos patogénicos prejudiciais para o homem; é assim importante controlar fatores como a temperatura e a humidade a que os bivalves possam ser sujeitos de modo a evitar uma perda de qualidade e garantir a segurança alimentar destes produtos¹⁸.

Rastreabilidade

Com a globalização das transações comerciais, é necessário existir um controlo rigoroso dos produtos alimentares ao longo de todo o seu processo de transporte e transformação, de modo a proteger a saúde e a segurança do consumidor. Este controlo vai permitir não só a garantia da segurança dos produtos, ou seja, que estes não promovem doenças no consumidor e assegurar

igualmente a qualidade do mesmo, isto é, a manutenção das características necessárias para o alimento ser considerado como seguro^{19,20}.

A Comissão Europeia regulou, em 2002, os princípios básicos para a rastreabilidade de alimentos de origem marinha, definindo rastreabilidade como “a capacidade de seguir os componentes alimentares, destinados a ser ou sendo produtos alimentares, em todos os estágios da cadeia de transporte”²¹. Esta capacidade de seguir os componentes alimentares, segundo a Comissão Europeia, é da responsabilidade dos produtores e das autoridades de cada país, tendo estas de criar um sistema de controlo dos seus produtos²².

O processo de rastreio implementado tem de ser capaz de determinar a espécie a que os indivíduos pertencem, visto que, muitas vezes estes são identificados comercialmente como sendo da mesma espécie quando na verdade pertencem a espécies diferentes. Para essa finalidade recorre-se, de um modo geral, à identificação taxonómica dos organismos com base em características da anatomia interna ou externa dos indivíduos ou a análises moleculares de DNA. Outro objetivo da rastreabilidade é a determinação do processo de produção, ou seja, se os indivíduos são provenientes de aquacultura ou capturados, recorrendo-se nesse caso à utilização de análises bioquímicas. Na determinação da origem geográfica dos indivíduos transacionados, podem ser utilizadas ferramentas geoquímicas, através da incorporação dos elementos minerais em estruturas calcárias como as conchas, análises moleculares de modo a definir a população de origem ou ainda análise de ácidos gordos, uma vez que estes vão variar estruturalmente em função das características do meio ambiente em que o organismo foi capturado/produzido²³⁻²⁵.

No caso específico dos bivalves é particularmente importante a determinação da sua origem geográfica, uma vez que os indivíduos pertencentes a esta classe são filtradores e incorporam microrganismos patogénicos existentes no meio que levam não só à redução das suas populações (ex. *Perkinsus olseni*), mas poderão provocar igualmente doenças no homem (ex. *Echerichia coli*)^{26,27}. Perante este enquadramento, os locais de colheita de bivalves estão classificados de acordo com a abundância de *E. coli*, sendo esta classificação baseada em normas da união europeia, variando sazonalmente e de acordo com a espécie. Os Regulamentos comunitários N.º 853/2004, de 29 de Abril de 2004 e 854/2004 de 29 de Abril de 2004, estabelecem as regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal, e a organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano. De acordo com estes regulamentos as zonas marinhas devem ser classificadas (de A a D) de acordo com o nível de contaminação avaliado em diferentes bivalves vivos, tendo como base testes microbiológicos que avaliam o número mais provável –MPN- de *E. coli* nos tecidos e líquido intravalvar dos indivíduos^{22,28}. As áreas classificadas como A têm de apresentar um teor de *E. coli* por cada 100 g de tecido e líquido intravalvar inferior a 230 MPN, podendo estes indivíduos ser consumidos diretamente pelo homem, não sendo necessário

qualquer processo de depuração. As zonas classificadas como B apresentam um MPN variável entre 230 a 4600, tendo estes espécimes de passar por um processo de depuração ou transposição em zona que permita a descontaminação dos mesmos. Por fim, os indivíduos das zonas classificadas como C apresentam elevados valores de *E. coli*, variando estes entre 4600 e 46000 MPN, tendo estes de ser transpostos por pelo menos 2 meses em zonas classificadas como A, podendo este processo ser combinado com depuração para posterior colocação no mercado. As áreas classificadas como D são consideradas interditas^{22,28,29} (Figura 3).

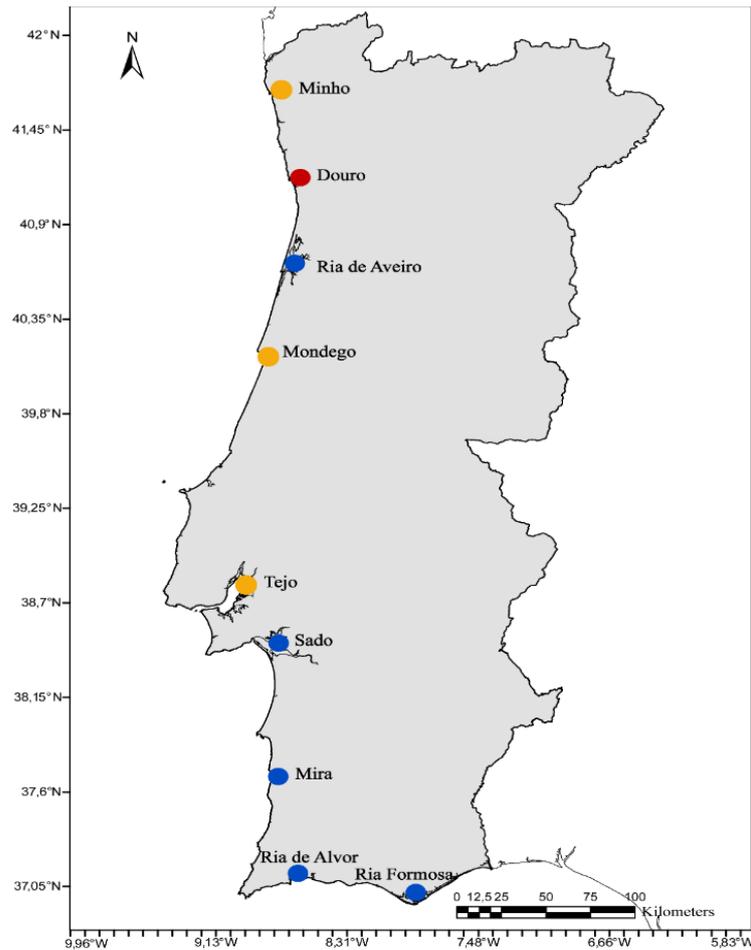


Figura 3. Classificação de diversas áreas de produção de bivalves portuguesas no ano 2015. Azul- áreas classificadas como B, amarelo- áreas classificadas como C e vermelho – áreas classificadas como D. Dados IPMA (2015)

O processo de depuração baseia-se na capacidade de filtração dos bivalves, tendo este, condições fisiológicas semelhantes às encontradas em meio natural, isto é, salinidade e temperatura de modo a permitir que os animais retomem a sua atividade normal de filtração e assim libertem os microrganismos que possam ter acumulado²⁹.

Lípidos

Os lípidos, são um grupo de compostos que ocorrem naturalmente, bastante vasto e diverso, sendo a sua principal característica o facto de serem insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, tais como clorofórmio, éter e metanol. Este grupo de biomoléculas inclui as gorduras, óleos, algumas vitaminas (A, D, e E) e hormonas. Podem ser obtidos por via exógena, ou seja, através da alimentação ou por via endógena quando biossintetizados a partir de outros compostos não lipídicos³⁰.

Por serem um grupo bastante diverso, são usados em estudos de ecologia e bioquímica dos ecossistemas, visto refletirem as fontes de matéria orgânica e contaminantes hidrofóbicos. Assim, os lípidos podem ser também usados para o estudo de dinâmicas populacionais e de bioacumulação, visto que estes são transferidos ao longo das cadeias tróficas, tendo início em produtores primários como o zooplâncton e atingindo o topo da cadeia alimentar^{16,31}.

A classificação dos lípidos mais comum classificação em dois grandes grupos, os lípidos simples e os complexos, tendo estes últimos ácidos gordos na sua constituição. Este último grupo pode ainda ser subdividido quanto à sua estrutura do álcool principal a que os ácidos gordos se ligam (ex. glicerolípidos, esfingolípidos e ésteres e esteróis)^{30,32}.

Entre as suas principais funções biológicas, as de reserva são umas das mais estudadas, visto os lípidos serem uma importante fonte metabólica de energia. Esta energia é armazenada em diversos locais, como os adipócitos e o fígado no homem e a glândula digestiva em bivalves, sob a forma de triacilgliceróis, que após hidrólise originam ácidos gordos podendo estes ser posteriormente oxidados de modo para produzir ATP^{30,33}. Os lípidos são também importantes constituintes das membranas celulares, permitindo que estas tenham uma estrutura em bicamada formada essencialmente por fosfolípidos; esta classe é formada por uma zona hidrofóbica, constituída por ácidos gordos que se encontra no interior da bicamada, e uma zona hidrofílica, formada pela cabeça polar dos fosfolípidos ou glicolípidos, que se encontra em contacto com o líquido extracelular^{30,31} (Figura 4). A constituição lipídica da membrana permite que esta mantenha os movimentos laterais e a sua fluidez em resposta às alterações do meio, funcionando como barreira a moléculas polares, água e iões, separando o meio intracelular do meio extracelular. Os lípidos estão também associados a outras funções biológicas como produção de compostos mensageiros que atuam ao nível intracelular^{30,31}.

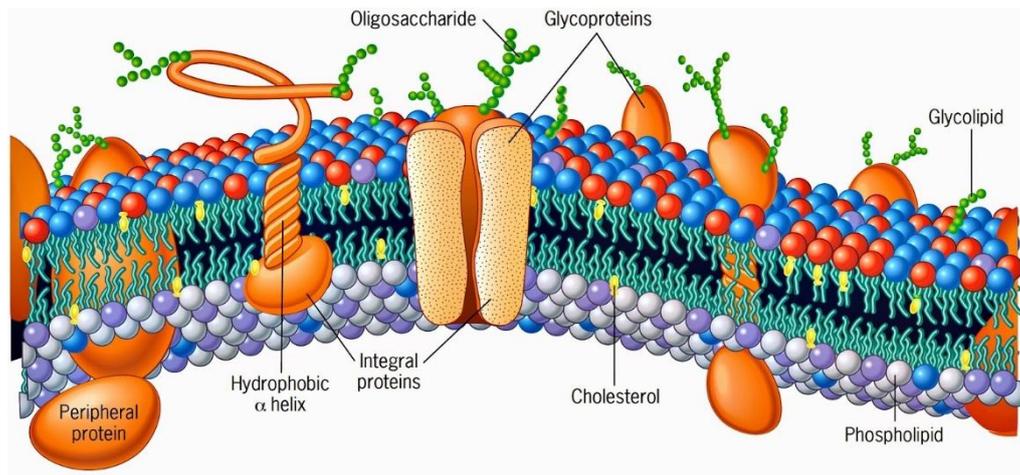


Figura 4. Membrana celular. Adaptado de <http://www.anatolandia.com/2014/05/membrana-plasmatica-celula.html>

Ácidos gordos

Os ácidos gordos são essenciais para a vida pelas suas funções energéticas e porque são um dos constituintes da membrana plasmática, alterando os seus níveis de insaturações e comprimento da cadeia em função das condições do meio envolvente, de modo a manter o meio intracelular em equilíbrio³⁴.

Os ácidos gordos são formados quimicamente por uma cadeia carbonada, com um grupo carboxilo, variando o número de carbono de 4 a 36; contudo, em sistemas biológicos variam, normalmente, entre 14 e 24 carbonos³⁰. Segundo a nomenclatura internacional, a denominação dos ácidos gordos é efetuada juntando o nome do hidrocarboneto com o sufixo “óico”. Assim, um ácido gordo com 18 carbonos e sem nenhuma insaturação será chamado de octadecanóico, se tiver uma insaturação é octadecenóico, com duas é octadecadienóico e com três será octadecatrienóico. A numeração dos átomos de carbono é feita a partir do carbono do grupo carboxilo, sendo o último carbono, no grupo metil, designado ómega (n).^{17,30,35} Assim, o ácido gordo 18:1 $n-9$ é formado por 18 carbono, estando a sua única insaturação no carbono 9, contagem a partir do grupo metil.

Os ácidos gordos, podem ser divididos por classes tendo em consideração o número de ligações duplas que apresentam. Assim, podem ser divididos em saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) com respetivamente, zero, uma, e mais do que uma ligação dupla. Os ácidos gordos polinsaturados podem ainda ser divididos em três famílias, a família oleica, que agrupa os $n-9$, a família linoleica que agrupa os $n-6$ e por fim os $n-3$ pertencentes à família linolénica³⁰ (Figura 5).

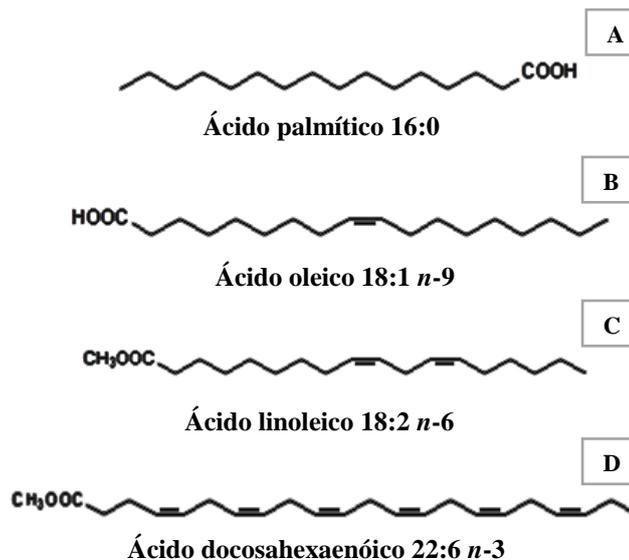


Figura 5. Estrutura molecular de ácidos gordos saturados (A), monoinsaturados (B) e polinsaturados pertencentes à família linoleica (C) e à família linolénica (D). Adaptado de <http://lipidlibrary.aocs.org/>

Os ácidos gordos presentes nos tecidos são influenciados por fatores intrínsecos, como sexo, idade, época reprodutiva e filogenia e extrínsecos aos indivíduos como a disponibilidade de alimento, sazonalidade, temperatura e salinidade do meio^{36,37}.

Ácidos gordos essenciais

Os animais, tanto marinho como terrestres, são capazes de sintetizar ácidos gordos saturados e monoinsaturados a partir de fontes não lipídicas; contudo, não são capazes de sintetizar ácidos gordos polinsaturados, *n-3* e *n-6*, importantes para o seu crescimento, reprodução e imunidade, sendo assim estes ácidos gordos considerados como essenciais em diferentes grupos taxonómicos^{34,38}.

Os ácidos gordos polinsaturados *n-3* e *n-6*, são sintetizados *de novo* apenas pelo fitoplâncton e plantas, e são obtidos pelos animais através da alimentação. O ácido oleico é o precursor de todos os *n-3* e *n-6* e por dessaturação é obtido o ácido linoleico e o ácido linolénico α , a partir dos quais por dessaturações e elongações são sintetizados os restantes PUFA *n-3* e *n-6*, respetivamente^{17,31,38,39}. A síntese de PUFAS é regulada pela ação de enzimas de dessaturação, que removem hidrogénio da cadeia de carbonos, criando assim uma insaturação e elongação, responsável pelo aumento da cadeia de carbono⁴⁰ (Figura 6).

