



Luísa Alves Inácio

**Efeito da temperatura no processo de depuração de
Ruditapes decussatus cultivadas em zonas de
produção com classificação C.**

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



Luísa Alves Inácio

Efeito da temperatura no processo de depuração de *Ruditapes decussatus* cultivadas em zonas de produção com classificação C.

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Marinha, realizada sob a orientação científica do Doutor Rui Jorge Miranda Rocha (Investigador em Pós-Doutoramento e Professor Auxiliar Convidado do Departamento de Biologia e CESAM, Universidade de Aveiro) e coorientação científica do Professor Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares (Professor Catedrático do Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro) e da Doutora Andreia do Carmo Martins Rodrigues (Investigadora em Pós-Doutoramento do Departamento de Biologia e CESAM, Universidade de Aveiro).

palavras-chave

Ruditapes decussatus, *Escherichia coli*, temperatura, depuração, dano genético, stresse oxidativo

resumo

As zonas de produção e apanha de moluscos bivalves são classificadas (A, B ou C) de acordo com o nível de contaminação com *Escherichia coli* (número mais provável – NMP) por 100 gramas de carne e líquido intravalvar. Os bivalves capturados ou produzidos: em zonas A, podem ser comercializados directamente; para as zonas B, devem passar por um processo de depuração antes da sua comercialização; para as zonas C, devem ser transferidos para zonas de afinação (A ou B), durante um longo período (semanas ou meses) e posteriormente depurados, antes da sua comercialização. A depuração de moluscos bivalves contribui de uma forma preponderante para o aumento dos níveis segurança alimentar associados ao consumo destes organismos frescos.

A temperatura tem um papel importante na actividade metabólica dos bivalves e como tal pode influenciar a sua capacidade de depuração. Por outro lado, o controle da temperatura (designadamente refrigeração) nos centros de depuração acarreta custos de funcionamento elevados. O objectivo deste estudo foi avaliar a possibilidade de depuração da ameijão *Ruditapes decussatus* produzidas em zonas C, bem como avaliar o efeito da temperatura (15 °C – temperatura controle- e 25 °C), na eficiência do processo de depuração, assim como na qualidade e tempo de prateleira de *R. decussatus* cultivadas em zonas C. Para tal, procedeu-se a um ensaio de 24 horas, seguido de um período de armazenamento a 5±1 °C durante 6 dias. Realizaram-se análises microbiológicas (NMP de *Escherichia coli*) no início e no fim do período de depuração. Analisaram-se também parâmetros bioquímicos, indicadores de stresse e dano celular, no início e fim da depuração, bem como no período de armazenamento (2, 4 e 6 dias). Os indicadores bioquímicos de stresse oxidativo utilizados foram a catalase (CAT), glutationa-s-transferase (GST) e peroxidação lipídica (LPO) e dano do ADN.

Os resultados demonstraram que é possível depurar *R. decussatus* produzidas em zonas C em 24 h, não tendo sido observado um efeito significativo da temperatura no processo de depuração. Não se observou mortalidade ao longo do período de prateleira (2, 4 e 6 dias). Embora o fator temperatura não tenha influenciado significativamente a generalidade dos parâmetros avaliados, os dados obtidos indicam que a temperatura de 15 °C é a melhor em termos de sobrevivência, qualidade do produto e eficiência na redução da carga microbiana do que a 25°C. A actividade da CAT em *R. decussatus* foi significativamente inibida ao longo do tempo de prateleira. Esta diminuição da capacidade antioxidante de *R. decussatus* foi traduzida em dano oxidativo, observado pelos níveis de LPO e dano do ADN.

Globalmente, estes resultados são promissores oferecendo uma estratégia potencial para a comercialização de moluscos bivalves produzidos em zonas C, bem como para o melhoramento da qualidade do produto durante o período de comercialização.

Keywords

Ruditapes decussatus, *Escherichia coli*, temperature, depuration, genetic damage, oxidative stress.

abstract

Production and harvesting zones for bivalve molluscs are classified (A, B or C) according to the level of contamination with *Escherichia coli* (most likely number - NMP) per 100 grams of meat and intravalvar liquid. Bivalves caught or produced: in zones A may be marketed directly; for zones B, must undergo a purification process before being placed on the market; for areas C, must be transferred to tuning areas (A or B) for a long period (weeks or months) and then purified before being placed on the market. The purification of bivalve molluscs contributes in a preponderant way to the increase of food safety levels associated to the consumption of these fresh organisms.

Temperature plays an important role in the metabolic activity of bivalves and as such may influence their purification capacity. On the other hand, temperature control (especially cooling) in the purification centers results in high operating costs. The objective of this study was to evaluate the possibility of cleaning the *Ruditapes decussatus* produced in zones C, as well as to evaluate the effect of temperature (15°C - control temperature and 25°C), the efficiency of the purification process, as well as the quality and shelf life of *R. decussatus* grown in zones C. For this purpose, a 24-hour test was carried out, followed by a storage period at 5 ± 1 ° C for 6 days. Microbiological analyzes (NMP of *Escherichia coli*) were performed at the beginning and at the end of the clearance period. Biochemical parameters, stress indicators and cell damage were analyzed at the beginning and end of the treatment, as well as in the storage period (2, 4 and 6 days). The biochemical indicators of oxidative stress used were catalase (CAT), glutathione-s-transferase (GST) and lipid peroxidation (LPO) and DNA damage.

The results demonstrated that it is possible to purify *R. decussatus* produced in zones C in 24 h, and a significant effect of the temperature in the purification process was not observed. No mortality was observed throughout the storage period (shelf time : 2, 4 and 6 days). Although the temperature factor did not significantly influence the overall parameters evaluated, the data indicate that the temperature of 15 ° C is the best in terms of survival, product quality and microbial load reduction efficiency at 25 ° C. CAT activity in *R. decussatus* was significantly inhibited over the shelf time. This decrease in the antioxidant capacity of *R. decussatus* was translated into oxidative damage, as observed by LPO levels and DNA damage.

Overall, these results are promising by offering a potential strategy for the marketing of bivalve molluscs produced in C zones as well as for improving the quality of the product during the marketing period

Índice

1. Introdução	9
1.1. Objetivo	13
1.1.1. Geral	13
1.1.2. Específico	13
2. Material e Métodos	15
2.1. Sistema experimental	15
2.2. Cultivo e colheita	15
2.3. Depuração	16
2.4. Embalamento e armazenamento	16
2.5. Análise microbiológica	16
2.6. Avaliação do dano genético	17
2.6.1. Ensaio Cometa	17
2.7. Biomarcadores de stresse oxidativo	19
2.7.1. Amostragem e processamento do tecido para as análises bioquímicas	19
2.7.2. Stresse oxidativo e biomarcadores neurofisiológicos	19
2.8. Análise estatística	20
3. Resultados	21
3.1. Análise microbiológica	21
3.2. Ensaio cometa	22
3.2.1. Índice do Dano Genético (IDG)	22
3.3. Biomarcadores de stress oxidativo	23
3.3.1. Actividade da Glutathiona-S-Transferase (GST)	24
3.3.2. Peroxidação lipídica (LPO)	25
4. Discussão	27
5. Conclusão	30
6. Referências	32

1. Introdução

O crescimento populacional acelerado tem levado ao aumento da necessidade produção de alimentos, o que se traduz numa exploração dos recursos naturais, designadamente dos stocks pesqueiros, acima da sua capacidade de regeneração. Neste contexto, a aquacultura vem surgindo como uma das alternativas mais viáveis para a produção de alimento com elevado teor proteico (Santos, 2013). O cultivo de bivalves é uma parte importante da aquacultura mundial (Prado et al., 2012), e a sua produção tem vindo a aumentar consideravelmente, de 12,5 milhões de toneladas em 2012 (Gosling, 2015) para 73,8 milhões de toneladas em 2014 (FAO, 2014; SOFIA, 2016).

