



**Rui Joel Monteiro da
Costa**

**Influência da temperatura e do pH nos efeitos
induzidos por Triclosan e Diclofenac em *Ruditapes
decussatus***

**The influence of temperature and pH on the effects
induced by Triclosan and Diclofenac in *Ruditapes
decussatus***

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.



**Rui Joel Monteiro da
Costa**

**Influência da temperatura e do pH nos efeitos
induzidos por triclosan e diclofenac em *Ruditapes
decussatus***

**The influence of temperature and pH on the effects
induced by triclosan and diclofenac in *Ruditapes
decussatus***

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 da Doutora Rosa de Fátima Lopes de Freitas (Investigadora nível 1 do Departamento de Biologia & Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, da Universidade de Aveiro).

A ciência faz-se todos os dias, o mundo altera-se a qualquer instante...
Um obrigado sincero a todos por me fazerem sorrir, aprender, crescer e
fundamentalmente viver.

.

o júri

presidente

Doutor Amadeu Soares

Professor Catedrático, Departamento de Biologia & CESAM, Universidade de Aveiro

Doutora Sara Cristina Ferreira Marques Antunes

Investigadora Auxiliar do CIIMAR e Professora Auxiliar Convidada no Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Doutora Rosa de Fátima Lopes de Freitas

Investigador Doutorado (nível 1), Departamento de Biologia & CESAM, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço à Doutora Rosa Freitas pela orientação científica e por me ter proporcionado esta fantástica etapa da minha vida, onde aprendi imenso e tive oportunidades únicas que serão uma mais valia para todo o meu futuro. Um agradecimento à Doutora Etelvina Figueira pela disponibilidade para me ajudar em todo o meu trabalho, assim como um obrigado à Doutora Montserrat Solé por me ter recebido em “casa” e por ter contribuído para o enriquecimento do meu trabalho.

Ao Anthony Moreira que mais do que um colega de laboratório foi sem dúvida o meu maior amigo nesta jornada científica, que se tornou tão mais fácil e focada. À Francesca Coppola, por se ter tornado a minha “sorella” mais velha, com tudo o que isso acarreta e traz de bom (incluindo vídeos). A todos os meus colegas de laboratório Luísa Magalhães, Adília Pires, Ricardo Pinto, Luís Gaspar, Paulo Cardoso, Francesco Martino, Silvana Costa, Ângela Almeida, Lucia Marchi, Rui Monteiro e Carina Sá por contribuírem e ajudarem de alguma forma a ultrapassar os desafios que foram surgindo.

Agradeço a todos os meus familiares presentes nesta etapa. Às minhas duas avós Emília Santos e Maria Costa que sempre me ajudaram com um brilho nos olhos que nunca irei esquecer. À minha mãe Helena Monteiro que me ajudou de todas as maneiras possíveis e (in)imagináveis sem olhar para o lado sempre que precisei. Ao meu padrinho Joaquim Carvalho que sempre me ajudou com o seu fantástico humor a pensar como seguir o meu futuro. À minha tia/amiga Adozinda Monteiro por tudo e mais algum conselho que me deu nesta caminhada. Ao meu avô Domingos Monteiro por ser a pessoa que sempre me apoiou com o lado mais correto possível. À minha madrinha Rosa Monteiro e ao meu primo Tiago Silva pelos bons momentos livres passados. Aos meus irmãos, a Inês Monteiro, o Miguel Monteiro e o Rúben Costa por todas as “festinhas” que me foram dando.

Ao meu incrível quarto “irmão” Tiago Rodrigues que esteve sempre presente dia após dia, noite após noite, em tudo o que apareceu.

Agradeço também à Anabela Monteiro, Manuel Marques, Ana Soares, Fátima Monteiro, Catarina Fontes, Carlos Fontes, Glória Santos e João Fontes por terem sido a minha segunda família, que me acolheu e me fez passar bons momentos.

Aos meus amigos Tiago Costa, Luís Nunes, Filipe Pereira, Diogo Canedo, Tiago Marques, Rita Jesus, Mara Ferreira, Ana Oliveira, Tiago Maganito, Eduardo Seabra, Tiago Maia, Rute Moreira, Madalena Andrade, Nicole Ferreira, Ana Rocha, Oleh Ryndyuk e Thainara Ferreira por me terem preenchido os dias, divertido e incentivando em cada passo que dei e em cada hora que passei.

À minha companheira de vida Ana Marques que sem dúvida deu o máximo de si para que esta etapa fosse uma das melhores da minha vida.

palavras-chave

Alterações climáticas, fármacos e produtos de cuidado pessoal, biomarcadores, stresse oxidativo, bivalves.

resumo

As mudanças climáticas atuais, aliadas à pressão antropogénica, e os seus possíveis impactos no planeta prometem cada vez mais desafiar a sobrevivência das várias espécies marinhas, em especial das zonas costeiras, que precisam de desenvolver estratégias adaptativas para tolerar e resistir a esses impactos. O problema do aumento da temperatura e da diminuição do pH associa-se cada vez mais ao aumento do uso dos fármacos e produtos de cuidado pessoal (PPCPs) que acabam no meio ambiente, afetando todos os ecossistemas. De forma a ampliar e aprofundar o conhecimento sobre esta problemática e contribuir para a sua divulgação, o presente estudo avaliou os impactos fisiológicos e bioquímicos induzidos por triclosan (1 µg/L TCS) e diclofenac (1 µg/L DIC), em dois cenários climáticos diferentes de temperatura e pH (17 °C/pH 8,1 e 20 °C/pH 7,7) em amêijoas *Ruditapes decussatus*. Os resultados evidenciaram que a uma temperatura de 17°C e a um pH 8,1, as amêijoas foram capazes de responder aos fatores induzidos por cada um dos PPCPs, aumentando as defesas antioxidantes e mobilização das reservas de energia, apesar de não conseguirem impedir danos celulares, evidenciados pelo aumento dos níveis da peroxidação lipídica (PLIP) e pelo aumento do rácio glutatona reduzida/glutatona oxidada (GSH/GSSG). No entanto, quando expostas a TCS ou a DIC em combinação com um aumento da temperatura (20 °C) e diminuição do pH (7,7), as amêijoas apresentaram não só uma diminuição do conteúdo de LIP e aumento da atividade das defesas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPX), como também uma maior atividade das enzimas de biotransformação glutatona S-transferases (GSTs). A diminuição do metabolismo, observado na menor atividade da cadeia de transporte de eletrões (CTE), pode também ter contribuído para uma menor produção de ERO na exposição das amêijoas a TCS a esta temperatura e pH, no entanto pode também indicar um maior stresse nesta condição. Esta resposta das amêijoas aos PPCPs em combinação com aumento da temperatura e diminuição de pH, também não evitou o dano oxidativo nas suas células, uma vez que apresentaram igualmente um aumento da PLIP e uma diminuição do rácio GSH/GSSG. Ainda assim, a existência e a rápida bioacumulação dos PPCPs nos tecidos exigem a necessidade das amêijoas rapidamente se adaptarem, o que pode comprometer a sua reprodução, sustentabilidade e até diminuir a sua capacidade para suportar outros fatores de stresse. No entanto, as alterações climáticas e as possíveis mudanças da temperatura e do pH, dentro dos valores testados, não parecem contribuir para que o TCS e o DIC causem um diferente stresse nas amêijoas *R. decussatus*, já que com ambos os PPCPs apresentam impactos semelhantes independente da temperatura e do pH.

keywords

Climate change, pharmaceuticals and personal care products, biomarkers, oxidative stress, bivalves.

abstract

Current climate change, combined with anthropogenic pressure, and its possible impacts on the planet increasingly promise to challenge the survival of various marine species, especially those from coastal, that need develop adaptive strategies to tolerate and resist these impacts. The problem of increasing temperature and decreasing pH is increasingly associated with increased use of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) that end up in the environment, affecting all ecosystems. In order to broaden and deepen the knowledge on this issue and contribute to its dissemination, the present study evaluated the physiological and biochemical impacts induced by triclosan (1 µg/L, TCS) or diclofenac (1 µg/L, DIC) in two different climatic scenarios of temperature and pH (17 °C/pH 8.1 and 20 °C/pH 7.7) in the clams *Ruditapes decussatus*. The results showed that at a temperature of 17°C and pH 8.1, the clams were able to respond to the factors induced by each of the PPCPs, increasing antioxidant defenses and mobilizing energy reserves, although they could not prevent damage. as evidenced by the increase in PLIP levels and decrease in glutathione reductase/glutathione oxidized (GSH/GSSG). However, when exposed to TCS or DIC in combination with an increase in temperature (20 °C) and a decrease in pH (7.7), clams showed not only decreased LIP content and increased activity of antioxidant defenses superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX), as well as a higher activity of the biotransformation enzymes glutathione S-transferase (GSTs). The decrease in metabolism, observed in the lower activity of CTE, may also have contributed to a lower ROS production in the clams exposure to TCS at this temperature and pH, however may also indicate a higher stress in this condition. This response of clams to PPCPs in combination with increased temperature and decreased pH also did not prevent oxidative damage to their cells as they also showed an increase in PLIP and a decrease in the ratio GSH/GSSG. Still, the existence and rapid bioaccumulation of PPCPs in tissues requires a quickly adaption from the clams, the need for clams to quickly adapt, which may compromise their reproduction, sustainability and even their ability to withstand other stressors. However, climate change and possible changes in temperature and pH, within these tested values, do not seem contribute to TCS and DIC causing a different stress in *R. decussatus* clams, since both PPCPs have similar impacts independent of temperature and pH.

Índice

Índice de Figuras	VII
Lista de Tabelas.....	IX
Lista de Abreviaturas	XI
Capítulo 1 - Introdução Geral.....	1
1.1. Mudanças ambientais associadas a sistemas costeiros	3
1.1.1. Mudanças climáticas: aumento da temperatura	4
1.1.2. Acidificação dos oceanos: diminuição do pH.....	6
1.1.3. Fármacos e os produtos de cuidado pessoal no ambiente aquático: triclosan e diclofenac.....	9
1.2. Bivalves marinhos como bioindicadores	12
1.2.1. Respostas dos bivalves ao aumento da temperatura	13
1.2.2. Respostas dos bivalves à diminuição do pH.....	14
1.2.3. Respostas dos bivalves aos fármacos e os produtos de cuidado pessoal	15
1.3. Objetivos	17
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	19
2.1 Organismos testados	21
2.2. Origem dos exemplares biológicos.....	24
2.3. Condições experimentais	26
2.4. Caracterização do sistema carbonato da água.....	33
2.5. Determinação das concentrações de triclosan e diclofenac	33
2.6. Respostas biológicas	34
2.6.1. Parâmetros fisiológicos	39
2.6.1.1. Taxa de respiração.....	39
2.6.1.2. Índice de Condição.....	40
2.6.2. Parâmetros bioquímicos.....	40
2.6.2.1. Capacidade metabólica	41
2.6.2.2. Reservas de energia	42
2.6.2.3. Stresse oxidativo	42
2.6.2.3.1. Danos celulares e balanço redox.....	43
2.6.2.3.2. Defesas antioxidantes e de biotransformação	45

2.6.2.4. Neurotoxicidade	47
2.7. Análise de dados.....	47
Capítulo 3 – Resultados	49
3.1. Caracterização do sistema carbonato da água.....	51
3.2. Determinação das concentrações de triclosan e diclofenac	52
3.3. Exposição ao triclosan e diclofenac: parâmetros fisiológicos.....	53
3.3.1. Mortalidade	53
3.3.2. Taxa de respiração.....	53
3.3.3. Índice de condição	54
3.4. Exposição ao triclosan e diclofenac: parâmetros bioquímicos	55
3.4.1. Capacidade metabólica	55
3.4.2. Reservas de energia	55
3.4.3. Stresse oxidativo	55
3.4.3.1. Danos celulares e balanço redox.....	57
3.4.3.2. Defesas antioxidantes e de biotransformação	59
3.4.4. Neurotoxicidade	62
Capítulo 4 – Discussão	65
4.1. Contextualização.....	67
4.2. Determinação das concentrações de triclosan e diclofenac	68
4.3. Concentrações de triclosan e diclofenac	68
4.4. Exposição ao <i>triclosan</i> e <i>diclofenac</i> : respostas fisiológicas	70
4.4.1. Taxa de respiração.....	70
4.4.2. Índice de condição	71
4.5. Exposição ao triclosan e diclofenac: respostas bioquímicas	72
4.5.1. Capacidade metabólica	72
4.5.2. Reservas de energia	74
4.5.3. Stresse oxidativo	75
4.5.3.1. Danos celulares e balanço redox.....	75
4.5.3.2. Defesas antioxidantes e de biotransformação	78
4.5.4. Neurotoxicidade	80

Capítulo 5 – Conclusões	83
5.1. Conclusões	83
5.2. Considerações Futuras	87
Capítulo 6 – Referências	89

Lista de figuras

Figura 1. Representação da amêijoa <i>R. decussatus</i>	21
Figura 2. Distribuição geográfica da amêijoa <i>R. decussatus</i>	22
Figura 3. Origem dos exemplares biológicos: Ria de Aveiro.....	24
Figura 4. Representação da configuração experimental das duas fases experimentais realizadas	28
Figura 5. Configuração experimental das salas aclimatizadas na 1. ^a fase experimental	29
Figura 6. Configuração experimental das duas salas aclimatizadas na 2. ^a fase experimental	30
Figura 7. Mecanismos de stresse oxidativo envolvidos nos mecanismos de desintoxicação	37
Figura 8. A: Taxa de respiração (TR); B: Índice de condição (IC), durante 37 dias	54
Figura 9. A: Atividade da cadeia de transporte de eletrões (CTE), durante 37 dias	55
Figura 10. A: Conteúdo de glicogénio (GLI); B: Conteúdo de lípidos (LIP), durante 37 dias	57
Figura 11. A: Nível da peroxidação lipídica (PLIP); B: Nível da carbonilação proteica (CP); C: Rácio entre a Glutathione reduzida e a Glutathione oxidada (GSH/GSSG), durante 37 dias	59
Figura 12. A: Atividade da superóxido dismutase (SOD); B: Atividade da catalase (CAT); C: Atividade da glutathione peroxidase (GPx); D: Atividade da glutathione S-transferases (GSTs), durante 37 dias.	61
Figura 13. A: Atividade da acetilcolinesterase (AChE), durante 37 dias	62

Lista de tabelas

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água	51
Tabela 2. Concentrações de triclosan e diclofenac na água e nos tecidos	53
Tabela 3. Dados de todos os biomarcadores avaliados	63

Lista de Abreviaturas

AChE – Acetilcolinesterase

AT – Alcalinidade total

CAT – Catalase

CI – Índice de condição

CO₂ – Dióxido de carbono

CP – Carbonilação proteica

CTL – Condições de controlo

DIC – Condições de exposição a diclofenac

ECOMARE – Laboratório para a Inovação e Sustentabilidade dos Recursos
Biológicos Marinhos da Universidade de Aveiro

CTE – Cadeia de transporte de eletrões

GLI – Glicogénio

GPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione oxidada

GSTs – Glutathione S-transferases

IPCC – Painel Internacional sobre Mudanças Climáticas

LIP – Lípidos

PLIP – Peroxidação lipídica

pCO₂ – Pressão parcial de CO₂

PF – Peso fresco

PPCPs – Fármacos e Produtos de Cuidado Pessoal

PS – Peso seco

ERO – Espécies reativas de oxigénio

SOD – Superóxido dismutase

TCS – Condições de exposição a triclosan

TM – Taxa de mortalidade

TPH – Condições de temperatura e pH teste

TR – Taxa de respiração

Capítulo 1

Introdução Geral

1.1. Mudanças ambientais associadas a sistemas costeiros

O litoral representa o cruzamento entre os oceanos, a terra e a atmosfera para a evolução de vários ecossistemas, dos quais os sistemas costeiros fazem parte, sendo responsável pela entrada e saída de energia e material (Haslett, 2008). Os sistemas costeiros, definidos como a zona de transição entre a zona marinha e a zona terrestre, estão entre os ecossistemas com maior importância ecológica e socioeconómica do planeta, fornecendo recursos através da diversidade biológica e fornecendo habitat para mais de 90% das espécies marinhas, e que constituem oportunidades comerciais e recreativas (Alhowaish, 2018; Lillebø *et al.*, 2017; Mccay e Jones, 2011; Rochette *et al.*, 2014; WWF, 2019). No entanto, para além dos fatores e interações locais, os sistemas costeiros estão ainda sujeitos a mudanças ambientais excecionais, como catástrofes naturais ou situações climáticas imprevisíveis e/ou extremas, que podem representar um risco para as diversas espécies, com repercussões nas atividades humanas que aí se desenvolvam, comprometendo assim o normal funcionamento do sistema costeiro (Crossland *et al.*, 2005; Nicholls *et al.*, 2007). A pressão sobre os ecossistemas costeiros sempre se fez sentir pelo aumento da população humana, que continua a procurar os recursos aí existentes o que, juntamente com as mudanças climáticas, poderá contribuir para acentuar os impactos negativos sobre estes ecossistemas, ao nível do stresse e da vulnerabilidade a mudanças e variações ambientais (Haslett, 2008; Scavia *et al.*, 2002; Waycott *et al.*, 2009).

Entre os ecossistemas costeiros marinhos, os estuários são alguns dos sistemas mais vulneráveis às alterações físico-químicas naturais que aí se fazem sentir, uma vez que normalmente são sistemas costeiros semifechados, com uma abertura restrita ao mar, altamente influenciados pelos ciclos de maré, interações de água doce e água salgada, correntes e outros eventos como as tempestades, que originam um estado hidrodinâmico particular (Nicholls *et al.*, 2007; Raimonet e Cloern, 2016). Assim, espécies aquáticas que aí habitam e se alimentam, estão sujeitas a uma grande variação das condições de tempo atmosférico e de clima – sendo o primeiro entendido como um estado da atmosfera durante um período curto (momentâneo e que pode mudar a qualquer instante), enquanto o clima

corresponde a um período mais longo, de pelo menos 30 anos – que podem levar a alterações de parâmetros como a temperatura, a salinidade e o pH para além de estarem sujeitos a mudanças bruscas provenientes de outros eventos naturais e produtos químicos resultantes da pressão antropogénica (Harley *et al.*, 2006; IPCC, 2013; Lazarus *et al.*, 2016; WMO, 2019).

1.1.1. Mudanças climáticas: aumento da temperatura

O clima da Terra foi sempre variável ao longo da história. Um estudo publicado por Sime *et al.* (2009) mostra que durante os três últimos interglaciares – intervalos geológicos que se caracterizam por temperaturas mais quentes e que separam os períodos glaciares, que ocorreram há cerca de 130 mil, 240 mil e 320 mil anos – as temperaturas estiveram mais altas 6 °C a 10 °C que as temperaturas médias climáticas atuais (da superfície do planeta) que, segundo a Administração Nacional da Aeronáutica e do Espaço (NASA), se situam nos 14,9 °C. Tendo assim o *Homo sapiens*, que aparece há cerca de 315 mil anos, e outros seres vivos vivenciado períodos mais quentes que os atuais (Hublin *et al.*, 2017; Imbrie e Palmer, 1979; Kukla *et al.*, 2002; NASA, 2019; Sharp, 2018).

Numa escala de tempo mais curta, de apenas algumas décadas, considera-se a hipótese de um aumento da frequência e da velocidade com que os eventos relacionados com as atuais mudanças climáticas ocorrem. Entre as mudanças previstas está o possível e acelerado aumento da temperatura média do planeta, motivado pelo aumento da concentração de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera provocado pela ação humana, através de desflorestações desreguladas, crescimento industrial e populacional (IPCC, 2007, 2013). Atualmente o CO₂ é descrito como sendo o fator com maior responsabilidade nas alterações climáticas observadas, devido à subida da sua concentração na atmosfera, tendo mesmo, segundo a Administração Oceânica e Atmosférica Nacional (NOAA), atingido um máximo na atualidade (405 ppm) em comparação com os últimos 800 mil anos (Lindsey e Dlugokencky, 2018; Lüthi *et al.*, 2008). O CO₂ (0,044 % da atmosfera), assim como outros gases como o metano (CH₄, 0,00019 % da atmosfera) e o óxido

nitroso (N_2O , 0,00003 % da atmosfera) presentes na atmosfera atual, podem interferir na reflexão da radiação infravermelha - resultante da radiação solar que, ao chegar à superfície terrestre (continentes e oceanos), a absorve (aquecendo) e a emite – refletindo-a novamente para a superfície terrestre e impedindo que ela saia (de imediato) para o espaço, originando assim um efeito semelhante a uma “estufa”, daí o nome de gás de efeito estufa (Cox, 2002; IPCC, 2007; Karl e Trenberth, 2003; Pierrehumbert, 2010; Reddy e DeLaune, 2008; WMO, 2018).

No entanto, se o aumento da concentração de CO_2 na atmosfera é uma possibilidade para desencadear mudanças climáticas e o decorrente aumento da temperatura média da Terra, então o Sol (principal fonte de energia do planeta) constitui-se como um dos principais responsáveis pela alteração do clima, dependente dos ciclos e dos ventos solares (Gray *et. al.*, 2010; Lüdecke e Weiss, 2017; Molion, 2005). O mesmo pode acontecer com outros fatores tais como os ventos atmosféricos, as correntes oceânicas, o eixo e órbita da Terra, a tectónica de placas ou o vulcanismo, que contribuem para as alterações do clima (Boé e Terray, 2013; Gao *et. al.*, 2008 Lüdecke e Weiss, 2017; Molion, 2005; Seidel *et al.*, 2008; Smith, 2012).

O Painel Internacional sobre Mudanças Climáticas (IPCC) estima que a temperatura média global em 2100 possa aumentar até 4,0 °C (com consequências a partir dos 2 °C), num cenário que classifica como muito grave e irreversível (IPCC, 2013). São apontadas consequências como a expansão de volume dos oceanos e o derreter dos mantos de gelo glacial que cobrem a superfície continental, podendo originar a elevação do nível médio dos oceanos, cuja estimativa aponta para um aumento de 98 centímetros (IPCC, 2013; Nicholls *et al.*, 2007). Este cenário pode levar a mudanças no ciclo hidrológico a uma escala global que, por sua vez, poderá provocar impactos através de inundações de estuários e outros sistemas costeiros, afetando dessa forma os organismos que aí se encontram (Breitburg *et al.*, 2018; Nicholls *et al.*, 2007; Reddy e DeLaune, 2008). Acresce ainda o facto de fenómenos climáticos como o El Niño provocarem um aquecimento das águas superficiais do Oceano Pacífico, originando variações da temperatura, que pode chegar a 2,6 °C, afetando em particular as espécies aquáticas costeiras, que cada vez mais já se encontram pressionadas pela presença do Homem junto dos seus habitats (Molion,

2005; NOAA, 2019). As mudanças de temperatura também podem levar a alterações na química dos contaminantes presentes nos ecossistemas marinhos, podendo resultar em alterações significativas na sua toxicidade e levar a alterações na sensibilidade e reação dos organismos a esses poluentes (IPCC, 2007; Schiedek *et al.*, 2007; Moe *et al.*, 2013).

Fenómenos ambientais como estes podem resultar em impactos imprevisíveis e amplificados com as mudanças climáticas globais que se projetam. O aumento de 2 °C a 4 °C na temperatura global do planeta, de forma rápida, pode provocar alterações na biologia dos animais marinhos (mortalidade, reprodução, crescimento, desempenho e comportamento químico) e/ou processos ecológicos (como as interações entre a produtividade e espécies) mais sensíveis, uma vez que diversos organismos já vivem perto dos seus limites de tolerância – enfrentando constantes variações naturais de fatores como temperatura, salinidade, oxigênio, nutrientes e marés (IPCC, 2001; Li e Brawley, 2004; Anestis *et al.*, 2007; Anacleto *et al.*, 2014; Wolanski e Elliott, 2015).

O aumento da temperatura pode ainda afetar a distribuição geográfica das espécies marinhas que têm de competir por recursos com outras espécies invasoras o que pode conduzir a alterações ambientais e impactos nas cadeias tróficas (IPCC, 2007; Lord, 2017; Pounds *et al.*, 2006). Foram já verificadas alterações bioquímicas, em estudos com espécies intertidais e subtidais de caranguejos (*Eurypanopeus abbreviatus* e *Menippe nodifrons*) e peixes (*Bathygobius soporator* e *Parablennius marmoreus*), onde as espécies da zona subtidal apresentaram um aquecimento mais lento e menor limite de tolerância térmica que as da zona intertidal (Madeira *et al.*, 2014; Vinagre *et al.*, 2015).

1.1.2. Acidificação dos oceanos: diminuição do pH

Outra consequência possível das alterações climáticas poderá ser a rápida e acentuada acidificação dos oceanos (Raven *et al.*, 2005; Schoolmeester *et al.*, 2019). Os oceanos, além de absorverem calor, também constituem um dos grandes depósitos de dióxido de carbono, já que quanto mais CO₂ for lançado para a

atmosfera, maior a quantidade que as águas superficiais do oceano podem absorver, devido à pressão parcial de CO_2 ($p\text{CO}_2$) (Raven e Falkowski, 1999; Raven *et al.*, 2005).

A dissolução do CO_2 no oceano origina um aumento das concentrações de ácido carbónico (H_2CO_3) que, por sua vez, se dissocia em iões de bicarbonato (HCO_3^-) e hidrogénio (H^+), que leva a um aumento da acidez do oceano – e quanto maior a emissão CO_2 maior será a quantidade de H^+ que se forma e mais ácidos se tornarão os oceanos (Fabry *et al.*, 2008; Turley *et al.*, 2010). Estas reações são seguidas por uma diminuição da concentração do ião carbonato (CO_3^{2-}) e de menor estados de saturação de aragonite (Ω Ar) e de calcite (Ω Ca) (Fabry *et al.*, 2008). Ao conjunto das reações físico-químicas responsáveis pela diminuição do pH e da disponibilidade de iões carbonato denomina-se acidificação dos oceanos (Caldeira e Wickett, 2003). Desde a Revolução Industrial o pH das águas superficiais do oceano passou de 8,21 para 8,10 (uma variação de 0,1 na escala do pH, que é logarítmica) significando um aumento de aproximadamente 30% na sua acidez (Lindsey e Dlugokencky, 2018; Schoolmeester *et al.*, 2019).

Segundo as projeções do IPCC (2013), a pressão parcial de dióxido de carbono nas águas superficiais do oceano pode, dependendo das emissões atmosféricas, atingir valores entre 490 e 1370 μatm (0,06 a 0,32 unidades de pH) até ao ano de 2100. Embora outros cenários sejam sugeridos por alguns autores que preveem uma diminuição do pH até 0,5 unidades até ao final do século XXI (Caldeira e Wickett, 2003; Raven *et al.*, 2005).

Em sistemas costeiros, como os estuários, os efeitos da acidificação preveem-se ainda maiores quando comparados com os dos oceanos, uma vez que o pH é diurno e sazonal e está diretamente relacionado com valores mais altos de CO_2 provocados pela degradação heterotrófica de materiais orgânicos, podendo a $p\text{CO}_2$ atingir valores de 1700 μatm , representando assim um stresse adicional para os organismos aquáticos aí presentes (IPCC, 2013; Melzner *et al.*, 2012; Ries *et al.*, 2009; Tomanek *et al.*, 2011).

A acidificação dos oceanos afeta a vida marinha de diversas formas. Os corais, os crustáceos, os moluscos e outros organismos calcificadores marinhos

são diretamente afetados à medida que o pH da água do mar diminui, dificultando a formação das suas conchas e esqueletos (Kuffner *et al.*, 2007; Lough *et al.*, 2012). Estes organismos necessitam de carbonato de cálcio (CaCO_3) para a formação das suas estruturas mas, com a diminuição do pH das águas o carbonato presente no ambiente marinho liga-se ao hidrogénio e não ao cálcio (Ca^{2+}), ficando o carbonato menos disponível para a formação de carbonato de cálcio (Comeau *et al.*, 2009). Além disso, a acidificação pode afetar a tolerância dos organismos em mudanças da temperatura das águas oceânicas, tornando-os mais sensíveis, podendo interferir assim na distribuição das espécies – os corais, por exemplo, sofrem perturbações mais acentuadas na produção e na calcificação das suas estruturas, quando ocorrem mudanças de temperatura em conjunto com o aumento da acidificação (Langdon e Atkinson, 2005). Outra possível consequência da diminuição do pH poderá ser a presença de um maior número de espécies invasoras, que podem apresentar desempenhos vantajosos em comparação com espécies nativas – o caracol aquático *Pomacea insularum* é um exemplo de espécie que se tem distribuído e criado perturbação nos ecossistemas onde se instala devido à sua capacidade de acumular e transmitir toxinas (Byers *et al.*, 2013).

Estudos demonstraram que, com a acidificação do meio em que se encontram, as lulas (*Doryteuthis pealeii* e *Loligo vulgaris*) tendem a ficar mais sensíveis a outros fatores abióticos (como a temperatura) e que normalmente têm prejuízos na sua atividade e capacidade de natatória, além de uma redução nas taxas de sobrevivência embrionária (Lacoue-labarthe *et al.*, 2011; Rosa *et al.*, 2014; Zakroff *et al.*, 2017). Outro estudo com cavalos-marinhos da espécie *Hippocampus guttulatus*, demonstrou que, com o aumento da acidificação, os indivíduos desta espécie tendem a exibir sinais de letargia (níveis de atividade reduzidos), que provocam taxas de alimentação e respiração mais lentas, apesar das suas taxas metabólicas não serem afetadas até uma diminuição de 0,5 unidades do pH (Faleiro *et al.*, 2015). Além de outros estudos mostrarem que peixes (como o *Amphiprion percula*) e copépodes (como o *Centropages tenuiremis*) podem sofrer diversas alterações bioquímicas (principalmente a nível enzimático), que em conjunto com outros fatores ambientais como temperatura e contaminantes presentes nos

ambientes aquáticos, podem resultar em consequências na sustentabilidade dos seres vivos (Dixon *et al.*, 2010; Koch *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012).