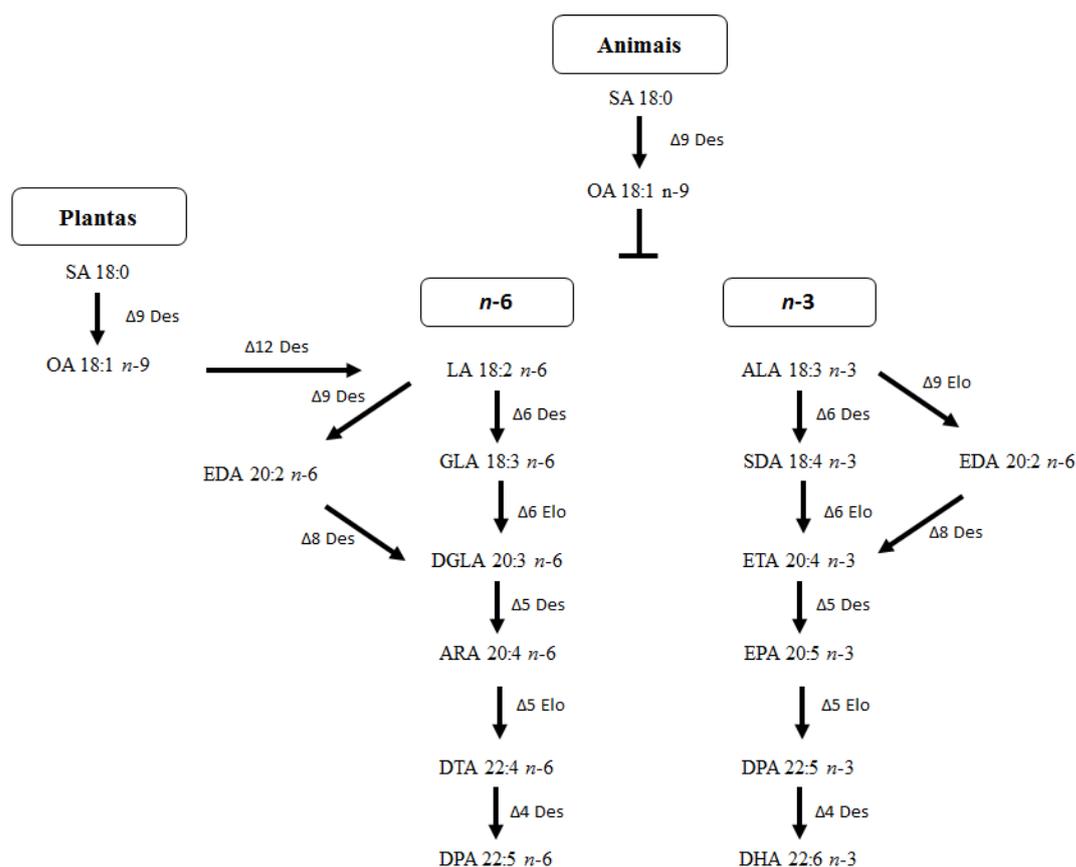


Figura 6. Síntese de ácidos gordos polinsaturados, *n-6* e *n-3*, a partir de ácidos gordos essenciais. Adaptado de Venegas-Calcrón, M. et al (2010), Adarme-Vega, T. C. et al.(2014)

Classe Bivalvia

A classe Bivalvia pertence ao filo Mollusca, tendo sido anteriormente designada por Lamellibranchia. Esta classe é caracterizada por apresentar o organismo protegido por uma concha constituída por duas valvas simétricas. Esta concha é formada por carbonato de cálcio e tem como principais funções a proteção contra predadores e não permitir a entrada de sedimentos quando o indivíduo se encontra enterrado. Os indivíduos pertencentes a esta classe, não têm cabeça diferenciada, sendo o seu corpo essencialmente formado por pé e brânquias⁴¹. As duas valvas são unidas por um ligamento de origem proteica, sendo que a abertura da concha é controlada pelo relaxamento dos músculos adutores – anterior e posterior; a existência de dentes ao longo da linha de charneira evita o deslizamento lateral das valvas, sendo uma das características de morfologia externa que permite distinguir espécies^{41,42} (Figura 7).

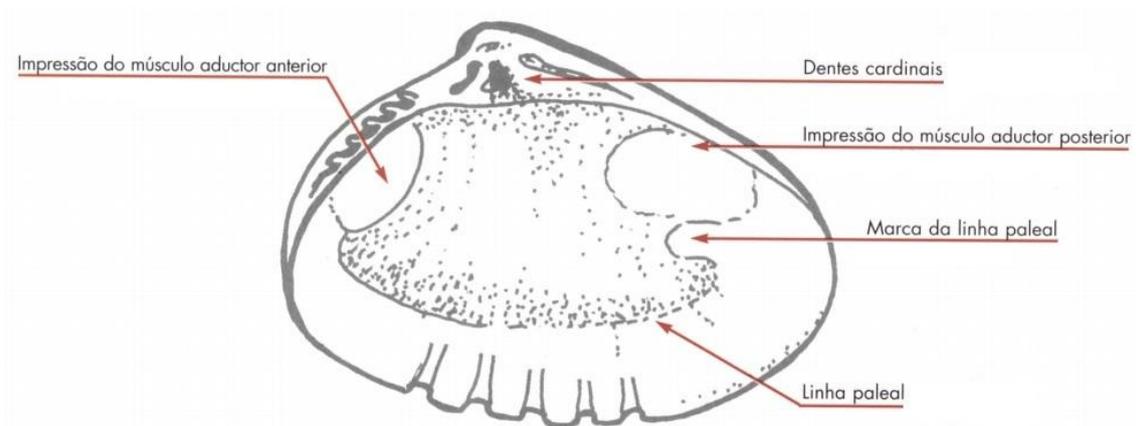


Figura 7. Morfologia interna de bivalves. Adaptado de Macedo, M & Borges, M. (1999)

Os indivíduos pertencentes à classe Bivalvia podem ser encontrados principalmente em ambientes marinhos, podendo também ocorrer em ambientes salobros e de água doce. Estes são essencialmente bentônicos quando adultos, podendo ser encontrados totalmente ou parcialmente enterrados no substrato⁴¹. Estes organismos alimentam-se através da filtração de partículas em suspensão presentes na água, entrando esta no indivíduo através de brânquias constituídas por cílios que removem microalgas e outros microorganismos da água. Devido a esta sua característica são muitas vezes usados em estudos de toxicologia ambiental, pois acumulam poluentes (ex. metais e microorganismos) que estejam não só presentes na água que filtram, mas também no plâncton que consomem⁴³.

A família Veneridae é uma das mais numerosas famílias pertencentes à classe Bivalvia, sendo constituída por 800 espécies diferentes de bivalves heterodontes, com três dentes cardinais em cada valva, estando presentes em ambientes estuarinos e marinhos. Muitas das espécies pertencentes a esta família são economicamente importantes, tais como *Ruditapes philippinarum* e *R. decussatus*⁴⁴.

***Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1848)**

A ameijoia *R. philippinarum*, comumente designada ameijoia japonesa, apresenta uma concha ovoide constituída por duas valvas simétricas e costelas serradas concêntricas e radiais, com padrão reticulado marcado, sendo esta uma das principais características que a permite diferenciar da espécie autóctone em águas nacionais *R. decussatus*. A sua charneira é formada por três dentes cardinais não apresentando dentes laterais e a sua conchas é normalmente acastanhada apresentando manchas com padrões variáveis⁴⁵ (Figura 8).



Figura 8. Representação de *Ruditapes philippinarum*. Adaptado de FAO (2013)

Esta espécie é proveniente do Pacífico oriental, tendo o seu nome origem nas ilhas onde foi encontrada pela primeira vez – as Filipinas; no entanto, atualmente apresenta uma vasta distribuição geográfica, sendo mesmo em alguns locais considerada invasora. A sua expansão pelo mundo encontra-se relacionada com a sobre-exploração e consequente diminuição das populações de outras ameijoas nativas, tais como *R. decussatus*⁴⁵. Em Portugal pode ser encontrada em diversas zonas estuarino-lagunares, como Ria de Aveiro, Lagoa de Óbidos, Estuário do Tejo, Lagoa de Albufeira e Estuário do Sado.

Os indivíduos desta espécie podem ser encontrados em ambientes com salinidades bastante variáveis, sendo o seu ótimo entre os 20 e 26, estando presentes na zona intertidal e subtidal e encontrando-se habitualmente enterradas a cerca de 4 cm de profundidade em fundos com sedimento arenoso e vasoso. Quanto à reprodução, os indivíduos pertencentes a esta espécie são gonocóricos e a época reprodutiva varia de acordo com a temperatura e com a disponibilidade de alimento, durando a gametogénese entre 2-5 meses; a reprodução é externa e a dispersão larvar é condicionada pelas correntes oceânicas⁴⁵⁻⁴⁷.

***Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758)**

Ruditapes decussatus (Linnaeus, 1758), é um molusco bivalve vulgarmente designado por ameijoia boa em território nacional. Esta espécie pode ser encontrada desde o sul de Marrocos até ao sul da Inglaterra, estando presente ao longo da Península Ibérica, estabelecendo-se principalmente em substratos arenosos e lodosos⁴⁸. Em Portugal pode ser encontrada na Ria de Aveiro, Estuário do Mondego, Lagoa de Óbidos e Albufeira, Ria de Alvor e Ria Formosa⁴⁹. Segundo dados da FAO, Portugal encontra-se entre os maiores produtores de ameijoia boa, assim como Espanha e França⁴⁸.

Esta ameijoia apresenta uma cor variável numa gama entre o branco e o castanho dependendo da cor do sedimento onde se encontra. A sua anatomia externa apresenta linhas de crescimento marcadas, apresentando à semelhança da ameijoia japonesa três dentes cardinais, habitando fundos arenosos encontrando-se enterrada a 15-20 cm de profundidade na zona intertidal^{48,50} (Figura 9).



Figura 9. Representação da ameijoia *Ruditapes decussatus*. Adaptado de FAO (2013)

Nesta espécie os indivíduos são habitualmente gonocóricos e a maturidade sexual depende do seu tamanho, tendo reprodução externa. A época reprodutiva varia de acordo com as condições do meio, contudo, decorre habitualmente entre os meses de Maio e Junho em Portugal, tendo um período de repouso durante o Inverno⁴⁸.

Objetivo

Com o aumento da procura por produtos alimentares de origem marinha, torna-se cada vez mais importante desenvolver métodos que assegurem a qualidade e a segurança alimentar destes mesmo produtos, tanto para os produtores como para os consumidores finais.

Neste sentido têm sido desenvolvidos diversos estudos que permitam aos produtores e autoridades garantir o cumprimento das normas impostas pela União Europeia no que concerne à necessidade de ferramentas que permitam identificar o local de origem dos produtos alimentares. Deste modo, o presente estudo tem como objetivo investigar a aplicabilidade da assinatura de ácidos gordos presentes no músculo adutor das ameijoas *Ruditapes philipinarum* e *R. decussatum* para determinação da sua origem geográfica. Para este propósito foram definidas duas hipóteses a testar no presente estudo:

1. O perfil de ácidos gordos, do músculo adutor, de ameijoas do género *Ruditapes* é igual a montante e a jusante nos ecossistemas ocupados por estes bivalves.
2. O perfil de ácidos gordos, do músculo adutor de ameijoas do género *Ruditapes* não varia entre os diferentes ecossistemas ocupados por estes bivalves.

Material e métodos

Áreas de estudo

O presente estudo foi realizado entre junho e julho de 2014, tendo sido colhidos indivíduos pertencentes às espécies *R. philippinarum* e *R. decussatus* ao longo de toda a costa portuguesa. Os exemplares de *R. philippinarum* foram colhidos na Ria de Aveiro (A), Estuário do Mondego (FF), Sado (S) e Tejo (T), sendo que todos estes locais se encontram classificados relativamente à produção de bivalves como classe B, com exceção do Estuário do Mondego classificado como classe C pelo IPMA em 2014. A espécie *R. decussatus* foi amostrada no Estuário de Mira (M), Ria de Alvor (Alv) e Ria Formosa (RF), estando todas estas áreas de produção classificadas como classe B. Quando possível os ecossistemas foram amostrados em dois locais com condições ambientais distintas, um local a montante e outro a jusante do curso de água (Figura 10).

Em todos os locais de amostragem foram recolhidos 5 espécimes, com exceção do Estuário de Mira onde só foi possível coletar 3 espécimes.

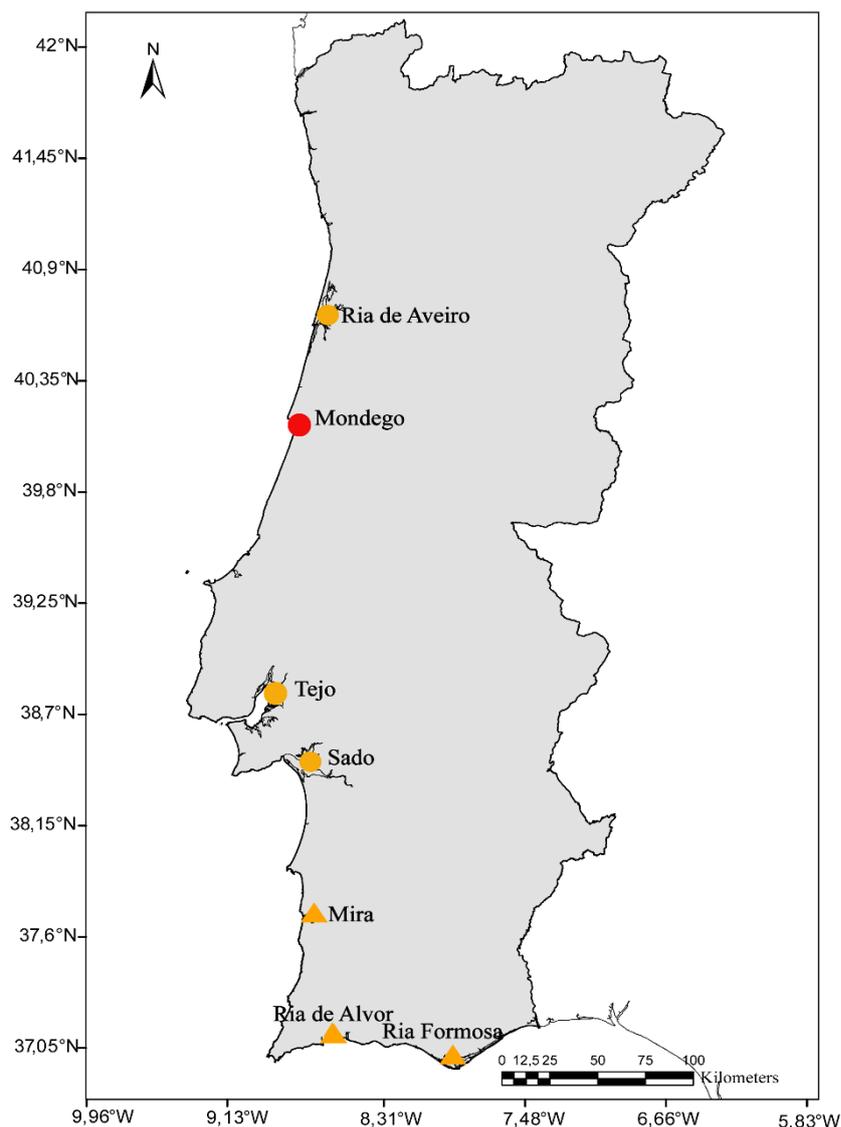


Figura 10. Locais amostrados ao longo da costa portuguesa. Círculos assinalam ecossistemas onde foi amostrada *Ruditapes philippinarum* e triângulos marcam ecossistemas onde foi amostrada *Ruditapes decussatus*. Ecossistemas assinalados com a cor laranja encontravam-se classificados como classe B, e ecossistemas marcado com vermelho encontrava-se classificado como C segundo registo do IPMA. Dados IPMA 2014

As amostras foram mantidas em sistema refrigerado até à chegada ao laboratório onde posteriormente foram dissecadas e unicamente guardado o músculo adutor; este foi liofilizado e mantido a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até realização da análise do perfil de ácidos gordos.

Ria de Aveiro

A Ria de Aveiro é uma laguna localizada a noroeste de Portugal, pertencente à bacia hidrográfica do baixo Vouga, formada por quatro canais principais – São Jacinto-Ovar, Mira, Ílhavo e Espinheiro⁵¹ (Figura 11). A sua área total varia entre 83 Km^2 durante a preia-mar e 66 Km^2 durante a baixa-mar, com uma largura máxima de 10 Km e um comprimento de 45 Km.

Este sistema lagunar, apresenta uma baixa profundidade (1 m), exceto nos canais de navegação⁵². A conexão da Ria de Aveiro com o oceano atlântico é feita através de um único canal artificial. Assim, a salinidade deste sistema é mais elevada junto à embocadura e mais baixos ou mesmo nulos junto às cabeceiras dos rios⁵². A Ria de Aveiro é bastante importante a nível socioeconómico, tendo diversas indústrias dependentes da sua produtividade e localizadas junto aos seus canais, como indústrias de pescas, produção de sal e agricultura, tendo também um elevado valor ambiental, visto apresentar uma elevada diversidade de espécies e habitats⁵³.