A aquacultura de bivalves apresenta algumas vantagens relativamente ao cultivo de outras espécies, designadamente peixes, porque:

- 1) Os bivalves são espécies de baixo nível trófico, filtradoras, que se alimentam de fitoplâncton presente no ambiente e, como tal, não necessitam do fornecimento de alimentos compostos (rações) que podem representar até 50% dos custos totais de produção em aquacultura (Gibbs, 2007; Wolff and Kluger, 2017);
- 2) Como não necessitam de rações, o seu cultivo tem um impacte ambiental menor, quando comparado com o cultivo de espécies de níveis tróficos superiores, onde são utilizados alimentos compostos (IPIMAR, 2008); em contexto de cultivo multitrófico os bivalves promovem a reciclagem de nutrientes desperdiçados pelas espécies de níveis tróficos superiores, podendo desta forma contribuir para a diminuição da carga orgânica dos efluentes das explorações aquícolas (Gibbs, 2007).
- 3) O cultivo de espécies diplóides pode permitir a recolha de juvenis resultantes da reprodução dos animais cultivados, sem recorrer em à aquisição de juvenis produzidos em “maternidades” (Henriques, 1998);

Pelas razões apresentadas anteriormente, o cultivo de bivalves pode ser realizado sem o recurso a meios tecnológicos muito complexos, o que permite que estes organismos sejam cultivados em diferentes contextos, incluindo em aquacultura comunitária, em sistemas de produção extensivos ou semi-intensivos.

Os moluscos bivalves são uma parte essencial da dieta de muitas populações e o seu valor comercial tem vindo a aumentar mundialmente (Oliveira et al., 2011). São fonte de nutrientes essenciais, tais como ácidos gordos polinsaturados, providenciando assim um conteúdo de alta qualidade biológica, sendo que o seu valor nutricional varia entre espécies (Oliveira et al., 2011).

No entanto, através dos seus processos de alimentação e respiração, estes animais podem absorver contaminantes do sedimento, partículas suspensas na coluna de água, concentrando no trato digestivo bactérias, vírus, biotoxinas (produzidas por dinoflagelados e diatomáceas) e químicos podendo assim causar graves doenças ou morte, quando consumidos crus ou mal cozinhados. Desde os finais do século XIX que o consumo de bivalves poluídos por esgotos está associado com numerosos surtos como a febre tifóide, cólera, gastroenterites e hepatites (Anacleto et al., 2015). Assim, os bivalves cultivados em zonas sujeitas ao impacto de esgotos urbanos ou de atividade agropecuárias podem constituir um grave problema de saúde pública (Lees, 2000; Oliveira et al., 2011).

Portanto, a salubridade dos moluscos bivalves vivos está diretamente relacionada com a qualidade da água dos ambientes costeiros e estuarinos, onde decorre todo o seu ciclo de vida (Prado et al., 2012; Ruano et al., 2015). Para além disso, por serem animais filtradores têm sido utilizados como bioindicadores de presença de poluentes químicos e biomonitorização em ecossistemas aquáticos (Anacleto et al., 2015; Monteiro, 2004; Phuvasate and Su, 2013).

De acordo com a legislação europeia (Regulamento (CE) nº853/2004, 854/2004) as zonas de produção de moluscos bivalves são classificadas, tendo em conta os níveis de contaminação microbiana dos bivalves.

Os limites de contaminação bacteriana (número mais provável de contaminação bacteriana) estão fixados em: ≤ 230 *E. coli*/100g de carne e líquido intervalvar para as zonas A, $230 < E. coli \leq 4600$ /100g de carne e líquido intervalvar em 90% das amostras para as zonas B e $4600 < E. coli \leq 46000$ /100g de carne e líquido intervalvar para as zonas C (Regulamento (CE), 2004).

Os bivalves cultivados em zonas A podem ser encaminhados para centros de expedição, destinados ao consumo direto; os bivalves cultivados em zonas B devem ser sujeitos a um processo de depuração que promova uma diminuição da contaminação bacteriana, para valores legalmente aceitáveis (iguais ou inferiores aos valores de referência para as zonas A), para que possam ser posteriormente comercializadas para consumo direto; os bivalves cultivados em zonas C, só poderão entrar no mercado após transposição e permanência em locais de afinação (zonas A ou B) pelo tempo necessário em termos sanitários (mínimo 2 meses), e depois encaminhados ao centro de expedição (Ruano et al., 1998).

De forma semelhante, em Portugal, a classificação, monitorização e controlo sanitário das zonas de produção de moluscos bivalves baseia-se na quantificação do teor de bactérias indicadoras da contaminação fecal em espécies de referência, como a *Ruditapes decussatus*, *Cerastoderma edule* e *Crassostrea* sp. (Soares et al., 2012).

Nos países da União Europeia, é possível a rentabilização de bivalves provenientes de zonas moderadamente poluídas, zonas B, após a sua passagem por centros depuradores, para que possam ser comercializados (Monteiro, 2004). Contudo, este processo não é aplicado aos bivalves produzidos e capturados em zonas C, o que contribui para a desvalorização do produto, particularmente quando determinada área classificada como zona B passa a zona C durante um ciclo de cultivo.

A depuração é um processo que consiste na limpeza controlada de moluscos bivalves, em água limpa, sob condições que facilitam a filtração natural que resulta na expulsão de contaminantes e microorganismos (FAO, 2008; Freitas et al., 2012; Ruano et al., 1998). Este processo é aplicado para reduzir a contaminação

bacteriana de origem fecal nos bivalves, mas, é pouco eficaz na redução de carga de vírus, parasitas, biotoxinas, metais, etc (Anacleto et al., 2015; FAO, 2008).

Os sistemas de depuração incluem processos onde a água (livre de contaminações químicas e biológicas) é continuamente renovada (sistema aberto) ou reciclada através de um sistema de desinfecção e outros processos de filtração mecânica (sistema fechado). (Lees, 2000; Phuvasate and Su, 2013). O processo de desinfecção da água inclui a adição ozono, irradiação ultravioleta (UV-c), clorinação e aplicação de iodóforos (Lees, 2000).

Os processos de depuração utilizados comercialmente, baseiam-se maioritariamente na manutenção de bivalves em sistemas fechados com reciclagem de água, através da utilização de filtros mecânicos e aplicação de radiação UV-c, durante períodos que podem variar entre 24 e 48 horas, independentemente da espécie, utilizando valores de temperatura de água entre 10 e 15 °C. Deste modo os requisitos fisiológicos das diferentes espécies têm sido sub-valorizados, o que pode afetar a qualidade final do produto durante o período de comercialização.

A variação da temperatura pode afectar estes organismos a nível fisiológico (Albuquerque et al., 2012). A salinidade é um parâmetro de grande importância para o processo de depuração (Larsen et al., 2015), tendo em conta a reduzida capacidade de adaptação dos moluscos bivalves à sua variação (Love et al., 2010).

Águas mais quentes, mas com temperaturas dentro dos limites fisiológicos de cada espécie, promovem um aumento da taxa metabólica dos moluscos bivalves, como a digestão e a atividade enzimática (Figueira et al., 2017; Loosanoff, 1958)., tendo todos estes fatores um papel relevante na redução microbiana (Brock et al., 1986).