1.1.3. Fármacos e os produtos de cuidado pessoal no ambiente aquático: triclosan e diclofenac

Atualmente há um contínuo e crescente aumento na utilização de químicos cujas consequências, após o seu uso e descarga para o ambiente, são uma preocupação à escala global (Dhillon *et al.*, 2015). Os contaminantes de preocupação emergente (CECs) são definidos como substâncias químicas ou outros materiais (naturais ou sintéticos) suspeitos de estarem presentes (ou de apenas terem sido recentemente descobertos) no ambiente e cujo impacto toxicológico e persistência possa ser capaz de provocar e alterar o metabolismo de um ser vivo (Sauvé e Desrosiers, 2014; Yang, 2016). Os impactos causados por estas substâncias no ambiente aquático só começaram a ser questionadas recentemente, levando a que as informações e os métodos analíticos utilizados para a determinação da toxicidade sejam ainda limitados (Crane *et al.*, 2006; Fabbri e Franzellitti, 2016). Os fármacos e os produtos de cuidado pessoal (PPCPs), são CECs que, em consequência do aumento da população mundial, da rápida urbanização e dos elevados padrões de vida, têm vindo a aumentar a sua presença nos ecossistemas costeiros (Dhillon *et al.*, 2015; Hasan *et al.*, 2015).

O triclosan (TCS – $C_{12}H_7Cl_3O_2$) e o diclofenac (DIC – $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$) são dois exemplos de PPCPs, que diariamente são usados em todo o mundo, que podem chegar ao ambiente aquático e ser facilmente acumulados pelos organismos que aí habitam, através da superfície corporal e do sistema digestivo e respiratório (Nassef *et al.*, 2010). Existem diferentes métodos para se proceder à remoção destes PPCPs do ambiente, métodos físicos (carvão ativado, grafeno e óxido de grafeno, nanotubos de carbono), biológicos (culturas puras, culturas mistas, lamas ativadas) e químicos (ozonização, oxidação de fenton, tratamento UV, radiação por ionização) – no entanto, a sua eliminação nem sempre é conseguida de modo

eficaz e estes acabam por chegar aos diversos ambientes costeiros (Wang e Wang, 2016).

O DIC é um medicamento anti-inflamatório e analgésico não esteroide, usado para reduzir a dor ou a inflamação, que aparece nos sistemas costeiros através das águas superficiais e efluentes das águas residuais que aí desaguar, e pode ser encontrado em concentrações que variam entre os nanogramas e os miligramas por litro: entre 2 – 12 ng/L na laguna do Pego–Oliva (Espanha); entre 7,4 – 19.4 ng/L na baía de Santos (Brasil); entre 8 – 195 ng/L no estuário de Tyne e Tees (Reino Unido); entre 1,6 – 3000 ng/L no Mar Vermelho (Arábia Saudita) (Bonnefille *et al.*, 2018; Hasan *et al.*, 2015; Jux *et al.*, 2002; Tixier *et al.*, 2003). A sua remoção do ambiente depende muito do tratamento utilizando nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs). Tratamentos que usam lamas convencionais ativadas com fósforo químico podem apresentar uma remoção de 22 % do total do contaminante, enquanto que tratamentos que utilizam absorção por carvão ativado seguido de uma ozonização apresentam uma remoção de aproximadamente 93 % – em Portugal, a remoção deste PPCP das águas residuais é de cerca de 76 % (Costa, 2014; Lonappan *et al.*, 2016). Estima-se que as concentrações de contaminante encontradas em águas superficiais portuguesas sejam mais elevadas relativamente aos restantes países europeus, com concentrações mínimas de 25,13 ng/L, encontradas em rios portugueses (rios Mondego e Tejo), e máximas de 3224 ng/L (rio Sousa) (Costa, 2014; Rocha e Rocha, 2015). Os vestígios de DIC podem ser degradado por luz solar (fotodegradação), apresentando uma semivida de 3 h, mas este processo origina metabolitos que, muitas das vezes, apresentam uma maior toxicidade para os organismos que o próprio DIC (Lonappan *et al.*, 2016).

O TCS é um agente antibacteriano e antifúngico presente em diversos produtos como elixires bucais, desodorizantes, sabonetes (de mão, de corpo e géis de banho), produtos de limpeza de unhas, cremes faciais e pastas de dentes. Este composto já foi registado em sistemas costeiros, em concentrações que variam entre nanogramas e os microgramas por litro: 0,015–0,036 µg/L foz do Rio Danshuei (Taiwan); 0,1-7,9 µg/L Delta do Ebro (Espanha); 6,91–10,36 µg/L golfo da Califórnia (México); 4,9-3440 µg/L estuário do Charleston Harbor (Estados

Unidos da América) (Aranami e Readman, 2007; Dhillon *et al.*, 2015; Fair *et al.*, 2009; Halden e Paull, 2005; Olaniyan *et al.*, 2016). Este PPCP pode sofrer vários processos de transformação desde que entra na rede de esgotos até chegar aos diferentes ecossistemas (Yu *et al.*, 2006). Este contaminante degrada-se rapidamente quando submetido a uma radiação contínua de luz artificial a 25 °C, numa solução aquosa a pH 7, tendo uma semivida fotolítica de 41 min (SCCS, 2010). As ETARs que usam a lama ativada como tratamento convencional, por sorção ou biodegradação, conseguem remover cerca de 90% deste PPCP, mas têm sido encontradas concentrações em efluentes que variam entre 10 ng/L e 2,7 µg/L (Anger *et al.*, 2013). Após o processo de tratamento em ETAR, o TCS é transformado em metil triclosan, exibindo um maior grau de persistência no meio ambiente do que o TCS, devido à sua lipofilicidade (capacidade de ser dissolvido em gorduras) e resistência a processos de biodegradação, apresentando assim um maior potencial de bioacumulação (Dann e Hontela, 2011; Haiba *et al.*, 2017; Montaseri e Forbes, 2016). Durante o tratamento de efluentes, as principais vias de degradação do TCS identificadas foram a clivagem da ligação éter e a cloração da ligação fenólica, no entanto num estudo realizado por Figueiredo (2014) numa ETAR da zona norte de Portugal, foram obtidos valores médios de TCS (efluente e afluente) de 0,59 µg/L, não se verificando nenhuma remoção deste após tratamento (Montaseri e Forbes, 2016).

Devido à grande diversidade nas taxas de concentração de contaminantes que, mesmo depois de terem passado processos de tratamento, se encontram nos diversos ecossistemas, vários estudos debruçam-se sobre o impacto dos contaminantes em diferentes concentrações e em diferentes condições abióticas (Ericson *et al.* 2010; Matozzo *et al.* 2012 Munari *et al.* 2018). Um exemplo destes estudos foi o desenvolvido por González-ortegón, et al. (2013) com três fármacos (DIC, Clofibril e Clotrimazole), com o objetivo de observar os efeitos provocados no crescimento, desenvolvimento e massa corporal durante os estágios larvais do camarão *Palaemon serratus* em diferentes temperaturas e salinidades, tendo os resultados demonstrado que os efeitos desses poluentes são mais fortes quando os organismos estão sob stresse ambiental adicional e que apenas o clotrimazol interferiu no desenvolvimento dos organismos estudados. Outro estudo realizado

com o peixe *Dicentrarchus labrax* exposto a diversos contaminantes emergentes (como o TCS) em conjunto com aumento da temperatura e/ou acidificação demonstrou alterações adversas a nível bioquímico celular e comportamental da espécie (Maulvault, 2018).

1.2. Bivalves marinhos como bioindicadores

Espécies bioindicadoras são capazes de refletir rapidamente o estado abiótico ou biótico de um ambiente, representando o impacto das mudanças ambientais num determinado habitat, comunidade ou ecossistema (Gerhardt, 2003). São organismos que fornecem informação sobre os efeitos das interações de diversas condições ambientais e em mudanças repentinas na combinação de diferentes fatores (Hamza-Chaffai, 2014).

Entre as espécies bioindicadoras, os bivalves são uma classe de moluscos identificados como bons bioindicadores, sendo caracterizados pela presença de uma concha, que os protege de diversos stresses ambientais, estão em constante adaptação e sobrevivência desde há cerca de 540 milhões de anos, tendo passado por diversas alterações do clima (Campbell *et al.*, 2009; Damborenea *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2010). São espécies aquáticas, tanto de água doce como de água salgada com um tempo de vida relativamente longo (vários anos, consoante a espécie) permitindo que se realizem estudos com períodos longos e, devido à sua ampla distribuição geográfica, possibilita também a comparação de dados entre diferentes habitats ou regiões (Bernard *et al.*, 1991; Galvão *et al.*, 2009; McDonald *et al.*, 2015).

Muitas destas espécies, como os mexilhões, as ostras, as vieiras e as amêijoas, habitam em ecossistemas costeiros. Como organismos filtradores apresentam um estilo de vida sedentário e estão regularmente expostos a variações abióticas, como a temperatura, a salinidade e o pH, que podem ocorrer na coluna de água, assim como à presença de contaminantes, que se acumulam nos seus tecidos, provocam impactos no seu desempenho fisiológico e bioquímico

(Álvarez-Muñoz *et al.*, 2015; Ambrose, 2009; Matozzo *et al.*, 2013; Mubiana e Blust, 2007; Riisgard e Larsen, 2005; Serafim *et al.*, 2002; Verlecar *et al.*, 2007).

Por todas estas características, os bivalves são frequentemente utilizados em estudos de monitorização ambiental, dando indicações não só sobre o estado de saúde destes organismos e níveis de contaminação dos seus habitats, mas também do perigo para a saúde humana associado ao seu consumo (Boening, 1999; Evangelista-barreto *et al.*, 2008; Galvão *et al.*, 2009; Waykar e Deshmukh, 2012; Yusof *et al.*, 2004). A sua utilização como bioindicador já foi comprovada em respostas subletais induzidas pela temperatura e pH e pela presença de diversos poluentes, incluindo os PPCPs (Almeida *et al.*, 2014; Matozzo *et al.*, 2012; Monteiro *et al.*, 2019; Pirone *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2016; Velez *et al.*, 2016).

1.2.1. Respostas dos bivalves ao aumento da temperatura

Apesar dos bivalves tenderem a aumentar as taxas metabólica e de filtração com o aumento da temperatura num intervalo térmico específico (variando conforme a espécie), o atual aumento da temperatura pode ultrapassar as suas tolerâncias e provocar efeitos fisiológicos e bioquímicos extremos, que podem levar a mudanças no seu crescimento, reprodução e mortalidade (Cheung *et al.*, 2009; FAO, 2005; Filgueira *et al.*, 2016; IPMA, 2019; Meer *et al.*, 2001; Talmage e Gobler, 2011).

Estudos recentes evidenciam diferentes respostas dos bivalves ao aumento da temperatura como diminuição da taxa metabólica, da capacidade respiratória e aeróbia, indução da cadeia de transporte de eletrões, aumento da expressão génica relacionada com enzimas antioxidantes, aumento anormal do número de larvas, variações significativas no sistema imunológico, mudança na distribuição geográfica (Andrade *et al.*, 2018; Banni *et al.*, 2014; Freitas *et al.*, 2017; Sorte *et al.*, 2011).

Foi também observado um maior período de fecho das valvas – evitamento que leva a uma redução de filtração e alimentação – e uma mortalidade superior

em mexilhões *Mytilus galloprovincialis* submetidos a um aumento de temperatura (24 °C) (Anestis *et al.*, 2007). Uma maior mortalidade e uma maior atividade das defesas antioxidantes (essenciais na proteção de danos celulares) nos organismos juvenis da espécie de ostra *Crassostrea brasiliana* quando expostas a um aumento da temperatura para 35 °C (Moreira *et al.*, 2018). Uma tendência para dano neurotoxicológico e diminuição da atividade das enzimas antioxidantes, com o aumento da temperatura (22,9 °C) foram observados na espécie de mexilhões *M. galloprovincialis* (Pfeifer *et al.*, 2005).

1.2.2. Respostas dos bivalves à diminuição do pH

Estudos têm mostrado que a diminuição do pH dos oceanos provoca impacto direto nos bivalves marinhos, pois diminui a percentagem de carbonato de cálcio que estes usam para formar as suas conchas e exoesqueletos e ainda corrói as estruturas já formadas (Findlay *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010). De facto, a formação e o desenvolvimento da concha pelo próprio bivalve, desde os primeiros estágios de vida, são realizados através de um muco segregado por células do manto, chamado nácar (vulgarmente conhecido como madrepérola), que tem na sua constituição base mais de 95 % de cristais de calcite e aragonite, que derivam do carbonato de cálcio saturado na água. A acidificação da água diminui a disponibilidade desses dois minerais, causando problemas na dureza da concha e consequentemente diminuir a proteção contra as diversas pressões ambientais a que os bivalves estão sujeitos (Addadi *et al.*, 2006; Marin *et al.*, 2012; Marin e Luquet, 2005; Silva *et al.*, 2010).

Além dos danos diretos que interferem na formação e desenvolvimento da concha, a acidificação oceânica prevista poderá ultrapassar as variações periódicas a que os bivalves estão habituados nos seus habitats. Estas variações podem originar fortes impactos que podem ser agravados por outros fatores ambientais (como a temperatura e salinidade) e pela presença de contaminantes (como os metais pesados e fármacos), causando modificações a nível fisiológico (como na taxa de respiração e crescimento) e a nível bioquímico (como

modificações metabólicas e danos celulares) (Freitas *et al.*, 2016; Gazeau *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2016).

Foi possível observar num estudo que apenas a espécie de mexilhões *Perna viridis* registou um aumento da taxa de respiração em condições de acidificação (pH 7,7), comparativamente com ostras *Pinctada fucata*, vieiras *Chlamys nobilis*, apesar de todas as espécies registarem uma diminuição significativa na taxa de excreção, concluindo-se assim que a redução do pH afetou o processo metabólico dos bivalves (Wenguang e Maoxian, 2012). Outro estudo observou a ausência de alteração na taxa de respiração e de crescimento das amêijoas *R. philippinarum* quando submetidas a variações do pH (entre 7,7 e 7,4) no entanto, registou uma redução de 44 % da desova a um pH de 7,4 (Xu *et al.*, 2016). Em mexilhões *M. coruscus* foi registado que a espécie apresenta respostas antioxidantes semelhantes, sem ocorrência de dano celular, em dois cenários de diminuição de pH (7,7 e 7,3) e de aumento da temperatura (25 °C e 30 °C) (Hu *et al.*, 2015).

1.2.3. Respostas dos bivalves aos fármacos e os produtos de cuidado pessoal

O aumento do uso de PPCPs nas últimas décadas contribuiu para a sua presença em diversas concentrações nos ecossistemas aquáticos que, mesmo em baixas concentrações, podem produzir efeitos adversos em vários organismos como os bivalves (Ellis, 2006; Smital *et al.*, 2004). Entre os efeitos provocados, estão referenciadas mudanças desfavoráveis no desempenho fisiológico e bioquímico em várias espécies, como nos mostram os estudos com mexilhões *M. galloprovincialis* expostos em laboratório a TCS (5 µg/L) e a metil triclosan (5 µg/L) (Marina *et al.* 2014), em *M. trossulus* expostos em laboratório a DIC (1 µg/L) (Swiacka *et al.* 2019), e com as amêijoas *R. philippinarum* expostas em laboratório a TCS (300, 600 e 900 ng/L) (Matozzo *et al.* 2012).

Embora se tenham feito avanços no estudo dos impactos provocados pela presença de PPCPs em bivalves, existe ainda uma lacuna no estudo dos efeitos combinados a exposições de PPCPs com possíveis efeitos das alterações

climáticas. Estima-se que as atuais alterações climáticas provoquem, entre outros fatores abióticos, uma subida da temperatura e uma diminuição do pH, que possivelmente afetarão significativamente não só os organismos como também a biodisponibilidade de poluentes, assim como o seu potencial de bioacumulação (IPCC, 2013, 2014). Nesse sentido, a disponibilidade de informação sobre os impactos causados em bivalves é escassa, estando apenas disponíveis algumas combinações de fatores abióticos, em que na maioria dos casos não se considera a combinação do aumento da temperatura e diminuição do pH com os PPCPs.

Um exemplo de combinação de fatores foi o estudo realizado por Munari *et al.* (2018) que avaliou o impacto combinado de pH (7,7) com DIC (0,05 e 0,50 mg/L) na possível indução de stresse oxidativo em mexilhões *M. galloprovincialis* e nas amêijoas *R. philippinarum*, onde foram observados que parâmetros bioquímicos medidos em ambas as espécies foram mais influenciados pelo pH reduzido do que pelo contaminante ou pela interação contaminante com pH. Nos casos combinados de DIC com o pH (7,7), os mexilhões *M. galloprovincialis* diminuíram as defesas antioxidantes e as amêijoas *R. decussatus* aumentaram as suas, mas ambas as espécies não conseguiram evitar o dano oxidativo das suas células.

No estudo recente realizado por Freitas *et al.* (2019b), que avaliou o impacto combinado da salinidade (30) com TCS (1 µg/L) ou DIC (1 µg/L) na possível indução de stresse oxidativo dos mexilhões *M. galloprovincialis*, os resultados revelaram que os parâmetros bioquímicos medidos foram influenciados pela salinidade isolada e pela presença de contaminantes, mas nenhum efeito amplificado foi observado pela combinação de ambos (salinidade e PPCPs). No entanto, nos casos combinados deste estudo observou-se uma diminuição do metabolismo, um aumento das reservas energéticas e um aumento das enzimas antioxidantes, que contribuíram para que não ocorresse dano oxidativo.

Pirone *et al.* (2019) desenvolveram um estudo para avaliar a indução de stresse oxidativo na exposição à temperatura de 22 °C, combinada com TCS (1 µg/L), utilizando a espécie de mexilhões *M. galloprovincialis*. Os autores observaram um claro efeito da temperatura elevada juntamente com o fármaco, tendo também sido observado que a capacidade metabólica e as reservas

energéticas se mantiveram e que atividade das enzimas antioxidantes aumentou, com consequente prevenção do dano oxidativo nos casos combinados.

1.3. Objetivos

O possível problema do rápido aumento da temperatura e da diminuição do pH associa-se cada vez mais ao aumento do uso dos fármacos e produtos de cuidado pessoal (PPCPs) que acabam lançados para o meio ambiente e afetam particularmente os sistemas costeiros. A complexidade dos efeitos que daí resultam, ou podem resultar, causam ainda dúvidas sobre os reais impactos induzidos a todos os seres vivos que aí se encontrem.

Dentro deste contexto, o presente estudo pretendeu avaliar os impactos fisiológicos e bioquímicos induzidos pelos PPCPs, TCS e DIC, em condições de variação de temperatura e pH, para melhor compreender as possíveis interações da exposição ao aquecimento/acidificação e toxicidade dos PPCPs no desempenho e tolerância da espécie de amêijoia *R. decussatus*.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1 Organismos testados

Entre todos os bivalves, as amêijoas têm sido amplamente utilizadas em programas de monitorização ambiental e estudos toxicológicos (Casatta *et al.*, 2016; Esposito *et al.*, 2018; Sacchi *et al.*, 2013). Entre as amêijoas, a espécie *R. decussatus* (**Figura 1.**) – sinónimo *Venerupis decussatus* (Linnaeus, 1758) – é um exemplo de espécie nativa da Europa (Bidegain, 2015).



Figura 1. Representação da amêijoia *R. decussatus*. Adaptado de FAO (2014).

Esta espécie, que pode ser encontrada desde a Inglaterra até à Península Ibérica, do Mediterrâneo ao sul de Marrocos e ao Senegal (**Figura 2.**), habita principalmente em zonas costeiras temperadas e protegidas, como lagoas e estuários, entre a zona intertidal e uma profundidade de 0 a 20 m, geralmente em substratos arenosos ou lodosos (normalmente enterrada entre os 15 e 20 cm) (FAO, 2017, Sobral e Widdows, 2000). Em Portugal está presente na Ria de Aveiro, Ria do Alvor, Ria Formosa, Estuário do Mondego, Lagoa de Óbidos, Lagoa de Albufeira e Lagoa da Fajã de Santo Cristo (S. Miguel, Açores) (IPMA, 2017, Jordaens *et al.*, 2000).



Figura 2. Distribuição geográfica (a vermelho) da amêijoia *R. decussatus* (Mapa adaptado da AquaMaps, com revisão feita em fevereiro de 2017).

Como são organismos filtradores, alimentam-se de partículas em suspensão, principalmente algas planctónicas e bentónicas, e a reprodução ocorre geralmente durante a primavera e o verão (Bebianno *et al.*, 2004). A formação dos gâmetas está relacionada principalmente com a temperatura e quantidade de alimento, sendo que com alimento disponível a temperatura ideal para a reprodução é de cerca de 20 °C (FAO, 2005; Matias *et al.*, 2016). Os organismos desta espécie atingem o comprimento de 6 a 7 cm e têm uma longevidade média de 5 anos, podendo atingir os 9 anos (Bebianno *et al.*, 2004; Ruano, Batista e Arcangeli, 2015, FAO, 2017).

A espécie *R. decussatus*, sendo uma das principais espécies de bivalves nativas da Europa, tem um importante interesse ecológico e económico e um importante papel no equilíbrio dos ecossistemas devido à sua importância na cadeia trófica de sistemas aquáticos (Bebianno *et al.*, 2004; FAO, 2014).

Esta espécie pode melhorar a qualidade da água e do ambiente onde se encontra através da filtração de partículas e do excesso de azoto, além de contribuir para o ciclo de carbonatos (Arsons *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2010). No entanto, a *R. decussatus* é frequentemente exposta a alterações de maré, correntes e

temperaturas e, ao ser um organismo filtrador sedentário, com uma mobilidade reduzida (cerca de 6 metros por mês), tem também a capacidade de acumular poluentes do meio ambiente em diferentes tecidos e refletir os impactos toxicológicos que lhe são colocados, podendo consequentemente tornarem-se inadequados para consumo humano (Bebianno *et al.*, 2004). Além disso, a espécie é conhecida por tolerar elevadas concentrações de xenobióticos e fornecer uma resposta específica aos poluentes e, por estas razões, a *R. decussatus* tem sido amplamente utilizada como espécie bioindicadora adequada na avaliação da qualidade do meio ambiente aquático (Almeida *et al.*, 2014; Aru *et al.*, 2016; Chalghmi *et al.*, 2015; Esposito *et al.*, 2018; Freitas *et al.*, 2016; Smaoui-Damak *et al.*, 2004).

Em Portugal a produção de bivalves representou 56,7 % da produção aquícola total em 2017 e a produção das várias espécies de amêijoas representa mais de 50 % do total da produção, com quase 3887 toneladas (REA, 2018). Contudo, a produção da espécie *R. decussatus* tem apresentado um decréscimo nesta década, devido a fatores como o excesso de captura de juvenis do meio natural, falha no recrutamento, doença (Perkinsiose) e, sobretudo, devido à competição que estas têm com as espécies invasoras (como a *R. philippinarum*) que causam interferências na reprodução, alimentação e desenvolvimento da espécie e ainda na ocupação do seu habitat (Cardoso *et al.*, 2013; FAO, 2014; Moura *et al.*, 2017; Ruano *et al.*, 2015).

2.2. Origem dos exemplares biológicos

Neste estudo, os exemplares de amêijoas *R. decussatus* foram colhidos no Canal de Mira, na Ria de Aveiro (Portugal) (**Figura 3.**).

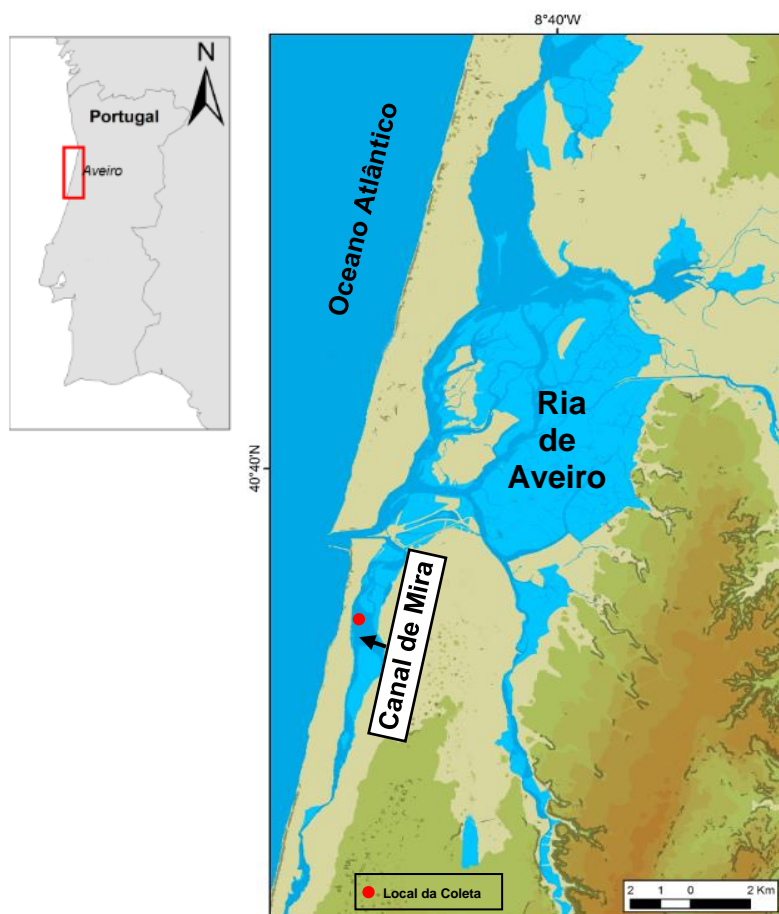


Figura 3. Origem dos exemplares biológicos: Ria de Aveiro (Adaptado de Duarte, 2009).

A Ria de Aveiro, é uma laguna costeira, localizada a noroeste de Portugal, pertencente à bacia hidrográfica do Baixo Vouga, formada por quatro canais principais: São Jacinto, Mira, Ílhavo e Espinheiro (Bastos e Dias, 2002; Lopes *et al.*, 2007). A sua área total varia entre os 66 km² durante a baixa-mar e os 82 km² na praia-mar, com um comprimento de 45 km e uma largura de 10 km, sendo feita a sua ligação com o oceano Atlântico através de um único canal artificial, na Barra, de 1,3 km de comprimento, 350 m de largura e 20 m de profundidade (Dias e Lopes, 2006; Génio *et al.*, 2007).

A hidrodinâmica da Ria de Aveiro é dominada pelas marés (entre 3,2 e 0,6 m), com correntes que atingem os 2 m/s, estando a circulação da água dominada pela entrada da água do mar ($70 \times 10^6 \text{ m}^3$ por ciclo de maré) proveniente do oceano Atlântico e não pela água doce ($1,8 \times 10^6 \text{ m}^3$ por ciclo de maré) proveniente dos vários afluentes e efluentes (Barroso *et al.*, 2000; Dias, 2001; Moreira *et al.*, 1993; Rodrigues *et al.*, 2011; Vaz *et al.*, 2009). Este ecossistema está exposto a mudanças de salinidade diárias e sazonais, apresentando um gradiente longitudinal de salinidade entre 0 (trecho superior do canal do Espinheiro) e os 36 (junto ao canal de ligação com o oceano) (Vaz e Dias, 2008).

A Ria de Aveiro desempenha um importante papel a nível socioeconómico na região da Beira Litoral, agregando ao seu redor aglomerados populacionais, agricultura, salinicultura, pesca e uma diversidade de indústrias, apesar da Ria apresentar-se com problemas ao nível da poluição, apesar dos tratamentos existentes, que afetam todo o ambiente costeiro (Cunha *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2003; Koumaki *et al.*, 2016). O canal de Estarreja, rodeado de um denso tecido industrial, apresenta-se como uma zona de grande impacto ambiental devido à contaminação de sedimentos superficiais e de fundo (Pereira *et al.*, 2008; Cardoso *et al.* 2013; Pinto *et al.*, 2018; Rocha *et al.*, 2016; Silva, 2016). No entanto, a poluição de origem doméstica surge principalmente dos esteiros de Ílhavo (Almeida, 2007). Numa zona menos industrializada e menos povoada encontra-se o canal de Mira, onde não é tão relevante o impacto da poluição como nos restantes canais (Almeida, 2007; AMBIECO, 2011; Lillebø *et al.*, 2013).

Apesar de ser considerado um ecossistema historicamente moldado pela atividade humana, pode ser considerado como um dos estuários e sistemas costeiros mais importantes de Portugal, uma vez que apresenta um grande número de características e biótopos que tornam a vida ideal para diversas espécies marinhas (Dias e Lopes, 2006; Lopes *et al.*, 2007; Morgado *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2017). A Ria de Aveiro possui uma grande biodiversidade de comunidades macrobentónicas, nas quais os bivalves se integram com diversas espécies como o mexilhão *M. galloprovincialis* e as amêijoas *R. decussatus* e *R. philippinarum*, vulgarmente encontrados neste ecossistema (Cunha e Moreira, 1995; Rodrigues *et al.*, 2011; Velez *et al.*, 2015). A distribuição geográfica das

espécies bentónicas deste tipo de ecossistema, como a *R. decussatus*, utilizada neste trabalho, está principalmente relacionada com a hidrodinâmica, o gradiente de salinidade e a temperatura (Garaulet, 2011; Rodrigues *et. al.*, 2011). O canal de Mira da Ria de Aveiro, local de recolha dos exemplares estudados, apresenta um fluxo contínuo de água doce, com origem num sistema de afluentes de pequenas lagoas e ribeiros, maior hidrodinamismo, maior salinidade e uma maior temperatura (principalmente no inverno), sobretudo na zona norte, junto ao canal artificial de ligação com o oceano Atlântico, local que regista o maior número de espécies bentónicas (AMBIECO, 2011; Garaulet, 2011; Rodrigues *et. ali.*, 2011 PDM, 2013).

2.3. Condições experimentais

Após a recolha das amêijoas *R. decussatus* (137 organismos) com um tamanho semelhante de concha (comprimento $4,4 \pm 0,3$ cm e largura $3,2 \pm 0,2$ cm), estas foram transportadas de imediato para o laboratório (ECOMARE) e colocadas durante 10 dias em 4 aquários, de 20 L cada, para depuração e aclimação às condições do laboratório – período que já foi comprovado ser suficiente para o estudo com bivalves (Almeida *et al.*, 2018; Andrade *et al.*, 2018 Freitas *et al.*, 2016). Neste período os organismos foram mantidos durante 7 dias a uma salinidade de 28 ± 1 , a uma temperatura de $18 \pm 1,0$ °C e a um pH de $8,1 \pm 0,1$, assemelhando-se as condições dos aquários às do local na altura da colheita. Nos restantes 3 dias, as condições começaram a ser gradualmente ajustadas, sendo as amêijoas distribuídas por duas salas climaticamente diferentes: uma sala com temperatura e pH controlo (sala controlo) e uma sala teste com aumento da temperatura e diminuição de pH. No primeiro dia, as amêijoas, foram distribuídas por 6 aquários diferentes, com 17 L cada, sendo que em 3 aquários da sala controlo a temperatura foi reduzida (17 ± 1 °C) e mantido o pH ($8,1 \pm 0,1$) e em 3 aquários da sala teste a temperatura foi aumentada (19 ± 1 °C) e o pH reduzido ($7,9 \pm 0,1$). Em ambas as salas, a salinidade dos aquários foi reduzida para 25 ± 1 . No segundo e terceiro dia, o pH dos aquários da sala teste continuou a ser reduzido para $7,8 \pm 0,1$ e $7,7 \pm 0,1$, respetivamente, mantendo-se as condições dos aquários da sala controlo.