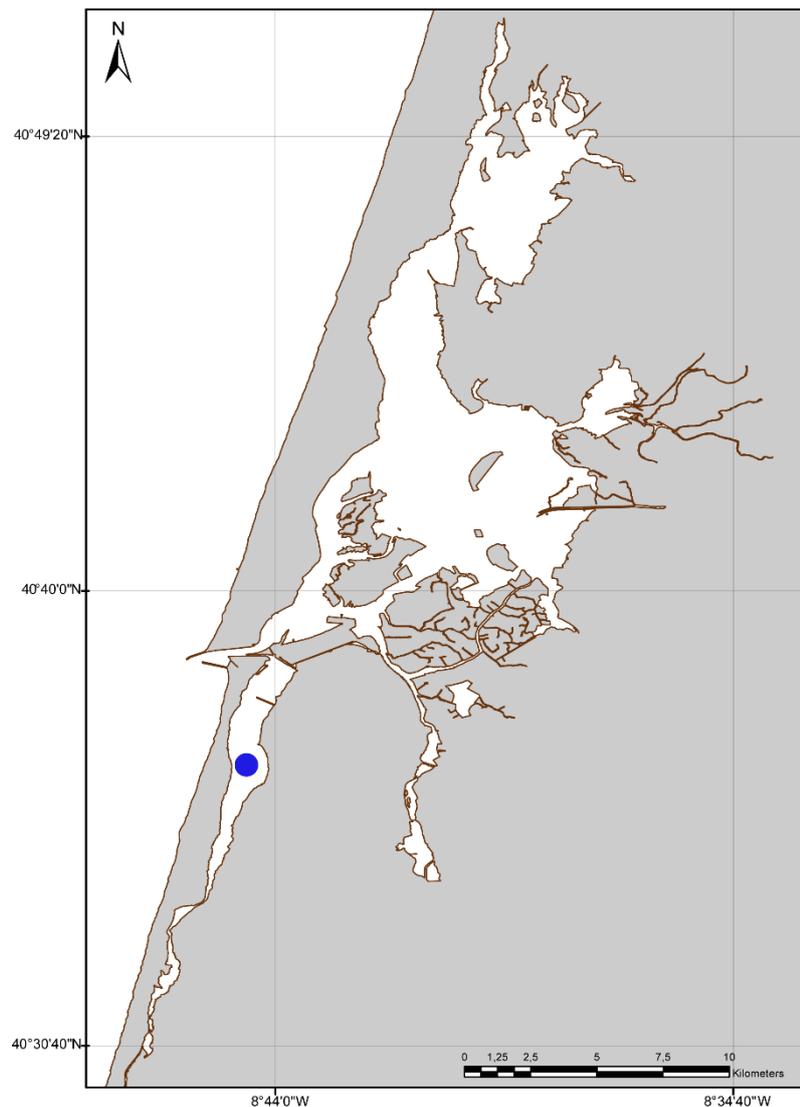


Figura 11. Mapa Ria de Aveiro (40 ° 40 ' 37 " N, 8 ° 40 ' 28.90 " W), Aveiro

Estuário do Mondego

O Estuário do Mondego, encontra-se localizado no concelho da Figueira da Foz, apresentando uma área de 1200 há, aproximadamente. Este estuário encontra-se dividido em dois braços (norte e sul) que apresentam diferentes características hidrológicas⁵⁴ (Figura 12). O

braço Norte, é o mais profundo (4-8 metros), sendo o canal navegável do estuário. Este recebe água doce proveniente do Rio Mondego, sendo também o braço mais hidrodinâmico, influenciado pela ação do caudal fluvial e da maré. O braço Sul, tem uma profundidade de 2-4 metros, durante a maré cheia sendo que a entrada de água doce é condicionada pelo fluxo do Rio Pranto, dependendo assim principalmente do ciclo de mares e da precipitação. A entrada de água proveniente do rio pranto é controlada pela abertura de comportas, estando esta enriquecida em nutrientes como fosfatos e nitratos oriundos da atividade agrícola existente na região, levando à eutrofização do canal alterando assim a sua estrutura trófica^{54,55}. As características físico-químicas do braço Sul tendem a manter-se sendo a temperatura o fator que mais varia, muito devido à baixa profundidade do sistema⁵⁶.

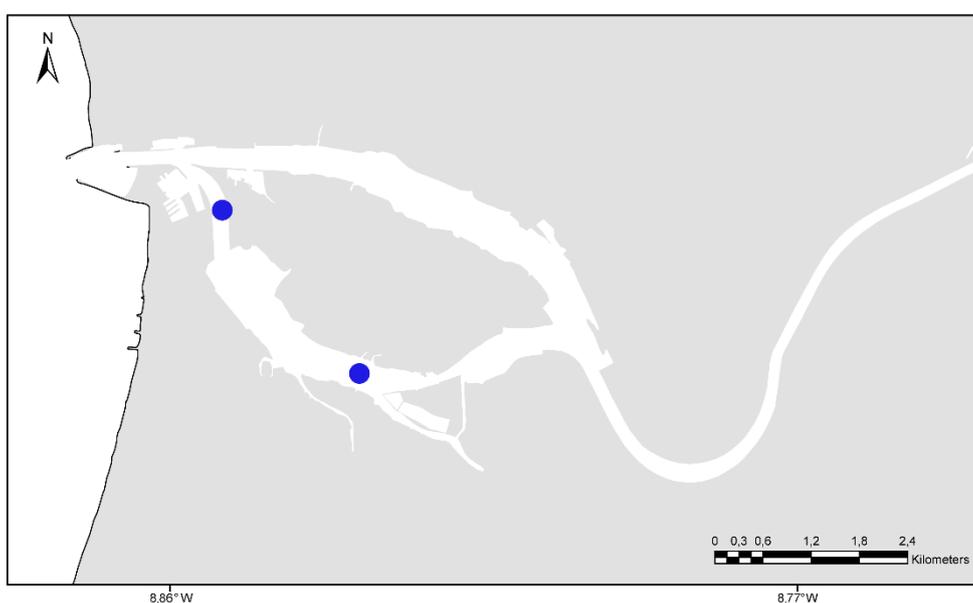


Figura 12. Mapa Estuário do Mondego (40 ° 8 '6 "N, 8° 51 ' 1 "W), Figueira de Foz.

Estuário do Tejo

O Estuário do Tejo, encontra-se localizado na região centro-Oeste de Portugal sendo este o maior estuário português e dos maiores da Europa, com uma área de 325 Km² e uma profundidade média inferior a 10 m⁵³ (Figura 13). As suas características sedimentares variam ao longo do estuário, sendo que a região a montante e intermédia é principalmente constituída por áreas-vasosas e a região a jusante é formada por areias, formando sapais ao longo das margens terrestres⁵³. Este sistema encontra-se sob elevada pressão das atividades antropogénicas como indústrias, agricultura e atividade portuária e piscatória que tem levado a um aumento dos metais pesados no estuário⁵⁷.

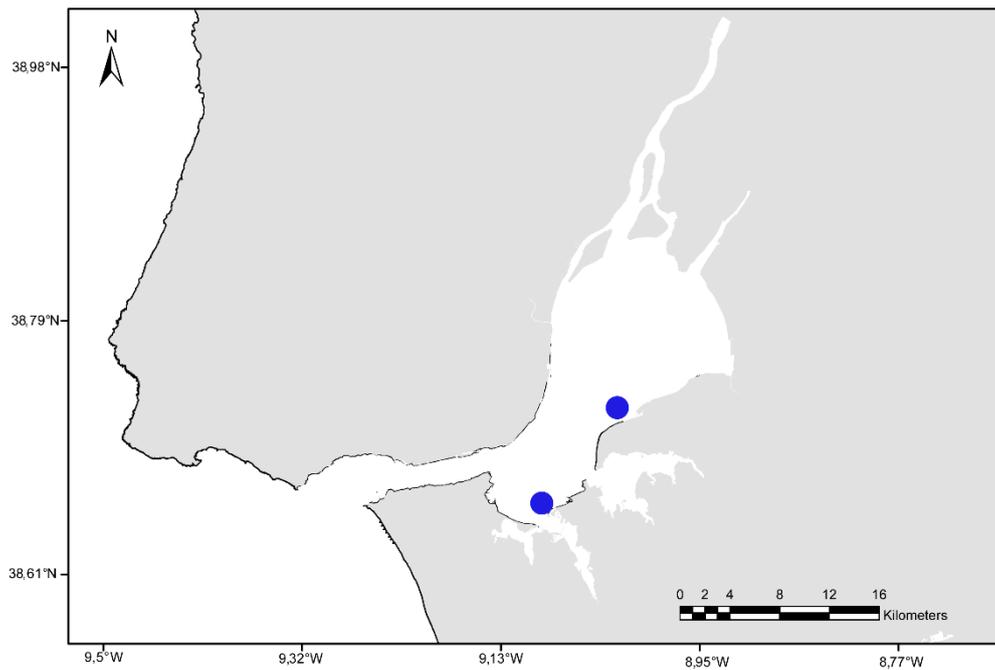


Figura 13. Mapa Estuário do Tejo (38 ° 39 ' 27 " N, 9 ° 6 ' 36 " W), Lisboa

Estuário do Sado

O Estuário do Sado, apresenta uma área de aproximadamente 24000 ha, sendo o segundo maior estuário do país. Este estuário encontra-se dividido em dois canais, o canal Sul apresenta mais hidrodinamismo e o canal Norte tem menos influência de correntes, o que leva a acumulação de poluentes no sistema^{53,58} (Figura 14). O Sado apresenta uma grande diversidade de animais e plantas tendo assim um elevado valor ecológica, sendo assim uma reserva nacional segundo a convenção de RAMSAR⁵⁹. Ao longo das suas margens são desenvolvidas várias atividades económicas como indústrias, agricultura de arroz e salinas⁵⁸.

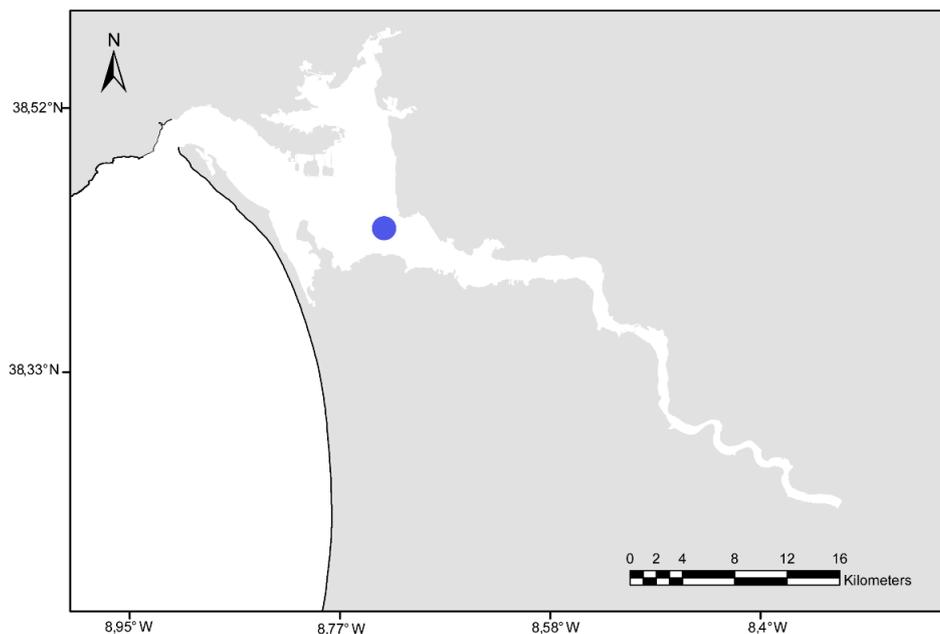


Figura 14. Mapa Estuário do Sado (38°29 '13 "N, 8°48 '53 "W), Oeiras.

Estuário de Mira

O estuário de Mira encontra-se localizado na costa alentejana e vicentina, junto a Vila Nova de Mil Fontes. Este é um estuário relativamente pequeno, apresentando um comprimento de 40 Km e uma largura de 400 m⁵³ (Figura 15). A entrada de água doce é controlada pela barragem de santa clara à velha localizada no rio mira, sendo no verão a época onde há um menor aporte de água doce no sistema⁶⁰. Este sistema estuarino, apresenta baixos valores de contaminantes, visto não existir um grande número de indústrias na região, sendo considerado dos menos poluídos em Portugal⁶⁰.

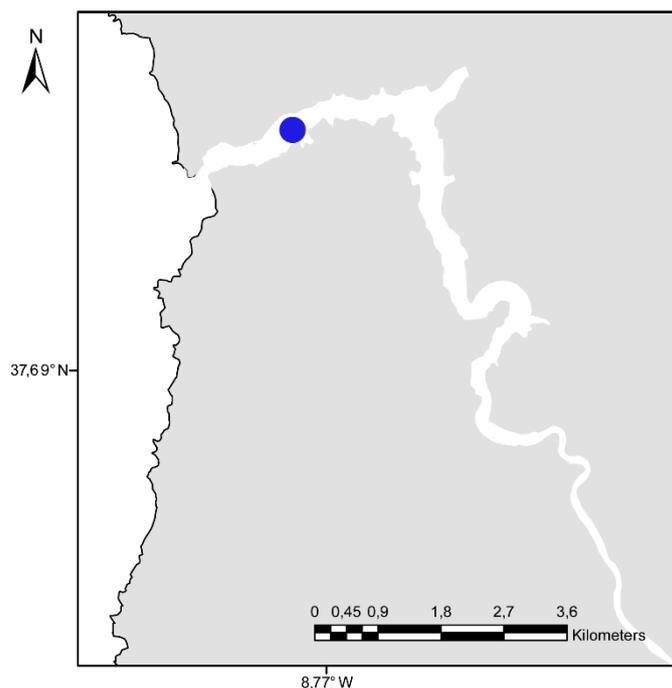


Figura 15. Mapa Estuário de Mira (37°43 '31 "N, 8°46 '15 "W), Vila nova de mil fontes

Ria de Alvor

A Ria de Alvor é uma lagoa mesotidal pequena, 15 Km², com grande importância ecológica, visto ser maternidade para peixes e suporta assim uma elevada biodiversidade (Figura 16)⁶¹. Este sistema é sustentado por quatro pequenos rios, sendo a renovação de água bastante influenciado pelo regime de marés e condições atmosféricas como a ocorrência de precipitação e períodos de seca prolongados⁶².

Ao longo da bacia da Ria de Alvor são desenvolvidas atividades económicas como agricultura, pecuária e algumas indústrias, estando esta área protegida por legislação nacional e internacional como diretiva habitats, sítio RAMSAR e zona especial de conservação (ZEC)⁶².

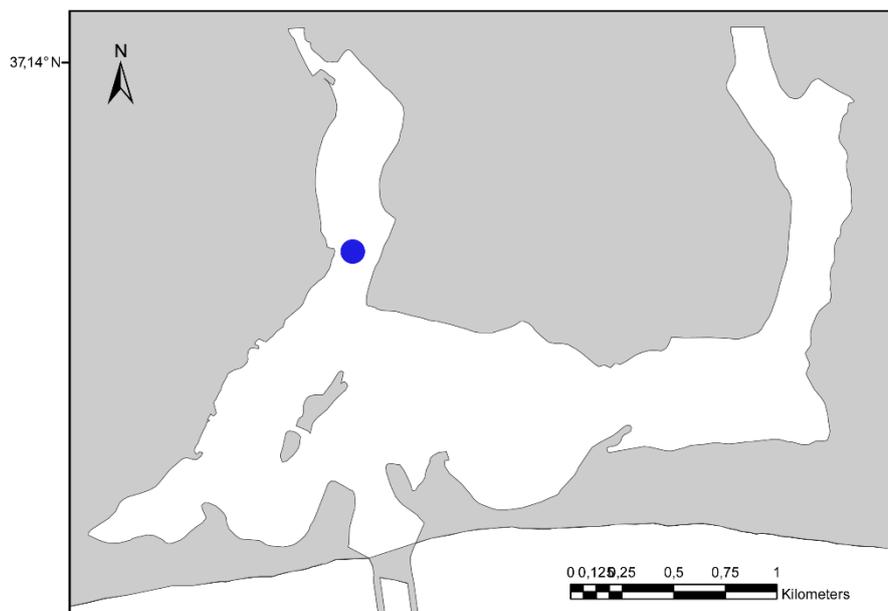


Figura 16. Mapa Ria de Alvor (37°7 '56 "N, 8°37 '27 "W)

Ria Formosa

A Ria Formosa, apresenta uma área superior a 80 Km², estando localizada numa região mediterrânea de elevado afloramento costeiro, sendo a produtividade da Ria influenciada por este fenómeno⁶¹ (Figura 17). A entrada de água doce mais significativa provem do Rio Gilão, sendo o efeito das marés o que mais influência as características do ecossistema, tendo uma coluna de água sem estratificações salinas ou térmicas^{63,64}. A Ria Formosa sustenta uma forte componente económica, no sector das pescas e aquacultura, mas também no sector do turismo⁶⁴. Este é um local de elevada biodiversidade, com bastante relevância para a reprodução de espécies marinhas estando protegida pela diretiva RAMSAR e de Berna⁶⁵.