O aumento da temperatura da água do mar pode melhorar a capacidade metabólica e estresse oxidativo dos organismos. O stresse oxidativo pode resultar da superprodução de espécies reativas de oxigénio (ROS) devido a stresse, mas também devido ao aumento da atividade respiratória mitocondrial (Figueira et al., 2017). Por exemplo, organismos da espécie *Ruditapes decussatus* em condição de stresse térmico fecham as suas valvas e reduzem as taxas de filtração. Esta

estratégia é acompanhada por períodos de anaerobioses e consequente depressão metabólica (Ortmann and Grieshaber, 2003).

Alguns indicadores, como biomarcadores de stresse oxidativo ou avaliação da degradação do ADN, dão-nos uma visão sobre o estado fisiológico e metabólico de um indivíduo sob condições de estresse, que pode ser traduzido a nível do organismo. Estes procedimentos podem ser uma mais-valia, quando aplicados à avaliação do estado fisiológico de moluscos bivalves antes, durante e após o processo de depuração, porque permitem uma avaliação mais precisa do efeito dos fatores abióticos durante este processo, antes que ocorra mortalidade.

1.1. Objetivo

1.1.1. Geral

Avaliação da exequibilidade da depuração de *R. decussatus* (ameijôa-boia) cultivadas em zonas de produção com classificação C e avaliação do efeito da temperatura e no processo de depuração e na qualidade e tempo de prateleira dos bivalves depurados, utilizando indicadores microbiológicos, fisiológicos e bioquímicos. Serão testadas 2 temperaturas (15 e 25 °C) durante 24 h. A temperatura de 15 °C foi utilizada como controlo, por ser a temperatura de referência em alguns centros de depuração em Portugal. A temperatura de 25 °C foi escolhida por se encontrar perto do limite máximo da espécie, o que em teoria poderá acelerar o metabolismo e promover a depuração num menor espaço de tempo. Adicionalmente, o custo do processo de depuração a 25 °C terá implicações no custo de operação de uma unidade de depuração, pelo facto de diminuir os custos energéticos relacionados com a refrigeração da água.

1.1.2. Específico

Avaliar a possibilidade de depurar bivalves cultivados em zonas de produção com classificação C.

Avaliação do efeito da temperatura no processo de depuração e na qualidade do produto simulando um cenário de comercialização.

Avaliar o efeito da temperatura de depuração e tempo de prateleira nos biomarcadores de stresse oxidativo (CAT, GST e LPO) e dano genético.

2. Material e Métodos

2.1. Sistema experimental

O ensaio realizou-se em sistemas fechados com recirculação de água. Cada tratamento (temperatura) foi testado em 5 réplicas (tanques com 9L de volume). Os tanques de cada tratamento estavam conectados com um tanque de filtração (250L com 120L de volume útil), equipado com um escumador de proteínas (EHEIM Typ 3550), um sistema de controlo de temperatura (refrigerador – modelo Hailea HC 300-A (1/4 HP, e aquecedor com termostato (EHEIM 300W), filtro UVc (Vecton 600) e uma bomba de água submersível 3400 L/h (EHEIM Universal-pump 1262).

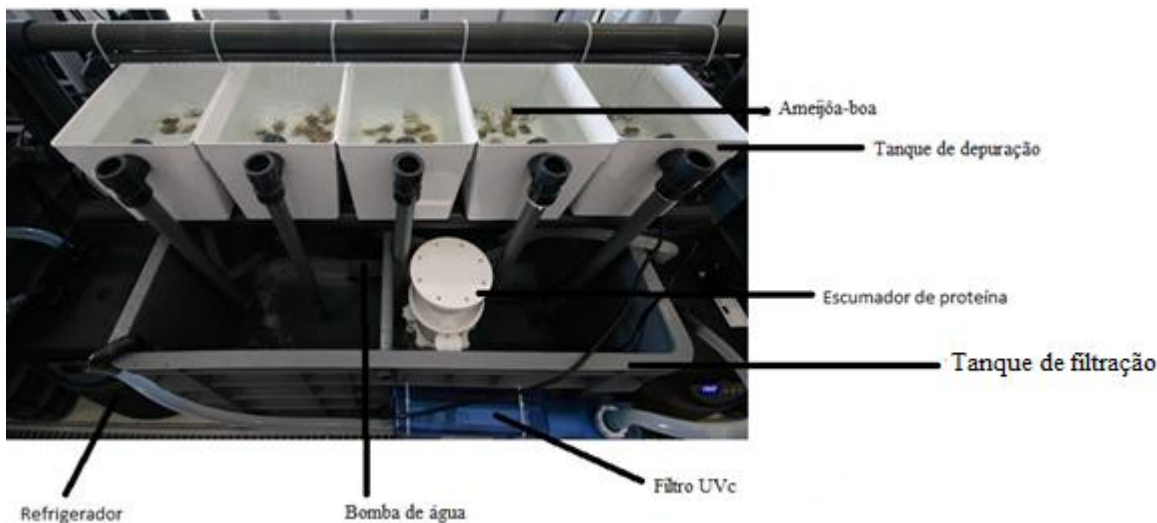


Figura 1. Sistema experimental de depuração, composto por 5 tanques de depuração (9 L) e por um tanque de filtração, equipado com um filtro UV, um escumador e uma bomba submersível.

2.2. Cultivo e colheita

O material biológico foi cultivado na Ria Formosa, no Concelho de Olhão (zona C). Após recolha, os organismos foram acondicionados em malas térmicas e transportadas a seco para o laboratório. À chegada recolheram-se amostras para análises microbiológicas e iniciou-se o processo de depuração.

2.3 Depuração

No processo de depuração, os bivalves foram submetidos a 2 tratamentos (15 °C - temperatura controlo - e 25 °C) com salinidade 35, durante 24 horas. Colocaram-se 86 indivíduos em cada tanque, correspondendo a uma densidade de estabulação de 150 g/L. Após as 24 horas de depuração, registrou-se a mortalidade e foram amostrados organismos para análises microbiológicas, de degradação do ADN e biomarcadores de stresse oxidativo.

2.4 Embalamento e armazenamento

Após o período de depuração, procedeu-se ao embalamento e identificação das amostras (3 sacos por tratamento de temperatura) utilizando as metodologias convencionais (saco de rede). Os bivalves foram armazenados a 5 ± 1 °C para simular um cenário de comercialização. A mortalidade foi avaliada aos 2, 4 e 6 dias após embalamento. Recolheram-se igualmente amostras para degradação do DNA e biomarcadores.

2.5 Análise microbiológica

O conteúdo de *E. coli* em bivalves foi determinado de acordo com o método Donovan et al. (1998) seguindo o ISO/TS 16649-3: 2005. Para cada amostra, aproximadamente 40 g de carne do bivalve e líquido intervalvar (FIL) foram diluídos (1:10) em solução de peptona (OXOID) e homogeneizados. A determinação de *E. coli* foi feita em solução de glutamato modificado com minerais (OXOID) e os resultados expressos como o número mais provável (NMP). A confirmação da *E. coli* foi obtida através da detecção da atividade da b-glucuronidase, utilizando um procedimento de subcultura em 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glicuronídeo (OXOID). Os valores de *E. coli* foram convertidos em 100 g de FIL e expressos como log MPN *E. coli* (Donovan et al., 1998; ISO/TS, 2005).