A temperatura de controlo de 17 °C foi escolhida considerando a média da temperatura da área de amostragem durante o mês de outubro e a temperatura de teste de 20 °C foi selecionada tendo em conta a variação anual de temperaturas médias (13,4 °C a 22,6°C) nos habitats das *R. decussatus* da Ria de Aveiro e o aumento previsto da temperatura média global (entre 1,0 °C e 4,0 °C) até 2100 (Coelho *et al.*, 2014; IPCC, 2007; IPMA, 2017; Velez *et al.*, 2015).

O pH da água dos aquários da sala teste, nas condições acidificadas, foi diminuído gradualmente 0,1 unidades por dia, até atingir o nível de pH pretendido (7,7), para evitar uma mudança brusca na acidez da água. Os valores de pH escolhidos (pH controlo de 8,1 e pH teste de 7,7) tiveram como base o pH médio da área de amostragem (entre 6,7 e 8,1) e as projeções de pior cenário, que sugerem uma diminuição de pH (entre 0,1 e 0,5) até 2100 (IPCC, 2013; Melzner *et al.*, 2012; Pires *et al.*, 2015; Tomanek *et al.*, 2011).

A fim de minimizar os efeitos causados por maiores concentrações de sal na quantificação de TCS e de DIC nas amêijoas, optou-se por uma salinidade de 25, tendo em conta a salinidade da área de estudo que se situa entre os 0 e 36 e trabalhos anteriores realizados com esta espécie (Almeida *et al.*, 2014; Dias e Lopes, 2006; Freitas *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2017; Vargas *et al.*, 2017).

No final deste período de 10 dias, já com as condições dos aquários ajustadas (pH, temperatura e salinidade) nas duas salas, deu-se início ao estudo em duas fases experimentais (**Figura 4.**).

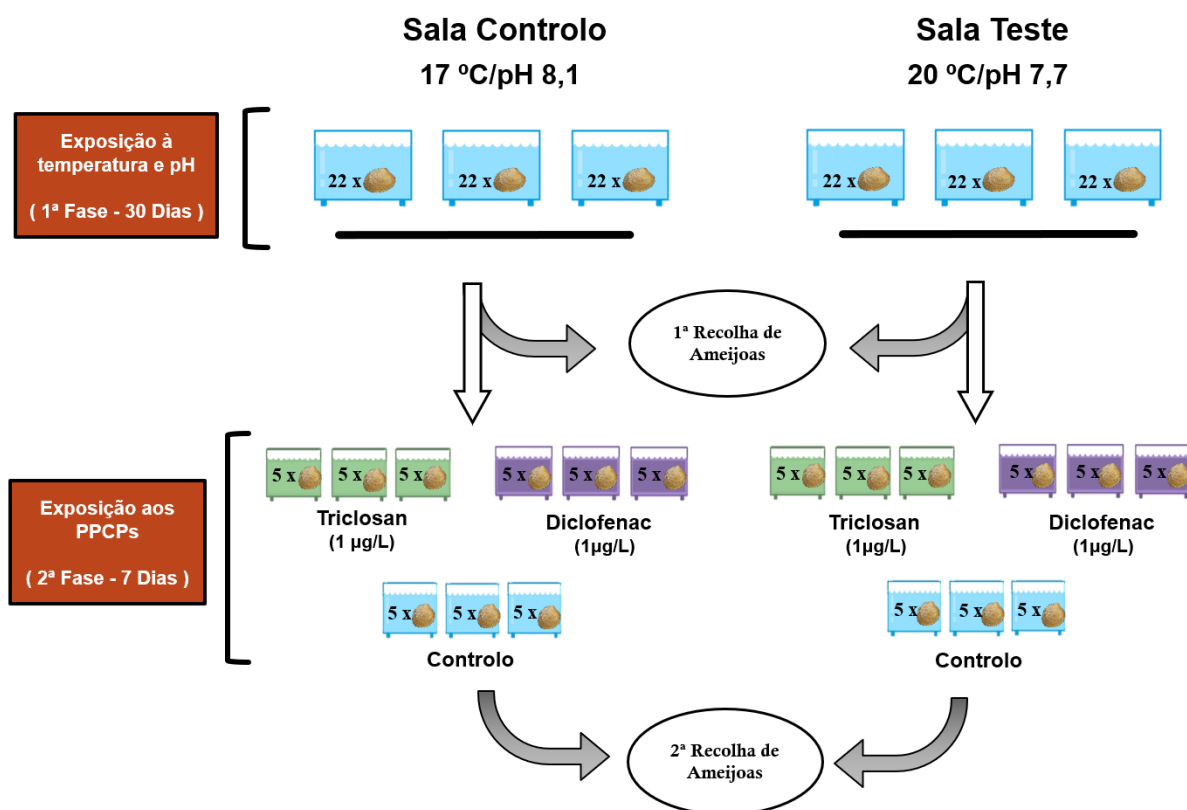


Figura 4. Representação da configuração experimental das duas fases experimentais realizadas.

A primeira fase experimental (**Figura 5.**), realizada durante 30 dias, foi utilizada para aclimatizar as amêijoas a diferentes temperaturas e pH de forma a ver qual o impacto que esta aclimação podia ter na resposta à presença de TCS e de DIC, testando as seguintes condições:

- Controlo à temperatura 17°C/pH 8,1 (CTL);
- Temperatura 20°C/pH 7,7 (TPH).

Começando com 22 organismos em cada um dos 3 aquários da sala controlo/condição CTL (temperatura a $17 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, pH a $8,1 \pm 0,1$ e salinidade a 25

± 1) e 22 organismos em cada um dos 3 aquários da sala teste/condição TPH (temperatura a $20 \pm 1,0^\circ\text{C}$, pH a $7,7 \pm 0,1$ e salinidade a 25 ± 1).

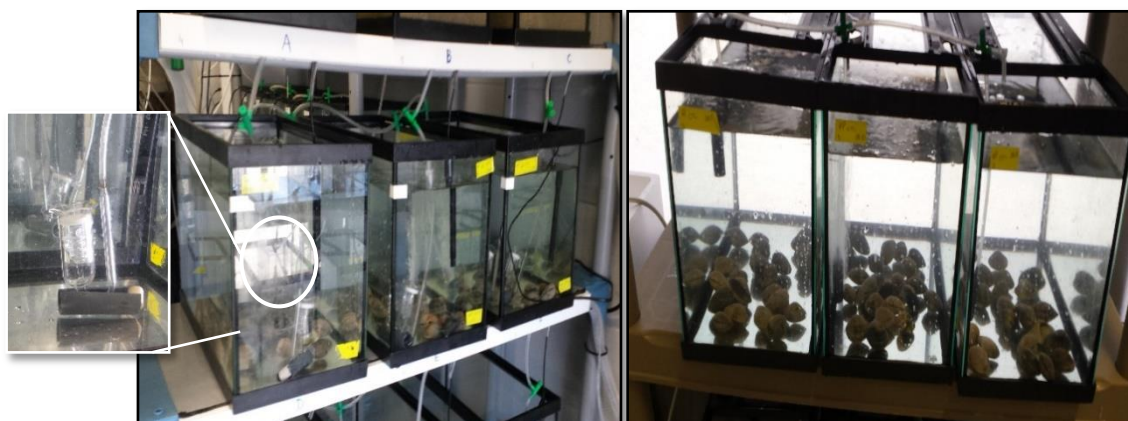


Figura 5. Configuração experimental das salas aclimatizadas na 1.^a fase experimental. Aquários da sala teste ligados ao sistema *Aquamedic At Controller* que permite controlar e monitorizar o pH (à esquerda) e aquários da sala controlo (à direita).

Na segunda fase experimental, realizada durante 7 dias, as condições (temperatura e pH) da primeira fase experimental foram mantidas nas duas salas. Os organismos (90 no total) foram distribuídos por 18 aquários (**Figura 6.**), 9 em cada sala e 3 aquários por condição, para testar os impactos induzidos pela exposição a TCS e a DIC, testando-se as seguintes condições:

- CTL, 0 $\mu\text{g/L}$ de PPCPs, à temperatura 17°C /pH 8,1;
- TPH, 0 $\mu\text{g/L}$ de PPCPs, à temperatura 20°C /pH de 7,7;
- TCS, 1 $\mu\text{g/L}$ de TCS à temperatura 17°C /pH 8,1;
- TCS, 1 $\mu\text{g/L}$ de TCS à temperatura 20°C /pH de 7,7;
- DIC, 1 $\mu\text{g/L}$ de DIC à temperatura 17°C /pH 8,1;
- DIC, 1 $\mu\text{g/L}$ de DIC à temperatura 20°C /pH de 7,7.

Foram distribuídos 5 organismos por cada um dos 9 aquário, sendo que os organismos de cada um dos 3 aquários de cada sala da primeira fase experimental, foram distribuídos por 3 aquários de cada uma das condições desta segunda fase experimental.

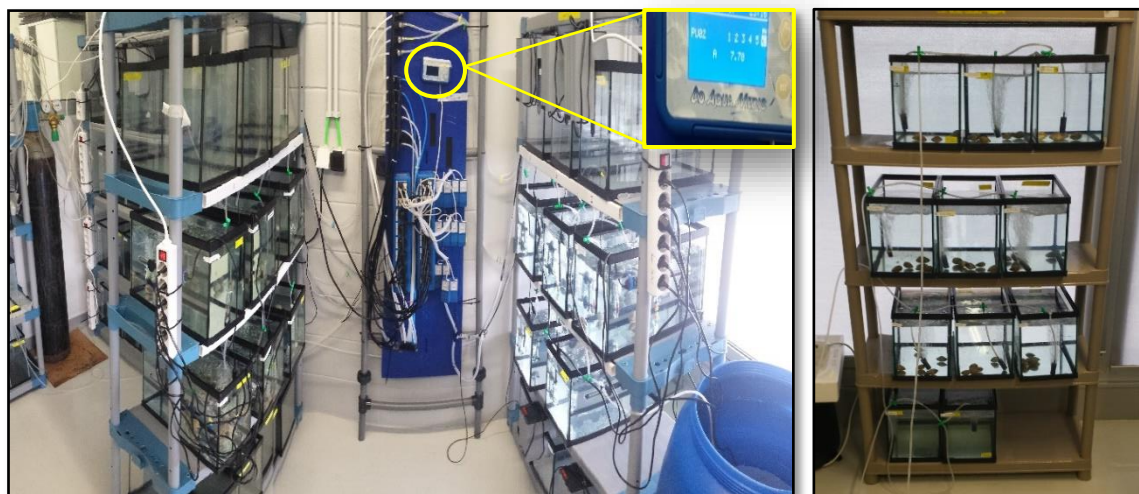


Figura 6. Configuração experimental das duas salas aclimatizadas na 2.^a fase experimental. Aquários da sala teste (à esquerda) e da sala controlo (à direita).

Em toda a experiência (período de depuração e aclimação, primeira fase experimental e segunda fase experimental) foi usada água do mar artificial, previamente preparada num tanque de 250 L de água, desionizada e preparada com a adição de sal artificial (*Tropic Marin®SEA SALT - Tropic Marine Center*). No caso da sala teste, em que os aquários tinham um pH de 7,7, foi usado um segundo tanque com a água do mar artificial previamente acidificada com recurso ao sistema *Aquamedic AT Controller*.

Ao longo de todas as etapas, as amêijoas foram mantidas sob um contínuo arejamento, um fotoperíodo de 12 h dia e 12 h noite e alimentadas com *AlgaMac Protein Plus - Aquafauna Bio-Marine Inc.* (150 000 células/animal).

Durante a depuração e a aclimação, a alimentação e as trocas da água foram realizadas de forma diferente consoante as diferentes etapas do estudo. Nos primeiros 10 dias (depuração e aclimação), os organismos foram alimentados a

cada dois dias e as trocas da água foram realizadas uma vez a cada três dias. Na primeira fase experimental, os organismos foram alimentados três vezes por semana e as trocas da água foram realizadas uma vez a cada sete dias. Na segunda fase experimental, os organismos foram alimentados no começo da fase e depois das trocas da água, realizadas uma vez a cada dois dias – sempre que se realizou troca da água, houve necessidade de repor as concentrações de DIC e TCS nos respectivos aquários.

A temperatura, a salinidade e o pH foram diariamente verificados e reajustados sempre que necessário. Os organismos foram igualmente verificados diariamente e considerados mortos quando as suas valvas se encontravam abertas e não fechavam aquando de um estímulo externo.

Para conseguir a acidificação dos aquários da sala teste, a redução do pH foi obtida por difusão direta de CO₂ na água e monitorizada utilizando sondas independentes de pH. Os níveis individuais de pH foram assim continuamente monitorizados e controlados usando um sistema regulável de pH (*Aquamedic AT Controller*), que permite ligar ou desligar automaticamente uma válvula solenoide, dedicada a cada aquário, permitindo que o gás (CO₂) passe através de difusores de vidro e se mantenha os níveis do pH (sistema representado na **Figura 5.**). Cada eletrodo das sondas de pH foi verificado, pelo menos uma vez a cada 2 dias, através da medição e comparação do pH com uma outra sonda independente (HI-2020 da *Hanna Instruments*) e recalibrado sempre que necessário usando-se soluções tampão (*buffers*) de padrão primário *NIST*.

As concentrações testadas de TCS (N.º CAS: 3380-34-5. REF: PHR1338) e DIC (N.º CAS: 15307-86-5. REF: D6899), compostos adquiridos à *Sigma-Aldrich*, foram selecionadas com base nas concentrações encontradas em estuários (entre vários ng/L até alguns mg/L) (Cunha *et al.*, 2017; Marina *et al.*, 2014; Matozzo *et al.*, 2012; Montaseri e Forbes, 2016).

Os períodos experimentais, de 30 e 7 dias para cada uma das fases, foram escolhidos tendo em conta estudos anteriores realizados com amêijoas, (Almeida *et al.*, 2014; De Marchi *et al.*, 2017; Velez *et al.*, 2016), em que estes observaram alterações fisiológicas e bioquímicas após períodos idênticos.

No final da primeira fase experimental (30 dias), 20 organismos (10 da condição CTL e 10 da condição TPH) foram imediatamente recolhidos e congelados (-20 °C) para posteriores análises, e outros 10 organismos (5 da condição CTL e 5 da condição TPH) foram de imediato usados para a determinação da taxa de respiração e depois congelados (-20 °C) também para posteriores análises. O mesmo processo aconteceu no final da segunda fase experimental (7 dias), onde 54 organismos (9 CTL, 9 TCS e 9 DIC, da sala controlo; 9 TPH, 9 TCS e 9 DIC, sala teste) foram imediatamente recolhidos e congelados (-20 °C), para posteriores análises, e outros 35 organismos (6 CTL, 6 TCS e 5 DIC, sala controlo; 6 TPH, 6 TCS e 6 DIC, sala teste) foram imediatamente usados para a determinação da taxa de respiração e depois congelados (-20 °C) para análises posteriores.

Durante as duas fases experimentais, antes de realizar as trocas da água, e no final de cada fase experimental, foram registados os valores da salinidade, temperatura e pH e ainda colhidas amostras de água de cada aquário, para possibilitar a caracterização dos parâmetros físico-químicos da água usada. Para esta caracterização, foi recolhido um total de 83 amostras, em frascos de 50 mL – 30 recolhas na primeira fase (15 CTL e 15 TPH) e 54 recolhas na segunda fase (9 CTL, 9 TCS, 9 DIC, sala controle; 9 TPH, 9 TCS, 9 DIC, sala teste).

Ao longo da segunda fase experimental, e com o objetivo de comparar as concentrações reais e nominais de TCS e DIC na água, logo após a sua adição, foram recolhidas duas amostras de cada um dos aquários, de todas as condições da sala teste e da sala de controlo (CTL, TPH, TCS e DIC), guardadas em frascos de 50 mL, a uma temperatura de -20 °C. Foi recolhido um total de 216 amostras de água dos aquários das duas salas em todas as condições, 108 amostra na sala controle (36 CTL, 36 TCS e 36 DIC) e 108 amostras na sala teste (36 TPH, 36 TCS e 36 DIC).

2.4. Caracterização do sistema carbonato da água

De forma a determinar a alcalinidade total (AT), as amostras de água recolhidas ao longo das duas fases experimentais foram submetidas ao procedimento de titulação potenciométrica com ácido sulfúrico (0,16N) (Gran, 1952) e a alcalinidade total foi calculada com o programa *Alkalinity Calculator* da *United States Geological Survey* (USGS).

Depois de calcular o valor da AT e juntar os registos de salinidade, temperatura e pH obtidos no momento da recolha das amostras da água, os dados foram introduzidos no programa *CO2SYS Calc*, seguindo o procedimento de Robbins *et al.* (2010) para calcular os carbonatos, usando as constantes de dissociação de carbonato K1, K2 de Mehrbach *et al.* (1973), reajustadas por Dickson e Millero (1987), e KSO4 de Dickson (1990). Para cada condição, nas 2 fases experimentais, foi então calculada a média da pressão parcial de CO₂ (pCO₂), concentração de iões de bicarbonato (HCO₃⁻), iões carbonato (CO₃²⁻), estado de saturação da calcite (Ω_{Cal}) e da aragonite (Ω_{Ag}).

2.5. Determinação das concentrações de triclosan e diclofenac

Para a determinação da concentração de TCS na água e nos tecidos moles das amêijoas foram usados dois procedimentos distintos. A determinação da concentração de TCS para as amostras da água foi obtida segundo o procedimento de Cheng *et al.* (2011) e para a dos tecidos moles usou-se o procedimento sugerido por Schmidt e Snow (2016). Para o caso das amostras da água (100 mL) foi usado o dispositivo SPE (*Thermo Scientific*). As amostras foram acidificadas para um pH de 3, o TCS foi separado e os extratos foram totalmente secos, utilizando-se o evaporador rotativo. Os resíduos foram analisados por cromatografia gasosa, acoplada a espectroscopia de massa (GC-MS). Para determinação da concentração do TCS nos tecidos moles (1 g) foram usados os kits de sais de extração e purificação *QuEChERS*, os extratos foram processados de acordo com o método da cromatografia gasosa, acoplada a espectroscopia de massa, relatado

por Tohidi e Caí (2015). Todas as soluções preparadas foram armazenadas a uma temperatura inferior a 6 °C. As análises de TCS foram realizadas com GC Trace 1300 (*Thermo Scientific*) acoplado a uma amostra automática *TriPlus RSH* e a um espectrómetro de massa *TSQDuo triple quadrupolo*, com uma fonte de ionização por impacto de elétrons (EI) (*Thermo Scientific*).

Relativamente à determinação das concentrações de DIC, foi utilizada a cromatografia líquida ultravioleta de alto desempenho (HPLCUV), para determinação da sua concentração na água e nos tecidos moles. As medições das amostras de água tiveram como orientação o método realizado por Madikizela e Chimuka (2017). As amostras de água (100 mL) foram extraídas por extração em fase sólida e o seu pH foi ajustado para 2,5. Foi feita a separação do resíduo de DIC e os resíduos foram quantificados, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Nas amostras dos tecidos moles (1 g), o método utilizado teve como orientação Gatidou *et al.* (2007). As amostras foram desidratadas, sonificadas e submetidas a centrifugação. Foi usado o sistema cromatográfico com uma bomba de gradiente *PerkinElmer* da Serie 200, acoplada a um detetor ultravioleta variável *PerkinElmer* da série 200, ajustado a 280 nm. O *software Turbochrome* foi usado para processamento de dados.

2.6. Respostas biológicas

Um biomarcador é um indicador de determinado estado de um organismo que pode ser medido. A avaliação de diversos biomarcadores é uma prática comum no estudo de mudanças de parâmetros ambientais (como a acidificação da água e o aumento da temperatura) ou presença de poluentes (como os dos PPCPs), em organismos aquáticos, nomeadamente em bivalves (Ali *et al.*, 2018; Freitas *et al.*, 2017; Munari *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2016; Velez *et al.*, 2016).

Os indicadores fisiológicos são normalmente usados para encontrar possíveis variações metabólicas temporárias que provêm normalmente de mudanças nos parâmetros ambientais (Freitas *et al.*, 2017; Lucas e Beninger, 1985). A medição da taxa de respiração (TR), que determina o consumo de

oxigénio realizado pelos organismos, assim como o cálculo do índice de condição (IC), que fornece informações sobre o peso e o crescimento dos organismos, são dois indicadores fisiológicos que podem dar informações sobre as alterações induzidas por diferentes stresses no estado fisiológico dos organismos (Bour *et al.*, 2018; Filgueira *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2016; Tang e Ulrik, 2018).

Em organismos aeróbios, o metabolismo celular depende de processos energéticos sendo a molécula de oxigénio indispensável para a produção de energia em grandes quantidades – por esse motivo, os indicadores bioquímicos também são usados para detetar alterações e/ou danos que surjam nos organismos (McCord, 2000; Ramos *et al.*, 2005). Através da cadeia de transporte de eletrões (CTE) na mitocôndria, o oxigénio reage com moléculas orgânicas e é reduzido a água, enquanto a adenosina trifosfato (ATP) é gerada como o principal combustível celular (Babcock, 1999; Inoue *et al.*, 2003). Este processo aumenta a quantidade de energia produzida no metabolismo – que é fundamental para compreender a toxicidade do oxigénio, uma vez que o aumento dessa produção leva ao aumento da probabilidade de gerar substâncias tóxicas de oxigénio no metabolismo celular (Inoue *et al.*, 2003; McCord, 2000).

O stresse oxidativo é descrito como um estado em que os organismos, expostos a diversos fatores de stresse, produzem mais quantidade de espécies reativas de oxigénio (ERO) do que aquelas que conseguem eliminar (França *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2016; Regoli e Giuliani, 2014). As ERO são assim formadas a partir do metabolismo celular sob diferentes tipos, entre outros: radical hidróxido ($\text{OH}\cdot$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o mais abundante (Cadenas e Davies, 2000; McCord, 2000).

Ao mesmo tempo que o oxigénio se torna fundamental para a célula em organismos aeróbios, o seu processamento excessivo pode-se tornar um risco para a estrutura e funcionamento celular (Inoue *et al.*, 2003; McCord, 2000). As elevadas concentrações de ERO nos organismos aquáticos podem provocar efeitos adversos e, naturalmente, provocar uma desordem na composição bioquímica, situação que permite a determinação da presença de substâncias tóxicas e de mecanismos de proteção dos organismos (Sonawane e Sonawane, 2018).

A exposição a condições de stresse está então associada a alterações no metabolismo energético dos organismos, visível na atividade da CTE, e nas suas reservas energéticas (glicogénio e lípidos). O conteúdo de glicogénio (GLI), principal fonte de energia nos sistemas de proteção dos bivalves, pode representar de 5% a 60% do seu peso seco e começa a ser usado, normalmente, em condições de stresse limitado (Sonawane e Sonawane, 2018; Zwaan e Wusman, 1976). Já o conteúdo dos lípidos (LIP) é normalmente usado em condições de stresse forte e pode representar entre 1% a 10% do seu peso seco (Deslous-Paoli e Héral, 1988; Zwaan e Wusman, 1976). Os valores do conteúdo de GLI e de LIP, assim como da atividade da CTE, podem ser determinados para fornecer informações sobre a capacidade metabólica e sobre as reservas de energia dos organismos (Coen e Janssen, 1997; Deslous-Paoli e Héral, 1988; Lagadic *et al.*, 1994; Marin *et al.*, 2003; Sonawane e Sonawane, 2018).

Os níveis de ERO nos organismos são também controlados e eliminados pelos mecanismos de defesa antioxidante dos quais fazem parte os mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, que tentam proteger as células e os tecidos de danos (oxidativos) severos e generalizados (De Marchi *et al.*, 2017; Thannickal e Fanburg, 2000). Alguns biomarcadores relacionados com os stresses e os danos oxidativos podem ser avaliados para determinar os impactos induzidos por alterações ambientais e poluentes nos organismos (Correia *et al.*, 2015).

A enzima superóxido dismutase (SOD), primeiro mecanismo de defesa enzimática, catalisa a conversão do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), formado por uma redução anómala na molécula de oxigénio (O_2) que fica com um eletrão (e^-) desemparelhado, em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Yu, 1994). O peróxido de hidrogénio (subproduto prejudicial) pode ser, por sua vez, metabolizado pelas enzimas catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), separadamente ou em simultâneo – convertendo o peróxido de hidrogénio em espécies inócuas – ou, em alternativa, este converte-se em radical hidróxido (OH^\bullet), outro subproduto prejudicial (Cadenas e Davies, 2000; Regoli e Giuliani, 2014). A enzima CAT, decompõe o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigénio (O_2) (Regoli e Giuliani, 2014). A enzima GPx, com o auxílio da glutathione reduzida (GSH) – que

se oxida, e se transforma em glutathiona oxidada (GSSG) – como dador de eletrões, catalisa a conversão do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em água (H_2O) (**Figura 4.**) (Cadenas e Davies, 2000; Freitas *et al.*, 2017).

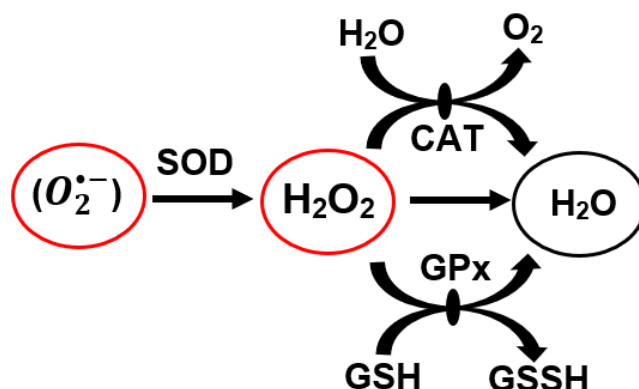


Figura 7. Mecanismos de stresse oxidativo envolvidos nos mecanismos de desintoxicação (Adaptado de Regoli e Giuliani, 2014).

No entanto, após exposição dos organismos a condições de stresse, os níveis de ERO podem exceder aqueles que são eliminados, devido a falhas ou insuficiências dos mecanismos de defesa das células, desenvolvendo-se um estado de stresse oxidativo (Regoli e Winston, 1999). Algumas consequências do excesso destas espécies nas células são a degradação de proteínas, danos no DNA (com eventuais consequências na expressão génica), a inativação de enzimas e a peroxidação de lípidos das membranas celulares, também designada por peroxidação lipídica (PLIP) – resultante do radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e/ou do radical hidróxido (OH^{\bullet}) – onde os lípidos atacados por ERO iniciam um processo oxidativo, gerando lípidos hidroperóxidos (LOOH) (Catalá, 2009; Regoli e Giuliani, 2014). Outro processo que pode surgir com o aumento de ERO, é a carbonilação proteica (CP), semelhante à PLIP, onde as proteínas são oxidadas (Gutteridge *et al.*, 2000).

Para combater as substâncias resultantes da PLIP, existe um mecanismo enzimático antioxidante que também envolve a GPx. Esta enzima, com o auxílio da glutathiona reduzida (GSH), que se oxida e se transforma em glutathiona oxidada (GSSG), reduz os lípidos hidroperóxidos em álcool lipídico estável (LOH) e assim neutraliza o ERO (De Marchi *et al.*, 2017, Regoli e Giuliani, 2014).

A glutathione redutase (GR), durante o processo de defesa enzimática, reduz a GSSG em GSH. Esta última, como importante antioxidante tecidual, neutraliza diretamente várias espécies reativas e atua como um cofator de enzimas antioxidantes, como dador de eletrões, restabelecendo o substrato para que a GPx, possa atuar eliminando o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e, em caso de dano oxidativo, os lípidos hidroperóxidos (LOOH) (Kehrer e Lund, 1994; Regoli e Giuliani, 2014). A conservação de altos níveis da relação entre a GSH e a GSSG permite a manutenção de um ambiente redutor intracelular e a sobrevivência celular, razão pela qual a determinação do rácio GSH/GSSG é útil como um indicador de stresse oxidativo em células e tecidos (Kehrer e Lund, 1994; Labudda, 2018). Em células e tecidos saudáveis, mais de 90% do total de glutathione está na forma reduzida (GSH) e a restante na forma oxidada (GSSG) (Halprin e Ohkawara, 1967; Regoli e Giuliani, 2014).

Numa situação de stresse, como a presença de contaminantes, as enzimas glutathione S-transferases (GSTs), grupo de enzimas envolvidas na biotransformação (necessária para desintoxicar as células), podem conjugar com o auxílio da glutathione reduzida (GSH) os compostos eletrofílicos ou os xenobióticos para facilitar a sua excreção (Freitas *et al.*, 2008). As GSTs atuam também na excreção de lípidos peroxidados na sua redução para álcool (LOH).

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) serve também como biomarcador, que pode ser determinado para compreender se as alterações do meio, como aumento da temperatura e a presença de poluentes, são capazes de ter um efeito neurotóxico sobre os organismos. A AChE impede a contração muscular contínua, desempenhando um papel importante no sistema neuromuscular (Marrs, 1994; Pohanka, 2011). A inibição da AChE pode resultar numa transmissão contínua e desordenada de impulsos nervosos (Huggett *et al.*, 1989). A atividade da enzima AChE é considerada um bom indicador para detetar contaminações resultantes de contaminantes (Cravo *et al.*, 2009). Sendo que a inibição de 20 % da atividade da AChE pode afetar a saúde geral dos bivalves e originar uma diminuição da produção de enzimas ou a redução da atividade das brânquias (Aguirre-martínez *et al.*, 2016; Huggett *et al.*, 1989; Marrs, 1994; US EPA, 1998). O eventual aumento da AChE nos bivalves pode ser explicado por uma possível ocorrência de apoptose,

por ruptura da membrana celular, ou como resultado de um efeito transitório de resposta à exposição a contaminantes, que pode originar um aumento da atividade das brânquias numa tentativa de atenuar os efeitos neurotóxicos (Fontes *et al.*, 2017; Aguirre-martínez *et al.*, 2016; Milan *et al.*, 2013).