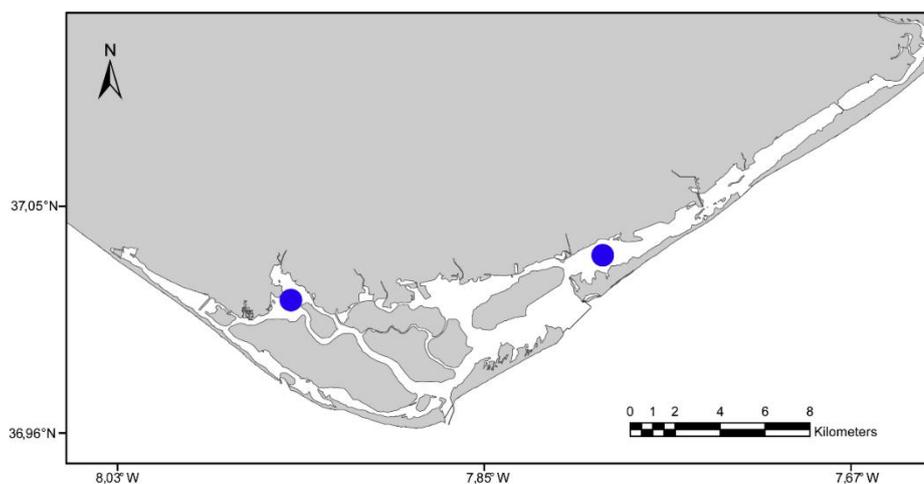


Figura 17. Mapa Ria Formosa (37°0 '23 "N, 7°59 '28 "W), Algarve

Extração lipídica

Os tecidos do músculo adutor foram pesados, tendo-se posteriormente procedido à extração, quantificação e análise do perfil em ácidos gordos. A extração de lípidos do músculo adutor foi efetuada segundo o método desenvolvido por Bligh & Dyer, sendo este um método rápido e simples que permite não só a extração, mas também a purificação dos lípidos⁶⁶. Neste método é adicionado ao tecido 3.75 mL de ½ (v/v) clorofórmio-metanol, sendo a amostra seguidamente agitada no vortex durante 90 s; posteriormente, é feita uma incubação em gelo por 30 min, sendo a amostra novamente agitada num vortex durante 30 s. Seguidamente, são adicionados 1.25 mL de clorofórmio à amostra com posterior agitação no vortex durante 2 min. Por último, é adicionada água mili-Q (1.25 mL), sendo a amostra novamente agitada no vortex durante 60 s e centrifugada a 1000 rpm durante 5 min (Figura 18).



Figura 18. Tubos de extração lipídica, após centrifugação. Fase orgânica na parte inferior, fase aquosa na parte superior.

A fase orgânica, que se encontra na parte inferior do tubo é pipetada para um novo tubo e à fase aquosa, que se encontra no primeiro tubo, é adicionado 1.88 mL de CHCl_3 , sendo a mistura agitada no vortex por 1 min e centrifugada durante 5 min a 1000 rpm; a fase orgânica é novamente pipetada para o segundo tubo. A fase orgânica é então seca numa centrífuga “speed vacuum” e o extrato obtido é dissolvida em CHCl_3 e transferida para um porta amostras; este é seco em corrente de azoto e armazenado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 19).

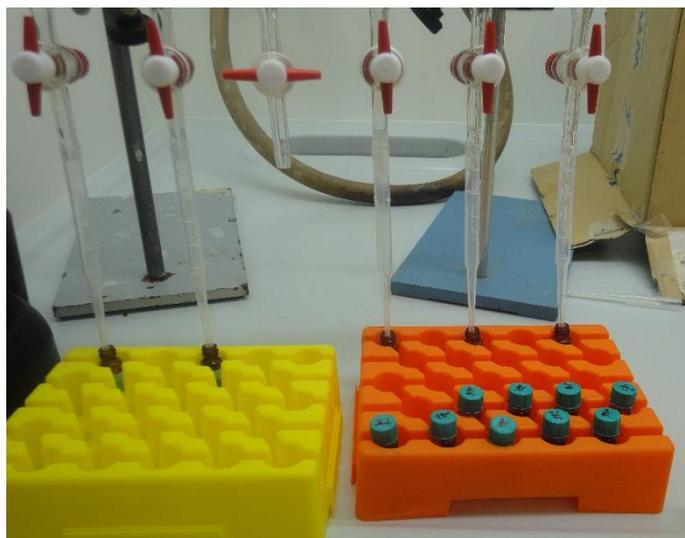


Figura 19. Secagem de amostras através de corrente de azoto.

Quantificação de fosfolípidos

O fósforo presente em cada amostra é quantificado através da técnica de Bartlett e Lewis⁶⁷, sendo adicionado ácido perclórico a 70% às amostras, seguindo-se uma incubação durante 1 h a 200 °C (Figura 20).



Figura 20. Incubação em calor das amostras a 200 °C

Em seguida, é adicionada 825 μL de água mili-Q, 125 μL de $\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2.5 %) e 125 μL de ácido ascórbico, sendo importante efetuar uma agitação no vortex após a adição de cada uma destas soluções à amostra. Este procedimento implica o uso de padrões com uma concentração crescente de NaH_2PO_4 , sendo estes preparados de acordo com a Tabela 1, são utilizados para a recta de calibração.

Tabela 1. Preparação de padrões para quantificação de fosfolípidos presentes no músculo adutor de *Ruditapes* spp.

	NaH₂PO₄	70% HClO₄	MilliQ H₂O	2.5% NaMoO₄.H₂O
P0	0 µL	125 µL	825 µL	125 µL
P1	1 µL	125 µL	825 µL	125 µL
P2	2 µL	125 µL	825 µL	125 µL
P3	4 µL	125 µL	825 µL	125 µL
P4	8 µL	125 µL	825 µL	125 µL
P5	12 µL	125 µL	825 µL	125 µL
P6	16 µL	125 µL	825 µL	125 µL
P7	20 µL	125 µL	825 µL	125 µL

A adição de cada solução implica mais uma vez a realização de uma agitação no vortex de modo a homogeneizar a amostra. Para finalizar, os padrões e as amostras são incubadas em banho maria (95-100 °C) por 10 min e em seguida colocados em gelo (Figura 21).

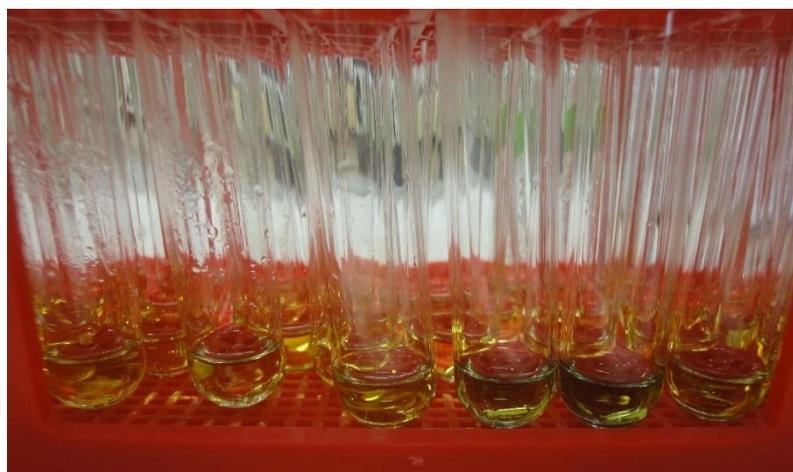


Figura 21. Amostras após incubação em calor

Os padrões e as amostras são transferidos para uma microplaca e a absorvância da solução é lida a 797 nm num leitor de microplacas (Multiscan 90, ThermoScientific) (Figura 22). Este procedimento é particularmente importante, visto que o tecido em análise não tem um peso fixo; deste modo, a sua re-suspensão para posterior injeção em GC-MS vai depender da quantidade de fosfolípido presente na amostra.

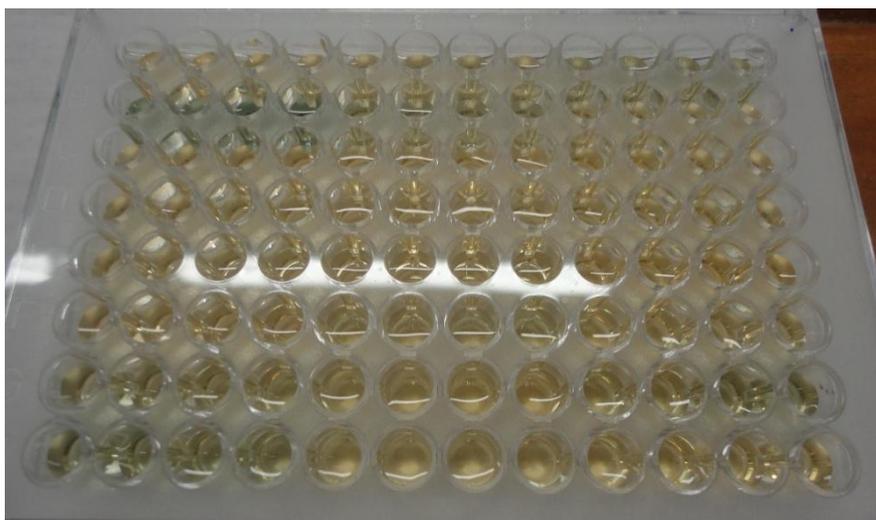


Figura 22. Microplaca para quantificação de fosfolípidos presentes nas amostras

Quantificação de ácidos gordos

O método de cromatografia gasosa- espectrometria de massa (GC-MS) foi utilizado para obter o perfil de ácidos gordos das amostras⁶⁸. Foram usados 15 μ L de amostra dissolvidas em clorofórmio, sendo esta seguidamente seca em corrente de azoto e posteriormente foram adicionados 1 mL de hexano e 200 μ L de KOH (2M), tendo esta mistura sido agitada no vortex. Em seguida, foram adicionados 2 mL de NaCl, sendo a amostra centrifugada por 5 min a 2000 rpm. No final foram obtidas duas fases, sendo a fase orgânica (em cima) transferida para um novo tubo e o solvente é evaporada em corrente de azoto (Figura 23).



Figura 23. Termoacumulador para manter as amostras refrigerados até dissolução para posterior análise no GC-MS.

Por fim, as amostras foram dissolvidas com 30 μL de hexano e 2 μL desta mistura foram injetadas num cromatógrafo a gás associado a um espectrómetro de massa (GC-MS) Agilent Technologies 6890N Network (Santa Clara, CA) equipado com um detetor de ionização e uma coluna capilar de sílica (DB-FFAP, 0.25 mm \times 30 m \times 0.25 μm), usando Hélio como gás portador com fluxo de 0.5 mL min⁻¹. A temperatura de injeção foi de 220 °C e a temperatura da coluna foi de 80 °C depois da injeção e antes desta aumentava para 220 °C a 14.4 °C min⁻¹, seguido de um aumento linear a 10 °C min⁻¹ até 240 °C e por fim 5 °C min⁻¹ até atingir 250 °C (Figura 24).

A identificação dos ácidos gordos obtida foi baseada na identificação do ião molecular e por comparação das abundâncias dos iões fragmento observados nos espectros de MS e tempos de retenção com espectros-padrão obtidos na biblioteca virtual “AOCS Lipid Library” (<http://lipidlibrary.aocs.org/>).



Figura 24. Cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (GC-MS)

Tratamento estatístico

Para cada réplica foi calculada a abundância relativa de cada ácido gordo presente no perfil obtido por GC-MS, tendo sido calculada a média e desvio padrão das réplicas por local de estudo.

A análise exploratória dos dados obtidos, teve início com a formação de grupos de ácidos gordos baseada nas suas abundâncias, para isso dividimos os ácidos gordos por classes e dentro de cada uma desta foram formados grupos entre os ácidos gordos com abundâncias próximas. Estes grupos, foram em seguida utilizados como variáveis dependentes na análise multivariada

-MANOVA- com o objetivo de verificar a existência de diferenças entre locais (montante e jusante) dos ecossistemas ou diferenças entre ecossistemas. Em caso de diferenças estatisticamente significativas na MANOVA ($p < 0.05$) procedemos a uma análise univariável – ANOVA de uma via, de modo a identificar quais os grupos de ácidos gordos responsáveis por estas diferenças, ou seja, comparando as abundâncias médias entre cada um dos locais/ecossistemas em análise⁶⁹. O teste de Tukey foi utilizado na análise estatística para os grupos com diferenças significativas na ANOVA, de modo a identificar quais os locais/ecossistemas em que estas diferenças ocorriam.

No estudo referente às diferenças entre ecossistemas, foram efetuadas análises discriminantes lineares, onde obtemos uma representação gráfica dos nossos grupos assim como o grau de distinção dentro destes⁷⁰.

Resultados

A partir da análise do perfil de ácidos gordos para cada espécie, identificamos um total de 27 ácidos gordos na espécie *R. phillipinarum* e 34 ácidos gordos na espécie *R. decussatus* (Tabela 2, 3). Foram identificados e quantificados ácidos gordos pertencentes a cinco classes de ácidos gordos – saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), polinsaturados (PUFA), altamente insaturados (HUFA) e ramificados (BCFA).

Tabela 2. Abundância relativa de ácidos gordos presentes no músculo adutor de *Ruditapes phillipinarum* da Ria de Aveiro, Estuário do Mondego, montante e jusante, Estuário do Sado e estuário do Tejo, montante e jusante. Os valores presentes são a média entre 5 réplicas \pm desvio padrão.