2.6. Avaliação do dano genético

2.6.1 Ensaio Cometa

O protocolo alcalino de electroforese em gel de célula única (SCGE), ou ensaio Cometa, detecta danos no ADN de células de vários órgãos e tecidos de organismos exposto a genotóxicos (Garcia-Käufer et al., 2015). Foi desenvolvido e reportado por Singh et al. (1988) e adaptado com sucesso a eritrócitos de peixe (e.g. Çok et al., 2011; Guilherme et al., 2014; Sekar et al., 2011). Este ensaio é um método padrão usado para medir quebras de cadeias de ADN, bem como tipo de lesões do DNA (dímeros de pirimidina, bases oxidadas, danos por alquilação (Collins, 2004).

O ensaio foi executado de acordo com a técnica descrita por Collins (2004) e adaptada por Guilherme et al. (2010), com os devidos ajustes no procedimento do ensaio. Todas as lâminas foram preparadas a fresco. Foi adotado um sistema de dez mini-géis por lâmina, baseado em um modelo criado por Shaposhnikov et al. (2010), para aumentar a produção do ensaio (Shaposhnikov et al., 2010). Cada indivíduo é representado por 2 mini-géis replicados, sendo 5 indivíduos diferentes representados em cada lâmina. Resumidamente a suspensão de células branquiais foi obtida através de alguns cortes efetuados numa pequena porção de tecido em 1 mL de PBS. Posteriormente adicionou-se 0,07 mL de 1% agarose LMP (Low Melting Point) a 0,01 mL da suspensão anterior resultando dez mini-géis colocados em lâminas previamente tratadas com agarose NMP (Normal Melting Point) em duas linhas de 5, sem lamelas. Os mini-géis foram deixados por aproximadamente ± 5 min a 4 °C a fim de solidificar a agarose, e em seguida imersos na solução de lise (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 0,01 M Tris, 1% Triton X-100, pH 10) a 4 °C durante 1 hora no escuro. Depois da lise as lâminas foram lavadas 3x em Buffer F (0,1 M KCl, 0,0005 M EDTA, 0,04 M HEPES, 200 mg L⁻¹ bovine serum albumin, pH 8) a 4 °C. Em seguida, as lâminas foram colocadas na tina de electroforese, imersas em solução de electroforese (20 min) para tratamento alcalino. Permitiu-se que o ADN migrasse a uma voltagem fixa de 25 V, com 1,04V / cm e uma corrente de 300 mA (conseguida ajustando o volume da solução no tanque de electroforese), durante 15 min. Posteriormente, as lâminas

foram coradas com brometo de etídio (0,035 mL por cada 4 mini-géis) e cinquenta nucleoides foram observados por mini-gel, utilizando um microscópio de fluorescência Zeiss Axio Scope.A1 (ampliação de 400x). O dano no ADN foi quantificado pela classificação visual dos nucleoides em cinco classes de cometas, de acordo com a intensidade e o comprimento da cauda, ou seja, de 0 (sem cauda) a 4 (quase todo o ADN na cauda) (Collins, 2004) (Figura 2).

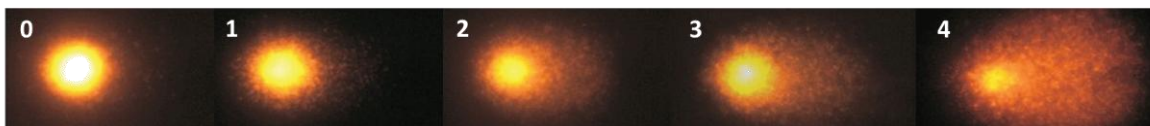


Figura 2: Imagens de cometas corados com brometo de etídio, elucidando a classificação de pontuação visual de 0 (sem cauda) a 4 (quase todo DNA na cauda) (Adaptado de: Kleinsasser et al., 2004).

A classificação total expressa como indicador de dano genético (IDG) foi calculada multiplicando a percentagem de nucleoides em cada classe pelo fator correspondente, de acordo com a seguinte fórmula:

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

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

2.7. Biomarcadores de stresse oxidativo

2.7.1. Amostragem e processamento do tecido para as análises bioquímicas

Após a depuração, foram selecionados aleatoriamente 5 indivíduos de cada tratamento, abertos com a ajuda de um bisturi e recolhida o conteúdo edível, pesados e imediatamente congelados em azoto líquido e mantido a -80 ° C para posteriores análises bioquímicas. As amostras foram mantidas em gelo e sonicadas em 1600 mL de água ultra pura. Para a determinação da peroxidação lipídica (LPO), utilizou-se uma alíquota de 200 mL e o restante do homogenizado (~ 500 mL) foi diluído em 500 mL de 0,2 M de tampão fosfato K, pH 7,4 (PBS), e centrifugado por 20 minuto a 10 000 g (4 ° C). O sobrenadante pós-mitocondrial (PMS) foi dividido em três microtubos por cada amostra, que foram mantidos a -80° C até a análise da actividade de Catalase (CAT) e Glutathione-S-Transferase (GST).

2.7.2. Stresse oxidativo e biomarcadores neurofisiológicos

O homogenizado de 200 mL usado para determinar o LPO foi tratado com 4 µL de uma solução a 4% do composto antioxidante butilado hidroxitolueno em metanol. A LPO foi medida através do nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) a 535 nm de acordo com Bird e Draper (1984). A atividade de GST foi determinada no PMS após a conjugação de GSH com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno em 340 nm (Habig et al., 1974). A atividade da catalase foi determinada a 240 nm por decomposição do substrato H₂O₂ (Clairborne, 1985).

O método de Bradford (Bradford, 1976) adaptado a uma placa de 96 poços de fundo plano, foi usado para determinar a concentração de proteína, usando globulina bovina como padrão.

As análises foram realizadas num espectrofotometro para placas de 96 poços (Microplate reader MultiSkan Spectrum, Thermo Fisher Scientific, USA).

2.8. Análise estatística

Os dados de microbiologia foram analisados por uma análise de variâncias (ANOVA) de uma via, seguida de um teste de Tukey. Os resultados do dano do ADN e biomarcadores de stresse foram analisados através de análise de variâncias (ANOVA) de duas vias, seguida de comparações múltiplas de Sidak. Os factores considerados foram a **temperatura** de depuração e o **tempo**, o **p** definido como menor ou igual que 0,05.

3. Resultados

Após as 24 h de depuração, de *R. decussatus* a diferentes temperaturas (15 e 25°C) foi contabilizado o número de indivíduos mortos. Para os indivíduos depurados a 25 °C a mortalidade observada foi de 0,9%, e não se observou mortalidade para os indivíduos depurados a 15 °C.

3.1. Análise microbiológica

Nas análises microbiológicas, após 24 h de depuração, verificou-se um decréscimo significativo ($F_{(2, 6)} = 10,75$, $p = 0,01$, $R^2 = 0,78$) da quantidade de *E. coli* em *R. decussatus*. Embora não se observem diferenças estatísticas significativas entre os valores de *E. coli* em organismos depurados em 15 ou 25 °C, os bivalves depurados a 15 °C apresentam um valor médio menor de carga microbiológica (Figura 3).

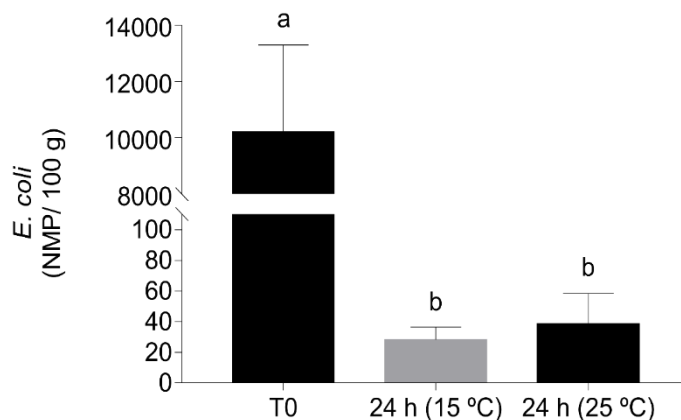


Figura 3. Número Mais Provável (NMP) por 100 g de *Escherichia coli*. As letras diferentes representam diferenças significativas.