2.6.1. Parâmetros fisiológicos

2.6.1.1. Taxa de respiração

No final de cada uma das duas fases experimentais foram de imediato realizadas as medições aos organismos recolhidos, necessárias para o cálculo das taxas de respiração (TR). As medições foram realizadas por respirometria estática simples, utilizando dois organismos do mesmo aquário por câmara respirométrica. Cada uma das câmaras, equipada com um ponto sensor de oxigénio fixado à parede interna, foi preenchida com a mesma água usada em cada um dos aquários (onde os organismos viveram durante o período experimental), até à sua capacidade máxima de 1 L – para evitar a formação de bolhas de ar aquando do fecho hermético das câmaras respirométricas.

Os organismos foram colocados nas câmaras respirométricas sob condições escuras e totalmente oxigenadas, onde estiveram a ser aclimatizados por 30 min, para evitar a influência do manuseamento na medição da TR. A leitura de dados para o cálculo da TR, através de um medidor de oxigénio multicanal (*PreSens GmbH*), foi registada em função da diminuição da concentração de O₂ (mg/L) ao longo de um período de duas horas, registando-se os seus valores a cada quinze min. Os dados foram registados utilizando-se o programa *PreSens Measurement Studio 2*.

Para além das medições aos organismos de cada um dos aquários das duas salas, foram também efetuadas medições simultâneas a uma câmara sem organismos, para se apurar as variações de oxigénio das câmaras ao longo das duas leituras (respiração de fundo). O cálculo das leituras permitiu estabelecer a taxa de respiração que foi expressa em mg de O₂ consumido por hora e por grama

de peso seco (PS). Os organismos utilizados para o cálculo da TR foram posteriormente congelados (-20 °C) para posteriores análises.

2.6.1.2. Índice de Condição

Para o cálculo do IC, o tecido mole de todos os organismos congelados, por cada condição, anteriormente utilizados para determinar a TR, foi cuidadosamente separado da concha e colocado na estufa a 60 °C por um período de 48 h. Após esse período, os tecidos moles (secos) e as respectivas conchas foram pesados e o IC calculado seguindo-se o procedimento de Matozzo *et al.* (2012). Os valores de IC foram expressos em percentagem, resultando da diferença entre o PS do tecido mole e o PS da concha, de acordo com a fórmula:

$$IC = \frac{\text{Peso Seco do Tecido (g)}}{\text{Peso Seco da Concha (g)}} * 100$$

O tecido seco que resultou desta fase foi homogeneizado e armazenado para ser ainda usado na quantificação de lípidos.

2.6.2. Parâmetros bioquímicos

O tecido mole (seco), dos organismos utilizados para o cálculo da TR, e posteriormente usados para o cálculo do IC, foi então submetido a um processo de homogeneização a seco, com o auxílio de um almofariz e um pilão, procedendo-se à sua separação em microtubos com 0,5 g de PS.

Os organismos congelados (-20 °C), que não foram submetidos a medição da TR, foram usados para a medição de outros parâmetros bioquímicos: CTE, GLI, SOD, CAT, GPx, GSTs, PLIP, GSH/GSSG, CP e AChE.

A concha destes organismos congelados foi removida e o tecido mole foi igualmente homogeneizado com um almofariz e um pilão e utilizando-se azoto líquido para evitar descongelar. O tecido mole (fresco) homogeneizado foi distribuído por microtubos com 0,5 g de peso fresco (PF).

Para cada parâmetro bioquímico, foi utilizado um tampão específico na extração do sobrenadante, utilizando-se uma proporção de 1:2 (0,5 g de tecido por 1 mL de tampão de extração). A extração do sobrenadante foi realizada da seguinte forma: primeiro, foi adicionada uma esfera de aço inoxidável em cada microtubo (já com amostra de tecido); de seguida, o microtubo com a amostra foi levado ao homogeneizador *TissueLyser II* (Qiagen) durante um min; e finalmente, o microtubo foi colocado na centrífugadora *Multifuge 3* (Heraeus) a uma velocidade de 10000 rpm, ou 3000 rpm nas amostras para o cálculo de CTE, durante vinte min e a uma temperatura de 4 °C – o LIP é realizado a 3500 rpm a 10 °C durante 10 min. Os tempos e velocidades variaram, pois cada partícula (componente biológico) sedimenta com uma velocidade que depende da sua massa e tamanho.

O depósito (sedimento que permanece compactado no fundo) foi descartado e os sobrenadantes com os componentes biológicos de menores dimensões necessários para o estudo de cada um dos biomarcadores foram armazenados em novos microtubos para serem de imediato usados na sua determinação ou guardados (-20 °C) para determinações posteriores. Em cada biomarcador foram usadas duas réplicas de cada amostra de tecido de forma a obter um maior nível de confiança e um consequente menor desvio padrão associado à média das várias réplicas.

2.6.2.1. Capacidade metabólica

Cadeia de transporte de eletrões

A atividade da CTE foi medida seguindo o método de King e Packard (1975) e as modificações de Coen e Janssen (1997). Para a extração do sobrenadante foi usado o tampão de extração com Tris-HCl 0,1 M, polivinilpirrolidona (PVP) a 15 % (p/v), sulfato de magnésio 153 mM ($MgSO_4$) e Triton X-100 a 0,2% (v/v), pH 8,5. Porções de 35,7 µL de sobrenadante foram colocadas por poço da microplaca, com 107 µL de solução tampão de diluição (Tris-HCl 0,13 M, Triton X-100 a 0,3 % (v/v), pH 8,5) e 35,7 µL de NAD (P) H (NADH 1,7 mM e NADPH 250 µM, pH 8,5). A reação iniciou-se após a adição de 71,4 µL de p-iodonitrotetrazolio (INT) 8mM. A

medição da absorvância foi efetuada durante 10 min a 490 nm, com intervalos de 25 s. O coeficiente de extinção molar de $15.900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi usado para calcular a quantidade de formazan formado e os resultados foram expressos em $\text{nmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ por g de PF.

2.6.2.2. Reservas de energia

Glicogénio

O conteúdo em GLI foi medido de acordo com o método do ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), utilizando soluções padrão de glicose (de 0 a 5 mg/mL) para criar a reta padrão. Para a extração do sobrenadante foi usado o tampão de extração com dihidrogenofosfato de sódio monohidratado 50 mM, hidrogenofosfato dissódico dihidratado 50 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, 1 % (v/v) de Triton X-100, 1 % (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP), ditiotreitól (DDT) 1 mM, pH 7,0. Para a determinação do GLI foram pipetados 10 μL de sobrenadante para um microtubo, onde foram adicionados 100 μL de fenol (5 %) e 600 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 96 %). A medição da absorvância foi medida a 492 nm após as amostras serem incubadas por 30 min, à temperatura ambiente, e após 300 μL terem sido pipetados para cada poço da microplaca. Os resultados foram expressos em mg por g de PF.

Lípidos

O conteúdo de LIP foi determinado seguindo os métodos desenvolvidos por Folch, Lees e Sloane (1956) e Cheng, Zheng e VanderGheynst (2010), utilizando o padrão de glicose (de 0 a 100 %) para criar a reta padrão. Primeiro, foram pesadas 10 mg de amostra de tecido seco, em seguida adicionou-se 5 mL de uma mistura de clorofórmio e metanol (na proporção 2:1) e agitou-se no vortex. Após a agitação, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 3500 rpm, a uma temperatura de 10 °C. Os padrões e as amostras foram então colocados em tubos, de 1 mL cada, e deixados na estufa a 50 °C, durante 12 h, tendo as amostras sido retiradas e adicionado 1 mL de ácido sulfúrico (95 %). Depois de agitadas e deixadas a

repousar por 10 min a uma temperatura de 100 °C, foram colocadas em gelo (de forma a parar a reação) sendo novamente introduzidas no agitador vortex. De cada tubo foram retirados 200 µL de amostra e adicionados 5 mL de solução de vanilina, tendo sido colocados à temperatura ambiente, num local escuro, durante uma hora, de forma a desenvolver cor. A absorvância foi medida a 520 nm em cuvetes de vidro e os resultados foram expressos em percentagem por mg de PS.

2.6.2.3. Stresse oxidativo

2.6.2.3.1. Danos celulares e balanço redox

Peroxidação lipídica

Os níveis da PLIP foram quantificados seguindo o método descrito por Ohkawa (1979), com modificações referidas por Carregosa (2014). Os sobrenadantes foram extraídos usando o tampão de extração com 20% (v/v) de ácido tricloroacético (TCA). Foram preparados, em microtubos, 100µL de sobrenadante. A cada microtubo foram adicionados 400 µL de TBA (ácido tiobarbitúrico a 0,5 % em 20 % de TCA (v/v)) e 300 µL de TCA. Todas as amostras foram incubadas na estufa a 96 °C, por 25 min, e a reação foi interrompida por transferência das amostras para o gelo. Posteriormente, foram pipetados 300 µL de cada amostra para cada poço da microplaca e a absorvância foi medida a 535 nm ($\epsilon=156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) tendo sido os resultados expressos em nmol (equivalentes de malonaldeído (MDA) formados) por g de PF.

Carbonilação proteica

Os níveis da CP foram medidos de acordo com o método alcalino DNPH, descrito por Mesquita *et al.* (2014). Para a extração do sobrenadante foi usado o tampão de extração com dihidrogenofosfato de sódio monohidratado 50 mM, hidrogenofosfato dissódico dihidratado 50mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM , 1 % (v/v) de Triton X-100, 1 % (v/v) de polivinilpirrolidona (PVP), ditiotreitól (DDT) 1nM, pH 7,0. Para a determinação da CP, foram colocados 120

μL de sobrenadante por poço da microplaca e adicionados 12 μL de DNPH (10 mM em 2 M de HCl). Após incubação por 10 min à temperatura ambiente, foram adicionados 60 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (NaOH) 6 M por poço da microplaca, sendo as amostras novamente incubadas por mais 10 min. A medição da absorvância foi realizada a 450 nm ($\epsilon=22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) com os resultados expressos em nmol (de grupos de proteína carbonila formados) por g PF.

Glutationa reduzida e glutathione oxidada

O conteúdo em GSH e GSSG foi medido de acordo com o método de (Rahman *et al.*, 2014). O rácio GSH/GSSG foi calculado dividindo os valores de GSH por duas vezes o valor de GSSG. Para a extração do sobrenadante de GSH e GSSG foi usado o tampão de extração com 0,1 % Triton X-100 e 0,6 % ácido sulfosalísílico, dihidrogenofosfato de sódio monohidratado 50 mM, hidrogenofosfato dissódico dihidratado 50 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, 1 % (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP), ditiotretol (DDT) 1 mM, pH 7,5).

Para criar a reta padrão da GSH foram usados padrões de glutathione oxidada (de 0 a 90 μmol L⁻¹). Para a determinação da GSH foram colocados 233 μL de tampão fostato (com dihidrogenofosfato de sódio monohidratado 50mM, hidrogenofosfato dissódico desidratado 50mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, 1 % (v/v) de Triton X-100, 1 % (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP), ditiotretol (DDT) 1 mM, pH 7,0), 33,3 μL de sobrenadante e 20 μL de DTNB – 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico ácido) – 100mM. A medição da absorvância foi realizada a 412 nm e os resultados expressos em nmol por PF.

Foram usados padrões de glutathione reduzida (de 0 a 90 μmol L⁻¹) para gerar a reta padrão da GSSG. Para a sua determinação foram colocados 193 μL de tampão fostato (dihidrogenofosfato de sódio monohidratado 50 mM, hidrogenofosfato dissódico dihidratado 50mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, 1 % (v/v) de Triton X-100, 1 % (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP), ditiotretol (DDT) 1 mM, pH 7,0), 33,3 μL de sobrenadante, 40 μL de DTNB – 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico ácido) – com GR 100 mM, e 20 μL de nicotinamida

adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) 250 μ M. A medição da absorvância foi realizada a 412nm com os resultados expressos em nmol por PF.

2.6.2.3.2. Defesas antioxidantes e de biotransformação

Superóxido dismutase

A atividade da SOD foi calculada com base no método de Beauchamp (1971), utilizando o padrão de superóxido dismutase (de 0,25 a 60 U/mL) para criar a reta padrão. Para a extração do sobrenadante foi usado o tampão de extração com dihidrogenofosfato de sódio monohidratado 50mM, hidrogenofosfato dissódico dihidratado 50 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, 1 % (v/v) de Triton X-100, 1 % (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP), ditioneitol (DDT) 1 mM, pH 7,0. Para a determinação da SOD foram colocados 25 μ L de cada amostra, 25 μ L de xantina oxidase 56,1 mU/mL e 250 μ L de tampão de reação (Tris-HCl 50 mM, ácido dietilenotriamino pentacético (DTPA) 0,1 mM, hipoxantina 0,1 mM, azul de nitrotetrazólio (NBT) 68,4 μ M, pH 8,0) por poço da microplaca. As amostras foram a incubar no agitador, durante 20 min, à temperatura ambiente. Após incubação, a absorvância foi medida a 560 nm. Os resultados foram expressos em unidade (U) por g PF, onde uma unidade de atividade enzimática corresponde a uma redução de 50 % do azul de nitrotetrazólio (NBT).

Catalase

A atividade da CAT foi quantificada seguindo o método de Johansson (1988), utilizando o padrão de formaldeído (de 0 a 150 μ M) para criar a reta padrão. Para a extração do sobrenadante foi usado o tampão de extração com dihidrogenofosfato de sódio monohidratado 50 mM, hidrogenofosfato dissódico desidratado 50mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1mM, 1% (v/v) de Triton X-100, 1 % (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP), ditioneitol (DDT) 1 mM, pH 7,0. Para o cálculo da CAT, foram colocados 125 μ L de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), 37,5 μ L de metanol e 25 μ L de cada amostra ou de cada padrão em cada poço da microplaca. Depois, foram adicionados 25 μ L de peróxido de hidrogénio 32,28 mM para começar a reação. De seguida, as microplacas foram

incubadas no agitador, por 20 min, à temperatura ambiente, para que a reação ocorresse e, no final desse período, foram adicionados 37,5 μL de hidróxido de potássio (KOH) 10 M e 37,5 μL de purpaldol 34,2 mM para parar a reação. As microplacas foram novamente incubadas no agitador durante mais 10 min. No final deste procedimento, foram adicionados 12,5 μL de peróxido de potássio 65,2mM e as microplacas foram mais uma vez incubadas no agitador durante um período de 5 min. A medição da absorvância foi realizada a 540 nm e os resultados expressos em U por g FW. Uma unidade (U) é definida como a formação de 1nmol formaldeído por min.

Glutathione peroxidase

A atividade da GPx foi determinada seguindo o método de Paglia (1967). Para a extração do sobrenadante foi usado o tampão de extração com dihidrogenofosfato de sódio monohidratado 50 mM, hidrogenofosfato dissódico desidratado 50mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, 1% (v/v) de Triton X-100, 1 % (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP), ditiotretol (DDT) 1mM, pH 7,0. Para a determinação de GPx, foram colocadas em cada poço da microplaca 30 μL de amostra, 112,5 μL de tampão diluição (50 mM Tris-HCl pH 7,6 e 5 mM EDTA), 60 μL de GSH 5 mM, 45 μL de hidroperóxido de cumeno (CHP) 2 mM e 30 μL de glutathione redutase (GS) 2,5 U/mL. Foram adicionados 22,5 μL de NADPH 250 μM , para iniciar a reação e, após homogeneização por alguns S, a medição de absorvância foi realizada a 340 nm, durante 5 min em intervalos de 10 S. Foi usado o coeficiente de extinção $0,00522 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e os resultados foram expressos em unidade (U) por g PF onde uma U corresponde à quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 μmol de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) por min.

Glutathione S-transferases

A atividade das GSTs foi quantificada seguindo o método de Habig (1976). Para a extração do sobrenadante foi usado o tampão de extração com dihidrogenofosfato de sódio monohidratado 50 mM, hidrogenofosfato

dissódico desidratado 50 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, 1% (v/v) de Triton X-100, 1 % (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP), ditioneitol (DDT) 1 mM, pH 7,0. Para a determinação da GSTs foram colocados 10 0µL de amostra e 200 µL solução reação: tampão de diluição (difosfato dipotássico e fosfato monopotássico 0,1 M, pH 7,0), GSH 10mM e dinitroclorobenzen (CDNB) 60 mM, pH 6,5. A absorvância foi medida a 340 nm, durante 5 min, com leituras a cada 10 S, e a atividade da GSTs foi determinada usando um coeficiente de extinção de 9,6 mM cm⁻¹. Os resultados foram expressos como U por g de PF.

2.6.2.4. Neurotoxicidade

Acetilcolinesterase

Para o cálculo da atividade da AChE foi seguido o método de Ellman *et al.* (1961). Para a extração do sobrenadante foi usado o tampão de extração com dihidrogenofosfato de sódio monohidratado 50 mM, hidrogenofosfato dissódico dihidratado 50 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, 1 % (v/v) de Triton X-100, 1 % (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP), ditioneitol (DDT) 1 mM, pH 7,0. Para a determinação da AChE, foram adicionados a cada poço da microplaca 220 µL de fosfato dipotássico 100mM, 50µL de DTNB – 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico ácido) – 100 mM, 10 µL de sobrenadante e, para começar a reação, foi adicionado 20 µL de iodeto de acetiltiocolina (AChI) 5 mM. A atividade enzimática foi registrada continuamente durante um período de 5 min a uma absorvância de 412 nm e foram expressas em nmol por min por g de PF, usando um coeficiente de extinção molar de 13,6x10³ M⁻¹cm⁻¹.

2.7. Análise de dados

Os valores de cada parâmetro fisiológico e bioquímico, analisados nas duas fases experimentais, foram submetidos a uma análise de variância multivariada permutacional, com o programa *PRIMER* 6, utilizando-se a aplicação *PERMANOVA+* (Anderson *et al.*, 2008).

Os valores dos testes resultantes do *PERMANOVA*+ foram avaliados tomando-se em consideração a ocorrência de diferença significativa – considerou-se diferença significativa os valores iguais ou inferiores a 0,05. Para as duas fases experimentais foi apresentada a seguinte hipótese nula:

- para cada biomarcador não houve diferenças significativas entre as condições de exposição (CTL 30D 17°C/8,1, CTL 7D 17°C/8,1, TCS 17°C/8,1, DIC 17°C/8,1, TPH 30D 20°C/7,7, TPH 7D 20°C/7,7, TCS 20°C/7,7, DIC 20°C/7,7).

Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as condições de exposição foram representadas nas figuras e tabelas com diferentes letras minúsculas.

Capítulo 3

Resultados

3.1. Caracterização do sistema carbonato da água

Relativamente aos resultados dos parâmetros físico-químicos do sistema de carbonato e da sua variação, para cada condição nos 37 dias experimentais (**Tabela 1**), observou-se um aumento da pressão parcial de CO_2 , um aumento na concentração dos iões de bicarbonato e diminuição da concentração de iões de carbonato da água dos aquários da sala teste (17 °C/pH 8,1) para a água dos aquários da sala teste (20 °C/pH 7,7), que resultaram numa diminuição do estado de saturação da calcite e da aragonite na água dos aquários, expostos a TPH 30D, TPH 7D, TCS e DIC na sala de teste. Tendo ocorrido nas referidas exposições uma diminuição de 81,2 % de aragonite e de 82,0 % de calcite.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos do sistema de carbonato (valores médios \pm desvio padrão; número de repetições = 15). Valores médios de pH, temperatura (T), salinidade (S) e alcalinidade total determinada (A_T) das amostras recolhidas nas duas fases experimentais de cada condição concentrações. Pressão parcial de CO_2 ($p\text{CO}_2$), iões carbonato (CO_3^{2-}), concentração de iões de bicarbonato (HCO_3^-), estado de saturação da calcite (Ω_{Cal}) e da aragonite (Ω_{Ag}) calculados com o software *CO2SYS Calc*.

Condição Parâmetros	1ª Fase		2ª Fase					
	CTL 30D	TPH 30D	Sala Controlo			Sala Teste		
			CTL 7D	TCS 7D	DIC 7D	CTL 7D	TCS 7D	DIC 7D
pH	8,09 \pm 0,01	7,69 \pm 0,03	8,09 \pm 0,01	8,08 \pm 0,01	8,08 \pm 0,01	7,70 \pm 0,02	7,71 \pm 0,02	7,70 \pm 0,03
T (°C)	17,1 \pm 0,3	20,2 \pm 0,2	16,9 \pm 0,2	17,0 \pm 0,1	17,1 \pm 0,1	20,0 \pm 0,1	19,9 \pm 0,2	20,1 \pm 0,2
S	25,1 \pm 0,2	25,2 \pm 0,2	25,0 \pm 0,2	25,0 \pm 0,1	25,1 \pm 0,2	25,1 \pm 0,2	25,0 \pm 0,1	25,1 \pm 0,1
A_T ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)	1933 \pm 137	2107 \pm 163	1994 \pm 116	1942 \pm 122	1962 \pm 97	2238 \pm 177	2183 \pm 145	2204 \pm 184
$p\text{CO}_2$ (μatm)	466 \pm 34	1410 \pm 115	478 \pm 28	479 \pm 31	485 \pm 25	1459 \pm 116	1396 \pm 94	1439 \pm 128
HCO_3^- ($\mu\text{mol kg}^{-1}$)	1695 \pm 12	1986 \pm 16	1752 \pm 10	1709 \pm 11	1726 \pm 87	2099 \pm 18	2055 \pm 14	2076 \pm 18
CO_3^{2-} ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$)	96,49 \pm 7,0	50,10 \pm 3,9	98,75 \pm 5,8	94,45 \pm 6,1	95,99 \pm 4,9	53,66 \pm 4,3	53,41 \pm 3,6	53,24 \pm 4,5
Ω_{Ag}	1,54 \pm 0,17	0,81 \pm 0,07	1,57 \pm 0,09	1,50 \pm 0,10	1,53 \pm 0,08	0,87 \pm 0,07	0,86 \pm 0,06	0,86 \pm 0,07
Ω_{Ca}	2,46 \pm 0,18	1,28 \pm 0,10	2,51 \pm 0,15	2,40 \pm 0,15	2,44 \pm 0,12	1,38 \pm 0,11	1,37 \pm 0,09	1,36 \pm 0,12

3.2. Determinação das concentrações de triclosan e diclofenac

A **Tabela 2** apresenta as concentrações obtidas das amostras de água dos aquários e dos tecidos das amêijoas *R. decussatus* expostas a TCS e DIC, durante 7 dias, nas condições CTL 7D, TPH 7D, TCS e DIC, em ambas as salas climáticas (controle e teste).

As concentrações obtidas nas amostras de água nas condições CTL e TPH foram inferiores ao limite de detecção (LOD) de 0,10 µg/L no caso do DIC e de 0,008 µg/L no caso do TCS. Nas condições DIC, os resultados da concentração do contaminante na água, logo após a sua adição, foram de $0,91 \pm 0,04$ µg/L para 17 °C/pH 8,1 e de $0,92 \pm 0,04$ µg/L para 20 °C/7,7. Na condição TCS, os resultados da concentração do contaminante na água, após a sua adição, foram de $0,82 \pm 0,16$ µg/L para 17 °C/pH 8,1 e de $0,72 \pm 0,15$ µg/L para 20 °C/7,7.

Relativamente à bioacumulação nos tecidos das amêijoas *R. decussatus*, a medição das amostras apresentou valores de PPCPs inferiores ao limite de detecção (LOD), de 5 ng/g PS no caso do DIC e 0,13 ng/g PS no caso do TCS, nas condições de CTL e TPH, em ambas as salas (17 °C/pH 8,1 e 20 °C/pH 7,7). A bioacumulação tecidual de DIC das amêijoas *R. decussatus* apresentou uma diferença de mais 38,8 % da condição DIC da sala controle ($40,0 \pm 1,0$ ng/g PS) relativamente à da condição DIC da sala de teste ($24,3 \pm 8,1$ ng/g PS). Na bioacumulação tecidual de TCS nas amêijoas foi registada uma diferença de mais 38,7 % da condição TCS da sala teste ($7,75 \pm 2,1$ ng/g PS) comparativamente à condição TCS da sala controle ($12,65 \pm 3,0$ ng/g PS).

Tabela 2. Bioacumulação nos tecidos e concentrações na água de triclosan e diclofenac. Resultado da análise das amostras da água (valores médios \pm desvio padrão; número de repetições = 36) e amostras de tecido (valores médios \pm desvio padrão; número de repetições = 3), após um período de exposição de 7 dias. LOD: limite de detecção (DIC água: 0,10 $\mu\text{g/L}$; DIC tecido: 5 ng/g PS; TCS água: 0,008 $\mu\text{g/L}$; TCS tecido: 0,13 ng/g PS). LOQ: limite de quantificação (DIC água: 0,30 $\mu\text{g/L}$; DIC tecido: 15 ng/g PS; TCS água: 0,025 $\mu\text{g/L}$; TCS tecido: 0,4 ng/g PS).

	Condição		Concentração Água ($\mu\text{g/L}$)	Bioacumulação Tecido (ng/g PS)
2ª Fase	Sala Controle (T: 17°C e pH: 8,1)	CTL 7D	< LOD	< LOD
		TCS 7D	0,82 \pm 0,16	12,65 \pm 3,02
		DIC 7D	0,91 \pm 0,04	40,00 \pm 1,01
	Sala Teste (T: 20°C e pH: 7,7)	TPH 7D	< LOD	< LOD
		TCS 7D	0,72 \pm 0,15	7,75 \pm 2,10
		DIC 7D	0,92 \pm 0,04	24,26 \pm 8,14

3.3. Exposição ao triclosan e diclofenac: parâmetros fisiológicos

3.3.1. Mortalidade

Após o período experimental de 37 dias, os organismos expostos a CTL 30D (17 °C/pH 8,1) apresentaram uma mortalidade de 22,7 %. No entanto, os organismos expostos a TPH 30D (20 °C/pH 7,7) apresentaram uma mortalidade de 9,6 % e os organismos expostos a DIC 7D (17 °C e pH 8,1) apresentaram uma mortalidade de 6,7 %. Nas restantes condições não se registaram taxas de mortalidade.

3.3.2. Taxa de respiração

Comparando os valores obtidos da TR (**Figura 8.A e Tabela 3**) em amêijoas *R. decussatus* registou-se um aumento significativo da TR na condição 17 °C/pH 8,1 quando as amêijoas foram expostas a TCS e a DIC em comparação as amêijoas que estavam na condição CTL. A mesma resposta foi observada quando as amêijoas foram expostas a 20 °C/pH 7,7. Relativamente à comparação dos valores

obtidos nas amêijoas expostas a diferentes temperaturas e pH (17 °C/pH 8,1 e 20 °C/pH 7,7) não se observou diferenças significativas entre as condições.

3.3.3. Índice de condição

Comparando os valores do IC (**Figura 8.B e Tabela 3**) nas amêijoas *R. decussatus* expostas à temperatura 17 °C/pH 8,1 observou-se que as amêijoas expostas a TCS e a DIC não registaram diferenças significativas quando comparadas aos indivíduos expostos à condição CTL. Resposta semelhante foi observada em amêijoas expostas TCS e a DIC à temperatura 20 °C/pH 7,7 quando comparadas com indivíduos expostos à condição TPH. Comparando os valores obtidos nas amêijoas expostas a diferentes temperaturas e pH (17 °C/pH 8,1 e 20 °C/pH 7,7) não se observaram diferenças significativas entre condições.

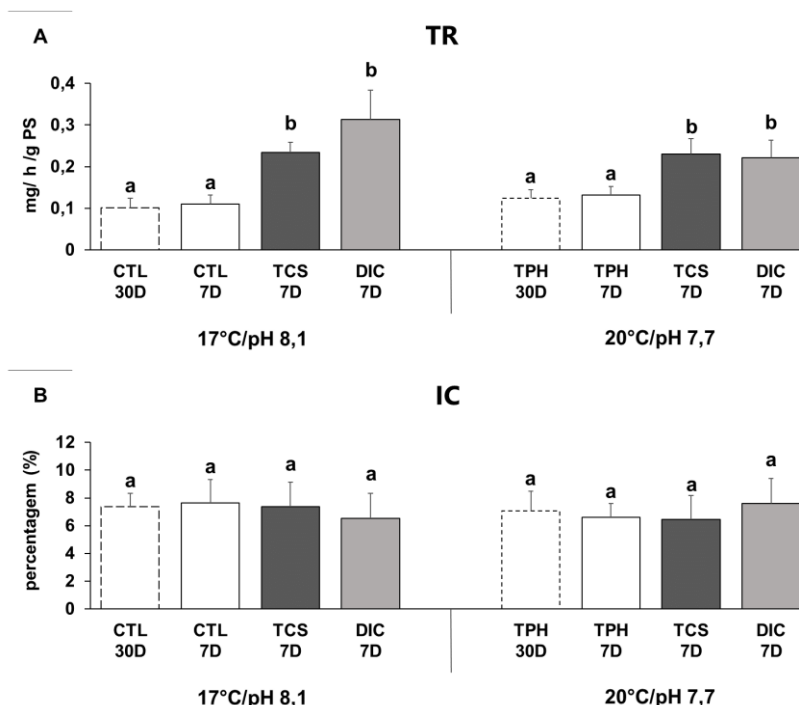


Figura 8. A: Taxa de respiração (TR); **B:** Índice de condição (IC) em espécimes de *Ruditapes decussatus* a diferentes condições de exposição: CTL 30D, CTL 7D TCS (1 µg/L), DIC (1 µg/L) à temperatura de 17°C e pH 8,1 (cenário climático de controlo); TPH 30D, TPH 7D, TCS (1 µg/L), DIC (1 µg/L) à temperatura de 20°C e pH 7,7 (cenário de alterações climáticas), durante 37 dias. Resultados apresentados como a média + desvio padrão (n= 9). As barras brancas a tracejado representam organismos na situação de controlo nos primeiros 30 dias, as barras brancas com traço sólido representam os organismos na situação de controlo nos seguintes 7 dias, as barras pretas representam os organismos expostos a TCS durante 7 dias e as barras cinzentas representam organismos expostos a DIC durante 7 dias. Letras diferentes representam diferenças significativas (p≤0,05) entre as condições.