Ácidos Gordos (%)	Aveiro (A)	Mondego Montante (Mond_m)	Mondego jusante (Mond_j)	Sado (S)	Tejo Montante (Tm)	Tejo Jusante (Tj)
14:0	0.42 \pm 0.10	0.60 \pm 0.05	0.58 \pm 0.11	1.02 \pm 0.35	0.54 \pm 0.17	0.44 \pm 0.07
15:0	0.50 \pm 0.05	0.37 \pm 0.02	0.40 \pm 0.01	0.45 \pm 0.26	0.47 \pm 0.35	0.42 \pm 0.07
16:0	10.51 \pm 0.99	11.66 \pm 0.42	11.95 \pm 0.28	22.45 \pm 5.82	17.59 \pm 3.45	13.93 \pm 2.20
17:0	1.50 \pm 0.10	1.69 \pm 0.16	1.48 \pm 0.15	0.96 \pm 0.23	1.14 \pm 0.45	1.13 \pm 0.16
18:0	8.32 \pm 0.29	10.53 \pm 0.81	9.15 \pm 0.98	17.93 \pm 5.08	10.07 \pm 2.25	7.34 \pm 0.98
Σ SFA	21.25	24.85	23.56	42.80	29.82	23.26
15:0 CH3	0.67 \pm 0.13	0.30 \pm 0.02	0.36 \pm 0.08	0.32 \pm 0.02	0.45 \pm 0.15	0.48 \pm 0.13
16:0 CH3	0.89 \pm 0.12	0.91 \pm 0.12	0.83 \pm 0.14	0.578 \pm 0.05	0.68 \pm 0.35	0.81 \pm 0.08
16:0 CH3	1.13 \pm 0.31	1.09 \pm 0.19	1.19 \pm 0.22	1.03 \pm 0.31	2.01 \pm 0.45	1.34 \pm 0.56
Σ BCFA	2.69	2.30	2.39	1.92	3.14	2.63
16:1 n-7	1.83 \pm 0.15	1.30 \pm 0.27	1.36 \pm 0.15	1.66 \pm 1.20	1.95 \pm 0.31	2.20 \pm 0.22
18:1 n-9	4.96 \pm 1.26	5.53 \pm 0.32	6.19 \pm 0.23	2.82 \pm 1.01	4.09 \pm 0.16	5.24 \pm 0.87
18:1 n-7	1.92 \pm 0.19	1.45 \pm 0.20	1.77 \pm 0.28	2.35 \pm 1.05	2.06 \pm 0.33	2.36 \pm 0.25
20:1 n-9/11	6.07 \pm 0.98	3.55 \pm 0.25	4.21 \pm 1.24	3.90 \pm 0.56	4.32 \pm 1.09	6.09 \pm 0.47
20:1 n-7	2.51 \pm 0.17	1.38 \pm 0.21	1.57 \pm 0.24	2.40 \pm 0.54	2.18 \pm 0.31	2.34 \pm 0.17
Σ MUFA	17.29	13.21	15.10	13.13	14.61	18.23
18:2 n-6	0.26 \pm 0.08	0.44 \pm 0.07	0.62 \pm 0.15	0.20 \pm 0.06	0.55 \pm 0.23	0.58 \pm 0.03
18:3 n-3	0.52 \pm 0.10	0.28 \pm 0.06	0.50 \pm 0.27	0.15 \pm 0.10	0.55 \pm 0.16	1.60 \pm 0.22
18:4 n-3	0.94 \pm 0.17	1.05 \pm 0.15	1.27 \pm 0.07	0.41 \pm 0.07	0.78 \pm 0.14	1.73 \pm 0.11
20:2 n-6	1.99 \pm 0.39	1.47 \pm 0.20	2.38 \pm 0.97	1.23 \pm 0.32	1.45 \pm 1.17	2.88 \pm 0.06
20:4 n-6	3.92 \pm 0.60	3.11 \pm 0.35	2.88 \pm 0.11	2.87 \pm 0.65	2.41 \pm 0.25	3.32 \pm 0.50
20:4 n-3	0.70 \pm 0.18	0.23 \pm 0.07	0.44 \pm 0.27	0.47 \pm 0.19	0.87 \pm 0.10	0.98 \pm 0.15
20:5 n-3	10.93 \pm 1.95	6.08 \pm 0.80	7.86 \pm 2.47	10.18 \pm 1.97	10.20 \pm 1.28	9.76 \pm 0.68

22:2 n-9	1.29±0.21	2.50±0.46	2.29±0.44	0.76±0.45	1.21±0.16	1.06±0.15
22:2 n-6	3.34±0.34	3.81±0.51	3.32±1.13	3.65±2.79	2.84±0.46	3.68±0.91
22:3 n-6	1.83±0.22	1.82±0.16	2.06±0.16	1.40±0.25	3.08±0.61	1.95±0.33
22:4 n-6	2.03±0.25	1.21±0.18	0.99±0.10	2.05±0.64	1.57±0.37	1.89±0.55
22:4 n-3	1.30±0.13	1.57±0.18	1.45±0.05	0.96±0.23	1.54±0.08	1.86±0.22
22:5 n-3	5.27±0.31	4.53±0.36	4.27±0.12	4.20±0.81	3.99±0.47	4.06±0.19
22:6 n-3	24.44±1.02	31.55±0.79	28.64±3.60	13.61±2.15	21.40±7.35	20.52±1.69
Σ PUFA	58.77	59.64	58.95	42.14	52.43	55.88

Tabela 3. Abundância relativa de ácidos gordos presentes no músculo adutor de *Ruditapes decussantus* da Ria de Alvor, Estuário de Mira e Ria Formosa (Faro e Olhão). Os valores presentes são a média entre 5 (4 no ecossistema Estuário de Mira) réplicas ± desvio padrão.

Ácidos Gordos (%)	Ria Alvor (Alv)	Mira (M)	Ria Formosa (RF) - Faro	Ria Formosa (RF) - Olhão
14:0	0.87±0.17	0.41±0.12	0.79±0.18	0.93±0.18
15:0	0.35±0.05	0.34±0.07	0.32±0.15	0.37±0.04
16:0	11.30±1.55	12.99±1.69	14.06±2.96	13.88±2.27
17:0	1.37±0.20	1.57±0.31	1.16±0.33	1.48±0.16
18:0	9.89±0.88	10.74±0.80	13.58±2.17	10.98±1.50
Σ SFA	23.77	26.04	29.91	27.65
14:0 CH3	0.11±0.04	0.19±0.08	0.14±0.01	0.09±0.03
15:0 CH3	0.42±0.08	0.41±0.08	0.45±0.09	0.38±0.04
16:0 CH3	0.80±0.04	0.79±0.15	0.94±0.15	0.75±0.09
16:0 CH3	0.90±0.26	1.00±0.39	1.35±0.34	0.96±0.44
17:0 CH3	0.22±0.04	0.32±0.11	0.20±0.05	0.30±0.07
Σ BCFA	2.45	2.71	3.08	2.48
16:1 n-7	1.24±0.11	1.91±0.62	1.25±0.31	1.20±0.22
16:1 n-5	0.33±0.09	0.14±0.03	0.18±0.15	0.27±0.04
17:1	0.13±0.02	0.37±0.47	0.10±0.06	0.15±0.04
18:1 n-9	4.84±0.89	4.51±0.38	4.50±0.57	4.84±0.49
18:1 n-7	2.33±0.30	2.31±0.48	1.83±0.26	1.91±0.39
20:1 n-9/11	3.47±0.68	4.23±1.17	3.96±0.46	3.47±0.40
20:1 n-7	2.58±0.22	1.78±0.20	1.88±0.19	2.03±0.29

Σ MUFA	14.91	15.27	13.70	13.86
18:2 n-6	0.36±0.05	0.53±0.25	0.27±0.05	0.29±0.03
18:2 n-3	0.31±0.04	0.23±0.03	0.22±0.03	0.21±0.06
18:3 n-3	0.24±0.03	0.50±0.22	0.30±0.07	0.19±0.03
18:4 n-3	0.89±0.04	0.68±0.08	0.83±0.23	0.70±0.09
20:2 n-9	0.59±0.17	0.32±0.16	0.74±0.10	0.31±0.04
20:2 n-6	2.13±0.60	2.02±0.59	1.78±0.21	2.14±0.55
20:3 n-6	0.28±0.04	1.21±1.88	2.31±1.94	0.65±1.04
20:4 n-6	3.28±0.46	2.79±1.71	1.36±1.61	2.93±0.50
20:4 n-3	0.39±0.07	0.41±0.17	0.28±0.04	0.24±0.04
20:5 n-3	8.79±1.22	9.26±2.79	7.03±0.20	6.07±0.47
22:2 n-9	1.43±0.27	1.21±0.33	1.79±0.25	1.70±0.28
22:2 n-6	5.07±0.85	3.36±1.40	5.46±0.87	4.51±0.68
22:3 n-6	1.88±0.08	1.65±0.07	1.63±0.13	1.63±0.18
22:4 n-6	1.64±0.20	2.67±0.35	2.04±0.44	1.49±0.16
22:4 n-3	1.25±0.14	1.43±0.17	1.33±0.14	1.18±0.05
22:5 n-3	4.61±0.27	4.17±0.83	4.31±0.59	3.62±0.15
22:6 n-3	25.89±0.85	23.53±3.86	21.63±2.47	28.16±1.94
Σ PUFA	59.02	55.97	53.31	56.02

Os PUFAS são o grupo de ácidos gordos com maior abundância relativa e diversidade em todos os locais, exceto no Estuário do Sado, em que o músculo adutor da ameijoja japonesa apresenta um valor mais elevado de SFA. No grupo dos PUFAs os mais abundantes são o DHA (22:6n-3) variando a sua abundância média entre 13.61 e 31.55%; o EPA (20:5n-3) apresenta uma abundância mínima de 6.07% na Ria Formosa jusante e máxima de 10.93% na Ria de Aveiro; o ácido palmítico (16:0) e o ácido esteárico (18:0) são os SFA mais abundantes variando entre 10.51% e 22.45% e 7.34% e 17.93%, respetivamente; por fim o 18:1n-9 e o 20:1n-9/11 são os MUFA que apresentam uma maior abundância relativa, que varia entre 2.82% e 6.19% e 3.47% e 6.09%, respetivamente.

Numa análise exploratória dos locais a montante e a jusante dos ecossistemas amostrados, foram selecionados quatro ácidos gordos principais, 16:0, 18:0, 22:5n-3 e o 22:6n-3, visto serem estes que contribuíram em conjunto com mais de 50% para a abundância total de ácidos gordos (Figura 25).

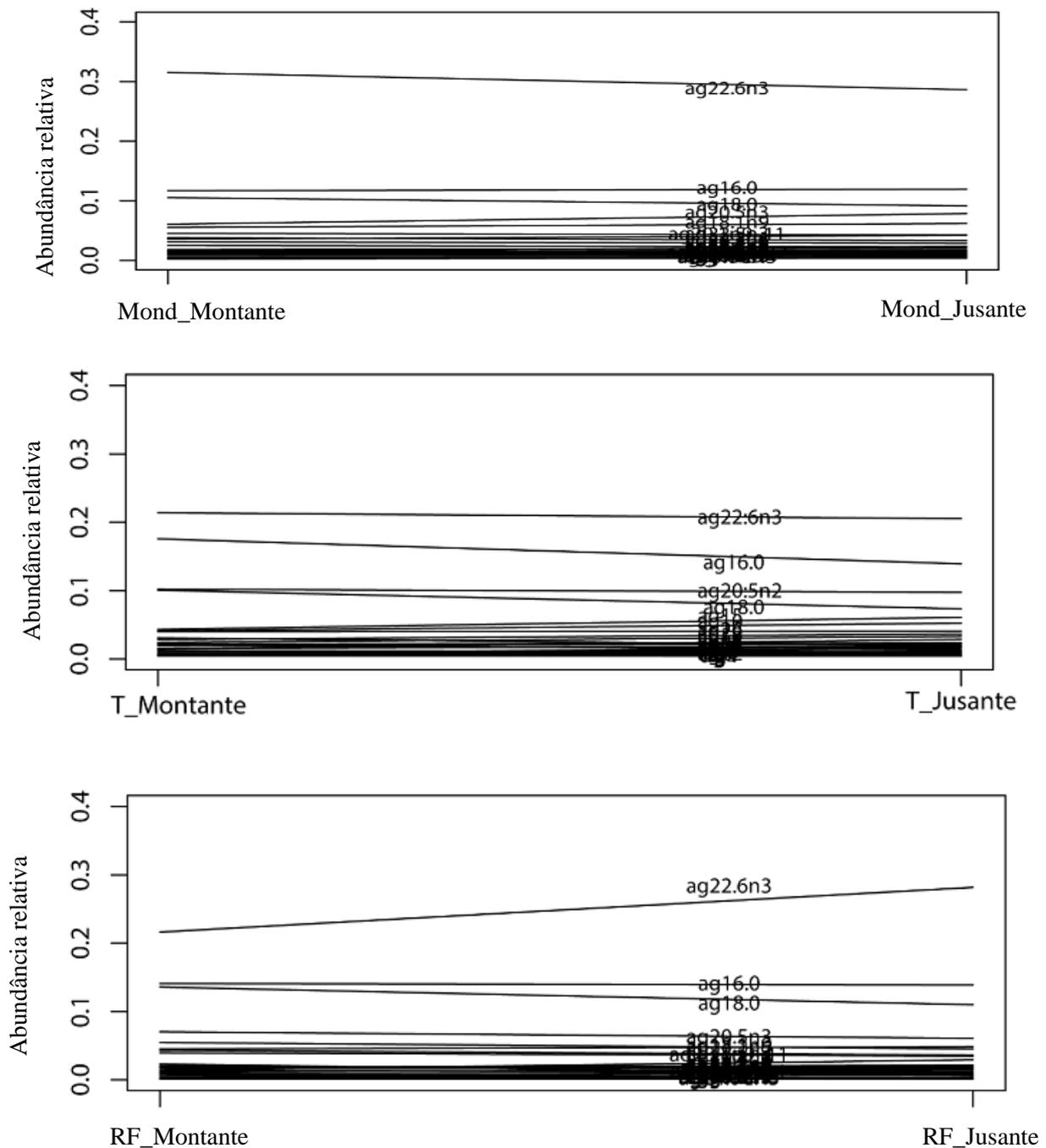


Figura 25. Abundâncias relativas de ácidos gordos entre locais a montante e jusante dos ecossistemas Estuário do Mondego, Estuário do Tejo e Ria Formosa.

Com o objetivo de estudar a existência de diferenças entre locais a montante e jusante dos ecossistemas, Estuário do Mondego, Estuário do Tejo e Ria Formosa, a análise multivariada MANOVA (tendo como variáveis dependentes os ácidos gordos referidos acima) permitiu verificar que apenas no Estuário do Mondego não são registadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0.05$, $F = 2.74$). Por oposição, foram registadas diferenças significativas no

perfil de ácidos gordos presentes no músculo adutor de ameijoas recolhidas em locais a montante e a jusante no Estuário do Tejo ($p < 0.05$, $F = 12.8$) e na Ria Formosa ($p < 0.001$, $F = 35.4$).

Recorrendo à análise univariada, foi possível verificar que para as diferenças registadas no Estuário do Tejo esta é principalmente explicada pelo ácido gordo saturado 18:0 ($p < 0.05$, $F = 6.2$). Na Ria Formosa, as diferenças registadas pela MANOVA devem-se principalmente aos ácidos gordos altamente insaturados 20:5 $n-3$ ($p < 0.05$, $F = 1706$) e 22:6 $n-3$ ($p < 0.05$, $F = 21.7$).

Tabela 4. Anova de uma via entre locais (montante e jusante) dos ecossistemas Estuário do Tejo e Ria Formosa tendo em consideração a formação de grupos de ácidos gordos baseados nas suas abundâncias

Locais	Grupo	Graus de Liberdade	Soma	Média	F	p. value
Tejo	16:0	1	0.003	0.003	4.02	8e-02
	18:0	1	0.002	0.002	6.2	3.75e-02
	20:5 $n-3$	1	0	0	0.457	5.18e-01
	22:6 $n-3$	1	0	0	0.067	8.03e-02
Ria Formosa	16:0	1	0	0	0.012	9.15e-01
	18:0	1	0.002	0.002	4.84	5.91e-02
	20:5 $n-3$	1	0	0	17.6	3.03e-03
	22:6 $n-3$	1	0.011	0.011	21.7	1.64e-03

Na análise exploratória do estudo entre ecossistemas ao longo a Costa Continental Portuguesa, os grupos foram formados de acordo com as proximidades de abundâncias dos ácidos gordos, sendo considerados todos os ácidos gordos pertencentes às diferentes classes. Dos ecossistemas com *R. philippinarum*, Ria de Aveiro (A), Estuário do Mondego (FF), Estuário do Tejo (T) e Estuário do Sado (S), os ácidos gordos foram agrupados em 16:0 e 18:0, restantes SFA, ramificados, PUFA, 20:5 $n-3$, 22:6 $n-3$, restantes HUFA e MUFA (Figura 26).