3.2. Ensaio cometa

3.2.1. Índice do Dano Genético (IDG)

Os valores de IDG foram significativamente ($F_{(3, 32)} = 135,2, p < 0,0001$) alterados ao longo do tempo (Tabela 01).

A Figura 4 apresenta os valores de IDG de *R. decussatus* depurados a 15 °C e 25 °C. Entre os organismos depurados a 15 °C, o maior aumento nos valores de IDG foi observado ao segundo dia de prateleira, enquanto que para os organismos depurados a 25 °C, o maior valor de dano genético foi observado tanto ao segundo como ao sexto dia de prateleira.

Verificaram-se ainda diferenças significativas de IDG entre *R. decussatus* depuradas a 15 e 25 °C ($F_{(1, 32)} = 296,5, p < 0,0001$), durante o tempo de ensaio (24h, 2, 4 e 6 dias) (Figura 4).

No geral o IDG foi maior nos organismos depurados a 25 °C ao longo do tempo (Figura 4).

Tabela 1. Índice do Dano Genético de *R. decussatus* depurados a 15 e 25 °C, durante o tempo de ensaio.

Fonte de variação	% do total de variação	F (DFn, DFd)	p valor
Interacção	4,911	F (3, 32) = 12,64	<0,0001
Tempo	52,53	F (3, 32) = 135,2	<0,0001
Temperatura	38,41	F (1, 32) = 296,5	<0,0001

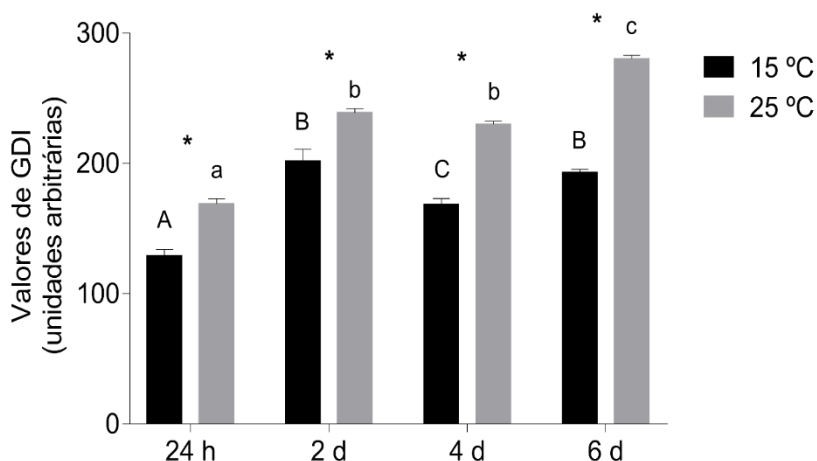


Figura 4. Valores do Índice de Dano Genético aos 15 e 25 °C de temperatura em *R. decussatus*, durante a depuração e embalagem (24h, 2, 4 e 6 dias). As letras diferentes representam as diferenças estatisticamente significativas (média ± erro padrão), entre os organismos depurados em 15 °C (letras maiúsculas) e 25 °C (letras minúsculas). Os asterísticos assinalam diferenças estatísticas entre *R. decussatus* depurados a 15 °C e 25 °C.

3.3. Biomarcadores de stress oxidativo

3.3.1. Catalase (CAT)

A actividade de CAT em *R. decussatus* foi significativamente ($F_{(3, 31)} = 8,114$, $p = 0,0004$), alterada ao longo do tempo. Entre os organismos depurados a 15 °C, o maior decréscimo na actividade da CAT foi observado ao quarto dia de prateleira, enquanto que para os organismos depurados a 25 °C, esta enzima apresentou a maior inibição ao sexto dia de prateleira (Figura. 5; Tabela 2).

Tabela 2. Resultados da ANOVA de duas vias para o efeito da temperatura de depuração (15 e 25 °C), tempo de ensaio (24h, 2, 4 e 6 dias) e sua interação, na actividade da CAT de *R. decussatus*.

Fonte de variação	% do total de variação	F (DFn, DFd)	p valor
Interação	3,034	F (3, 31) = 0,5744	0,6362
Tempo	42,85	F (3, 31) = 8,114	0,0004
Temperatura	0,1935	F (1, 31) = 0,1099	0,7425

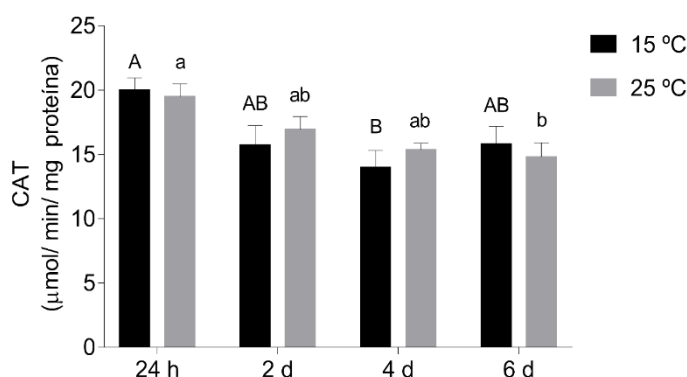


Figura 5. Actividade da catálase (CAT) em *R. decussatus*, depuradas a 15 e 25 °C após o tempo de depuração (24 h) e embalagem (2, 4 e 6 dias). Os valores estão representados como média ± erro padrão. As letras diferentes representam as diferenças estatisticamente significativas (média ± erro padrão), entre os organismos depurados em 15 °C (letras maiúsculas) e 25 °C (letras minúsculas) ao longo do tempo.

3.3.1. Actividade da Glutathiona-S-Transferase (GST)

Não se observaram alterações significativas à actividade das glutathiona-S-transferase de *R. decussatus*, devido à temperatura de depuração ou ao tempo de prateleira ($F_{(3, 30)} = 1,291$, $p = 0,2954$; $F_{(1, 30)} = 0,305$, $p = 0,5848$, respectivamente) (Tabela 3; Figura 6).

Tabela 3. Resultados da ANOVA de duas vias para o efeito da temperatura de depuração (15 e 25°C), tempo de ensaio (24h, 2, 4 e 6 dias) e sua interacção, na actividade da GST de *R. decussatus*.

Fonte de variação	% do total de variação	F (DFn, DFd)	p valor
Interação	0,7744	F (3, 30) = 0,089	0,9655
Tempo	11,24	F (3, 30) = 1,291	0,2954
Temperatura	0,8847	F (1, 30) = 0,305	0,5848

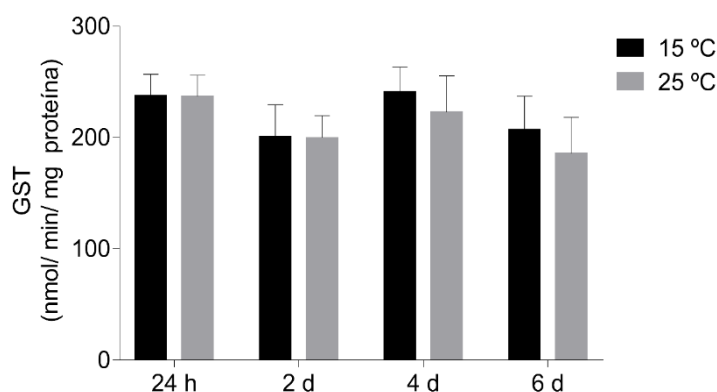


Figura 6. Actividade da GST em *R. decussatus* a 15 e 25 °C de temperatura, durante o tempo de depuração (24 h) e embalagem (2, 4 e 6 dias). Os valores estão representados como média \pm erro padrão.