3.4. Exposição ao triclosan e diclofenac: parâmetros bioquímicos

3.4.1. Capacidade metabólica

Comparando os valores obtidos da atividade da CTE (**Figura 9 e Tabela 3**) nas amêijoas *R. decussatus* expostas à temperatura 17 °C/pH 8,1 as amêijoas expostas a TCS e a DIC não registaram diferenças significativas quando comparadas ao CTL. O mesmo se observou na CTE das amêijoas expostas a DIC à temperatura 20 °C/pH 7,7, em comparação com as expostas a TPH. No entanto observou-se um decréscimo significativo das amêijoas expostas ao TCS à temperatura 20 °C/pH 7,7 em comparação com as amêijoas expostas a TPH. Relativamente à comparação dos valores obtidos nas amêijoas expostas a diferentes temperaturas e pH (17 °C/pH 8,1 e 20 °C/pH 7,7) observou-se uma diminuição significativa entre as amêijoas expostas a DIC à temperatura 17 °C/pH 8,1 e as expostas a DIC à temperatura 20 °C/pH 7,7.

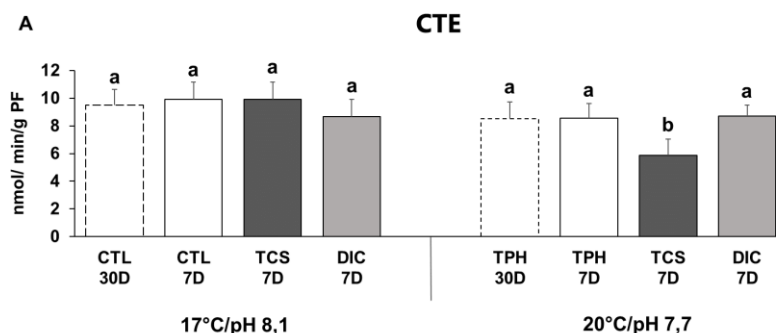
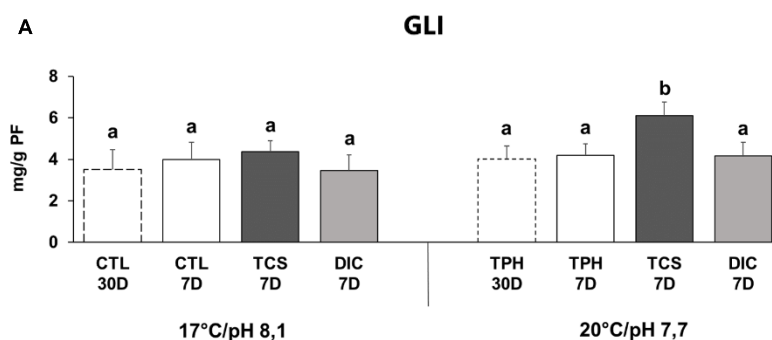


Figura 9. Atividade da cadeia de transporte de eletrões (CTE) em espécimes de *Ruditapes decussatus* a diferentes condições de exposição: CTL 30D, CTL 7D TCS (1 µg/L), DIC (1 µg/L) à temperatura de 17°C e pH 8,1 (cenário climático de controlo); TPH 30D, TPH 7D, TCS (1 µg/L), DIC (1 µg/L) à temperatura de 20°C e pH 7,7 (cenário de alterações climáticas), durante 37 dias. Resultados apresentados como a média + desvio padrão (n= 9). As barras brancas a tracejado representam organismos na situação de controlo nos primeiros 30 dias, as barras brancas com traço sólido representam os organismos na situação de controlo nos seguintes 7 dias, as barras pretas representam os organismos expostos a TCS durante 7 dias e as barras cinzentas representam organismos expostos a DIC durante 7 dias. Letras diferentes representam diferenças significativas (p≤0,05) entre as condições.

3.4.2. Reservas de energia

Comparando os valores medidos do conteúdo de GLI (**Figura 10.A e Tabela 3**) nas amêijoas *R. decussatus* expostas à temperatura 17 °C/pH 8,1 observou-se que as amêijoas expostas a TCS e a DIC não registaram diferenças significativas quando comparadas às expostas a CTL. O mesmo se observou nas amêijoas expostas a DIC, à temperatura 20 °C/pH 7,7, em comparação com as expostas a TPH. No entanto observou-se um aumento significativo do conteúdo em GLI nas amêijoas expostas ao TCS à temperatura 20 °C/pH 7,7. Relativamente à comparação dos valores obtidos nas amêijoas expostas a diferentes temperaturas e pH (17 °C/pH 8,1 e 20 °C/pH 7,7) observou-se um aumento significativo da atividade da CTE em amêijoas expostas a TCS à temperatura 20 °C/pH 7,7 em comparação com as expostas a DIC à temperatura 17 °C/pH 8,1.

Relativamente aos valores obtidos do conteúdo de LIP (**Figura 10.B e Tabela 3**) nas amêijoas *R. decussatus* expostas à temperatura 17 °C/pH 8,1 observou-se que os organismos expostos a TCS e a DIC registaram um decréscimo significativo do conteúdo de LIP quando comparado com o conteúdo de LIP observado nos organismos expostos ao CTL. O mesmo foi observado no conteúdo de LIP dos organismos expostos a TCS e a DIC à temperatura 20 °C/pH 7,7 quando comparados com os organismos expostos à condição de TPH. Comparando os valores obtidos nas amêijoas expostas a diferentes temperaturas e pH (17 °C/pH 8,1 e 20 °C/pH 7,7) não se observou diferenças significativas entre as condições.



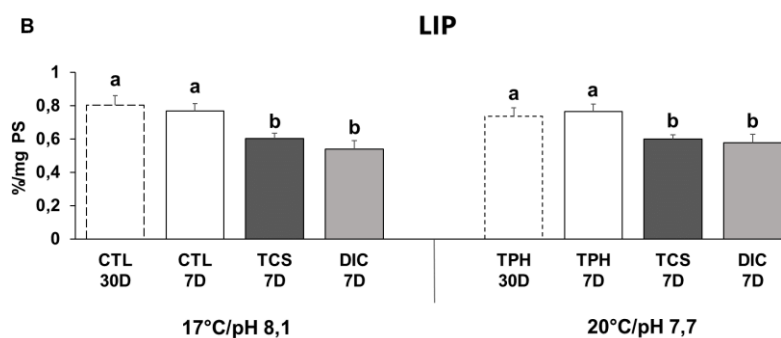


Figura 10. A: Conteúdo de glicogênio (GLI); **B:** Conteúdo de lípidos (LIP) em espécimes de *Ruditapes decussatus* a diferentes condições de exposição: CTL 30D, CTL 7D TCS (1 µg/L), DIC (1 µg/L) à temperatura de 17°C e pH 8,1 (cenário climático de controlo); TPH 30D, TPH 7D, TCS (1 µg/L), DIC (1 µg/L) à temperatura de 20°C e pH 7,7 (cenário de alterações climáticas), durante 37 dias. Resultados apresentados como a média + desvio padrão (n= 9). As barras brancas a tracejado representam organismos na situação de controlo nos primeiros 30 dias, as barras brancas com traço sólido representam os organismos na situação de controlo nos seguintes 7 dias, as barras pretas representam os organismos expostos a TCS durante 7 dias e as barras cinzentas representam organismos expostos a DIC durante 7 dias. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as condições.

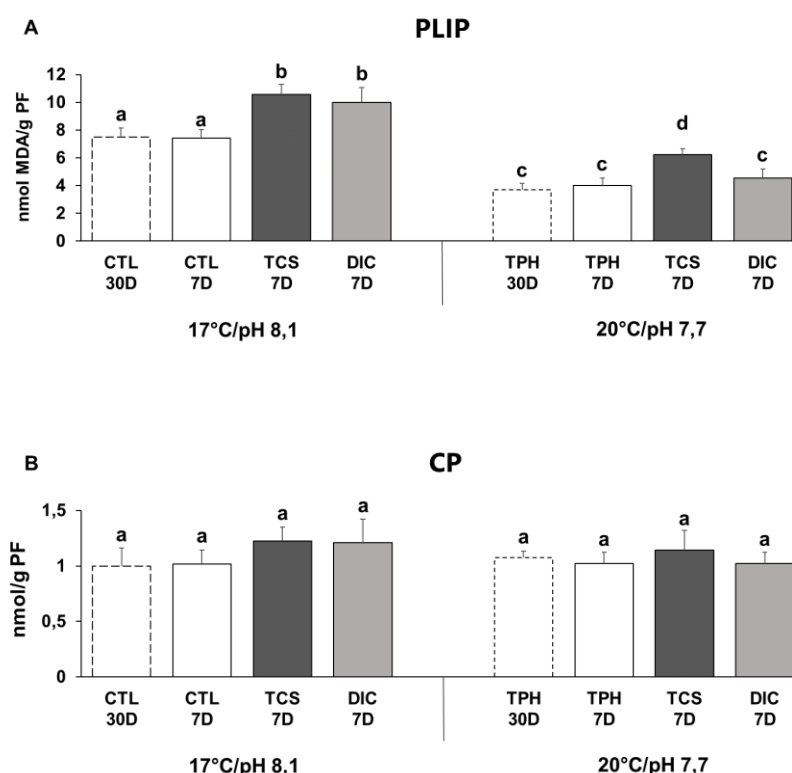
3.4.3. Stresse oxidativo

3.4.3.1. Danos celulares e balanço redox

Os valores obtidos para o nível da PLIP (**Figura 11.A e Tabela 3**) nas amêijoas *R. decussatus* expostas à temperatura 17 °C/pH 8,1 mostraram que as amêijoas expostas a TCS e a DIC registaram um aumento significativo do nível da PLIP em comparação com as amêijoas expostas a CTL. O mesmo se observou no nível da PLIP das amêijoas expostas a TCS e a DIC à temperatura 20 °C/ pH 7,7 quando comparado com o nível de PLIP das amêijoas expostas a TPH. Comparando os valores obtidos nas amêijoas expostas a diferentes temperaturas e pH (17 °C/pH 8,1 e 20 °C/pH 7,7) observou-se que o nível da PLIP foi significativamente maior nas amêijoas expostas a todas as condições à temperatura de 17 °C/pH 8,1 em comparação com as amêijoas expostas à temperatura de 20 °C/pH 7,7.

Comparando os valores obtidos do nível da CP (**Figura 11.B e Tabela 3**) em espécimes de amêijoas *R. decussatus* expostas à temperatura 17 °C/pH 8,1 não se observaram diferenças significativas entre condições, o mesmo acontecendo nos organismos à temperatura de 20 °C/pH 8,1. Comparando os valores obtidos das amêijoas expostas a diferentes temperaturas e pH (17 °C/pH 8,1 e 20 °C/pH 7,7) não se observaram diferenças significativas entre as condições.

Comparando os valores obtidos do rácio GSH/GSSG (**Figura 11.C e Tabela 3**) nas amêijoas *R. decussatus* expostas à temperatura 17 °C/pH 8,1 observou-se que as amêijoas expostas a TCS e a DIC registam um decrescimo significativo do rácio GSH/GSSG quando comparadas as amêijoas expostas ao CTL. O mesmo se observou no rácio GSH/GSSG das amêijoas expostas a TCS e DIC à temperatura 20 °C/pH 7,7 comparativamente às amêijoas expostas a TPH. Relativamente aos valores obtidos nas amêijoas expostas a diferentes temperaturas e pH (17 °C/pH 8,1 e 20 °C/pH 7,7) registou-se um decrescimo significativo do rácio GSH/GSSG nas amêijoas expostas a TCS e a DIC à temperatura de 17 °C/pH 8,1 em comparação com as amêijoas expostas a 20 °C/pH 8,1.



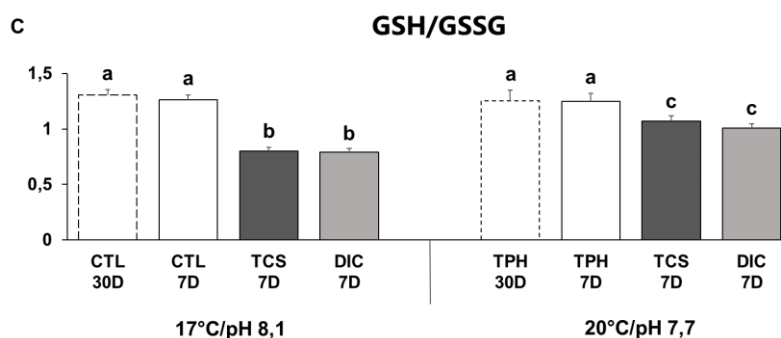


Figura 11. A: Nível da peroxidação lipídica (PLIP) nível; **B:** Nível da carbonilação proteica (CP); **C:** Rácio entre a Glutathiona reduzida e a Glutathiona oxidada (GSH/GSSG), em espécimes de *Ruditapes decussatus* a diferentes condições de exposição: CTL 30D, CTL 7D TCS (1 µg/L), DIC (1 µg/L) à temperatura de 17°C e pH 8,1 (cenário climático de controlo); TPH 30D, TPH 7D, TCS (1 µg/L), DIC (1 µg/L) à temperatura de 20°C e pH 7,7 (cenário de alterações climáticas), durante 37 dias. Resultados apresentados como a média + desvio padrão (n= 9). As barras brancas a tracejado representam organismos na situação de controlo nos primeiros 30 dias, as barras brancas com traço sólido representam os organismos na situação de controlo nos seguintes 7 dias, as barras pretas representam os organismos expostos a TCS durante 7 dias e as barras cinzentas representam organismos expostos a DIC durante 7 dias. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as condições.

3.4.3.2. Enzimas antioxidantes e de biotransformação

Relativamente aos resultados da atividade da SOD (**Figura 12.A e Tabela 3**) obtidos nas amêijoas *R. decussatus* expostas à temperatura 17 °C/pH 8,1 observou-se que as amêijoas expostas a TCS e a DIC apresentaram um aumento significativo da atividade da SOD em comparação com as amêijoas expostas ao CTL. O mesmo se observou na atividade da SOD das amêijoas expostas a TCS e a DIC em comparação com as amêijoas expostas à condição TPH. Comparando os valores obtidos da atividade da SOD das amêijoas expostas a diferentes temperaturas e pH (17 °C/pH 8,1 e 20 °C/pH 7,7) observou-se uma atividade significativamente maior em todas as condições à temperatura de 17 °C/pH 8,1 em comparação com as condições à temperatura de 20 °C/pH 7,7.

Observando os resultados obtidos da atividade da CAT (**Figura 12.B e Tabela 3**) nas amêijoas *R. decussatus* expostas à temperatura 17 °C/pH 8,1 observou-se que as amêijoas expostas a DIC apresentam um aumento significativo da atividade da CAT quando comparadas com as amêijoas expostas ao CTL. O

mesmo se observou na atividade CAT das amêijoas expostas a TCS e DIC à temperatura 20 °C/pH 7,7 em comparação com às expostas a TPH. Comparando os valores obtidos da atividade da CAT das amêijoas expostas a diferentes temperaturas e pH (17 °C/pH 8,1 e 20 °C/pH 7,7) observou-se uma atividade significativamente maior em todas as condições à temperatura de 17 °C/pH 8,1 em comparação as condições à temperatura 20 °C/pH 7,7.

Comparando os resultados da atividade da GPx (**Figura 12.C e Tabela 3**) obtidos nas amêijoas *R. decussatus* expostas à temperatura 17 °C/pH 8,1 observou-se que as amêijoas expostas a TCS e a DIC aumentaram significativamente a atividade da GPx quando comparadas às amêijoas expostas a CTL. O mesmo se observou na atividade da GPx das amêijoas expostas a DIC à temperatura 20 °C/pH 7,7 comparativamente às amêijoas expostas à condição TPH. Relativamente aos valores obtidos nas amêijoas expostas a diferentes temperaturas e pH (17 °C/pH 8,1 e 20 °C/pH 7,7) registou-se uma atividade significativamente maior na GPx nas amêijoas expostas a TCS à temperatura de 17 °C/pH 8,1 em comparação com as amêijoas as expostas a TCS à temperatura de 20 °C/pH 7,7.

Comparando os valores dos resultados da atividade das GSTs (**Figura 12.D e Tabela 3**) nas amêijoas *R. decussatus* expostas a TCS e a DIC à temperatura 17 °C/pH 8,1 não registaram diferenças significativas quando comparadas às que estavam na condição CTL. Nos organismos expostos à temperatura 20 °C/pH 7,7 observou-se que as amêijoas expostas a TCS e a DIC registaram um aumento significativo da atividade das GSTs quando comparadas com as amêijoas expostas a TPH. Comparando os valores obtidos das amêijoas expostas a diferentes temperaturas e pH (17 °C/pH 8,1 e 20 °C/pH 7,7) observou-se uma atividade significativamente maior nas amêijoas expostas a TCS e DIC à temperatura de 20 °C/pH 7,7 em comparação com as amêijoas expostas a TCS e DIC à temperatura 17 °C/pH 8,1.

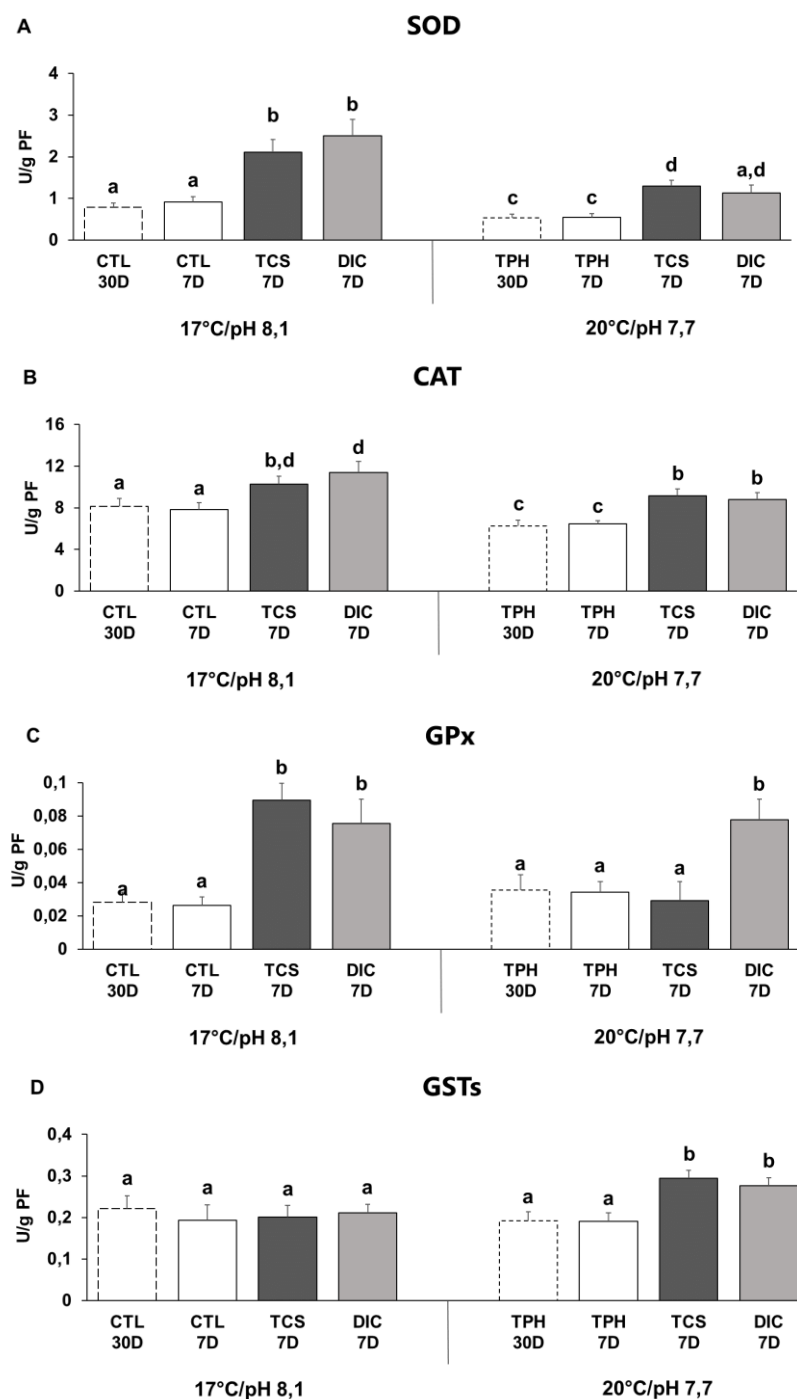


Figura 12. A: Atividade da superóxido dismutase (SOD); **B:** Atividade da cataláse (CAT); **C:** Atividade da glutatona peroxidase (GPx); **D:** Atividade da glutatona S-transferases (GSTs) em espécimes de *Ruditapes decussatus* a diferentes condições de exposição: CTL 30D, CTL 7D TCS (1 µg/L), DIC (1 µg/L) à temperatura de 17°C e pH 8,1 (cenário climático de controlo); TPH 30D, TPH 7D, TCS (1 µg/L), DIC (1 µg/L) à temperatura de 20°C e pH 7,7 (cenário de alterações climáticas), durante 37 dias. Resultados apresentados como a média + desvio padrão (n= 9). As barras brancas a tracejado representam organismos na situação de controlo nos primeiros 30 dias, as barras brancas com traço sólido representam os organismos na situação de controlo nos seguintes 7 dias, as barras pretas representam os organismos expostos a TCS durante 7 dias e as barras cinzentas representam organismos expostos a DIC durante 7 dias. Letras diferentes representam diferenças significativas (p≤0,05) entre as condições.

3.4.4. Neurotoxicidade

Os valores obtidos da AChE (**Figura 13 e Tabela 3**) nas amêijoas *R. decussatus* expostas à temperatura 17 °C/pH 8,1 mostram que as amêijoas expostas a TCS e a DIC não registaram diferenças significativas quando comparadas às expostas a CTL, observando-se a mesma resposta nas amêijoas *R. decussatus* expostas a TCS e DIC à temperatura 20 °C/pH 7,7 quando comparadas com as amêijoas expostas à condição TPH. Relativamente aos resultados obtidos nas amêijoas expostas a diferentes temperaturas e pH (17 °C/pH 8,1 e 20 °C/pH 7,7) também não se observaram diferenças significativas entre as condições.

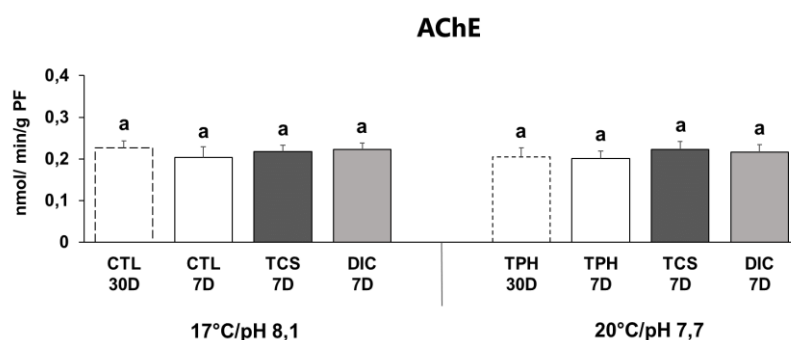


Figura 13. Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em espécimes de *Ruditapes decussatus* a diferentes condições de exposição: CTL 30D, CTL 7D TCS (1 µg/L), DIC (1 µg/L) à temperatura de 17°C e pH 8,1 (cenário climático de controlo); TPH 30D, TPH 7D, TCS (1 µg/L), DIC (1 µg/L) à temperatura de 20°C e pH 7,7 (cenário de alterações climáticas), durante 37 dias. Resultados apresentados como a média + desvio padrão (n= 9). As barras brancas a tracejado representam organismos na situação de controlo nos primeiros 30 dias, as barras brancas com traço sólido representam os organismos na situação de controlo nos seguintes 7 dias, as barras pretas representam os organismos expostos a TCS durante 7 dias e as barras cinzentas representam organismos expostos a DIC durante 7 dias. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as condições.

Tabela 3. Dados de todos os biomarcadores avaliados (média condição e desvio padrão), o símbolo ▲ representa um aumento significativo, o símbolo ▼ representa uma diminuição significativa e o símbolo = representa que não houve diferença significativa, em relação ao controle.

		17 °C/pH 8,1								20 °C/pH 7,7							
		CTL 30D		CTL 7D		TCS 7D		DIC 7D		TPH 7D		TPH 7D		TCS 7D		DIC 7D	
TR (mg/h/g)	Média Condição	0,12	-	0,11	=	0,21	▲	0,31	▲	0,16	=	0,16	=	0,23	▲	0,22	▲
	Desvio Padrão	0,01	-	0,01	=	0,04		0,08		0,01	=	0,02	=	0,04		0,04	
IC (%)	Média Condição	7,4	-	7,6	=	7,3	=	5,5	=	7,0	=	6,9	=	6,4	=	7,6	=
	Desvio Padrão	0,8	-	1,7	=	1,8	=	2,2	=	1,6	=	1,3	=	2,4	=	2,6	=
ETS (nmol/ min/g)	Média Condição	9,5	-	9,9	=	9,9	=	8,6	=	8,5	=	8,5	=	5,9	▼	8,7	=
	Desvio Padrão	1,1	-	1,3	=	1,3	=	1,3	=	1,2	=	1,3	=	1,2		1,4	=
GLY (mg/g)	Média Condição	4,5	-	4,8	=	4,6	=	4,4	=	4,0	=	4,2	=	5,7	▲	4,2	=
	Desvio Padrão	0,7	-	0,3	=	0,4	=	0,8	=	0,6	=	0,6	=	0,3		0,7	=
LIP (%/mg)	Média Condição	0,80	-	0,78	=	0,65	▼	0,60	▼	0,75	=	0,75	=	0,61	▼	0,59	▼
	Desvio Padrão	0,02	-	0,03	=	0,03		0,04		0,01	=	0,02	=	0,03		0,05	
SOD (U/g)	Média Condição	0,8	-	0,9	=	2,1	▲	2,5	▲	0,5	▼	0,5	▼	1,3	▲	1,1	▲
	Desvio Padrão	0,1	-	0,1	=	0,5		0,4		0,1		0,1		0,1		0,1	
CAT (U/g)	Média Condição	8,1	-	7,8	=	10,2	▲	11,3	▲	6,3	▼	6,5	▼	9,2	▲	8,8	▲
	Desvio Padrão	0,7	-	0,6	=	0,8		1,1		0,5		0,3		0,7		0,6	
GPx (U/g)	Média Condição	0,02	-	0,03	=	0,07	▲	0,05	▲	0,03	=	0,03	=	0,03	=	0,06	▲
	Desvio Padrão	0,01	-	0,01	=	0,01		0,02		0,01	=	0,01	=	0,01	=	0,01	
GSTs (U/g)	Média Condição	0,22	-	0,19	=	0,20	=	0,21	=	0,19	=	0,19	=	0,28	▲	0,27	▲
	Desvio Padrão	0,03	-	0,04	=	0,03		0,03		0,02	=	0,02	=	0,02		0,02	
LPO (nmol MDA/g)	Média Condição	7,4	-	7,0	=	10,5	▲	10,0	▲	3,7	▼	4,0	▼	6,6	▲	4,6	▼
	Desvio Padrão	0,6	-	0,6	=	0,8		1,05		0,5		0,5		0,4		0,6	
CP (nmol/g)	Média Condição	1,0	-	1,0	=	1,1	=	1,2	=	1,1	=	1,0	=	1,1	=	1,0	=
	Desvio Padrão	0,2	-	0,1	=	0,1	=	0,2	=	0,1	=	0,1	=	0,2	=	0,1	=
GSH / GSSG	Média Condição	1,14	-	1,13	=	0,83	▼	0,83	▼	1,24	=	1,21	=	1,02	▼	1,01	▼
	Desvio Padrão	0,05	-	0,05	=	0,03		0,03		0,09	=	0,07	=	0,07		0,04	
AChE (nmol/ min/g)	Média Condição	0,22	-	0,20	=	0,20	=	0,20	=	0,21	=	0,20	=	0,22	=	0,21	=
	Desvio Padrão	0,01	-	0,02	=	0,03	=	0,02	=	0,02	=	0,02	=	0,01	=	0,02	=

Capítulo 4

Discussão

4.1. Contextualização

Diversas espécies de bivalves, como a *R. decussatus*, estão expostas a diferentes combinações de stresse no seu habitat natural. Existem vários estudos que revelam diferentes comportamentos adaptativos dos bivalves às diferentes pressões ambientais a que estão expostos, como por exemplo o fecho das valvas na amêijoia *R. philippinarum*, como medida de proteção, quando exposta a uma concentração de salinidade baixa, ou a amêijoia *Donax vittatus* que escava e se enterra rapidamente para se proteger das altas temperaturas (Anacleto *et al.*, 2014; Ansell *et al.*, 1980; Kim *et al.*, 2001; McLachlan *et al.*, 1995).

Algumas das mudanças e pressões a que os organismos aquáticos costeiros estão continuamente expostos no seu habitat são o aumento da temperatura e a diminuição do pH da água do mar. Fatores que, com um previsível rápido aquecimento do planeta e a acelerada acidificação dos oceanos, podem fazer exceder a tolerância máxima dos organismos e causar-lhes alterações fisiológicas e bioquímicas, cujas proporções são ainda pouco conhecidas.

É hoje igualmente importante conhecer impactos ao nível bioquímico e fisiológico de poluentes, considerados contaminantes emergentes, como os PPCPs (fármacos e produtos de cuidado pessoal), existindo a necessidade de perceber que efeitos podem causar e, no caso de acontecerem, como podem ser minimizados.

Assim, este estudo avaliou o desempenho fisiológico e bioquímico da espécie de amêijoia *R. decussatus* quando exposta a triclosan e a diclofenac (dois PPCPs) em dois ambientes controlados de temperatura e pH de forma a compreender se os efeitos provocados pelos dois contaminantes se amplificam nos organismos quando expostos previamente a condições de aumento de temperatura e diminuição de pH.

4.2. Determinação do sistema de carbonato

As amostras da água recolhidas para a caracterização do sistema carbonato mostraram variações físico-químicas da água dentro do previsto para habitats costeiros.

4.3. Concentrações de triclosan e diclofenac

As amostras da água e dos tecidos nas condições de CTL e TPH em ambos os cenários (17 °C/pH 8,1 e 20 °C/pH 7,7) mostraram valores abaixo dos limites de deteção de TCS e de DIC, garantindo-se a qualidade da água utilizada.

As concentrações de DIC nos tecidos das amêijoas *R. decussatus* mostraram que houve uma maior bioacumulação (aproximadamente 39 % – 15,7 ng/g PS) num cenário climático de controlo (17 °C/pH 8,1), comparativamente com o cenário de teste (20 °C/pH 7,7). Os valores das concentrações de TCS nos tecidos da *R. decussatus* revelaram também uma maior bioacumulação a 17 °C/pH 8,1 com uma diferença de mais 39 % (4,9 ng/g PS) relativamente à bioacumulação verificada a 20 °C/pH 7,7.