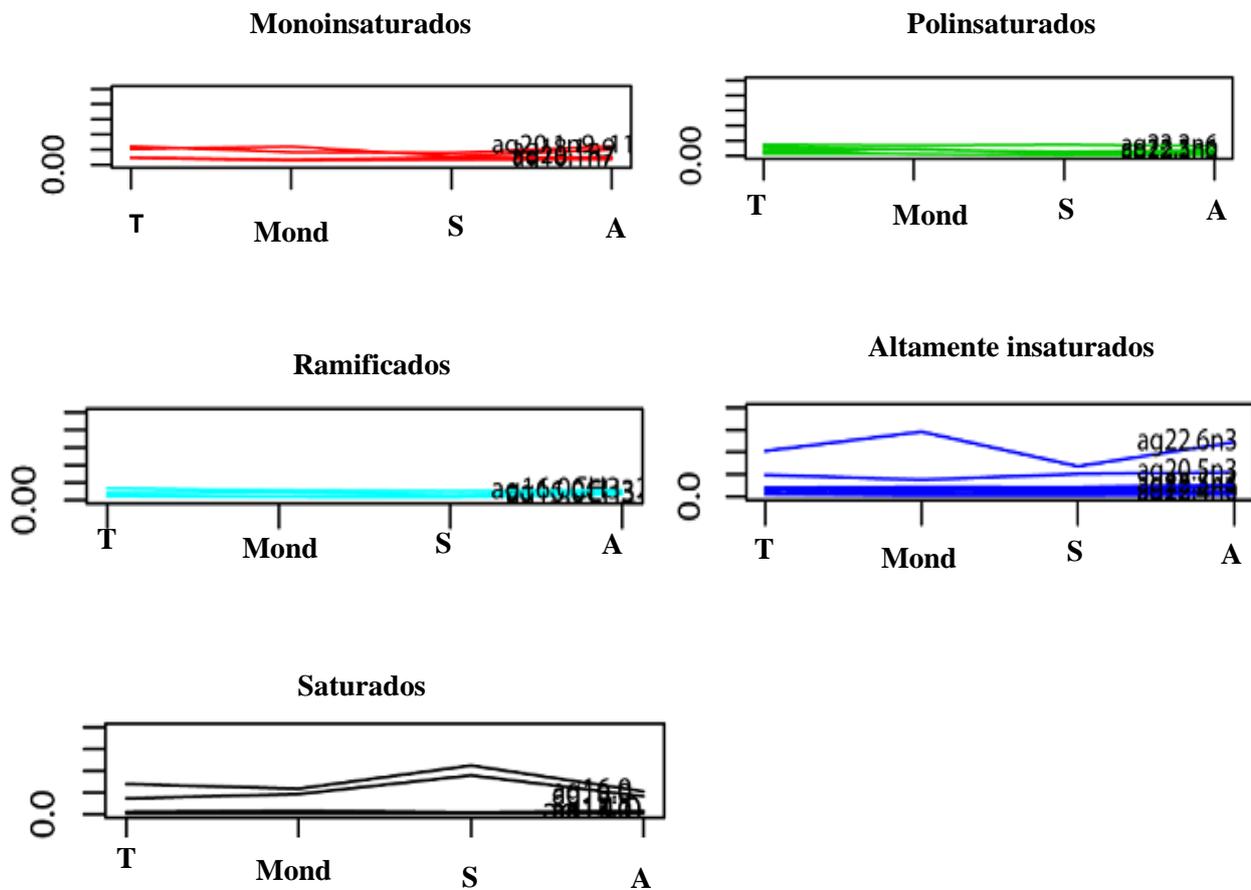
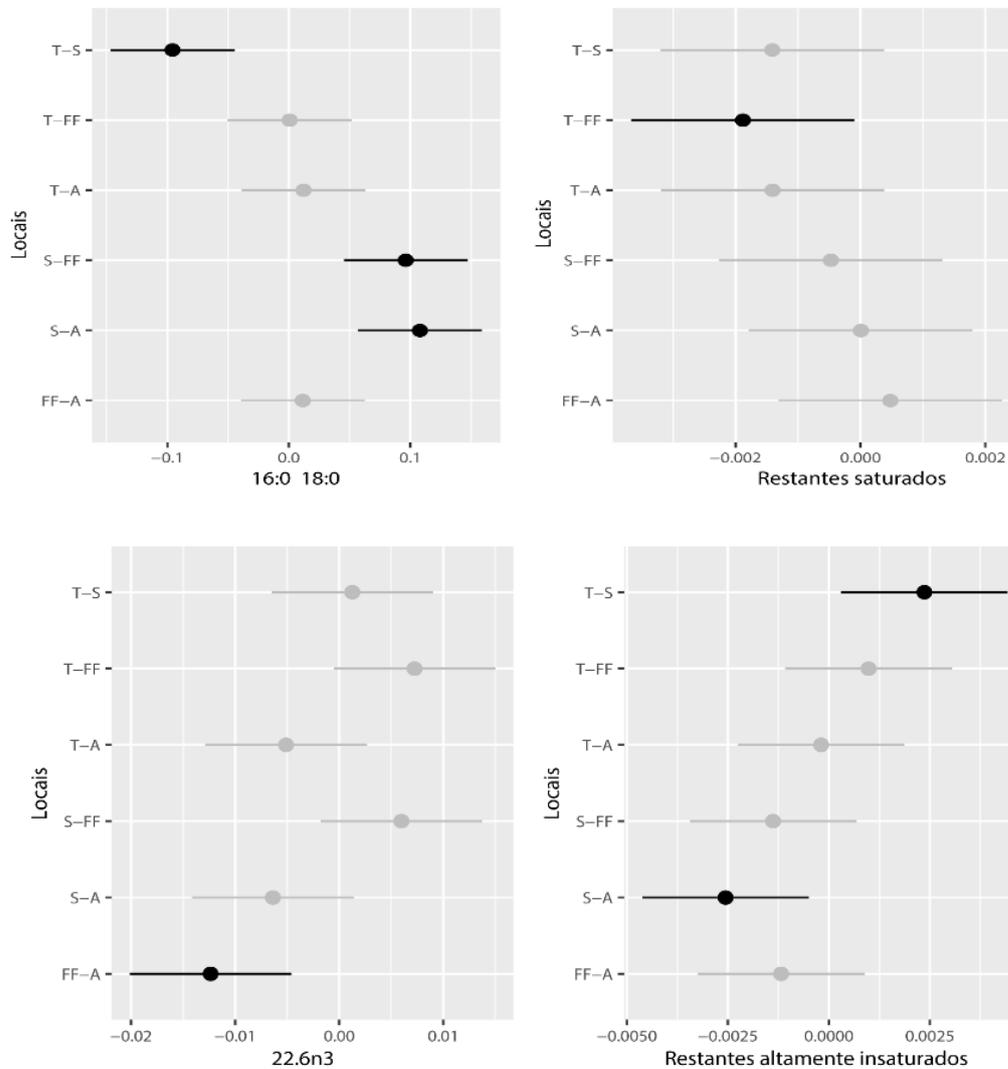


Figura 26. Abundância relativas de ácidos gordos divididos segundo a sua classe nos ecossistemas Ria de Aveiro (A), Estuário do Mondego (Mond), Estuário do Sado (S) e Estuário do Tejo (T)

A análise multivariada MANOVA revelou a existência de diferenças significativas ($p < 0.001$, $F = 12.1$), tendo a análise univariada realizada através da ANOVA de 1 via permitido avaliar quais grupos que mais contribuíram para as diferenças estatisticamente significativas registadas. Efetivamente, todos os grupos formados apresentaram diferenças estatisticamente significativas, com exceção do grupo dos PUFA (Tabela 5). A realização posterior de um teste de tukey permitiu determinar quais os ácidos gordos que contribuem para as diferenças registadas na ANOVA de 1 via, sendo os HUFA, 16:0 e 18:0 os que apresentaram maiores diferenças entre ecossistemas (Figura 27).

Tabela 5. Anova de uma via entre ecossistemas onde foram coletados exemplares de *Ruditapes philippinarum*, tendo em consideração a formação de grupos de ácidos gordos baseados nas suas abundâncias

Grupo	Graus de Liberdade	Soma	Média	F	p. value
16:0-18:0	3	0.038	0.013	15.9	4.64e-5
Restantes saturados	3	0	0	3.39	4.39e-2
Monoinsaturados	3	0	0	5.16	1.1e-2
Polinsaturados	3	0	0	3.09	5.68e-2
22:6 n-3	3	0.065	0.022	44.1	5.86e-8
Restantes altamente insaturados	3	0	0	7	3.19e-3
Ramificados	3	0	0	5.27	1.02e-2



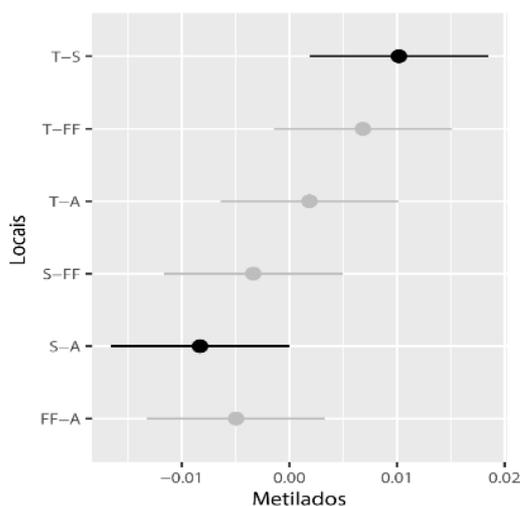


Figura 27. Teste de tukey entre ecossistemas onde foram recolhidas *Ruditapes philippinarum* tendo em consideração diversos grupos de ácidos gordos.

Para finalizar o estudo dos ecossistemas Ria de Aveiro, Estuário do Mondego Tejo e Sado, foi efetuada uma análise discriminante linear, onde foi obtido um valor de 100% de discriminação entre ecossistemas (Tabela 1a, Figura 28).

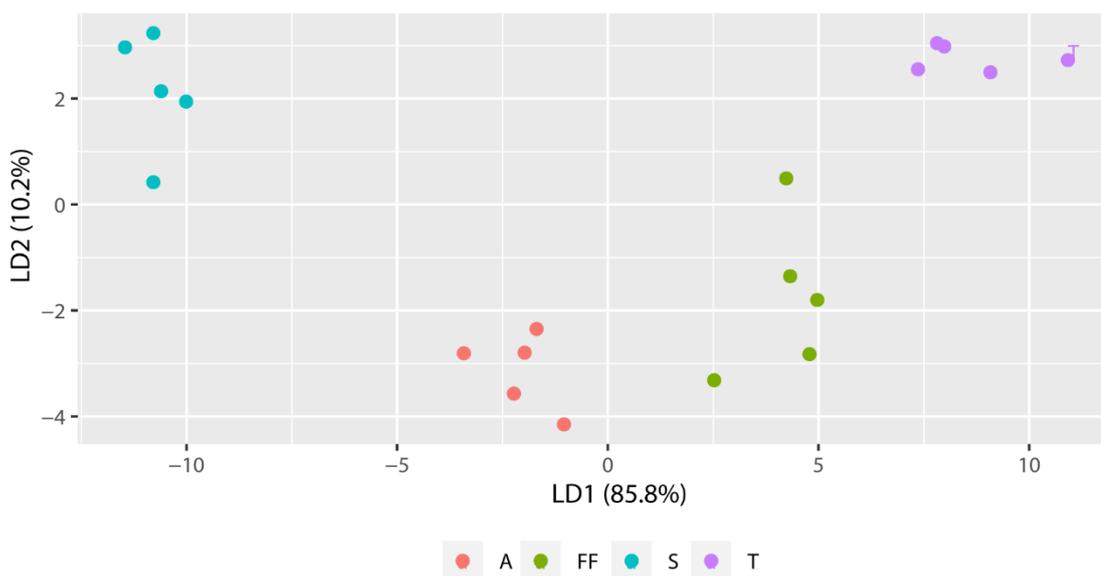


Figura 28. Análise discriminante linear dos ecossistemas Ria de Aveiro, Estuário do Mondego, Estuário do Tejo e Estuário do Sado (LD1 80.1% LD2 14.9%)

Relativamente aos ecossistemas onde foi amostrada *R. decussatus*, Ria de Alvor (Alv), Estuário de Mira (M) e Ria Formosa (RF), os ácidos gordos presentes no músculo adutor destes bivalves foram agrupados em 16:0 e 18:0, restantes SFA, 18:1n-9, 20:1n-9/11, restantes MUFA, 22:2n-6, restantes PUFA, 20:5n-3, 22:6n-3, restantes HUFA e ramificados (Figura 29).

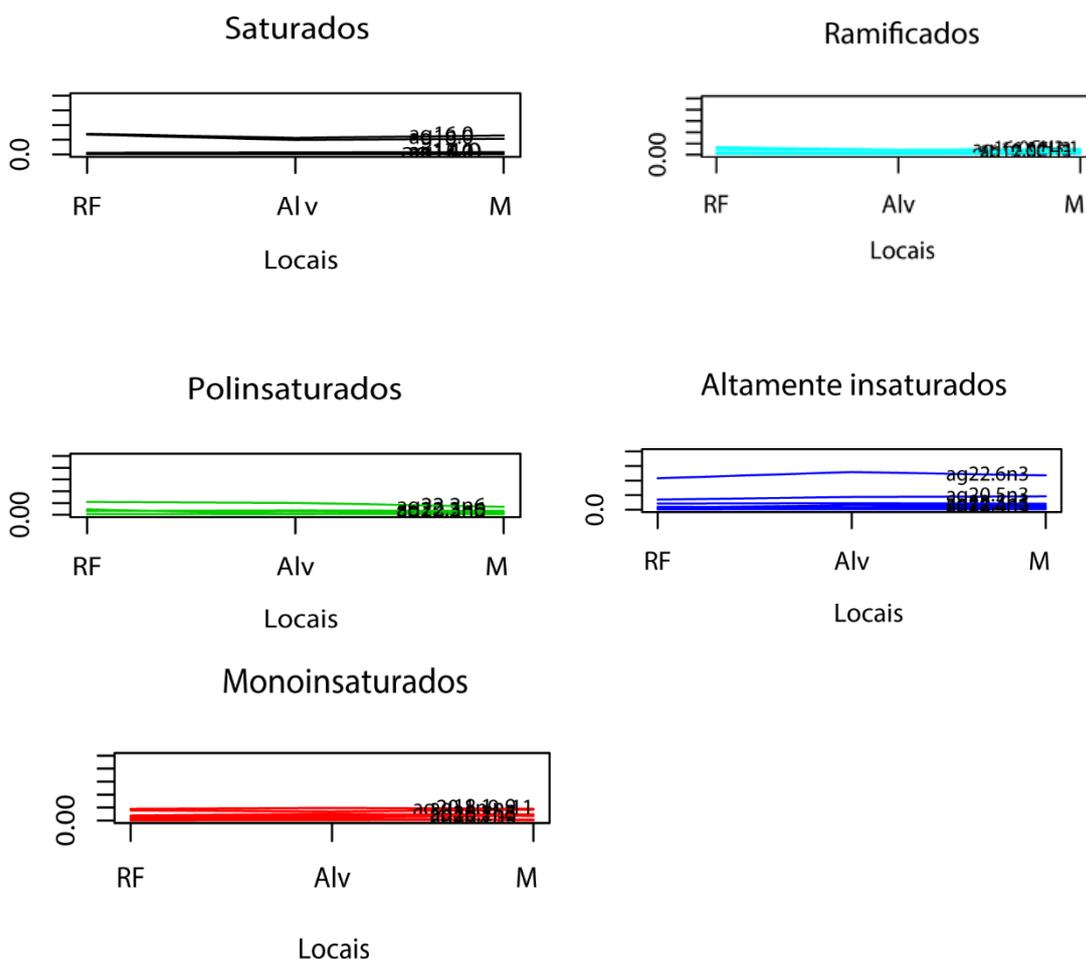
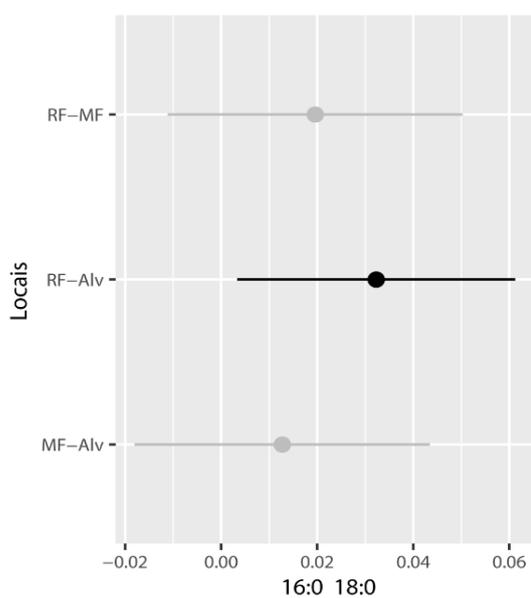


Figura 29. Abundância relativas de ácidos gordos divididos segundo a sua classe nos ecossistemas Estuário do Mira (M), Ria de Alvor (Alv) e Ria Formosa (RF)

Recorrendo à análise multivariada MANOVA foi verificada a existência de diferenças estatisticamente significativas entre ecossistemas de *R. decussatus* ($p < 0.05$, $F = 13.1$), no qual as variáveis dependentes em estudo foram os grupos de ácidos gordos anteriormente formados. A análise univariada apenas revelou que os grupos 16:0 e 18:0, restantes MUFA, 22:2 $n-6$, e 20:5 $n-3$ apresentaram diferenças estatísticas significativas (Tabela 6). De modo a identificar entre que locais ocorreram estas diferenças, foi realizado um teste Tukey, tendo sido possível verificar que as diferenças foram registadas entre os locais Ria Formosa e Ria de Alvor, tendo em consideração os ácidos gordos 16:0 e 18:0 e entre o Estuário de Mira e a Ria Formosa, considerando apenas o ácido gordo 18:1 $n-9$ (Figura 30).