3.3.2. Peroxidação lipídica (LPO)

Quanto à peroxidação lipídica, observou-se uma alteração significativa ($F_{(3, 32)} = 4,46$, $p = 0,01$) dos níveis de LPO de *R. decussatus* ao longo do tempo (Tabela 4). Os níveis de LPO mais elevados foram ao sexto dia de prateleira para as ameijões depuradas a 25 °C (Figura 7).

Tabela 4. Resultados da ANOVA de duas vias para o efeito da temperatura de depuração (15 e 25 °C), tempo de ensaio (24h, 2, 4 e 6 dias) e sua interação, na actividade da LPO de *R. decussatus*.

Fonte de variação	% do total da variação	F (DFn, DFd)	p valor
Interação	3,167	F (3, 32) =0,518	0,6729
Tempo	27,27	F (3, 32) = 4,46	0,0100
Temperatura	4,339	F (1, 32) =2,129	0,1543

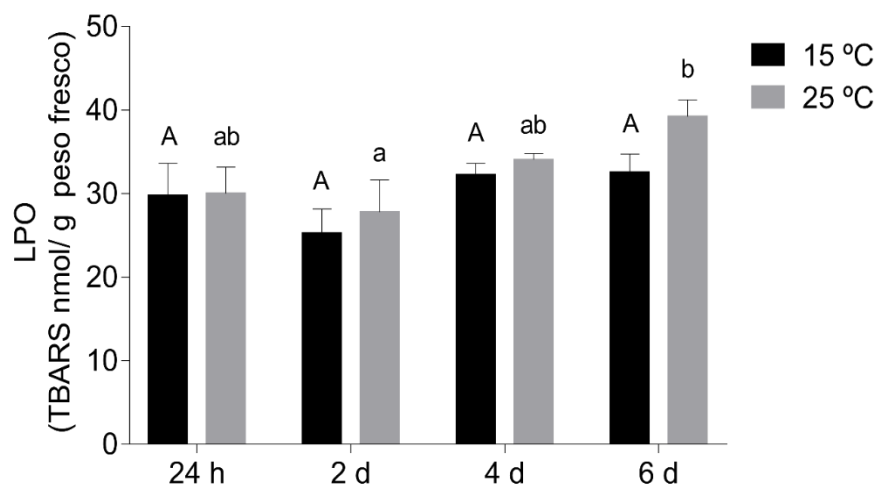


Figura 7. Actividade de LPO em *R. decussatus*, depuradas a 15 e 25 °C após o tempo de depuração (24 h) e embalamento (2, 4 e 6 dias). Os valores estão representados como média ± erro padrão. As letras representam as diferenças estatisticamente significativas (média ± erro padrão), entre os organismos depurados em 15 °C (letras maiúsculas) e 25 °C (letras minúsculas) ao longo do tempo.

4. Discussão

Os resultados do presente estudo sugerem a possibilidade de depuração de moluscos bivalves produzidos em zonas com classificação C, durante 24 h. De acordo com a legislação europeia (nº853/2004, 854/2004) os moluscos bivalves produzidos ou capturados em zonas C não podem ser diretamente comercializados para consumo humano, tendo, obrigatoriamente, que ser transpostos para zonas de afinação (com classificação A ou B). Em alternativa, os moluscos produzidos em zonas C podem ser processados e transformados (indústria conserveira, por exemplo). Ambos os cenários contribuirão certamente para a desvalorização do produto e também, no caso da transposição, para o aumento de custos de mão-de-obra e muito provavelmente para o aumento da mortalidade. Como agravante desta situação, algumas zonas de produção anteriormente classificadas como B foram reclassificadas como C, colocando em risco o investimento realizado pelos moluscicultores.

Relativamente à temperatura, não se verificou um efeito significativo no sucesso de depuração. A qualidade do alimento e a temperatura são os principais fatores que regulam o tempo e a taxa de armazenamento de energia nos bivalves. A espécie *R. decussatus* acumula glicogénio, antes da gametogénese, no outono e no início do inverno. O glicogénio é usado como fonte de energia para o desenvolvimento das gónadas, e no período da desova que ocorre no verão (Ojea et al., 2004).

A indisponibilidade de alimento durante a depuração e posterior exposição ao ar durante o período de prateleira pode afetar potencialmente as respostas ao estresse oxidativo em bivalves por uma variedade de mecanismos que incluem: a alteração da quantidade de aminoácidos disponíveis, a produção de mecanismos antioxidantes, a composição de ácidos gordos nas membranas, afetando assim as taxas de peroxidação lipídica, ou causando mudanças nas taxas metabólicas afetos à filtração, e por fim, a sobrevivência destes organismos (Connors, 1998; Power and Sheehan, 1996; Solé et al., 1995; Viarengo et al., 1991).

Neste estudo após o embalamento (2, 4 e 6 dias) não se observou mortalidade, provavelmente pela adaptação da espécie a baixas temperaturas (Anacleto et al., 2013). Para além disso, tem sido observado que baixas temperaturas favorecem a sobrevivência dos bivalves devido a uma diminuição das suas taxas metabólicas (Urian et al., 2011).

Chae *et al* (2009) concluiu em seu estudo que a temperatura de 15 °C é a mais eficiente na depuração de *Crassostrea virginica*, enquanto que Oliveira *et al* (2011) defende que temperaturas baixas ajudam os bivalves a manter-se vivos mais tempo, mas não são muito eficientes em termos de redução na carga bacteriana (Chae et al., 2009).

Biomarcadores de estresse oxidativo e de alocação de energia celular dão-nos uma visão sobre o estado fisiológico e metabólico de um indivíduo sob condições de estresse, que pode ser traduzido a nível do organismo.

O stresse oxidativo pode resultar não só da superprodução de ROS devido a estresse, mas também devido ao aumento da atividade respiratória mitocondrial (Figueira et al., 2017).

Neste estudo observou-se uma diminuição da actividade da defesa antioxidante, CAT, ao longo do tempo (Kamel et al., 2014), que pode ser devida a uma saturação de enzimas devida ao aumento da produção de ROS (Bielen et al., 2016), ou pela diminuição do metabolismo devido a diminuição da temperatura durante o tempo de prateleira. Resultados semelhantes foram observados para *Perna viridis* por Wang *et al*, 2018 (Wang et al., 2018).

A GST pertence à classe das enzimas de biotransformação desintoxicantes e a sua atividade é induzida durante os processos de desintoxicação, tendo esta função de excreção um contributo essencial para a manutenção da homeostase celular (Jemec et al., 2007).

Anacleto et al., (2014) e Aniya (1989) demonstraram em seus estudos que a GST pode ser alterada ao longo do tempo com o aumento da temperatura. Neste estudo não se observou alteração da GST com diferentes temperaturas de depuração, o que

se pode dever ao curto período de exposição (24 h), nem ao longo do tempo de prateleira, indicando mais uma vez o possível efeito da temperatura baixa na redução da atividade metabólica nestes indivíduos (5 ± 1) (Anacleto, 2014; Aniya, 1989).