Na exposição a TCS as amêijoas *R. decussatus* a bioacumulação observada nos tecidos esteve entre os $7,75 \pm 2,1$ ng/g (condição teste 20 °C/7,7) e os $12,65 \pm 3,0$ ng/g PS (condição controlo 17 °C/8,1), valores que estão entre os encontrados em bivalves marinhos do mediterrâneo em ambiente natural, que registaram 1,7ng/g PS (mexilhões *Chamelea gallina*, do Espanha) e 2578 ng/g PS (mexilhões *M. galloprovincialis*, da Grécia) (Álvarez-Muñoz *et al.*, 2015; Gatidou *et al.*, 2010). Em relação ao DIC bioacumulado nos tecidos a variação situou-se entre $24,26 \pm 8,1$ ng/g PS (condição controlo) e os $40,00 \pm 1,0$ ng/g PS (TPH), valores que estão próximos dos já observados em diferentes bivalves em ambiente natural, cujos valores variaram entre 0,5 ng/L (mexilhões *M. edulis*, de Portugal) e 42,83 ng/L PS (mexilhões *M. galloprovincialis*, de Itália) (Cunha *et al.*, 2017; Mezzelani *et al.*, 2016). Freitas *et al.*, (2019b), demonstraram, com mexilhões *M. galloprovincialis* expostos a TCS (1 µg/L) e sujeitos a uma variação de temperatura (17 °C e 21 °C), durante 28 dias, uma maior bioacumulação na exposição a TCS a uma temperatura

de 17 °C. A variação da concentração de TCS e DIC em condições de temperatura e pH diferentes vai de encontro do que foi observado em mexilhões *M. galloprovincialis* expostos, durante 28 dias, a TCS (1µg/L) e a uma variação de temperatura de 17 °C e 22 °C, que registou uma menor bioacumulação quando a espécie foi sujeita a um aumento de temperatura (Pirone *et al.*, 2019). Um outro estudo realizado com mexilhões *M. galloprovincialis* expostos a TCS (1µg/L) e a DIC (1 µg/L) sem variação de temperatura, mas com variação de salinidade (25 e 30), durante 28 dias, observou uma bioacumulação maior no TCS comparativamente ao DIC, onde foi observado uma maior bioacumulação a uma salinidade de 25 comparativamente a uma salinidade de 30 (Freitas *et al.*, 2019a).

No presente estudo registou-se uma menor bioacumulação nos tecidos das amêijoas *R. decussatus* expostas a DIC ou a TCS, a uma temperatura de 20 °C e pH 7,7. A solubilidade na água de cada um dos PPCPs pode variar consoante as forças iónicas, o pH e a temperatura do meio em que se encontram, que aumenta normalmente quando cada um destes fatores aumenta isoladamente e em combinação (Jazbin e Klamt, 2007; Llina *et al.*, 2007; Montaseri *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2011). Esta menor bioacumulação observada nas amêijoas *R. decussatus*, resulta possivelmente da combinação da temperatura (20 °C), pH (7,7) e salinidade (25) – o grau de salinidade pode ter influenciado os resultados, mas a variação deste parâmetro não foi testada neste estudo. Esta combinação pode originar uma maior solubilidade, que resulta numa maior absorção, embora também possa resultar numa mais fácil eliminação do PPCP, por este se encontrar mais dissolvido. Outro fator que pode ter contribuído para a menor bioacumulação nesta temperatura e pH foi a ativação de enzimas envolvidas na biotransformação como as GSTs que podem conjugar os PPCPs para facilitar a sua excreção (Freitas *et al.*, 2008).

4.4. Exposição ao *triclosan* e *diclofenac*: respostas fisiológicas

4.4.1. Taxa de respiração

A taxa de respiração dos organismos responde a várias condições ambientais, físicas e químicas e pode ser um indicador ao nível das respostas dos ecossistemas aos PPCPs (Freitas *et al.*, 2019a; Rosi-Marshall *et al.*, 2013; Sabater *et al.*, 2007). Normalmente, o aumento da taxa de respiração (TR) tem sido observado como resposta fisiológica de bivalves quando expostos a poluentes (Radlvc *et al.*, 2007; Relexans, 1996).

Os resultados obtidos mostraram que *R. decussatus*, expostas a TCS ou a DIC em ambos os cenários climáticos (20 °C/pH 7,7 e 17 °C/pH 8,1), tendem a aumentar a sua TR quando comparadas com as amêijoas não contaminadas nas mesmas temperaturas e pH.

Sabe-se que sob moderada condição de stresse a taxa de respiração dos bivalves aumenta, como forma adaptativa, e que sob stresse severo esta diminui (Gestoso *et al.*, 2016; Portner *et al.*, 1999; Wenguang e Maoxian, 2012). Contudo, apesar de não existirem muitos estudos sobre os impactos dos PPCPs neste parâmetro fisiológico, foi observado um aumento da TR em estudos com amêijoas *Rangia cuneata* e mexilhões *Perna perna*, em ambiente natural contaminado (Hartwell *et al.*, 1991; Resgalla *et al.*, 2010). Contrariamente a estes estudos, foi observada uma diminuição da TR nos mexilhões *M. trossulus* quando expostos a concentrações elevadas de DIC (100 e 1000 µg/L) (Ericson *et al.*, 2010). A manutenção da TR foi, por sua vez, observada nos mexilhões *M. galloprovincialis* expostos a nanotubos de carbono apontando-se como causa o facto das concentrações do contaminante não serem suficientes para provocar impactos na TR (Andrade *et al.*, 2018).

Neste sentido, os resultados obtidos indicam que a presença destes contaminantes provocou uma moderada condição de stresse que causou um aumento da TR como resposta adaptativa e que pode fazer melhorar a sua capacidade de resistir ao stresse oxidativo. No entanto, o aumento da TR em ambos os cenários de temperatura e pH, indica que a concentração de TCS e DIC

testada é suficiente para alterar a capacidade respiratória de *R. decussatus*, que necessitam compensar o stress provocado pelos PPCPs com o aumento do consumo de oxigénio.

Embora o aumento da TR, em ambos os cenários climáticos, não apresente diferenças significativas, a menor bioacumulação tecidual registada nas amêijoas expostas a 20 °C/pH 7,7 parece indicar que os mecanismos de defesa e eliminação de compostos químicos utilizados (PPCPs) apresentam uma maior atividade, possivelmente resultante de um maior stresse nesta situação.

4.4.2. Índice de condição

O índice de condição (IC) é usado para caracterizar a aparente saúde das espécies de bivalves, mostrando a atividade fisiológica, como o crescimento e o peso, sob determinadas condições ambientais (Filgueira et al., 2013; Lucas e Beninger, 1985).

Os resultados do IC mostraram que as amêijoas expostas a TCS ou a DIC, em ambos os cenários climáticos (20 °C/pH 7,7 e 17 °C/pH 8,1), não apresentaram diferenças em comparação com os controlos às mesmas temperaturas e pH. A variação de temperatura e pH também não influenciou o IC das amêijoas expostas ao DIC e TCS.

Os resultados do IC obtidos no presente estudo aproximam-se de outros trabalhos científicos realizados com bivalves. É o caso do estudo realizado com amêijoas *R. philippinarum*, numa exposição de 22 dias a DIC (15 µg/L), que registou a manutenção do IC, em comparação com o controlo não contaminado (Trombini et al., 2019). Também em mexilhões *M. galloprovincialis*, expostos a diclofnac (0,25 µg/L) por um período 7 e 15 dias, não foram observadas diferenças no IC, em comparação com o controlo (Gonzalez-rey e Bebianno, 2014). No estudo com a espécie de mexilhões *M. trossulus*, expostos a DIC (133,33 µg/L) durante 5 dias, também não se observaram diferenças no IC (Swiacka et al., 2019). Também num estudo realizado com o fármaco carbamazepina (entre 0,03 e 9,00 µg/L), por um

período de 96 horas, *R. philippinarum* e *R. decussatus*, não apresentaram diferenças no IC, em comparação o controlo (Almeida *et al.*, 2014).

R. decussatus revela ser capaz de manter o peso e tamanho, não revelando stresse suficiente para alterar o IC, quando exposta a TCS ou a DIC, em ambos os cenários climáticos (20 °C/pH 7,7 e 17 °C/pH 8,1), o que também pode indiciar o aparecimento de um comportamento adaptativo capaz de resistir a condições de stresses comuns no seu habitat provocados pela exposição a contaminantes. O período experimental pode também não ter sido suficientemente longo para se observarem diferenças no IC entre as diferentes condições experimentais.

4.5. Exposição ao triclosan e diclofenac: respostas bioquímicas

4.5.1. Capacidade metabólica

A atividade da cadeia de transporte de eletrões (CTE), tem sido usada para estimar o consumo de energia a nível mitocondrial e assim obter informações do estado metabólico dos organismos (Simčič e Brancelj, 1997). É frequentemente aceite que a atividade metabólica está intimamente relacionada com a TR (consumo de oxigénio) – normalmente diminui a atividade metabólica quando a TR diminui e aumenta quando a TR aumenta (Schalk, 1988). Quando são expostos a condições de stresse, os bivalves podem aplicar estratégias adaptativas como o fecho das suas valvas durante alguns períodos, reduzindo a taxa de filtração para evitar a acumulação de poluentes (Kramer *et al.*, 1989; Lannig *et al.*, 2006). Normalmente, os bivalves apresentam uma depressão metabólica quando mantêm as valvas fechadas durante longos períodos, o que pode ser visível na diminuição da atividade na CTE (Anestis *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos revelaram que as amêijoas expostas a DIC, em ambos os cenários climáticos (20 °C/pH 7,7 e 17 °C/pH 8,1), e a TCS num cenário climático de controlo (17 °C/pH 8,1), foram capazes de manter o nível da CTE quando comparados com os controlos às mesmas temperaturas e pH. No entanto, quando expostas a TCS combinado com um aumento da temperatura (20 °C) e uma

diminuição do pH (7,7), as amêijoas apresentaram uma diminuição da CTE, em comparação com as amêijoas expostas às mesmas temperaturas e pH.

Num estudo realizado com mexilhões *M. galloprovincialis* expostos durante 28 dias a TCS (1 µg/L) e a DIC (1 µg/L), a uma temperatura de 18 °C, não se registaram variações da CTE relativamente ao controlo à mesma temperatura – no mesmo estudo foi verificado que o aumento da salinidade de 25 para 30 e para 35 a espécie registou uma redução da atividade da CTE (Freitas *et al.*, 2019a). Resultado semelhante foi observado com as amêijoas *R. philippinarum*, expostas durante 28 dias ao fármaco cetirizina (0,6 µg/L), numa condição de acidificação de 7,5, que não registou mudança da CTE, face ao controlo (pH 7,8) (Almeida *et al.*, 2018). Num outro estudo realizado com amêijoas *R. philippinarum*, expostas ao fármaco cetirizina durante 28 dias, os resultados indicaram uma manutenção da CTE para baixas concentrações (0,3 e 3 µg/L) do contaminante, no entanto, mostraram uma diminuição do metabolismo quando sujeitas a altas concentrações do fármaco (12 µg/L) (Almeida *et al.*, 2017). No entanto, num estudo com mexilhões *M. galloprovincialis*, expostos durante 28 dias a TCS (1 µg/L) combinado com um aumento de temperatura (22 °C), foi observada uma diminuição da atividade da CTE em comparação com os organismos que estavam no controlo à mesma temperatura, colocando a hipótese dos organismos terem fechado as valvas como mecanismo de defesa causando depressão metabólica (Pirone *et al.*, 2019).

As amêijoas *R. decussatus* do presente estudo demonstraram que são capazes de manter a sua capacidade metabólica, mesmo tendo havido um aumento da TR, possivelmente ativando comportamentos, como o fecho das valvas durante curtos períodos, quando sujeitas a DIC em ambos os cenários climáticos (20 °C/pH 7,7 e 17 °C/pH 8,1) e a TCS num cenário climático de controlo (17 °C/pH 8,1).

No entanto, a diferente capacidade metabólica de *R. decussatus*, quando expostas a TCS com mudanças climáticas – condição que também registou um aumento da TR – deve resultar de um maior stresse que esta combinação de fatores provocou, levando ao fecho das valvas por um período mais longo (de forma

a diminuir a produção de ERO na cadeia respiratória mitocondrial) e, consequentemente, a uma diminuição (depressão) da capacidade metabólica.

A redução e a manutenção da atividade da CTE sugere ainda que os mecanismos de defesa da amêijoas *R. decussatus* foram suficientes para suportar a concentração de PPCP utilizado e que a produção de ERO pode não ter sido muito elevada, já que a maior produção de ERO normalmente resulta de um aumento da atividade do sistema de transporte de elétrons na mitocôndria (Abele et al., 2002; Kushnareva et al., 2002).

4.5.2. Reservas de energia

A disponibilidade das reservas de energia, como o conteúdo do glicogénio (GLI) e dos lípidos (LIP), podem ser afetadas por stresses fisiológicos gerais, podendo ser usadas para avaliar o comportamento dos bivalves face a alterações como a temperatura e o pH (Cossu et al., 1997; Freitas et al., 2017; De Marchi et al., 2017; Mathieu e Lubet, 2011; Scott-fordsmand e Weeks, 2000). Sob condições de stresse, os bivalves podem usar as reservas de energia em mecanismos de defesa, como as enzimas antioxidantes, ou no reparo de danos a estruturas celulares, através da renovação de GLI e LIP danificado (Mathieu e Lubet, 2011; Smolders et al., 2004; Velez et al., 2016).

Os resultados obtidos neste estudo mostram que as amêijoas *R. decussatus* têm diminuição do conteúdo de LIP quando expostas a TCS ou a DIC, em ambos os cenários climáticos (20 °C/pH 7,7 e 17 °C/pH 8,1), comparativamente às amêijoas expostas às mesmas temperaturas e pH. Os resultados mostraram ainda que conteúdo de GLI subiu quando as amêijoas foram expostas a TCS num cenário de alterações climáticas (20 °C e pH 7,7), comparativamente ao controlo. No entanto, os resultados obtidos no conteúdo de LIP, quando as amêijoas estão expostas a TCS ou a DIC, em ambos os cenários climáticos (20 °C/pH 7,7 e 17 °C/pH 8,1) mostram que a espécie pode estar a mobilizar esta reserva energética para o reparo de estruturas danificadas ou para os mecanismos de defesa.

Resultados idênticos foram encontrados num estudo com mexilhões *M. galloprovincialis* quando expostos a TCS (1 µg/L) e a um aumento de temperatura de 22 °C, durante 28 dias, que também não registou diferenças nas reservas de energia, evidenciadas no conteúdo de GLI, comparativamente ao controlo (17 °C) (Pirone *et al.*, 2019). Em contrapartida, um estudo mostrou um aumento das reservas de energia (GLI) com mexilhões *M. galloprovincialis* expostos a TCS (1µg/L) e a uma temperatura de 21 °C, durante 28 dias, face ao controlo (17 °C) (Freitas *et al.*, 2019b). Um estudo realizado com *R. philippinarum* mostra que em situação de stresse, devido a uma subida de salinidade, as amêijoas diminuíram o conteúdo de LIP e, simultaneamente, aumentaram o conteúdo de GLI (Velez *et al.*, 2016).

Assim, *R. decussatus* mostram uma necessidade de mobilizar o conteúdo de LIP, o que sugere que os contaminantes testados causam stresse suficiente para aumentar o gasto das reservas de energia, provavelmente associado ao seu uso em mecanismos de defesa e/ou para reparo de danos às estruturas celulares (como lípidos danificados), quando expostas a TCS ou a DIC, em ambos os cenários climáticos (20 °C/pH 7,7 e 17 °C/pH 8,1). Mostrando ainda, no caso das amêijoas expostas a TCS, numa situação de mudanças climáticas, que o conteúdo de GLI, o único que registou uma variação em relação ao controlo, aumentou possivelmente devido à diminuição do metabolismo – observada na menor e única variação da atividade da CTE, registada na mesma condição.

4.5.3. Stresse oxidativo

4.5.3.1. Danos celulares e balanço redox

Mudanças ambientais extremas, onde a própria temperatura e a variação da acidificação dos oceanos podem ser incluídas, pode conduzir a uma superprodução de espécies reativas de oxigénio (ERO), que podem provocar stresse oxidativo e consequentemente danos oxidativos nas membranas celulares, com a ocorrência da peroxidação lipídica (PLIP) e da carbonilação proteica (CP) (Catalá, 2009; Gutteridge *et al.*, 2000; Regoli e Giuliani, 2014). A redução do rácio GSH/GSSG

indica que a GSH está a atuar diretamente contra o ERO (ao limpar o citosol) ou a restabelecer o substrato para a enzima GPx atuar contra o stresse e dano oxidativo (se ocorrer) na sua oxidação para a GSSG, criando um ambiente oxidativo das células (Kehrer e Lund, 1994; Labudda, 2018).

Os resultados mostram que as amêijoas expostas a TCS em ambos os cenários climáticos (20 °C/pH 7,7 e 17 °C/pH 8,1) e a DIC no cenário climático de controlo (17 °C/pH 8,1) sofrem um aumento do nível da PLIP, comparativamente com as amêijoas expostas às mesmas temperaturas e pH, sem contaminante. Mostrando também que entre ambos os cenários climáticos houve um maior nível da PLIP nas amêijoas expostas a TCS e a DIC no cenário climático de controlo. Os resultados mostraram também que as amêijoas *R. decussatus* expostas a TCS ou a DIC em ambos os cenários climáticos não registaram variações do nível da CP em comparação com as amêijoas expostas às mesmas temperaturas sem contaminantes. O aumento da temperatura e a diminuição do pH não influenciaram o nível de CP das amêijoas expostas a TSC e DIC. No entanto, nos mesmos cenários, registou-se uma redução do rácio de GSH/GSSG, com um decréscimo mais acentuado nas amêijoas expostas a uma temperatura de 17 °C/pH 8,1, tanto nas amêijoas expostas a TSC e DIC.

Estes resultados são idênticos a um estudo realizado com mexilhões *M. galloprovincialis*, onde se verificou um aumento do nível da PLIP e a manutenção da CP, quando expostos durante 28 dias a TCS (1 µg/L), a uma temperatura de 17 °C, relativamente ao controlo à mesma temperatura (Pirone *et al.*, 2019). O aumento do nível de PLIP foi também observado nas brânquias de amêijoas *R. philippinarum*, quando expostas durante 7 dias a DIC (0,5 µg/L) e com uma redução de pH (7,7), em comparação com o controlo com o mesmo pH (Munari *et al.*, 2018). Também num estudo com amêijoas *R. philippinarum*, foi verificado um aumento do nível da PLIP, quando estas foram expostas durante 7 dias a TCS (0,9 µg/L) a uma temperatura de 17 °C, em comparação com o controlo (Matozzo *et al.*, 2012).

No presente estudo, os níveis mais elevados de PLIP observados nas amêijoas *R. decussatus* expostas a um cenário de controlo sem contaminante em relação às amêijoas expostas ao cenário de alterações climáticas sem

contaminante, podem ser explicados por uma comum aclimação à variação de temperatura que desencadeia vários mecanismos e interações, como reestruturação da membrana celular, ajuste metabólico e capacidade antioxidante. A reestruturação da membrana celular dos organismos – possivelmente o mais importante desses mecanismos – induzida pelas variações de temperatura, envolve alterações nos níveis de insaturação dos fosfolipídios, onde os organismos podem apresentar um alto teor de ácidos gordos polinsaturados quando aclimatizados a temperatura mais baixas (Hazel e Williams, 1990; Moreira *et al.*, 2016). É possível que o estado de saturação das membranas influencie a suscetibilidade dos organismos à PLIP, uma vez que teores mais altos de ácidos gordos polinsaturados podem aumentar a propensão das membranas a reações de peroxidação (Crockett, 2008; Halliwell e Gutteridge, 1999). Assim os níveis mais altos de PLIP observados nas amêijoas *R. decussatus* exposta a 17 °C/pH 7,7 podem estar relacionados com o maior teor de ácidos gordos polinsaturados nas membranas das células.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram ainda que as amêijoas *R. decussatus* sofrem danos oxidativos nas moléculas dos lípidos das suas células, visível no aumento do nível da PLIP, quando expostas a TCS em ambos os cenários climáticos (20 °C/pH 7,7 e 17 °C/pH 8,1), e a DIC no cenário climático de controlo (17 °C/pH 8,1). Tal dever-se-á ao facto de as enzimas antioxidantes poderem não ter sido suficientemente eficazes a controlar e/ou neutralizar o excesso de ERO.

Contudo, as amêijoas *R. decussatus* aparentam ser capazes de controlar o ERO, quando expostas a DIC num cenário de alterações climáticas, colocando-se aqui a hipótese de que o aumento do nível de PLIP, neste caso, ser demasiado baixo para que se observem diferenças significativas – o nível basal da PLIP à temperatura de 20 °C e pH 7,7 só por si, já se apresenta mais baixo que a uma temperatura de 17 °C e pH 8,1 – podendo nesta condição ter existido danos que não foram visíveis nos resultados.

Além disso, o stresse causado pelo TCS ou DIC, em ambos os cenários climáticos, conduz a uma redução do rácio GSH/GSSG, o que pode indicar que a produção de ERO foi alta o suficiente para aumentar a produção de GSSG, que

permite ativar as enzimas antioxidantes que evitam ou reparam uma maior oxidação das moléculas de lípidos ou ainda que o GSH estava a atuar na limpeza das ERO do citosol das células. Contudo, a diminuição do rácio, compromete a resposta das amêijoas a longo prazo, uma vez que este provoca um ambiente oxidativo das células. A produção de ERO pode, no entanto, não ter sido demasiado elevada, uma vez que não houve um aumento da CTE (principal produtor de ERO) na exposição a TCS e a DIC, em ambos os cenários climáticos. Podendo a enzima SOD não ter exercido controlo sobre as ERO o que pode ter levado a um aumento da sua presença nas células das amêijoas *R. decussatus* e, consequente, ao stress oxidativo (Wang *et al.* 2018).

4.5.3.2. Defesas antioxidantes e de biotransformação

Em condições que possam causar stresse, as enzimas antioxidantes – superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e as glutathione S-transferases (GSTs) – podem entrar em ação (ser ativadas) para tentar eliminar o excesso de ERO, numa tentativa de prevenir danos oxidativos nas células, como a peroxidação lipídica (PLIP) e a carbonilação proteica (CP) (Almeida *et al.*, 2014; Andrade *et al.*, 2018; Regoli e Giuliani, 2014; Velez *et al.*, 2016).

Os resultados mostraram que *R. decussatus* sofreram um aumento da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD quando expostas a TCS ou a DIC, em ambos os cenários climáticos (20 °C/pH 7,7 e 17°C/pH 8,1) – aumento mais pronunciado quando expostas à temperatura de 20 °C/pH 7,7 –, comparativamente às amêijoas expostas às mesmas temperaturas e pH. Os resultados mostram também que *R. decussatus* tiveram um aumento da atividade da GPx quando as amêijoas foram expostas a DIC em ambos os cenários climáticos e a TCS num cenário de controlo, sem nenhum acréscimo entre cenários climáticos, em comparação com as amêijoas expostas às mesmas temperaturas e pH, sem contaminantes. Relativamente à atividade das enzimas GSTs os resultados apresentaram um aumento da atividade nas amêijoas expostas a TCS e a DIC num

cenário de alterações climáticas em comparação com as amêijoas expostas ao controlo às mesmas temperaturas, sem contaminantes.

O aumento da atividade destas enzimas foi também observado num estudo realizado com amêijoas *R. philippinarum* em que se observou um aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSTs (nas glândulas digestivas) quando expostas a DIC (15 µg/L) a uma temperatura de 21 °C, durante 24 h, em comparação com o controlo à mesma temperatura (Trombini *et al.*, 2019). Foi também observado um aumento da atividade da enzima antioxidante CAT nas brânquias das amêijoas *R. philippinarum* expostas a DIC (1 µg/L) e a uma diminuição do pH (7,4), durante 7 dias, em comparação com as que estavam no controlo com o mesmo pH e sem contaminante (Munari *et al.*, 2018). Num outro estudo realizado com mexilhões *M. galloprovincialis* foi registado um aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, quando expostos durante 28 dias a TCS (1 µg/L) e a DIC (1 µg/L), a uma temperatura de 17 °C e de 21 °C (Freitas *et al.*, 2019b). Também num estudo com mexilhões *M. galloprovincialis* foi observada uma subida da atividade das enzimas antioxidantes GPx e GSTs quando expostos durante 28 dias a TCS (1 µg/L), a uma temperatura de 22 °C, em comparação com os que estavam no controlo à mesma temperatura, sem contaminante (Pirone *et al.*, 2019).

No presente estudo *R. decussatus* aumentaram a atividade das suas defesas antioxidantes, ativando um comportamento adaptativo, sugerindo que estão sob stresse oxidativo devido ao aumento de ERO, quando expostas a TCS ou a DIC, em ambos os cenários climáticos (20 °C/pH 7,7 e 17 °C/pH 8,1). Este aumento das defesas antioxidantes (CAT, SOD e GPx) é mais expressivo nas amêijoas expostas aos contaminantes num cenário de controlo, podendo estar a acompanhar o maior aumento da PLIP e maior diminuição do rácio GSH/GSSG observado nas amêijoas expostas a TCS e DIC a esta temperatura e pH.

Contudo, embora o aumento da atividade das defesas antioxidantes, nos dois cenários climáticos, se tenha mostrado capaz de prevenir a degradação das proteínas (visível no nível da CP), este não parece ter sido suficiente para suportar o stresse oxidativo e prevenir danos nas moléculas dos lípidos, evidenciados no

aumento do nível da PLIP, no caso das amêijoas expostas a TCS em ambos os cenários climáticos e a DIC no cenário climático de controlo.

A maior atividade das enzimas GSTs visível nas amêijoas expostas a TCS num cenário de alterações climáticas (20 °C/pH 7,7), pode ter levado a um menor nível da PLIP, já que as enzimas podem ter tido um importante papel na redução dos lípidos hidroperóxidos. Para além disso, o facto das amêijoas *R. decussatus*, quando expostas a PPCPs num cenário de alterações climáticas, revelarem uma maior atividade das enzimas GSTs e apresentarem menor dano celular (visível no nível da PLIP), ajuda a perceber a menor bioacumulação destes contaminantes nos seus tecidos, uma vez que estas podem ter sido as principais responsáveis pela eliminação do TCS e do DIC.

4.5.4. Neurotoxicidade

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é responsável por impedir a contração muscular contínua, contribuindo para a saúde geral dos bivalves ao manter entre outras funções a atividade normal das brânquias, sendo considerada um bom indicador na deteção de efeitos causados por contaminantes (Aguirre-martínez *et al.*, 2016; Cravo *et al.*, 2009; Huggett *et al.*, 1989).

Os resultados da AChE não apresentaram diferenças nas amêijoas, expostas a TCS ou a DIC, em ambos os cenários climáticos (20 °C/pH 7,7 e 17 °C/pH 8,1), comparativamente a amêijoas dos grupos controlo. A variação de temperatura e pH também não influenciou a atividade da AChE das amêijoas expostas ao DIC e TCS.

A manutenção da AChE foi também observada num estudo com amêijoas *R. philippinarum* expostas a DIC (15,86 µg/L), a 24 horas e a 22 dias, em comparação com o controlo (Trombini *et al.*, 2019). Observou-se também a manutenção da AChE num estudo com *R. philippinarum* expostas a uma concentração de TCS de 0,6 µg/L, durante 28 dias (Matozzo *et al.*, 2012). Num estudo com mexilhões *Perna perna*, expostos 48 horas a baixas concentrações de DIC (0,02 µg/L e 0,20 µg/L), observou-se também a manutenção da AChE. O mesmo estudo registou que a espécie, quando exposta a uma quantidade de 2 µg/L

de DIC, aumentou a AChE, o que foi explicado como uma possível ocorrência de apoptose, provavelmente provocada por uma rutura da membrana celular que promoveu a AChE (Fontes *et al.*, 2017). No entanto, um estudo realizado com *R. decussatus*, quando expostas a 7 dias a fosforilados orgânicos (grupo de substâncias de cuidado pessoal), observou-se uma inativação da AChE na exposição de 10 µg/L e nenhum efeito neurotóxico na exposição a concentrações mais baixas (0,01, 0,1 e 1 µg/L) (Sellami *et al.*, 2015).

Os resultados do presente sugerem que as amêijoas *R. decussatus* mantêm a sua capacidade neurotóxica quando expostas a baixas concentrações a TCS ou a DIC, em ambos os cenários climáticos (20 °C/pH 7,7 e 17 °C/pH 8,1). Estes resultados podem estar relacionados com a reação da amêijoas a cada composto, ou a cada uma das substâncias que o compõem. O mesmo podendo ter acontecido com a concentração de PPCP utilizado, justificando-se assim a ausência na estimulação ou inibição da atividade da AChE.

Capítulo 5

Conclusões

5.1. Conclusões

Os impactos relacionados com as atuais mudanças climáticas, como o rápido aumento da temperatura e a acentuada diminuição do pH, aliados à presença antropogénica, que cada vez mais usa os PPCPs que acabam no meio ambiente, levam a uma interação entre fatores que podem alterar a sensibilidade dos organismos e provocar diferentes impactos fisiológicos e bioquímicos. Por estas razões estudos como este, que combinam vários parâmetros entre si, podem fornecer informações relevantes sobre os efeitos provocados por vários stresses nos bivalves para assim, antecipar cenários e possibilitar o aparecimento de respostas atempadas e adequadas, que permitam minimizar os danos.

Os resultados do presente estudo indicam que as amêijoas *R. decussatus* apresentaram stress oxidativo quando expostas, a TCS ou a DIC a diferentes temperaturas e pH.

De facto, quando expostas a TCS ou a DIC, a uma temperatura de 17 °C e a um pH 8,1, as amêijoas foram capazes de responder aos fatores induzidos, aumentando as defesas antioxidantes (aumento da atividade da SOD, CAT e GPx) e mobilizando as suas reservas de energia (diminuição do conteúdo de LIP) possivelmente devido ao aumento da produção de ERO. Contudo, as defesas não impediram danos oxidativos nas células das amêijoas quando expostas a cada um dos PPCPs, como evidenciado pelo aumento dos níveis da PLIP e pela diminuição da relação GSH/GSSG.