Tabela 6. Anova de uma via entre ecossistemas onde foram coletados exemplares de *Ruditapes decussatus*, tendo em consideração a formação de grupos de ácidos gordos baseados nas suas abundâncias

Grupo	Graus de Liberdade	Soma	Média	F	p. value
16:0-18:0	2	0.003	0.001	4.6	3.54e-2
Restantes saturados	2	0	0	1.08	3.74e-1
Monoinsaturados	2	0.001	0.001	5.05	2.78e-2
18:1 n-9	2	0.001	0.001	2.43	1.34e-1
20:1 n-9/11	2	0	0	1.12	3.61e-1
Polinsaturados	2	0	0	1.16	3.5e-1
22:2 n-6	2	0.001	0.001	5.05	2.78e-2
22:6 n-3	2	0.005	0.002	3.48	6.74e-2
20:5 n-3	2	0	0	0.404	6.77e-1
Restantes altamente insaturados	2	0	0	2.74	1.08e-1
Ramificados	2	0	0	3.03	8.94e-2



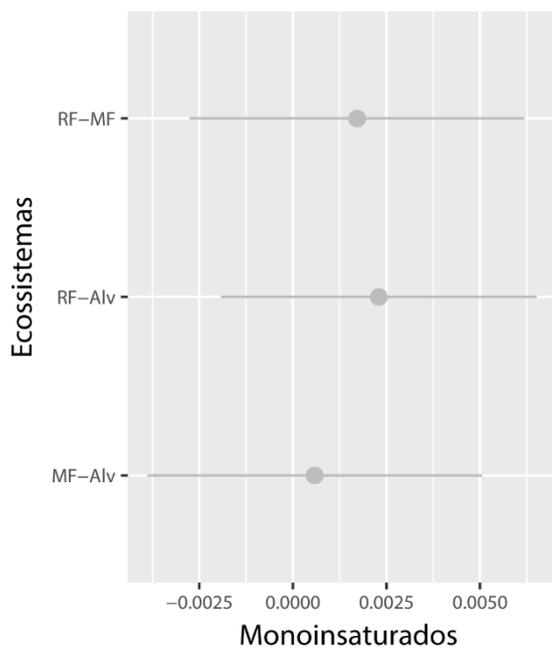


Figura 30. Teste de tukey entre ecossistemas onde foram recolhidas *Ruditapes decussatus* tendo em consideração diversos grupos de ácidos gordos.

Por fim, foi avaliada a probabilidade da origem geográfica de um espécime de *R. decussatus* ser corretamente determinado através do perfil de ácidos gordos do seu músculo adutor, tendo sido obtido um valor de 100% através da realização de uma análise discriminante linear (Tabela 2a, Figura 31).

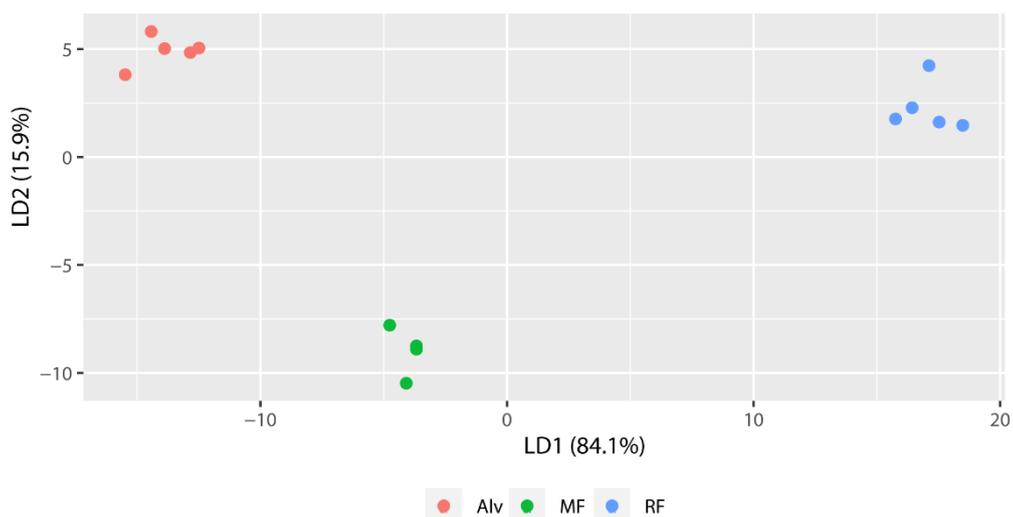


Figura 31. Análise discriminante linear dos ecossistemas Estuário do Mira, Ria de Alvor e Ria Formosa (LD1 84.1% LD2 15.9%)

Discussão

No presente estudo, foi possível observar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre locais a jusante e montante de dois dos três ecossistemas amostrados e ainda diferenças estatisticamente significativas entre todos os ecossistemas amostrados, tendo como base a assinatura de ácidos gordos do músculo adutor de duas espécies de ameijoas existentes na costa portuguesa.

De acordo com os resultados apresentados, tanto a espécie *R. philippinarum* como *R. decussatus* apresentam uma maior abundância média de PUFAs, seguido de SFAs e só por fim MUFAs. A dominância de PUFAs é comum a várias espécies marinhas, estando descrita em diversos tecidos de bivalves, nomeadamente as gónadas, a glândula digestiva e as brânquias^{37,71-73}.

No grupo dos PUFAs, que representa uma grande diversidade e abundância no músculo adutor das espécies em estudo, destaca-se a elevada diversidade de ácidos gordos *n*-3 característicos de organismos marinhos distribuídos por vários níveis tróficos. Os organismos marinhos acumulam estes compostos, principalmente DHA e EPA obtidos através da alimentação de produtores primários como fitoplâncton. sendo que estes ácidos gordos são transferidos ao longo da cadeia trófica³⁵. A DHA e EPA são assim considerados essenciais em bivalves e nos animais em geral, pois estes não são capazes de os sintetizar *de novo* tendo importantes funções no crescimento e reprodução dos indivíduos^{74,75}. Esta dominância de DHA e EPA foi observada em diferentes bivalves, tais como *Cerastoderma edulee* *Mytilus edulis*, tanto no músculo adutor como noutros tecidos. Contudo, o perfil de ácidos gordos pode sofrer alterações durante a época reprodutiva, como descrito por Fernández, A. *et al.* em fêmeas da espécie *Mytilus edulis*, sendo a principal alteração o aumento da quantidade de PUFAs⁷⁶. Durante a análise do perfil de ácidos gordos, principalmente do perfil de PUFAs, é importante ter em consideração a sua relevância nas adaptações fisiológicas dos organismos marinhos às condições ambientais. Quando em ambientes de temperaturas mais baixas, os ácidos gordos saturados tendem a aumentar permitindo à membrana manter a sua fluidez, não comprometendo a homeostasia entre o meio intracelular e extracelular^{15,16,77,78}. Assim, ambientes mais salinos e com temperaturas mais elevadas, como os locais mais a jusante dos ecossistemas, o esperado será uma maior abundância de PUFA em relação a locais que se encontram mais a montante dos ecossistemas tendo estas temperaturas e salinidades menores.

Relativamente aos SFA, verificou-se uma dominância de 16:0 e 18:0, assim como descrito em estudos anteriores, tanto em ameijoas como noutras espécies de bivalves^{37,73,79}. O ácido gordo 16:0 é um importante precursor para a biossíntese na síntese de outros ácidos gordos, visto que por ação de enzimas elongases são sintetizados a partir do 16:0 outros ácidos gordos com 18, 20 e 22 carbonos³⁴. Dos MUFAs destacam-se o 18:1 *n*-9 e o 20:1 *n*-9/11, sendo a sua

abundância bastante reduzida quando comparada com os restantes ácidos gordos que constituem o perfil do músculo adutor. O ácido 18:1 *n*-9 é o precursor de todos os *n*-6 e *n*-3 sintetizados, apesar deste processo estar diretamente dependente da alimentação, já que a maioria dos animais não têm a capacidade de sintetizar a enzima Δ 12 responsável pela transformação de 18:1 *n*-9 em *n*-3 e *n*-6, assim sendo, a assinatura de ácidos gordos do músculo adutor vai depender em parte da disponibilidade de alimento disponível no meio³⁹.

Da análise entre locais a montante e jusantes dos ecossistemas Estuário do Tejo e Ria Formosa foram registadas diferenças estatisticamente significantes que poderão estar relacionadas com o facto dos locais amostrados terem características ambientais bastante diferentes. Nos locais mais próximos da embocadura do estuário/ria, os indivíduos vão estar expostos a salinidades mais elevadas, contrariamente ao que ocorre a montante do ecossistema, onde a influência de água doce é superior^{79,80}. Em 2015, num estudo efetuado ao longo dos diferentes canais da Ria de Aveiro foram registadas alterações no perfil de ácidos gordos do músculo adutor de berbigão, tendo sido apontado como causa provável das diferenças registadas as diferentes condições salinas registadas nesses locais²⁵. A presença de bivalves num ecossistema é principalmente influenciada pela sua capacidade de adaptação a alterações de salinidade, visto estes indivíduos terem uma menor gama de tolerância a este parâmetro do que relativamente à temperatura da água^{71,77}. De modo a manter a osmorregulação entre o meio intracelular e extracelular, os indivíduos respondem fisiologicamente às condições ambientais a que estão sujeitos, num mecanismo causa-efeito, ou seja, com o aumento da salinidade é de esperar que a razão entre polinsaturados *n*-3 e *n*-6 aumente⁸¹.

Da análise entre locais a montante e jusante do Estuário do Mondego, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas. A amostragem neste estuário, como descrito anteriormente, foi efetuada ao longo do braço Sul, sendo este um canal de pequenas dimensões e baixa profundidade onde a entrada de água doce está principalmente dependente da precipitação e da água doce proveniente de uma única fonte – Rio Pranto^{54,56}. Deste modo, durante as épocas mais quentes, a entrada de água doce no sistema é reduzida, estando a hidrologia do sistema principalmente dependente do ciclo de marés, apresentando assim condições bastante semelhantes ao longo de todo o braço Sul do estuário⁵⁵.

A assinatura de ácidos gordos, do músculo adutor, permitiu ainda diferenciar os ecossistemas amostrados na Costa Continental Portuguesa, sendo que os ácidos gordos que mais contribuíram para esta discriminação são também os que apresentam uma maior abundância. A escolha do músculo adutor minimiza a influência de fatores intrínsecos aos indivíduos, tais como sexo, idade e época reprodutiva, assim como diminui (mas não eliminar na totalidade) o contributo de fatores externos, tais como alterações anuais e sazonais^{25,37,76}. Por ser um tecido formado

essencialmente por lípidos polares, o músculo adutor dos bivalves reflete principalmente características ambientais, sendo os ácidos gordos que o constituem essencialmente estruturais, isto é, têm como função manter as membranas celulares funcionais e a comunicação celular, não sendo uma fonte de energia para os indivíduos^{33,73,79}.

Embora a amostragem dos ecossistemas tenha sido efetuada em locais com características semelhantes, cada um deles vai ter uma hidrologia e complexidade diferente, devido às duas dimensões: fluxo de água doce e de água salgada que entra no sistema ao longo do tempo^{73,76}. Portanto, tal como descrito anteriormente, os ácidos gordos presentes nos tecidos vão variar em função de fatores como a temperatura e salinidade do meio, levando assim à ocorrência de perfis de ácidos gordos diferentes em função do local e ecossistema ocupado pelos bivalves^{37,72,78}.

Os ecossistemas tais como o Estuário do Mondego e Estuário de Mira, devido às suas dimensões e ao facto da entrada de água doce ser bastante reduzida principalmente nas estações mais quentes, podem ser facilmente discriminados dos restantes ecossistemas onde ocorrem *R. phillipinarum* e *R. decussatus*^{53,55}. Contrariamente, os restantes ecossistemas em estudo apresentam diversas proveniências de água doce, podendo algumas reduzir o seu fluxo durante o Verão. Contudo, existe sempre uma mistura de água doce e salgada levando os sistemas a apresentar diferentes características hidrológicas que influenciam os indivíduos e por conseguinte o perfil de ácidos gordos presente nos seus tecidos^{47,51,56-58,63}.

Baseado nos resultados apresentados no presente estudo e em estudos anteriores, o perfil de ácidos gordos do músculo adutor pode ser utilizado por produtores e autoridades na rastreabilidade de bivalves. Contudo, a aplicabilidade desta técnica depende de uma amostragem efetuada nos ecossistemas no mesmo período de tempo em que foi efetuada a colheita dos indivíduos a comercializar, visto que o perfil de ácidos gordos sofre alterações temporais. Este método permite somente determinar se a origem do produto é, ou não, a origem fornecida às autoridades ou produtores. Situações nas quais a origem do produto fornecida não coincidir com a amostragem efetuada no local o método não permite determinar a origem real dos espécimes.

A rastreabilidade de bivalves baseada no perfil de ácidos gordos pode ser utilizada pelas autoridades competentes de cada país, permitindo não só uma proteção do consumidor final e da saúde pública, mas também um combate à atividade de pesca ilegal. Em Portugal, é particularmente importante conseguir diferenciar a origem geográfica de bivalves, visto existir uma grande exploração ilegal de ameijoas, principalmente ameijoas japonesas, que coloca em risco não só a saúde pública, mas também o equilíbrio dentro dos ecossistemas.

Os produtores podem também usufruir da utilização do perfil de ácidos gordos como método de rastreabilidade, pois através deste podem assegurar ao comprador a origem dos bivalves,

visto as zonas de produção apresentarem diferentes níveis de poluição; deste modo, os produtores poderão assegurar de forma verificável a proveniência dos bivalves transacionados e aumentar o valor do seu produto.

Apesar desta técnica permitir rastrear a origem geográfica de bivalves com uma resolução espacial assinalável, ainda é necessário efetuar mais estudos de modo a aperfeiçoar a mesma e aumentar o seu grau de sucesso na discriminação da origem geográfica dos indivíduos monitorizados. Atualmente, a técnica é utilizada somente em estudos com bivalves vivos, sendo o músculo adutor recolhido pouco tempo depois dos indivíduos serem retirados do meio natural. Assim, futuramente, deverá ser estudada a influência do processo de depuração no perfil de ácidos gordos do músculo adutor, assim como a alteração deste perfil em função da espécie e do tempo decorrido desde o momento da colheita e da análise (ex. tempo de prateleira).

Considerações finais

No presente estudo foi possível verificar que através da análise da assinatura de ácidos gordos presentes no músculo adutor de duas espécies de ameijoas presentes na costa continental Portuguesa, *R. philipinarum* e *R. decussatus*, é possível discriminar entre locais pertencentes ao mesmo ecossistema (a montante e a jusante), assim como entre diferentes ecossistemas. Esta técnica pode assim ser utilizada por autoridades competentes e produtores de bivalves, no sentido de avaliar a origem geográfica dos mesmos, tal como legislado pela União Europeia em 2002. Assim, o perfil de ácidos gordos do músculo adutor pode permitir uma diminuição da fraude e consequentemente um aumento da segurança alimentar, diminuindo o risco para a saúde pública. Adicionalmente, poderá também ser utilizada pelos produtores na valorização dos produtos que estão a comercializar, uma vez que lhes permite assegurar a rastreabilidade dos locais de origem que apresentem uma qualidade ambiental superior. Contudo, a utilização deste método ainda necessita de maior investigação de modo a determinar a influência de diversos fatores, tanto intrínsecos como extrínsecos aos indivíduos, tais como o efeito da sazonalidade e da filogenia.