Quando os sistemas de defesa antioxidante não são capazes de eliminar o excesso de ROS ocorre o dano oxidativo, que pode ser traduzido em Peroxidação lipídica (LPO), carbonilação proteica e dano de ADN (Amiard-Triquet et al., 2012; Catalá, 2009). No presente estudo os valores de LPO aumentaram ao longo do tempo de prateleira (Pellerin-Massicotte, 1994), o que vai de encontro ao aumento de stresse oxidativo traduzido na inibição da atividade da CAT. Estes resultados eram expectáveis e podem ser devidos quer longo período de jejum quer de exposição ao ar. Para além disso, o aumento do dano oxidativo em organismos expostos a temperaturas de água elevadas (21 °C) foi igualmente reportado em outros estudos (Coppola et al., 2017). Os mesmos resultados foram encontrados por Freitas et al, 2017 para *Mytilus galloprovincialis*. Para além disso, o aumento da peroxidação lipídica tem sido relacionado com a diminuição da qualidade da carne, uma vez que a oxidação dos ácidos gordos é precursora de compostos voláteis que alteram o seu sabor (Grigorakis, 2007).

Neste estudo observou-se que *R. decussatus* depuradas a 25 °C apresentaram maior dano ao nível do ADN, medido pelo IDG, em relação aos indivíduos depurados a 15 °C, reforçando que temperaturas elevadas (25 °C) são prejudiciais ao balanço fisiológico e de combate a stresse oxidativo desta espécie (Sobral and Widdows, 1997). Resultados semelhantes foram obtidos por Buschini (2003) e Bolognesi (2004) para o mexilhão *Dreissena polymorfa* (Bolognesi et al., 2004; Buschini et al., 2003).

5. Conclusão

O valor nutricional e económico dos moluscos é reconhecido em todo mundo (Nunes et al., 2008). Da mesma forma, a alimentação dos bivalves por filtração é um potencial meio de acumulação de agentes patogénicos ou outros poluentes, sendo um potencial meio de transmissão de doenças para humanos. A depuração e a transposição ajudam a melhorar a qualidade do molusco bivalve.

Portanto, são necessárias medidas preventivas para melhorar a qualidade de bivalves vivos quando comercializado, como a monitorização e melhoria da qualidade da água encontrada nas áreas de cultivo. A sua transposição para áreas com melhor qualidade de água e depuração contribuem para a segurança alimentar (Travers et al., 2015) e nutricional das populações (SOFIA, 2016).

Neste trabalho concluiu-se que é possível depurar *R. decussatus* cultivada em zonas com classificação C em 24 horas, para valores de carga microbiológica seguros para a sua comercialização e consumo direto. Isto é importantíssimo porque permite alargar as áreas de produção e maximizar o valor dos bivalves produzidos nestas zonas, que teriam que ser transpostos para zonas A (com custos acrescidos e mortalidade associada) ou processados (o que também desvaloriza o produto, para o produtor).

Embora temperaturas mais elevadas de depuração pareçam não alterar a capacidade de depuração de *R. decussatus*, em termos práticos, no verão depurar a 15 °C ficará mais caro do que depurar a 25 °C (consumo de energia eléctrica para o arrefecimento da água).

Em geral, podemos concluir que a temperatura de 15 °C é a temperatura de depuração para a espécie em estudo em termos de sobrevivência, e redução do dano oxidativo.

A temperatura vai influenciar a qualidade do produto final (processo de armazenamento), por isso é importante ter esta questão em conta na hora de

selecionar a temperatura ótima para depuração, que varia de espécie para espécie, pelo que serão necessários mais estudos com outras espécies.

6. Referências

- Albuquerque, M.C., Alves, R., Zanandrea, A.C., Ferreira, J., Melo, C.M., Magalhães, A.R., 2012. Growth and survival of the pearl oyster *Pteria hirundo* (L . 1758) in an intermediate stage of culture in Santa Catarina , Brazil 72, 175–180.
- Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Rainbow, P.S., 2012. Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects. CRC Press.
- Anacleto, P., 2014. Clams from Tagus estuary : microbiological , physiological and chemical responses to depuration , transport and environmental stress. Mar. Pollut. Bull.
- Anacleto, P., Luísa, A., Chaguri, M., Pedro, S., Leonor, M., Rosa, R., Marques, A., 2013. Microbiological responses to depuration and transport of native and exotic clams at optimal and stressful temperatures. Food Microbiol. 36, 365–373. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.002>
- Anacleto, P., Luísa, A., Leonor, M., 2015. Effects of depuration on metal levels and health status of bivalve molluscs. Food Control 47, 493–501. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.055>
- Aniya, Y., 1989. Activation of Liver Microsomal Glutathione S-Transferase activity by heating. J. Pharmacobio - Dyn 12, 235–240.
- Bielen, A., Bošnjak, I., Sepčić, K., Jaklič, M., Cvitanić, M., Lušić, J., Lajtner, J., Simčič, T., Hudina, S., 2016. Differences in tolerance to anthropogenic stress between invasive and native bivalves. Sci. Total Environ. 543, 449–459. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.049>
- Bolognesi, C., Buschini, A., Branchi, E., Carboni, P., Furlini, M., Martino, A., Monteverde, M., Poli, P., Rossi, C., 2004. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. Sci. Total Environ. 333, 127–136. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2004.05.018>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brock, V., Kennedy, V.S., Brock, A., 1986. Temperature dependency of carbohydrase activity in the hepatopancreas of thirteen estuarine and coastal bivalve species from the North American east coast. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 103, 87–101. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(86\)90134-6](https://doi.org/10.1016/0022-0981(86)90134-6)
- Buschini, A., Carboni, P., Martino, A., Poli, P., Rossi, C., 2003. Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 537, 81–92. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00050-0](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00050-0)
- Catalá, A., 2009. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxyalkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids* 157, 1–11.
- Chae, M.J., Cheney, D., Su, Y.C., 2009. Temperature Effects on the depuration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from the American Oyster (*Crassostrea virginica*) 74, 62–66. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.01031.x>
- Clairborne, A., 1985. Catalase activity, in: *CRC Handbook of Methods in Oxygen Radical Research*. Boca Raton, pp. 283–284.
- Çok, I., Ulutaş, O.K., Okuşluk, Ö., Durmaz, E., Demir, N., 2011. Evaluation of DNA Damage in Common Carp (*Cyprinus carpio L.*) by Comet Assay for Determination of Possible Pollution in Lake Mogan (Ankara). *Res. Artic. Sci. World J.* 11, 249–261.
- Collins, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Mol. Biotechnol.* 26, 249–261.
- Connors, D.E., 1998. The toxicological significance of glutathione depletion in oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to copper under laboratory and field conditions.
- Coppola, F., Almeida, Â., Henriques, B., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Pereira, E., Freitas, R., 2017. Biochemical impacts of Hg in *Mytilus galloprovincialis* under present and predicted warming scenarios. *Sci. Total Environ.* 601–602, 1129–