Quando expostas a TCS ou a DIC, em combinação com um aumento da temperatura (20 °C) e uma diminuição do pH (7,7), as amêijoas *R. decussatus* apresentaram não só uma diminuição do conteúdo de LIP e um aumento da atividade das defesas antioxidantes CAT, SOD e GPX, como também uma maior atividade das enzimas de biotransformação GSTs. A diminuição do metabolismo, observado na menor atividade da CTE, pode também ter contribuído para uma menor produção de ERO na exposição das amêijoas a TCS a esta temperatura e pH, no entanto pode indicar também um maior stress nesta condição já que parece implicar um maior esforço das amêijoas para o suportar. Esta resposta das

amêijoas aos PPCPs em combinação com aumento da temperatura e diminuição de pH, também não evitou o dano oxidativo nas suas células, uma vez que apresentaram igualmente um aumento da PLIP e uma diminuição do rácio GSH/GSSG.

A existência e a rápida bioacumulação de PPCPs nos tecidos exigem a necessidade das amêijoas rapidamente se adaptarem desencadeando mecanismos de defesa, este processo também as coloca numa situação que as pode afetar negativamente e conduzir a uma diminuição da sua capacidade de reprodução, sustentabilidade e até diminuir a sua capacidade para suportar outros fatores de stresse. No entanto, as alterações climáticas e as possíveis mudanças da temperatura e do pH, dentro dos valores testados, não parecem contribuir para que o TCS e o DIC causem um diferente stresse nas amêijoas *R. decussatus*, já que ambos os PPCPs apresentam impactos semelhantes independente da temperatura e pH. Contudo, períodos mais longos de exposição devem ser testados no futuro de forma a verificar se ocorrem maiores e/ou diferentes danos celulares.

Os resultados obtidos fornecem novos conhecimentos sobre o stresse provocado por dois cenários climáticos, combinadas com os PPCPs, em organismos marinhos, que poderão ser usados como base para futuros estudos de aprofundamento, nomeadamente ao nível de diferentes espécies, diferentes contaminantes e diferentes condições ambientais.

5.2. Considerações Futuras

Em estudos futuros considero importante a realização de ensaios com bivalves submetidos aos efeitos do substrato, para obtenção de resultados complementares. Já que a natureza do substrato em que os bivalves são colocados, pode atuar como fator condicionante de outros fatores, que já são hoje alvo de investigação (entre outros, a temperatura, a salinidade e os contaminantes).

Um estudo sobre a dureza, rigidez e concentração de minerais nas conchas deveria também ser alvo de aprofundamento. Uma vez que as menores concentrações de aragonite e calcite provocam impactos nos bivalves, pondo em causa a sua sobrevivência, a médio ou longo prazo. Assim sendo, as conchas dos bivalves podem igualmente ser usadas como biomarcadores de modificações na composição da água, motivadas por atividades antropogénicas ou por fatores naturais.

Os efeitos dos PPCPs poderiam ser estudados na fase de reprodução dos bivalves, em condição de alterações climáticas. Desta forma poderia ser percebido o impacto destes na sobrevivência e qualidade da espécie que também é produzida para alimento.

Uma vez que existem diversas variações entre as concentrações bioacumuladas nos tecidos dos bivalves, tanto em ambiente natural como em laboratório, considero importante criar uma base de dados que permita uma listagem dos resultados já observados em diferentes estudos, com o registo pormenorizado sobre espécie e sua proveniência, temperatura, salinidade, pH, substrato, contaminante(s) e quantidades, efeitos observados, entre outros. As observações partilhadas, de forma fácil e aberta a toda a comunidade científica, permitem estabelecer novas linhas de estudo, procurar convergências de valores e de consequências, comparar resultados e agilizar procedimentos.

Considerando que as pressões colocadas aos organismos aquáticos surgem de diversas fontes (muitas vezes em simultâneo), o estudo combinado dos efeitos de outros poluentes, e/ou em concentrações diferentes, torna-se necessário. Seria também interessante estudar o impacto de outros fatores abióticos e até a junção

de espécies (como a *Ruditapes philippinarum*) que possam partilhar o mesmo habitat. Este tipo de estudo pode constituir um avanço científico para se entender a importância dos stresses num panorama em que o clima se está a alterar de uma forma «acelerada» e os efeitos da poluição avançam rapidamente para o meio aquático.

Capítulo 6

Referências

- Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F., & Weiner, S. (2006). Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chemical Thermodynamics*, 12, 980–987. <https://doi.org/10.1002/chem.200500980>
- Aguirre-martínez, G. V, Delvalls, T. A., & Martín-díaz, M. L. (2016). Ecotoxicology and environmental safety general stress, detoxification pathways, neurotoxicity and genotoxicity evaluated in *Ruditapes philippinarum* exposed to human pharmaceuticals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124, 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.031>
- Alhowaish, A. K. (2018). Coastal cities, rapid transformation and unsustainable development practices: the case of qatif oasis, Saudi Arabia. *Engineering and Information Systems*, 2, 119–128.
- Ali, A. M., Rønning, H. T., Sydnés, L. K., Alarif, W. M., Kallenborn, R., & Al-Lihaibi, S. S. (2018). Detection of PPCPs in marine organisms from contaminated coastal waters of the Saudi Red Sea. *Science of the Total Environment*. 621, 654–662. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.298>
- Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V. I., Schneider, R. J., Soares, A. M. V. M., Figueira, E., & Freitas, R. (2014). Presence of the pharmaceutical drug carbamazepine in coastal systems: effects on bivalves. *Aquatic Toxicology*, 156, 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.08.002>
- Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V. I., Schneider, R. J., Soares, A. M. V. M., Figueira, E., & Freitas, R. (2017). Ecotoxicity of the antihistaminic drug cetirizine to *Ruditapes philippinarum* clams. *Science of the total environment*. 602, 793–801. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.149>
- Almeida, Â., Freitas, R., Schneider, R. J., Soares, A. M. V. M., Figueira, E., Esteves, V. I., & Barata, C. (2018). Effects of carbamazepine and cetirizine under an ocean acidification scenario on the biochemical and transcriptome responses of the clam. *Environmental Pollution*, 235, 857–868. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.121>
- Almeida, J. (2007). Poluição por águas pluviais: A qualidade da água em esteiros da Ria de Aveiro e o uso do solo na orla do estuário. PhD thesis, Universidade de Aveiro, Portugal, 133pp.
- Álvarez-Muñoz, D., Rodríguez-Mozaz, S., Maulvault, A. L., Tediosi, A., Fernández-Tejedor, M., Van den Heuvel, F., Kotterman, M., Marques, A., & Barceló, D. (2015). Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe. *Environmental Research*, 143, 56–64.

- <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.09.018>
- AMBIECO (2011). Estudo de Caracterização da Qualidade Ecológica da Ria de Aveiro. 226p.
- Ambrose, R. F. (2009). Marine behaviour and physiology midden formation by octopuses: the role of biotic and abiotic factors. *Marine ehavbiour and physiology*, 10, 137–144. <https://doi.org/10.1080/10236248309378613>
- Anacleto, P., Maulvault, A. L., Lopes, V. M., Repolho, T., Diniz, M., Nunes, M. L., Marques, A., & Rosa, R. (2014). Ecophysiology of native and alien-invasive clams in an ocean warming context. *Comparative biochemistry and physiology -part A: Molecular and Integrative Physiology*, 175, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.05.003>
- Anderson, M. J., Gorley, R. N., & Clarke, K. R. (2008). Permanova + for primer :guide to software and statistical methods. In plymouth:PRIMER-E Ltd, 214p.
- Andrade, M., De Marchi, L., Pretti, C., Chiellini, F., & Morelli, A. (2018). Are the impacts of carbon nanotubes enhanced in *Mytilus galloprovincialis* submitted to air exposure? *Aquatic Toxicology*, 202, 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.07.006>
- Andrade, M., De Marchi, L., Pretti, C., Chiellini, F., Morelli, A., Figueira, E., Rocha, R., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. (2019). The impacts of warming on the toxicity of carbon nanotubes in mussels. *Marine Environmental Research*, 145, 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.01.013>
- Andral, B., Yves, J., Sauzade, D., & Damier, E. (2004). Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Marine Pollution Bulletin*, 49, 704–712. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.05.008>
- Anestis, A., Lazou, A., Po, H. O., & Michaelidis, B. (2007). Behavioral , metabolic , and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. *Physiological Reviews*, 293, 911–921. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00124.2007>.
- Anger, C., Sueper, C., Blumentritt, D., Mcneill, K., Engstrom, D., & Arnold, W. (2013). Quantification of Triclosan, chlorinated triclosan derivatives, and their dioxin Photoproducts in lacustrine sediment cores. *Environment Science & Technology* , 47, 1833–1843. <https://doi.org/10.1021/es3045289>
- Ansell, A. D., Barnett, P. R. O., Bodoy, A., & Massd, H. (1980). Upper temperature tolerances of some european molluscs II . *Donax vittatus*, *D. semistriatus* and *D.*

- trunculus*. Marine Biology, 46, 41–46.
- Aranami, K., & Readman, J. W. (2007). Photolytic degradation of triclosan in freshwater and seawater. Chemosphere, 66, 1052–1056. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.010>
- Arsons, P., Heault, R. O. R., & Ikfors, G. (2003). Shellfish aquaculture - In praise of sustainable economies and environments. World Aquaculture, 34, 15–17.
- Aru, V., Sarais, G., Savorani, F., Balling, S., & Cesare, F. (2016). Metabolic responses of clams, *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*, to short-term exposure to lead and zinc. Marine Pollution Bulletin, 107, 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.054>
- Babcock, G. T. (1999). How oxygen is activated and reduced in respiration. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96, 12971–12973. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.12971>
- Banni, M., Hajer, A., Sforzini, S., Oliveri, C., Boussetta, H., & Viarengo, A. (2014). Transcriptional expression levels and biochemical markers of oxidative stress in *Mytilus galloprovincialis* exposed to nickel and heat stress. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 160, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.11.005>
- Barroso, C. M., Moreira, M. H., & Gibbs, P. E. (2000). Comparison of imposex and intersex development in four prosobranch species for TBT monitoring of a southern European estuarine system (Ria de Aveiro , NW Portugal). Marine Ecology Progress Series, 201, 221–232. <https://doi.org/10.3354/meps201221>
- Bastos, M. R., & Dias, J. A. (2002). Representação do litoral português: o baixo Vouga (Séculos IX-XIV). O litoral em perspectiva histórica (Séc. XVI a XVIII), 2, 111–126.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry, 44, 276–287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Bebianno, M. J., G  ret, F., Hoarau, P., Serafim, M. A., Coelho, M. R., Gnassia-Barelli, M., & Rom  o, M. (2004). Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: a potential bioindicator species. Biomarkers, 9, 305–330. <https://doi.org/10.1080/13547500400017820>
- Bernard, F. R., McKinnell, S. M., & Jamieson, G. S. (1991). Distribution and zoogeography of the bivalvia of the eastern pacific ocean. Fisheries and Aquatic Sciences, 60pp.

- Bidegain, G., & Bárcena, J. (2015). Estuarine, Coastal and Shelf Science Predicting coexistence and predominance patterns between the introduced Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) and the European native clam (*Ruditapes decussatus*). Estuarine, Coastal and Shelf Science, 152, 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.11.018>
- Boé, J., & Terray, L. (2013). Land – sea contrast, soil-atmosphere and cloud-temperature interactions: interplays and roles in future summer European climate change. Climate Dynamics Volume, 43, 683–699. <https://doi.org/10.1007/s00382-013-1868-8>
- Boening, D. W. (1999). An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. Environmental Monitoring and Assessment, 55, 459–470.
- Bonnefille, B., Gomez, E., Courant, F., Escande, A., & Fenet, H. (2018). Diclofenac in the marine environment: A review of its occurrence and effects. Marine Pollution Bulletin, 131, 496–506. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.053>
- Bour, A., Haarr, A., Keiter, S., & Hylland, K. (2018). Environmentally relevant microplastic exposure affects sediment-dwelling bivalves. Environmental Pollution, 236, 652–660. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.006>
- Breitbart, D., Levin, L. A., Oshlies, A., Grégoire, M., Chavez, F. P., Conley, D., Garçon, V., Gilbert, D., Gutiérrez, D., Isensee, K., Jacinto, G., Limburg, K., Montes, I., Naqvi, S., Pitcher, G., Rabalais, N., Roman, M., Zhang, J. (2018). Declining oxygen in the global ocean and coastal waters. Science, 359, 1–11. <https://doi.org/10.1126/science.aam7240>
- Byers, J. E., McDowell, W. G., Dodd, S. R., Haynie, R. S., Pintor, L. M., & Wilde, S. B. (2013). Climate and pH predict the potential range of the invasive apple snail (*Pomacea insularum*) in the southeastern United States. Plos One, 8, e56812. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056812>
- Cadenas, E., & Davies, K. J. A. (2000). Lars Ernster commemorative issue. Free Radical Biology, 29, 222–230. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00317-8)
- Caldeira, K., & Wickett, M. E. (2003). Anthropogenic carbon and ocean pH. Oceanography, 425, 365. <https://doi.org/10.1038/425365a>
- Campbell, N. A., Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., College, M., Ferry, D., York, N., & Jackson, R. B. (2009). Biology (Eighth edit). Pearson Australia.
- Cardoso, J. F. M. F., Peralta, N. R. E., Machado, J. P., & Veer, H. W. Van Der. (2013). Estuarine, coastal and shelf science growth and reproductive investment of introduced Pacific oysters *Crassostrea gigas* in southern European waters. Estuarine, Coastal and

- Shelf Science, 118, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.12.017>
- Cardoso, P.G., Marques, S.C., D'Ambrosio, M., Pereira, E., Duarte, A.C., Azeiteiro, U.M., Pardal, M.Â., 2013. Changes in zooplankton communities along a mercury contamination gradient in a coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). *Marine Pollution*. 76, 170–177.
- Carregosa, V., Velez, C., Pires, A., Soares, A. M. V. M., Figueira, E., & Freitas, R. (2014). Physiological and biochemical responses of the *Polychaete Diopatra neapolitana* to organic matter enrichment. *Aquatic Toxicology*, 155, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.029>
- Casatta, N., Stefani, F., Pozzoni, F., & Guzzella, L. (2016). Endocrine-disrupting chemicals in coastal lagoons of the po river delta: sediment contamination, bioaccumulation and effects on Manila clams. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 10477–10493. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5656-3>
- Catalá, A. (2009). Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 157, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.09.004>
- Chalghmi, H., Bourdineaud, J., Haouas, Z., Zrafi, I., & Saidane-mosbahi, D. (2015). Transcriptomic, biochemical, and histopathological responses of the clam *Ruditapes decussatus* from a metal-contaminated tunis lagoon. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 70, 241–256. <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0185-0>
- Cheng, Y., Zheng, Y., & VanderGheynst, J. S. (2011). Rapid quantitative analysis of lipids using a colorimetric method in a microplate format. *Lipids*, 46, 95–103. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3494-0>
- Cheung, W. W. L., Lam, V. W. Y., Sarmiento, J. L., Kearney, K., Watson, R., & Pauly, D. (2009). Projecting global marine biodiversity impacts under climate change scenarios. *Fish and Fisheries*, 10, 235–251. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2008.00315.x>
- Coelho, J. P., Pato, P., Henriques, B., Picado, A., Lillebø, A. I., Dias, J. M., Duarte, A. C., Pereira, M. E., & Pardal, M. A. (2014). Long-term monitoring of a mercury contaminated estuary (Ria de Aveiro, Portugal): The effect of weather events and management in mercury transport. *Hydrological Processes*, 28, 352–360. <https://doi.org/10.1002/hyp.9585>
- Coen, W. M. De, & Janssen, C. R. (1997). The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity

- testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6, 43–55.
- Comeau, S., Gorsky, G., Jeffree, R., Teyssi, J., Villefranche, D., & Cedex, V. (2009). Impact of ocean acidification on a key arctic pelagic mollusc (*Limacina helicina*). *Biogeosciences*, 6, 1877–1882. <https://doi.org/10.5194/bg-6-1877-2009>
- Correia, B., Freitas, R., Figueira, E., Soares, A. M. V. M., & Nunes, B. (2015). Oxidative effects of the pharmaceutical drug paracetamol on the edible clam *Ruditapes philippinarum* under different salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 179, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.09.006>
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M. C., Babut, M., Exinger, A., & Vasseur, P. (1997). Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic Contamination in Field Studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 131, 122–131. <https://doi.org/10.1006/eesa.1997.1582>
- Costa, A. (2014). Ocorrência de diclofenac, ibuprofeno e paracetamol em águas residuais em Portugal. PhD thesis, Universidade de Coimbra, Portugal, 49pp.
- Cox, A. N. (2002). *Allen's astrophysical quantities* (Fourth edi). Springer, 723pp.
- Crane, M., Watts, C., Boucard, T., 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Science Total Environment* 367, 23–41.
- Cravo, A., Lopes, B., Company, R., & Joa, M. (2009). A multibiomarker approach in *Mytilus galloprovincialis* to assess environmental quality. *Environmental Monitoring*, 11, 1673–1686. <https://doi.org/10.1039/b909846a>
- Crockett, E., 2008. The cold but not hard fats in ectotherms: consequences of lipid restructuring on susceptibility of biological membranes to peroxidation, a review. *Physiology*. 178, 795–809. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-008-0275-7>
- Crossland, C. J., Baird, D., Ducrotoy, J., Lindeboom, H., Buddemeier, C. R. W., Dennison, W. C., Maxwell, B. A., Smith, S. V., & Swaney, D. P. (2005). Chapter 1 the coastal zone – a domain of global interactions. *Coastal Fluxes in the Anthropocene*, 1–37. https://doi.org/10.1007/3-540-27851-6_1
- Cunha, A., Almeida, A., Santos, L., & Salvador, S. (2009). Evaluation of the impact of two aquaculture systems on bacterial communities of the estuarine system Ria de Aveiro.

- World Scientific, 1, 236–239. https://doi.org/10.1142/9789812837554_0049
- Cunha, M. R., & Moreira, M. H. (1995). Macrobenthos of potamogeton and myriophyllum beds in the upper reaches of canal de mira (Ria de Aveiro, Portugal): community structure and environmental factors. *Aquatic Ecology*, 29, 377–390.
- Cunha, S. C., Pena, A., & Fernandes, O. J. (2017). Mussels as bioindicators of diclofenac contamination in coastal. *Environmental Pollution*, 225, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.02.061>
- Damborenea, S., Echevarría, J., & Ros-Franch, S. (2013). Southern hemisphere palaeogeographic of triassic - jurassic marine bivalves (First Edit). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5098-2>
- Dann, A., & Hontela, A. (2011). Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *Toxicology*, 23, 285–311. <https://doi.org/10.1002/jat.1660>
- De Marchi, A. L., Neto, V., Pretti, C., Chiellini, F., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. (2017). The impacts of emergent pollutants on *Ruditapes philippinarum*: biochemical responses to carbon nanoparticles exposure. *Aquatic Toxicology*, 187, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.03.010>
- De Marchi, L., Neto, V., Pretti, C., Figueira, E., Chiellini, F., Morelli, A., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. (2017a). The impacts of seawater acidification on: *Ruditapes philippinarum* sensitivity to carbon nanoparticles. *Environmental Science: Nano*, 4, 1692–1704. <https://doi.org/10.1039/c7en00335h>
- De Marchi, L., Neto, V., Pretti, C., Figueira, E., Chiellini, F., Morelli, A., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. (2017b). Toxic effects of multi-walled carbon nanotubes on bivalves: Comparison between functionalized and nonfunctionalized nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 622, 1532–1542. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.031>
- Deslous-Paoli, J.-M., & Héral, M. (1988). Biochemical composition and energy value of *Crossostrea* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléon. *Aquatic Living Resources*, 1, 239–249.
- Dhillon, G. S., Kaur, S., Pulicharla, R., & Brar, S. K. (2015). Triclosan: current status , occurrence , environmental risks and bioaccumulation potential. *Environmental Monitoring*, 12, 5657–5684. <https://doi.org/10.3390/ijerph120505657>
- Dias, J. M., & Lopes, J. F. (2006). Implementation and assessment of hydrodynamic, salt and heat transport models: The case of Ria de Aveiro lagoon (Portugal). *Environmental*

- Modelling and Software, 21, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2004.09.002>
- Dias, J. M. S. (2001). Contribution to the study of the Ria de Aveiro hydrodynamics. PhD thesis, Universidade de Aveiro, Portugal, 288pp.
- Dickson, A. G., & Millero, F. J. (1987). A comparison of the equilibrium-constants for the dissociation of carbonic-acid in seawater media. *Deep-Sea Res.* 34, 1733e1743. *Deep Sea Research*, 34, 1733–1743. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(87\)90021-5](https://doi.org/10.1016/0198-0149(87)90021-5)
- Dickson, Andrew G. (1990). Standard potential of the reaction: $\text{AgCl (s)} + \text{iH, (g)} = \text{Ag (s)} + \text{HCl (aq)}$, and the standard acidity constant of the ion HSO_3^- in synthetic sea water from 273.15 to 318.15 K. *Chemical Thermodynamics*, 22, 113–127. [https://doi.org/10.1016/0021-9614\(90\)90074-Z](https://doi.org/10.1016/0021-9614(90)90074-Z)
- Dixson, D. L., Munday, P. L., & Jones, G. P. (2010). Ocean acidification disrupts the innate ability of fish to detect predator olfactory cues. *Ecology Letters*, 13, 68–75. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01400.x>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Ellis, J. B. (2006). Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. *Environmental Pollution*, 144, 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.018>
- Ellman, G. L., Courtney, D., Andres, V., Jr, & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Ericson, H., Thorsén, G., & Kumblad, L. (2010). Physiological effects of diclofenac , ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels. *Aquatic Toxicology*, 99, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.017>
- Esposito, G., Domenico, M., Cesarina, M., Colombero, G., Mantia, M., Pastorino, P., Prearo, M., Pais, A., Antuofermo, E., & Squadrone, S. (2018). The bivalve *Ruditapes decussatus*: A biomonitor of trace elements pollution in Sardinian coastal lagoons (Italy). *Environmental Pollution*, 242, 1720–1728. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.098>
- Evangelista-barreto, N. S., Sousa, O. V. de, & Vieira, R. H. S. dos F. (2008). Moluscos bivalves: organismos bioindicadores da qualidade microbiológica das águas: uma revisão 1. *Higiene e Sanidade Animal*, 31, 18–31. <https://doi.org/10.5935/1981-2965.20080007>

- Fabbri, E., & Franzellitti, S. (2016). Human pharmaceuticals in the marine environment: Focus on exposure and biological effects in animal species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35, 799–812. <https://doi.org/10.1002/etc.3131>
- Fabry, V. J., Seibel, B. A., Feely, R. A., & Orr, J. C. (2008). Impacts of ocean acidification on marine Biodiversity. *marine science*, 65, 185–195. <https://doi.org/10.2307/j.ctv8jnzwl.25>
- Fair, P. A., Lee, H., Adams, J., Darling, C., Pacepavicius, G., Alae, M., Bossart, G. D., Henry, N., & Muir, D. (2009). Occurrence of triclosan in plasma of wild Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and in their environment. *Environmental Pollution*, 157, 2248–2254. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.04.002>
- Faleiro, F., Baptista, M., Santos, C., Aurélio, M. L., Pimentel, M., Pegado, M. R., Paula, J. R., Calado, R., Repolho, T., & Rosa, R. (2015). Seahorses under a changing ocean: the impact of warming and acidification on the behaviour and physiology of a poor-swimming bony-armoured fish. 3, 1–7. <https://doi.org/10.1093/conphys/cov009>
- FAO. (2005). *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758). Cultured Aquatic Species Information Programme. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Retrieved July 6, 2019, from http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ruditapes_decussatus/en
- FAO. (2014). FishStat Plus - 392 Universal software for fishery statistical time series, 393. Retrieved September 17, 2019, from <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>
- Ferreira, I., & Abreu, R. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, 2, 32–39.
- Ferreira, J. G., Simas, T., Nobre, A., Silva, M. C., Shifferegger, K., & Lencart-Silva, J. (2003). Identification of sensitive areas and vulnerable zones in transitional and coastal portuguese systems. Instituto Da Água (INAG) and Institute of Marine Research (IMAR), 79–96.
- Figueiredo, A. (2014). Influência de agentes antimicrobianos e ambientais nas comunidades bacterianas e nos níveis de resistência a antibióticos numa estação de tratamento de águas residuais. PhD thesis, Universidade de Católica, Portugal, 51pp.
- Filgueira, R., Comeau, L. A., Landry, T., Grant, J., Guyondet, T., & Mallet, A. (2013). Bivalve condition index as an indicator of aquaculture intensity: A meta-analysis. *Ecological Indicators*, 25, 215–229. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.10.001>

- Filgueira, Ramón, Guyondet, T., Comeu, L., & Tremblay, R. (2016). Bivalve aquaculture-environment interactions in the context of climate change. *Global Change Biology*, 22, 3901–3913. <https://doi.org/10.1111/gcb.13346>
- Findlay, H. S., Wood, H. L., Kendall, M. A., Spicer, J. I., Twitchett, R. J., & Widdicombe, S. (2009). Calcification, a physiological process to be considered in the context of the whole organism. *Biogeosciences Discussions*, 6, 2267–2284. <https://doi.org/10.5194/bgd-6-2267-2009>
- Folch, J., Lees, M., & Sloane, G. H. (1956). A simple method for isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Biochemical Systematics*, 226, 497–509.
- Fontes, M. K., Gusso-choueri, P. K., Maranhão, L. A., Moledo, D., Abessa, D. S., Mazur, W. A., Campos, B. G. De, Guimarães, L., Toledo, M. S. De, Lebre, D., Marques, J. R., Felício, A., Cesar, A., Almeida, E. A., Dias, C., Pereira, S., Guimarães, L. L., Marques, J. R. (2017). A tiered approach to assess effects of diclofenac on the brown mussel *Perna perna*: A contribution to characterize the hazard. *Water Research*, 132, 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.077>
- França, B. K., Melo Alves, M. R., Silveira Souto, F. M., Tiziane, L., Freire Boaventura, R., Guimarães, A., & Alves, A. (2013). Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. *Jornal Português de Gastroenterologia*, 20, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.jpg.2013.04.002>
- Freitas, D. R. ., Vaz Junior, I. da S., Masuda, A., & Mané. (2008). Expressão e atividade enzimática de glutathione S-transferase em tecidos de fêmeas de *Boophilus microplus*. *Parasitologia Veterinária*, 17, 99–104. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612008000200007>
- Freitas, R., Ramos Pinto, L., Sampaio, M., Costa, A., Silva, M., Rodrigues, A. M., Quintino, V., & Figueira, E. (2012). Effects of depuration on the element concentration in bivalves: Comparison between sympatric *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 110, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.01.011>
- Freitas, R., Martins, R., Campino, B., Figueira, E., Soares, A. M. V. M., & Montaudouin, X. (2014). Trematode communities in cockles (*Cerastoderma edule*) of the Ria de Aveiro (Portugal): Influence of inorganic contamination. *Marine Pollution Bulletin*, 82, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.03.012>
- Freitas, R., Almeida, Â., Calisto, V., Velez, C., Moreira, A., Schneider, R. J., Esteves, V. I., Wrona, F. J., Figueira, E., & Soares, A. M. V. M. (2016). The impacts of pharmaceutical

- drugs under ocean acidification: New data on single and combined long- term effects of carbamazepine on *Scrobicularia plana*. *Science of the Total Environment*, 541, 977–985. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.138>
- Freitas, R., De Marchi, L., Moreira, A., Pestana, J. L. T., Wrona, F. J., Figueira, E., & Soares, A. M. V. M. (2017a). Physiological and biochemical impacts induced by mercury pollution and seawater acidification in *hediste diversicolor*. *Science of the Total Environment*, 595, 691–701. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.005>
- Freitas, R., De Marchi, L., Bastos, M., Moreira, A., Velez, C., Chiesa, S., Wrona, F. J., Figueira, E., & Soares, A. M. V. M. (2017b). Effects of seawater acidification and salinity alterations on metabolic, osmoregulation and oxidative stress markers in *Mytilus galloprovincialis*. *Ecological Indicators*, 79, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.04.003>
- Freitas, R., Coppola, F., Costa, S., Manzini, C., Intorre, L., Meucci, V., Soares, A. M. V. M., Pretti, C., & Solé, M. (2019a). Does salinity modulates the response of *Mytilus galloprovincialis* exposed to triclosan and diclofenac? *Environmental Pollution*, 251, 756–765. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.115>
- Freitas, R., Coppola, F., Costa, S., Pretti, C., Intorre, L., Meucci, V., Soares, A. M. V. M., & Solé, M. (2019b). The influence of temperature on the effects induced by triclosan and diclofenac in mussels. *Science of the Total Environment*, 663, 992–999. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.189>
- Galvão, P. M. A., Rebelo, M. F., Guimarães, J. R. D., Torres, J. P. M., & Malm, O. (2009). Bioacumulação de metais em moluscos bivalves: aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados para a biomonitorização de ambientes marinhos. *Brazil Journal Aquatic Science*, 13, 59–66. <https://doi.org/10.14210/bjast.v13n2.p59-66>
- Gao, C., Robock, A., Ammann, C. (2008). Volcanic forcing of climate over the past 1500 years: An improved ice core-based index for climate models. *Geophysical Research: Atmospheres*, 113, 1-15. <https://doi.org/10.1029/2008JD010239>
- Gatidou, G., Vassalou, E., & Thomaidis, N. S. (2010). Bioconcentration of selected endocrine disrupting compounds in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Pollution Bulletin*, 60, 2111–2116. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.07.003>
- Gazeau, F., Parker, L. M., Comeau, S., Gattuso, J., & O'Connor, W. A. (2013). Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Marine Biology*, 160, 2207–2245. <https://doi.org/10.1007/s00227-013-2219-3>