O perfil de ácidos gordos do músculo adutor é um método rápido e barato, quando comparado com análises moleculares e geoquímicas, que permite assegurar um aumento na rapidez de execução da componente analítica para determinação do perfil bioquímico da espécie em causa para determinação da sua origem geográfica.

Referências

1. Nations, U. *World population prospects*. (2015).
2. FAO. Globefish research programme. **113**, (2014).
3. State, T. & Fisheries, W. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2014*. (2014).
4. FAO. Global Aquaculture Production statistics database updated to 2013 Summary information. (2015).
5. Parreño-Marchante, A., Alvarez-Melcon, A., Trebar, M. & Filippin, P. Advanced traceability system in aquaculture supply chain. *J. Food Eng.* **122**, 99–109 (2014).
6. INE. *Estatísticas da Pesca 2015*. (2015).
7. INE. *Estatísticas da Pesca 2010*. (2010).
8. INE. *Estatísticas da Pesca 2011*. (2011).
9. INE. *Estatísticas da Pesca 2012*. (2012).
10. INE. *Estatísticas da Pesca 2013*. (2013).
11. INE. *Estatísticas da Pesca 2014*. (2014).
12. Petrossian, G. A. Preventing illegal, unreported and unregulated (IUU) fishing: A situational approach. *Biol. Conserv.* **189**, 39–48 (2015).
13. Helyar, S. J., Lloyd, Hywel D., Bruyn, M., Leake, J., Bennett, N. & Carvalho, G. R. Fish Product Mislabelling: Failings of Traceability in the Production Chain and Implications for Illegal, Unreported and Unregulated (IUU) Fishing. *PLoS One* **9**, 1–7 (2014).
14. Montilivi, C. Challenging the links between seafood and human health in the context of global change. **96**, 29–42 (2016).
15. Copeman, L. A. & Parrish, C. C. Lipids classes, fatty acids, and sterols in seafood from Gilbert Bay, Southern Labrador. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4872–4881 (2004).
16. Parrish, C. C. *Lipids in aquatic ecosystems*. Springer (2009).
17. Rustan, Arild C & Drevon, C. A. Fatty Acids: Structures and Properties. *Encycl. life Sci.* 1–7 (2005).
18. Rodgers, C. J., Carnegie, R. B., Chávez-Sánchez, M. C., Martínez-Chávez, C. C., Nozal, M. D. & Hine, P. M. Legislative and regulatory aspects of molluscan health management. *J. Invertebr. Pathol.* **131**, 242–255 (2015).
19. Pizzuti, T., Mirabelli, G., Sanz-Bobi, M. A. & Gómez-González, F. Food Track & Trace ontology for helping the food traceability control. *J. Food Eng.* **120**, 17–30 (2014).
20. Aung, M. M. & Chang, Y. S. Traceability in a food supply chain: Safety and quality perspectives. *Food Control* **39**, 172–184 (2014).
21. Union, E. Regulation (EC) No 178/2002 of the european parliament and of the council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food saf. *Offial J. Eur. Union* (2002).
22. Union, E. Regulation (EC) No 854/2004 of the european parliament and of the council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. *Offial J. Eur. Union* (2004).
23. Ricardo, F., Génio, L., Leal, M., Albuquerque, R., Queiroga, H., Rosa, R. & Calado, R. Trace element fingerprinting of cockle (*Cerastoderma edule*) shells can reveal harvesting location in adjacent areas. *Sci. Rep.* **5**, 11932 (2015).
24. Leal, M. C., Pimentel, T., Ricardo, F., Rosa, R. & Calado, R. Seafood traceability: current needs, available tools, and biotechnological challenges for origin certification. *Trends Biotechnol.* **33**, 331–336 (2015).
25. Ricardo, F., Pimentel, T., Moreira, A. S. P., Rey, F., Coimbra, M. A., Domingues, M. R., Domingues, P., Costa Leal, M. & Calado, R. Potential use of fatty acid profiles of the adductor muscle of cockles (*Cerastoderma edule*) for traceability of collection site. *Sci.*

- Rep.* **5**, 11125 (2015).
26. Lees, D., Younger, A. & Dore, B. *Depuration and relaying*. (2010).
 27. FAO. *Bivalve depuration: fundamental and practical aspects*. (2008).
 28. Europeia, C. Commission regulation (EC No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbial criteria for foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **L338**, 1–26 (2005).
 29. Cachola, R. A. & Campos, J. A. Redefinição das zonas de produção de bivalves nos sistemas lagunares do algarve no âmbito do programa de monitorização microbiológica. *IPIMAR* (2006).
 30. Cox, M. M. & Nelson, D. L. *Principles of biochemistry 5th edition*.
 31. Parrish, C. C. Lipids in Marine Ecosystems. (2013).
 32. Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., Raetz, C. R. H., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., Meer, G. V. Vannieuwenhze, M. S., White, S. H., Witztum, J. L. & Dennis, E. A. A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **46**, (2005).
 33. Gulliksen, B., Birkely, S. & Grahl-Nielsen, O. Temporal variations and anatomical distributions of fatty acids in the bivalve *Mya truncata*, L. 1758, from Isfjorden, Spitsbergen. *Polar Biol.* 83–92 (2003).
 34. Hulbert, A. J., Kelly, M. A. & Abbott, S. K. Polyunsaturated fats, membrane lipids and animal longevity. *J. Comp. Physiol. B* **184**, 149–166 (2014).
 35. Arts, M. T., Ackman, R. G. & Holub, B. J. ‘Essential fatty acids’ in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **58**, 122–137 (2001).
 36. Pastoriza, L., Gallardo, J. M., Franco, J. M. & Sampedro, G. Acidos grasos de la almeja babosa *Venerupis pullastra* (mont.) berberecho *Cerastoderma edule* (L.) y mejillón *Mytilus galloprovincialis* (lam.). *Investigación pesquera* **45**, 21–25 (1981).
 37. Olsen, B. R., Grahl-Nielsen, O. & Schander, C. Population study of *Astarte sulcata*, da Costa, 1778, (Mollusca, Bivalvia) from two Norwegian fjords based on the fatty acid composition of the adductor muscle. *Biochem. Syst. Ecol.* **37**, 662–669 (2009).
 38. Venegas-Calerón, M., Sayanova, O. & Napier, J. A. Progress in Lipid Research An alternative to fish oils: Metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Prog. Lipid Res.* **49**, 108–119 (2010).
 39. Bergé, J. P. & Barnathan, G. Fatty acids from lipids of marine organisms: Molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **96**, 49–125 (2005).
 40. Adarme-Vega, T. C., Thomas-Hall, S. R., Lim, D. K. Y. & Schenk, P. M. Effects of Long Chain Fatty Acid Synthesis and Associated Gene Expression in Microalga *Tetraselmis* sp. 3381–3398 (2014).
 41. Gosling, E. *Bivalve Molluscs Biology, Ecology and Culture*. (2003).
 42. Macedo, M. & Borges, M. *Conchas Marinhas de Portugal - Seashells of Portugal*. (1999).
 43. Cimino, G. & Gavagnin, M. *Molluscs From Chemo-ecological study to biotechnological application*. (2006).
 44. Rawlings, T. A. Phylogeny of Veneroidea (Mollusca : Bivalvia) based on morphology and molecules. 439–521 (2006).
 45. FAO. *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) Fisheries. (2013).
 46. Lee, S. Y. Distribution pattern and interaction of two infaunal bivalves, *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve) and *Anomalocardia squamosa* (Linnaeus) (Bivalvia : Veneridae). **201**, 253–273 (1996).
 47. Medeiros, J. P., Chaves, M. L., Silva, G., Azeda, C., Costa, J. L., Marques, J. C., Costa, M.

- J. & Chainho, P. Benthic condition in low salinity areas of the Mira estuary (Portugal): Lessons learnt from freshwater and marine assessment tools. *Ecol. Indic.* **19**, 79–88 (2012).
48. FAO. *Ruditapes decussatus*. (2013).
 49. IPMA. Lista de espécies-Zonas litorais. (2015).
 50. Sobral, P. & Widdows, J. Effects of increasing current velocity, turbidity and particle- size selection on the feeding activity and scope for growth of *Ruditapes decussatus* from Ria Formosa, southern Portugal. **245**, 111–125 (2000).
 51. Lopes, F., Silva, C. I. & Cardoso, A. C. Validation of a water quality model for the Ria de Aveiro lagoon , Portugal. *Environ. Model. Softw.* **23**, (2008).
 52. Génio, L., Sousa, A., Vaz, N., Dias, J. M. & Barroso, C. Effect of low salinity on the survival of recently hatched veliger of *Nassarius reticulatus* (L.) in estuarine habitats: A case study of Ria de Aveiro. *J. Sea Res.* **59**, 133–143 (2008).
 53. Ferreira, J. G., Simas, T., Nobre, A., Silva, M. C., Shifferegger, K. & Lencart-Silva, J. Identification of sensitive areas and vulnerable zones in transitional and coastal portuguese systems. *Inst. da Água e Inst. do Mar, Lisboa, Port.* (2013).
 54. Marques, J. C., Graça, M. A. & Pardal, M. Â. Aquatic ecology of the Mondego River basin global importance of local experience. *Imprensa da Univ. Coimbra URL* (2002).
 55. Lillebø, A. I., Neto, J. M., Martins, I., Verdelhos, T., Leston, S., Cardoso, P. G., Ferreira, S. M., Marques, J. C. & Pardal, M. A. Management of a shallow temperate estuary to control eutrophication: The effect of hydrodynamics on the system's nutrient loading. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **65**, 697–707 (2005).
 56. Marques, C., Azeiteiro, U. M., Martinho, F. & Miguel, A. Climate variability and planktonic communities: The effect of an extreme event (severe drought) in a southern European estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **73**, 725–734 (2007).
 57. Cabral, H. N., Costa, M. J. & Salgado, J. P. Does the Tagus estuary fish community reflect environmental changes? *Clim. Res.* **18**, 119–126 (2001).
 58. Caeiro, S., Costa, M. H., Ramos, T. B., Fernandes, F. & Silveira, N. Assessing heavy metal contamination in Sado Estuary sediment: An index analysis approach. *Ecol. Indic.* **5**, 151–169 (2005).
 59. RAMSAR. *Information Sheet on Ramsar Wetlands-Sado*.
 60. Marques, F., Chainho, P., Costa, J. L. & Domingos, I. Estuarine, Coastal and Shelf Science Abundance, seasonal patterns and diet of the non-native jelly fish *Blackfordia virginica* in a Portuguese estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **167**, 212–219 (2015).
 61. Brito, A. C., Quental, T., Coutinho, T. P., Branco, A., Falcão, M., Newton, A., Icely, J. & Moita, T. Phytoplankton dynamics in southern Portuguese coastal lagoons during a discontinuous period of 40 years: An overview. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **110**, (2012).
 62. ICNB. Plano sectorial da Rede Natura 2000.
 63. João, M., Soares, F., Matias, D. & Vale, C. Nutrients and clam contamination by *Escherichia coli* in a meso-tidal coastal lagoon: Seasonal variation in counter cycle to external sources. *Mar. Pollut. Bull.* **96**, 188–196 (2015).
 64. Cravo, A., Pereira, C., Gomes, T., Cardoso, C., Sera, A., Almeida, C., Rocha, T. & Lopes, B. A multibiomarker approach in the clam *Ruditapes decussatus* to assess the impact of pollution in the Ria Formosa lagoon , South Coast of Portugal. *Mar. Environ. Res.* **75**, 23–34 (2012).
 65. RAMSAR. RAMSAR wetlands informatlon sheet.
 66. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917 (1959).
 67. Bartlett, R. Phosphorus Assay in Column chromatography. *J. Biol. Chem.* (1958).

68. Aued-Pimentel, S., Lago, J. H. G., Chaves, M. H. & Kumagai, E. E. Evaluation of a methylation procedure to determine cyclopropanoids fatty acids from *Sterculia striata* St. Hil. Et Nauds seed oil. *J. Chromatogr. A* **1054**, 235–239 (2004).
69. Anderson, M. J. & Walsh, D. C. I. PERMANOVA, ANOSIM, and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions: What null hypothesis are you testing? *Ecol. Monogr.* **83**, 557–574 (2013).
70. Antonio, A., Archivio, D., Giannitto, A., Anna, M. & Ruggieri, F. Geographical classification of Italian saffron (*Crocus sativus* L.) based on chemical constituents determined by high-performance liquid-chromatography and by using linear discriminant analysis. *Food Chem.* **212**, 110–116 (2016).
71. Özogul, Y. & Özogul, F. Fatty acid profiles of commercially important fish species from the Mediterranean, Aegean and Black Seas. *Food Chem.* **100**, 1634–1638 (2007).
72. Galap, C., Netchitaïlo, P., Leboulenger, F. & Grillot, J. P. Variations of fatty acid contents in selected tissues of the female dog cockle (*Glycymeris glycymeris* L., Mollusca, Bivalvia) during the annual cycle. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **122**, 241–254 (1999).
73. Grahl-Nielsen, O., Jacobsen, A., Christophersen, G. & Magnesen, T. Fatty acid composition in adductor muscle of juvenile scallops (*Pecten maximus*) from five Norwegian populations reared in the same environment. *Biochem. Syst. Ecol.* **38**, 478–488 (2010).
74. Caers, M., Coutteau, P., Lombeida, P. & Sorgeloos, P. The effect of lipid supplementation on growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* spat. *Aquaculture* **162**, 287–299 (1998).
75. Waldock, M. J. & Holland, D. L. Fatty Acid Metabolism in Young Oysters, *Crassostrea gigas*: Polyunsaturated Fatty Acids. *Lipids* **19**, 332–336 (1984).
76. Fernández, A., Grienke, U., Soler-Vila, A., Guihéneuf, F., Stengel, D. B. & Tasdemir, D. Seasonal and geographical variations in the biochemical composition of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) from Ireland. *Food Chem.* **177**, 43–52 (2015).
77. Carregosa, V., Figueira, E., Gil, A. M., Pereira, S., Pinto, J., Soares, A. M. V. M. & Freitas, R. Tolerance of *Venerupis philippinarum* to salinity: Osmotic and metabolic aspects. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **171**, 36–43 (2014).
78. Ackman, R. G. Characteristics of the fatty acid composition and biochemistry of some fresh-water fish oils and lipids in comparison with marine oils and lipids. *Comp. Biochem. Physiol.* **22**, 907–922 (1967).
79. Napolitano, G. E. & Ackman, R. G. Anatomical distributions and temporal variations of lipid classes in sea scallops *Placopecten magellanicus* (gmelin) from georges bank (nova scotia). *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **103**, 645–650 (1992).
80. Macdonald, G., Thompson, R. & Ackman, R. Lipid composition of eggs and adductor muscle in giant scallops (*Placopecten magellanicus*) from different habitats. *Mar. Biol.* **113**, 71–76 (1992).
81. Nemova, N., Fokina, N., Nefedova, Z., Ruokolainen, R. & Bakhmet, I. Modifications of gill lipid composition in littoral and cultured blue mussels *Mytilus edulis* L. under the influence of ambient salinity. *Polar Rec. (Gr. Brit.)* **49**, 273–277 (2013).

Anexo

Tabela 1a. Tabela de análise de discriminantes entre ecossistemas de *Ruditapes philippinarum*

Ecossistema de origem	% Previsão de alocação				Total por ecossistema	% Correta (ecossistemas)
	Ria de Aveiro	Estuário do Mondego	Estuário do Tejo	Estuário do Sado		
Ria de Aveiro	100	0	0	0	5	100
Estuário do Mondego	0	100	0	0	5	100
Estuário do Tejo	0	0	100	0	5	100
Estuário do Sado	0	0	0	100	5	100
Classificação média						100

Tabela 2a. Tabela de análise de discriminantes entre ecossistemas de *Ruditapes decussatus*

Ecossistema de origem	% Previsão de alocação			Total por ecossistema	% Correta (ecossistemas)
	Estuário de Mira	Ria de Alvor	Ria Formosa		
Estuário de Mira	100	0	0	4	100
Ria de Alvor	0	100	0	5	100
Ria Formosa	0	0	100	5	100
Classificação média					100