1138. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.201>
- Donovan, T.J., Gallacher, S., Andrews, N.J., Greenwood, M.H., Graham, J., Russell, J.E., Roberts, D., Lee, R., 1998. Modification of the standard method used in the United Kingdom for counting *Escherichia coli* in live bivalve molluscs 1, 188–196.
- FAO, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014.
- FAO, 2008. Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. FAO Fisheries Technical Paper.
- Figueira, E., Soares, A.M.V.M., Freitas, R., 2017. Effects of seawater temperature increase on economically relevant native and introduced clam species 123, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.11.010>
- Freitas, R., Pinto, L.R., Sampaio, M., Costa, A., Silva, M., Rodrigues, A.M., Quintino, V., Figueira, E., 2012. Estuarine , Coastal and Shelf Science Effects of depuration on the element concentration in bivalves: Comparison between sympatric *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. Estuar. Coast. Shelf Sci. 110, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.01.011>
- Garcia-Käufer, M., Gartiser, S., Hafner, C., Schiwy, S., Keiter, S., Gründemann, C., Hollert, H., 2015. Genotoxic and teratogenic effect of freshwater sediment samples from the Rhine and Elbe River (Germany) in zebrafish embryo using a multi-endpoint testing strategy. Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 16341–16357.
- Gibbs, M.T., 2007. Sustainability performance indicators for suspended bivalve aquaculture activities 7, 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2005.10.004>
- Gosling, E., 2015. Fisheries and management of natural populations. Mar. Bivalve Molluscs, 2nd Ed. 270–324. <https://doi.org/10.1002/9781119045212.ch8>
- Grigorakis, K., 2007. Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. Aquaculture 272, 55–75. <https://doi.org/doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.062>
- Guilherme, S., Santos, M.A., Gaivão, I., Pacheco, M., 2014. DNA and chromosomal damage induced in fish (*Anguilla anguilla* L.) by aminomethylphosphonic acid (AMPA)—the major environmental breakdown product of glyphosate. Environ.

Sci. Pollut. Res.

- Habig, W.H.H., Pabst, M.J.J., Jacoby, W.B., Jakoby, W., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem* 249, 7130–7139.
- Henriques, M.A.R., 1998. Manual de Aquicultura (1^a ed.). Departamento de Produção Aquática. Inst. ciências biomédicas 11–76.
- IPIMAR, 2008. Produção, salubridade e comercialização de moluscos bivalves em Portugal. Eds. Publicações Avulsas do IPIMAR 20, 171.
- ISO/TS, 16649-3, 2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* — Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide 1.
- Jemec, A., Drobne, D., Tišler, T., Trebše, P., Roš, M., Sepčić, K., 2007. The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 144, 303–309.
- Kamel, N., Burgeot, T., Banni, M., 2014. Effects of increasing temperatures on biomarker responses and accumulation of hazardous substances in rope mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Bizerte lagoon 6108–6123. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2540-5>
- Kleinsasser, N., Sassen, A., Wallner, B., 2004. Toxicological assessment of noxious inhalants. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.*
- Larsen, A.M., Rikard, F.S., Walton, W.C., Arias, C.R., 2015. International Journal of Food Microbiology Temperature effect on high salinity depuration of *Vibrio vulnificus* and *V. parahaemolyticus* from the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Int. J. Food Microbiol.* 192, 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.025>
- Lees, D., 2000. Viruses and bivalve shellfish 59, 81–116.
- Loosanoff, V.L., 1958. Some Aspects of Behavior of Oysters at Different Temperatures 114, 57–70.

- Love, D.C., Lovelace, G.L., Sobsey, M.D., 2010. International Journal of Food Microbiology Removal of *Escherichia coli*, *Enterococcus fecalis*, coliphage MS2, poliovirus, and hepatitis A virus from oysters (*Crassostrea virginica*) and hard shell clams (*Mercinaria mercinaria*) by depuration. Int. J. Food Microbiol. 143, 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.028>
- Monteiro, L.M.P.S., 2004. Estudo da eficácia da depuração na redução da contaminação Bacteriológica do mexilhão (*Mytilus* spp) e sua viabilidade.
- Nunes, M.L., Batista, I., Bandarra, N.M., 2008. Produtos da pesca: valor nutricional e importância para a saúde e bem-estar dos consumidores. Publicações avulsas do IPIMAR, Lisboa.
- Ojea, J., Pazos, A.J., Martínez, D., Novoa, S., Sánchez, J.L., Abad, M., 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. Aquaculture. 238, 451–468.
- Oliveira, J., Cunha, A., Castilho, F., Romalde, J.L., Pereira, M.J., 2011. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives e A mini-review. Food Control 22, 805–816. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.032>
- Ortmann, C., Grieshaber, M.K., 2003. Energy metabolism and valve closure behaviour in the Asian clam *Corbicula fluminea*. J. Exp. Biol 206, 4167–4178.
- Pellerin-Massicotte, J., 1994. Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. J. Aquat. Ecosyst. Heal. 3, 101–111.
- Phuvasate, S., Su, Y.C., 2013. Impact of water salinity and types of oysters on depuration for reducing *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Food Control 32, 569–573. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.025>
- Power, A., Sheehan, D., 1996. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. Comp Biochem Physiol 114C, 99–103.
- Prado, S., Dubert, J., Barja, J.L., 2012. Clam Fisheries and Aquaculture.
- Regulamento (CE), 853/2004, 2004. REGULAMENTO (CE) N.º 853/2004 DO

- PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 29 de Abril de 2004. J. Of. da União Eur. 2002.
- Ruano, F., Batista, F.M., Arcangeli, G., 2015. Perkinsosis in the clams *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* in the Northeastern Atlantic and Mediterranean Sea: A review. J. Invertebr. Pathol. 131, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.015>
- Ruano, F., Brito, B.G.P., Nunes, M.C., Carneiro, A., 1998. Ensaio de certificação de um tanque experimental de depuração de bivalves. Relat. Cient. Téc. Invest. Pescas Mar, 31st ed.
- Santos, S.S. dos, 2013. DIAGNÓSTICO DA CADEIA PRODUTIVA DE OSTRAS EM DOIS MUNICÍPIOS DA REGIÃO DO BAIXO SUL DA BAHIA.
- Sekar, D., Falcioni, M.L., Barucca, G., Falcioni, G., 2011. DNA Damage and Repair Following In Vitro Exposure to Two Different Forms of Titanium Dioxide Nanoparticles on Trout Erythrocyte. Environ. Toxicol.
- Shaposhnikov, S., Azqueta, A., Henriksson, S., Meier, S., Gaivão, I., Huskisson, N.H., Smart, A., Brunborg, G., Nilsson, M., Collins, A.R., 2010. Twelve-gel slide format optimised for comet assay and fluorescent in situ hybridisation. Toxicol. Lett. 195 (1), 31–34.
- Soares, F., Almeida, C., Cachola, R., 2012. Qualidade microbiológica dos bivalves da Ria Formosa - vinte anos de resultados. Relatórios Científicos e Técnicos, Ser. Digit. 1–47.
- Sobral, P., Widdows, J., 1997. Effects of elevated temperatures on the scope for growth and resistance to air exposure of the clam. Cell 61, 163–171.
- SOFIA, 2016. THE STATE OF WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE.
- Solé, M., Porte, C., Albaigés, J., 1995. Seasonal variation in the mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Env. Toxicol Chem 14, 157–164.
- Travers, M., Boettcher, K., Roque, A., Friedman, C.S., 2015. Bacterial diseases in marine bivalves 131, 11–31. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.010>
- Urian, A.G., Hatle, J.D., Gilg, M.R., 2011. Thermal constraints for range expansion of

- the invasive green mussel, *Perna viridis*, in the southeastern United States. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 315 A, 12–21. <https://doi.org/10.1002/jez.644>
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R., 1991. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp Biochem Physiol* 100C, 187–190.
- Wang, J., Dong, B., Yu, Z.X., Yao, C.L., 2018. The impact of acute thermal stress on green mussel *Perna viridis*: Oxidative damage and responses. *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 222, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.04.001>
- Wolff, M., Kluger, L.C., 2017. Integrating the Concept of Resilience into an Ecosystem Approach to Bivalve Aquaculture Management 1364–1382. <https://doi.org/10.1007/s10021-017-0118-z>