- Génio, L., Sousa, A., Vaz, N., Dias, J. M., & Barroso, C. (2007). Effect of low salinity on the survival of recently hatched veliger of *Nassarius reticulatus* in estuarine habitats : A case study of Ria de Aveiro. *Sea Research*, 59, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2007.09.001>
- Gerhardt, A. (2003). Bioindicator species and their use in biomonitoring. *Enviromental Monitorig*, 1, 1–13.
- Gestoso, I., Arenas, F., & Olabarria, C. (2016). Interactions modulate responses of two intertidal mussel species to changes in temperature and pH. *Marine Biology and Ecology*, 474, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.10.006>
- González-ortegón, E., Blasco, J., Vay, L., & Giménez, L. (2013). A multiple stressor approach to study the toxicity and sub-lethal effects of pharmaceutical compounds on the larval development of a marine invertebrate. *Hazardous Materials*, 263, 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.041>
- Gonzalez-rey, M., & Bebianno, M. J. (2014). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 148, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.011>
- Gray, L., Beer, J., Geller, M., Haigh, J. Loockwood, M. Solar influences on climate. *Geophysics*, 48, 1-53. <https://doi.org/10.1029/2009RG000282>
- Gran, G. (1952). Determination of the equivalence point in potentiometric titrations. Part II. *The Analyst*, 77, 661–671. <https://doi.org/10.1039/an9527700661>
- Gutteridge, J. M. C., Halliwell, B., M, & M. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annual Review of Marine Science*, 899, 136–147. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06182.x>
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1976). Glutathione S-transferase AA from Rat Liver. *Biochemistry and Biophysics*, 175, 710–716. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(76\)90563-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(76)90563-4)
- Haiba, E., Nei, L., Kutti, S., Lillenberg, M., Herodes, K., & Ivask, M. (2017). Degradation of diclofenac and triclosan residues in sewage sludge compost. *Agronomy*, 15, 395–405.
- Halden, R. U., & Paull, D. H. (2005). Co-occurrence of triclocarban and Triclosan in U.S. water resources. *Environment Technology*, 39, 1420–1426. <https://doi.org/10.1021/es049071e>

- Halliwell, B. (1989). Current status review: free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Brazil Aquatic Science*, 70, 737–757.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Universiade de Oxford.
- Hamza-Chaffai, A. (2014). Usefulness of Bioindicators and Biomarkers in Pollution Biomonitoring. *Biotechnology for Wellness Industries*, 3, 19–26. <https://doi.org/10.6000/1927-3037.2014.03.01.4>
- Harley, C. D. G., Hughes, A. R., Kristin, M., Miner, B. G., Sorte, C. J. B., & Carol, S. (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters*, 9, 228–241. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00871.x>
- Hartwell, S. I., Wright, D. A., Takacs, R., & Hocutt, C. H. (1991). Relative respiration and feeding rates of oyster and brackish water clam in variously contaminated waters. *Marine Pollution Bulletin*, 22, 1984–1987. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(91\)90469-9](https://doi.org/10.1016/0025-326X(91)90469-9)
- Hasan, Z., Khan, N. A., & Jhung, S. H. (2015). Adsorptive removal of diclofenac sodium from water with Zr-based metal–organic frameworks. *Chemical Engineering Journal*, 284, 1406–1413. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.08.087>
- Haslett, S. K. (2008). Coastal systems: second edition. In *Coastal Systems: Second Edition*, 216pp. <https://doi.org/10.4324/9780203893203>
- Hazel, J.R., Williams, E.E., 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Program Lipidids*. 29, 167–227
- Hu, M., Li, L., Sui, Y., Li, J., Wang, Y., Lu, W., & Dupont, S. (2015). Fish & shell fish immunology effect of pH and temperature on antioxidant responses of the thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 46, 573–583. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.07.025>
- Hublin, J., Ben-ncer, A., Bailey, S. E., Freidline, S. E., Neubauer, S., Skinner, M. M., Bergmann, I., Cabec, A. Le, Benazzi, S., Harvati, K., & Gunz, P. (2017). New fossils from Jebel Irhoud, Morocco and the pan-African origin of *Homo sapiens*. *Nature Publishing Group*, 546, 289–292. <https://doi.org/10.1038/nature22336>
- Huggett, R. J., Kimerle, R. A., Mehrle, P. M., & Bergman, H. L. (1989). *Biochemical, physiological, and histological markers of antropogenic stress (First edit)*. CRC Press,

- 365pp.
- Imbrie, J., & Palmer, K. (1979). *Ice ages solving the mystery*. Harvard University Press, 224pp.
- Inoue, T., Wilkens, S., & Forgac, M. (2003). Subunit structure, function , and arrangement in the yeast and coated vesicle V-ATPases. *Bioenergetics and Biomembranes*, 35, 291–299. <https://doi.org/10.1023/a:1025720713747>
- IPCC. (2001). *The Scientific Basis, Summary for Policy Makers - Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 881pp.
- IPCC. (2007). *Climate change 2007: the physical science basis*. In: *Contribution of Work Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 976pp.
- IPCC. (2013). *Climate Change 2013: The Physical Science Basis Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 203pp.
- IPCC. (2014). IPCC, 2014. *Climate change 2014: Synthesis report*. In: *Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. IPCC, Geneva, Switzerland, 151pp.
- IPMA. (2017). Instituto Português do Mar e da Atmosfera: Resumo climático (balanço preliminar), novembro e outono de 2017. 1–5. Retrieved from www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20171130/dZkjvQpKClcpViLqVuFV/cli_20171101_20171130_pcl_mm_co_pt.pdf
- IPMA. (2019). Instituto Português do Mar e da Atmosfera: Morfologia, biologia e ecologia dos bivalves. Retrieved October 28, 2019, from <https://www.ipma.pt/pt/enciclopedia/pescas/index.html>
- Johansson, L. H., & Håkan Borg, L. A. (1988). A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Analytical Biochemistry*, 174, 331–336. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90554-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90554-4)
- Jux, U., Baginski, R. M., Arnold, H. G., Krönke, M., & Seng, P. N. (2002). Detection of pharmaceutical contaminations of river, pond, and tap water from Cologne (Germany) and surroundings. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 205, 393–

398. <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00166>
- Karl, T. R., & Trenberth, K. E. (2003). Modern Global Climate Change. *Science*, 302, 1719–1723. <https://doi.org/10.1126/science.1090228>
- Kehrer, J. P., & Lund, L. G. (1994). Celular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 17, 65–75. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90008-6)
- Kim, W. S., Huh, H. T., Huh, S. H., & Lee, T. W. (2001). Effects of salinity on endogenous rhythm of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). *Marine Biology*, 138, 157–162. <https://doi.org/10.1007/s002270000430>
- King, F. D., & Packard, T. T. (1975). Respiration and the activity of the respiratory electron transport system in marine zooplankton. *Limnology and Oceanography*, 20, 849–854. <https://doi.org/10.4319/lo.1975.20.5.0849>
- Koch, M., Bowes, G., Ross, C., & Zhang, X. H. (2013). Climate change and ocean acidification effects on seagrasses and marine macroalgae. *Global Change Biology*, 19, 103–132. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2012.02791.x>
- Koumaki, E., Mamais, D., & Noutsopoulos, C. (2016). Environmental fate of non-steroidal anti-inflammatory drugs in river water/sediment systems. *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.026>
- Kramer, K. J. M., Jenner, H. A., & Zwart, D. De. (1989). The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. *Hydrobiology*, 188, 433–443.
- Kuffner, I. B., Andersson, A. J., Jokiel, P. L., Rodgers, K. U. U. S., & Mackenzie, F. T. (2007). Decreased abundance of crustose coralline algae due to ocean acidification. *Nature Geoscience*, 1, 6–9. <https://doi.org/10.1038/ngeo100>
- Kukla, G. J., Bender, M. L., de Beaulieu, J. L., Bond, G., Broecker, W. S., Cleveringa, P., Gavin, J. E., Herbert, T. D., Imbrie, J., Jouzel, J., Keigwin, L. D., Knudsen, K. L., McManus, J. F., Merkt, J., Muhs, D. R., Müller, H., Poore, R. Z., Winograd, I. J. (2002). Last interglacial climates. *Quaternary Research*, 58, 2–13. <https://doi.org/10.1006/qres.2001.2316>
- Labudda, M. (2018). Ascorbate-glutathione pathway as an important player in redox regulation in nematode-infested plants: What we have learned so far. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 103, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.04.007>

- Lacoue-labarthe, T., Réveillac, E., Oberhänsli, F., Teyssié, J. L., Jeffree, R., & Gattuso, J. P. (2011). Effects of ocean acidification on trace element accumulation in the early-life stages of squid *Loligo vulgaris*. *Aquatic Toxicology*, 105, 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.05.021>
- Lagadic, L., Caquet, T., & Ramade, F. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology*, 3, 193–208. <https://doi.org/10.1007/BF00117084>
- Langdon, C., & Atkinson, M. J. (2005). Effect of elevated pCO₂ on photosynthesis and calcification of corals and interactions with seasonal change in temperature/irradiance and nutrient enrichment. *Geophysical Research*, 110, 1–16. <https://doi.org/10.1029/2004JC002576>
- Lannig, G., Flores, J. F., & Sokolova, I. M. (2006). Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: Pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquatic Toxicology*, 79, 278–287. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.017>
- Lazarus, E. D., Ellis, M. A., Murray, A. B., & Hall, D. M. (2016). An evolving research agenda for human–coastal systems. *Geomorphology*, 256, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2015.07.043>
- Li, R., & Brawley, S. H. (2004). Improved survival under heat stress in intertidal embryos (*Fucus* spp.) simultaneously exposed to hypersalinity and the effect of parental thermal history. *Marine Biology*, 144, 205–213. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1190-9>
- Lillebø A. I., Sousa A. I., Queiroga H., Soares J. A., Aleixo A. (2013) Results of the problem based science analysis: The Ria de Aveiro Lagoon, LAGOONS Report No. D3.2, 50pp
- Lillebø, A. I., Pita, C., Rodrigues, J. G., Ramos, S., & Villasante, S. (2017). How can marine ecosystem services support the Blue Growth agenda? *Marine Policy*, 81, 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2017.03.008>
- Lindsey, R., & Dlugokencky, E. (2018). Climate Change: atmospheric carbon Dioxide. Retrieved from NOAA September 12, 2019, from website: <https://www.climate.gov/news-features/understanding-climate/climate-change-atmospheric-carbon-dioxide>
- Llina, A., Burley, J. C., Box, K. J., Glen, R. C., & Goodman, J. M. (2007). Diclofenac solubility: independent determination of the intrinsic solubility of three crystal forms. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50, 979–983. <https://doi.org/10.1021/jm0612970>

- Lonappan, L., Kaur, S., Kumar, R., Verma, M., & Surampalli, R. Y. (2016). Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity - A review. *Environment International*, 96, 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.09.014>
- Lopes, F., Silva, C. I., & Cardoso, A. C. (2007). Validation of a water quality model for the Ria de Aveiro lagoon, Portugal. *Environmental Modelling and Software*, 23, 479–494. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2007.07.001>
- Lopes, M. L., Marques, B., Dias, J. M., Soares, A. M. V. M., & Lillebø, A. I. (2017). Challenges for the WFD second management cycle after the implementation of a regional multi-municipality sanitation system in a coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). *Science of the Total Environment*, 586, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.205>
- Lord, J. (2017). Impact of seawater temperature on growth and recruitment of invasive fouling species at the global scale. *Marine Ecology*, 38, 1–10. <https://doi.org/10.1111/maec.12404>
- Lough, J. M., Gupta, A. Sen, & Hobday, A. J. (2012). Marine climate change in Australia: impacts and adaptation responses. . Retrieved September 25, 2019, from <http://www.oceanclimatechange.org.au>
- Lucas, A., & Beninger, P. G. (1985). The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 44, 187–200. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90243-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90243-1)
- Lüdecke, H., & Weiss, C. (2017). Harmonic analysis of worldwide temperature Proxies for 2000. *The Open Atmospheric Science*, 11, 44–53. <https://doi.org/10.2174/1874282301711010044>
- Lüthi, D., Le Floch, M., Bereiter, B., Blunier, T., Barnola, J. M., Siegenthaler, U., Raynaud, D., Jouzel, J., Fischer, H., Kawamura, K., & Stocker, T. F. (2008). High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000-800,000 years before present. *Nature*, 453, 379–382. <https://doi.org/10.1038/nature06949>
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H., Diniz, M., & Vinagre, C. (2014). Role of thermal niche in the cellular response to thermal stress: Lipid peroxidation and HSP70 expression in coastal crabs. *Ecological Indicators*, 36, 601–606. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.09.023>
- Marin, F., & Luquet, G. (2005). Molluscan biomineralization: The proteinaceous shell constituents of *Pinna nobilis* L. *Materials Science and Engineering*, 25, 105–111.

- <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.01.003>
- Marin, F., Roy, N. Le, & Marie, B. (2012). The formation and mineralization of mollusk shell. *Frontiers in Bioscience*, 4, 1099–1125.
- Marin, M. G., Moschino, V., Deppieri, M., & Lucchetta, L. (2003). Variations in gross biochemical composition, energy value and condition index of *T. philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Aquaculture*, 219, 859–871. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00035-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00035-8)
- Marina, G. Pintado-Herrera, González-mazo, Eduardo, Lara-martín, & A, P. (2014). Chemosphere determining the distribution of triclosan and methyl triclosan in estuarine settings. *Chemosphere*, 95, 478–485. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.101>
- Marrs, T. C. (1994). Organophosphate poisoning. *Seminars in Neurology*, 24, 197–204. <https://doi.org/10.1055/s-2004-830907>
- Martins, V. A., Frontalini, F., Tramonte, K. M., Figueira, R. C. L., Miranda, P., Sequeira, C., Fernández-fernández, S., Dias, J. A., Yamashita, C., Renó, R., Laut, L. L. M., Silva, F. S., Antonieta, M., Rodrigues, C., Bernardes, C., Nagai, R., Sousa, S. H. M., Rocha, F. (2013). Assessment of the health quality of Ria de Aveiro (Portugal): Heavy metals and benthic foraminifera. *Marine Pollution Bulletin*, 70, 18–33. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.02.003>
- Mathieu, M., & Lubet, P. (2011). Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves—a brief review. *Invertebrate Reproduction and Development*, 2, 123–129. <https://doi.org/10.1080/07924259.1993.9672303>
- Matias, D., Joaquim, S., Matias, A. M., & Leitão, A. (2016). Reproductive effort of the European clam *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758): Influence of different diets and temperatures. *Invertebrate Reproduction and Development*, 60, 49–58. <https://doi.org/10.1080/07924259.2015.1126537>
- Matozzo, V., Binelli, A., Parolini, M., Previato, M., Masiero, L., Finos, L., Bressan, M., & Marin, M. G. (2012). Biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* and contamination levels in sediments from seaward and landward sites in the Lagoon of Venice. *Ecological Indicators*, 19, 191–205. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.06.020>
- Matozzo, V., Chinellato, A., Munari, M., Bressan, M., & Marin, M. G. (2013). Can the combination of decreased pH and increased temperature values induce oxidative stress in the clam *Chamelea gallina* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Marine Pollution*

- Bulletin, 72, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.05.004>
- Matozzo, V., Costa Devoti, A., & Marin, M. G. (2012). Immunotoxic effects of triclosan in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Ecotoxicology*, 21, 66–74. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0766-2>
- Maulvault, L. (2018). Climate change and emerging chemical contaminants in marine organisms: Bioaccumulation, ecotoxicology and public health impacts. PhD thesis, Universidade de Nova de Lisboa, Portugal, 398pp.
- Mccay, B., & Jones, P. (2011). Marine Protected Areas and the Governance of Marine Ecosystems and Fisheries. *Conservation Biology*, 25, 1130–1133. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2011.01771.x>
- McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, 108, 652–659. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00412-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00412-5)
- Mcdonald, P. S., Essington, T. E., Davis, J. P., Galloway, A. W. E., Stevick, C., Jensen, G. C., Vanblaricom, G. R., Armstrong, D. A., Mcdonald, P. S., Essington, T. E., Davis, J. P., Galloway, A. W. E., Stevick, B. C., Jensen, G. C., Vanblaricom, G. R., & Armstrong, D. A. (2015). Distribution, abundance, and habitat associations of a large bivalve (*Panopea generosa*) in a eutrophic fjord estuary. *Shellfish Research*, 34, 137–145. <https://doi.org/10.2983/035.034.0117>
- McLachlan, A., Jaramillo, E., Defeo, O., Dugan, J., Ruyck, A. De, & Coetzee, P. (1995). Adaptations of bivalves to different beach types. *Experimental Marine Biology and Ecology*, 187, 147–160. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(94\)00176-E](https://doi.org/10.1016/0022-0981(94)00176-E)
- Meer, J. Van Der, Beukema, J. J., & Dekker, R. (2001). Long-term variability in secondary production of an intertidal bivalve population is primarily a matter. *Animal Ecology*, 70, 159–169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2001.00469.x>
- Mehrbach, C., Culberson, C. H., Hawley, J. E., & Pytkowicz, R. M. (1973). Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. *Limnology and Oceanography*, 18, 897–907. <https://doi.org/10.4319/lo.1973.18.6.0897>
- Melzner, F., Oschlies, A., Gutowska, M. A., Bange, H. W., Peter, H., & Arne, H. (2012). Future ocean acidification will be amplified by hypoxia in coastal habitats. *Marine Biology*, 160, 1875–1888. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-1954-1>
- Mesquita, C. S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J., & Marcos, J. C. (2014).

- Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical Biochemistry*, 458, 69–71. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.034>
- Mezzelani, M., Gorbi, S., Ros, Z. Da, Fattorini, D., Errico, G., Milan, M., Bargelloni, L., & Regoli, F. (2016). Ecotoxicological potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in marine organisms: Bioavailability, biomarkers and natural occurrence in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 3, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.03.005>
- Milan, M., Pauletto, M., Patarnello, T., Bargelloni, L., Marin, M. G., & Matozzo, V. (2013). Gene transcription and biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* after exposure to ibuprofen. *Aquatic Toxicology*, 126, 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.10.007>
- Moe, J., Schamphelaere, K., Clements, W., & Sorensen, M. (2013). Combined and interactive effects of global climate change and toxicants on populations and communities. *Environmental Toxicology*, 32, 49–61. <https://doi.org/10.1002/etc.2045>
- Molion, L. (2005). Aquecimento global, el niños, manchas solares, vulcões e oscilação decadal do pacífico. *Climanálise*, 1–6. Retrieved from <http://climanalise.cptec.inpe.br/~rclimanl/revista/>
- Montaseri, H., & Forbes, P. (2016). A review of monitoring methods for triclosan and its occurrence in aquatic environments. *Trends in Analytical Chemistry*, 85, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.09.010>
- Monteiro, R., Costa, S., Coppola, F., Freitas, R., Vale, C., & Pereira, E. (2019). Evidences of metabolic alterations and cellular damage in mussels after short pulses of Ti contamination. *Science of the Total Environment*, 650, 987–995. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.314>
- Moreira, A., Figueira, E., Pecora, I. L., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. (2016a). Biochemical alterations in native and exotic oyster species in Brazil in response to increasing temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 191, 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.10.008>
- Moreira, A., Figueira, E., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. (2016b). The effects of arsenic and seawater acidification on antioxidant and biomineralization responses in two closely related *Crassostrea* species. *Science of the Total Environment*, 545–546, 569–581. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.029>

- Moreira, A., Freitas, R., Figueira, E., Volpi Ghirardini, A., Soares, A. M. V. M., Radaelli, M., Guida, M., & Libralato, G. (2018). Combined effects of arsenic, salinity and temperature on *Crassostrea gigas* embryotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.043>
- Moreira, M. H., Queiroga, H., Machado, M. M., & Cunha, M. R. (1993). Environmental gradients in a southern Europe estuarine system: Ria de Aveiro, Portugal implications for soft bottom macrofauna colonization. *Aquatic Ecology*, 27, 465–482. <https://doi.org/10.1007/BF02334807>
- Morgado, R., Nobre, M., Ribeiro, A., Puga, J., & Luís, A. (2009). A importância do Salgado para a gestão da avifauna limícola invernante na Ria de Aveiro (Portugal). *Integrated Coastal Zone Management*, 9, 79–93. <https://doi.org/10.5894/rgci157>
- Moura, P., Gaspar, M., Costa, J., Chainho, P., Garaulet, L., & Vasconcelos, P. (2017). Age and growth of a highly successful invasive species: the *Manila* clam *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) in the Tagus Estuary (Portugal). *Aquatic Invasions*, 12, 133–146. <https://doi.org/10.3391/ai.2017.12.2.02>
- Mubiana, V. K., & Blust, R. (2007). Effects of temperature on scope for growth and accumulation of Cd, Co, Cu and Pb by the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 63, 219–235. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.08.005>
- Munari, M., Matozzo, V., Chemello, G., Riedl, V., Pastore, P., Badocco, D., & Marin, M. G. (2019). Seawater acidification and emerging contaminants: A dangerous marriage for haemocytes of marine bivalves. *Environmental Research*, 175, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.04.032>
- Munari, M., Matozzo, V., Gagn, F., Chemello, G., Riedl, V., Finos, L., Pastore, P., Badocco, D., Gabriella, M. (2018). Does exposure to reduced pH and diclofenac induce oxidative stress in marine bivalves? A comparative study with the mussel *Mytilus galloprovincialis* and the clam *Ruditapes philippinarum*. *Environmental Pollution*, 240, 925–937. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.005>
- NASA. (2019). National Aeronautics and Space Administration: global temperature. Retrieved August 14, 2019, from <https://climate.nasa.gov/vital-signs/global-temperature/>
- Nassef, M., Kim, S. G., Seki, M., Kang, I. J., Hano, T., Shimasaki, Y., & Oshima, Y. (2010). In ovo nanoinjection of triclosan, diclofenac and carbamazepine affects embryonic development of medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, 79, 966–973. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.02.002>

- Nicholls, R. J., Wong, P. P., Burkett, V. R., Codignotto, J. O., Hay, J. E., McLean, R. F., Ragoonaden, S., & Woodroffe, C. D. (2007). Coastal systems and low-lying areas. *Science*, 1, 315–356.
- NOAA. (2019). National Oceanic and Atmospheric Administration: cold & warm episodes by season. Retrieved September 9, 2019, from https://origin.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis_monitoring/ensostuff/ONI_v5.php
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Olaniyan, L. W. B., Mkwetshana, N., Okoh, A. I. (2016). Triclosan in water, implications for human and environmental health. *SpringerPlus*, 5, 16–39. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3287-x>
- Oliveira, Fernandes de, L., Santos, Martinez, C. dos R., & Bueno, C. (2016). Biomarkers in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* confined downstream a domestic landfill leachate discharge. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 13931–13942. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6567-7>
- Paglia, D. E., Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Molecular Biology*, 3, 18–30.
- Penner, N., Woodward, C., & Prakash, C. (2012). Drug metabolizing enzymes and biotransformation reactions. *Appendix*, 1, 545–565.
- Pereira, E., Lopes, E., Pato, P., Rodrigues, S. M., Otero, M., Va, M., Coelho, J. P., Lillebø, A. I., Pardal, M. A., Rocha, R., & Duarte, A. C. (2008). Evaluation of an interlaboratory proficiency-testing exercise for total mercury in environmental samples of soils, sediments and fish tissue. *Trends in Analytical Chemistry*, 27, 959–970. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.001>
- PDM. (2013). Estudos de Caracterização Biofísica do Município de Ílhavo. Plano Diretor Municipal de Ílhavo. 30p.
- Pfeifer, S., Schiedek, D., & Dippner, J. W. (2005). Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus sp.* from the south-western Baltic Sea. *Experimental Marine Biology and Ecology*, 320, 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.12.020>
- Pierrehumbert, R. T. (2010). Principles of planetary climate, *Environment*, 32, 101–123.

- <https://doi.org/10.1017/cbo9780511780783>
- Pinto, I., Ribeiro, M., Rodrigues, D., & Costa, J. (2018). Perfil de utilização e eficácia de antibióticos: a percepção do utilizador das regiões de vale e Ave de Aveiro. *Antibiotic Resistance*, 1, 356–357.
- Pires, A., Figueira, E., Moreira, A., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. (2015). The effects of water acidification, temperature and salinity on the regenerative capacity of the polychaete *Diopatra neapolitana*. *Marine Environmental Research*, 106, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.03.002>
- Pirone, G., Coppola, F., Pretti, C., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. (2019). Comparative Biochemistry and Physiology, Part B The effect of temperature on Triclosan and Lead exposed mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 232, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.02.007>
- Pohanka, M. (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedicine Chzech Republic.*, 155, 219–230. <https://doi.org/10.5507/bp.2011.036>
- Portner, H. O., Hardewig, I., & Peck, L. S. (1999). Mitochondrial function and critical temperature in the Antarctic bivalve, *Laternula elliptica*. *Biochemistry and Physiology*, 124, 179–189. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(99\)00105-1](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00105-1)
- Pounds, A., Bustamante, R., Coloma, L. A., Consuegra, J. A., Fogden, M. P. L., Pounds, J. A., Puschendorf, R., Foster, P. N., Marca, E. La, Masters, K. L., Still, C. J., Young, B. E., Ron, S. R., & Sa, G. A. (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439, 161–167. <https://doi.org/10.1038/nature04246>
- Radlvc, J., D., L., & GS, M. (2007). Effect of zinc and benzene on respiration and excretion of mussel larvae (*Perna perna*) (Linnaeus, 1758) (Mollusca; Bivalvia). *Braz. J. Biol.*, 67, 111–115. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842007000100015>
- Rahman, S., Kim, K. H., Saha, S. K., Swaraz, A. M., & Paul, D. K. (2014). Review of remediation techniques for arsenic (As) contamination: Anovel approach utilizing bio-organisms. *Journal of Environmental Management*, 134, 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.12.027>
- Raimonet, M., & Cloern, J. E. (2016). Estuary–ocean connectivity: fast physics, slow biology. *Global Change Biology*, 23, 2345–2357. <https://doi.org/10.1111/gcb.13546>
- Ramos, M. L., Campos, J. J., & Quintero, E. H. (2005). Biomarcadores bioquímicos: uma alternativa para o monitoramento ambiental. *Tecnoceanic*, 1, 1–3.

- <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3851.7526>
- Range, P., Chícharo, M. A., Ben-Hamadou, R., Pilo, D., Range, P., Munari, M., Menif, N. T. El, Dellali, M., & Chícharo, L. (2013). Impacts of CO₂-induced seawater acidification on coastal Mediterranean bivalves and interactions with other climatic stressors. *Regional Environmental Change*, 14, 19–30. <https://doi.org/10.1007/s10113-013-0478-7>
- Raven, J. A., & Falkowski, P. G. (1999). Oceanic sinks for atmospheric CO₂. *Plant, Cell and Environment*, 22, 741–755. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1999.00419.x>
- Raven, J., Caldeira, K., Elderfield, H., Hoegh-Guldberg, O., Liss, P., Riebesell, U., & Quinn, R. (2005). Ocean Acidification Due to Increasing Atmospheric Carbon Dioxide Royal Society Policy Document. In The Royal Society, 60pp.
- REA. (2018). Composição da produção aquícola em águas salobras e marinhas, em 2017. Retrieved October 25, 2019, from <https://rea.apambiente.pt/content/produ%C3%A7%C3%A3o-em-aquicultura>
- Reddy, K. R., & DeLaune, R. D. (2008). *Biogeochemistry of wetlands: Science and Applications (First Edit)*. Boca Raton: Crc Press , 800pp.
- Regoli, F., & Giuliani, M. E. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research*, 93, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.07.006>
- Regoli, F., & Winston, G. W. (1999). Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 156, 96–105. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8637>
- Relexans, J. C. (1996). Measurement of the respiratory electron transport system (ETS) activity in marine sediments: State-of-the-art and interpretation. I. Methodology and review of literature data. *Marine Ecology Progress Series*, 136, 277–287. <https://doi.org/10.3354/meps136277>
- Resgalla, C., Radetski, C. M., & Schettini, C. A. F. (2010). Physiological energetics of the brown mussel *Perna perna* (L.) transplanted in the Itajaí-Açu river mouth, Southern Brazil. *Ecotoxicology*, 19, 383–390. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0422-2>
- Ries, J. B., Cohen, A. L., & Mccorkle, D. C. (2009). Marine calcifiers exhibit mixed responses to CO₂-induced ocean acidification. *Geology*, 37, 1131–1134. <https://doi.org/10.1130/G30210A.1>

- Riisgard, H. U., & Larsen, P. S. (2005). Water flow analysis and particle capture in ciliary suspension-feeding scallops (Pectinidae). *Marine Ecology Progress Series*, 303, 177–193. <https://doi.org/10.3354/meps303177>
- Robbins, L. L., Hansen, M. E., Kleypas, J. A., & Meylan, S. C. (2010). CO₂calc: A user-friendly seawater carbon calculator for Windows, Mac OS X, and iOS (iPhone). <https://doi.org/10.3133/ofr20101280>
- Rocha, M., Cruzeiro, C., & Reis, M. (2016). Pollution by endocrine disruptors in a southwest European temperate coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). *Environmental Monitoring and Assessment*, 188, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5114-9>
- Rocha, M., & Rocha, E. (2015). Estrona, estradiol, etinilestradiol e diclofenac em águas superficiais portuguesas e sua contextualização internacional. *Histomorfologia*, 40, 19–39. <https://doi.org/10.5894/rh40n1-d2>
- Rochette, J., Gjerde, K., Druel, E., Ardron, J. A., & Craw, A. (2014). Delivering the Aichi target 11: challenges and opportunities for marine areas beyond national jurisdiction. *Aquatic Conservation*, 24, 31–43. <https://doi.org/10.1002/aqc.2507>
- Rodrigues, M. A., Quintino, V., Sampaio, L., Freitas, R., & Neves, R. (2011). Benthic biodiversity patterns in Ria de Aveiro, western Portugal: Environmental-biological relationships. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 95, 338–348. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.05.019>
- Rosa, R., Trübenbach, K., Pimentel, M. S., Boavida-portugal, J., Faleiro, F., Baptista, M., Dionísio, G., Calado, R., Pörtner, H. O., & Repolho, T. (2014). Differential impacts of ocean acidification and warming on winter and summer progeny of a coastal squid (*Loligo vulgaris*). *Experimental Biology*, 2, 518–525. <https://doi.org/10.1242/jeb.096081>
- Rosi-Marshall, E. J., Kincaid, D. W., Bechtold, H., Royer, T. V., Rojas, M., & Kelly, J. J. (2013). Pharmaceuticals suppress algal growth and microbial respiration and alter bacterial communities in stream biofilms. *Ecological Applications*, 23, 583–593. <https://doi.org/10.1890/12-0491.1>
- 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. *Invertebrate Pathology*, 131, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.015>
- Sabater, S., Guasch, H., Ricart, M., Romani, A., Vidal, G., Klunder, C., & Schmitt-Jansen, M. (2007). Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1425–1434.

- <https://doi.org/10.1007/s00216-006-1051-8>
- Sacchi, A., Mouneyrac, C., Bolognesi, C., Sciutto, A., Roggieri, P., Fusi, M., Maria, G., & Capri, E. (2013). Biomonitoring study of an estuarine coastal ecosystem, the Sacca di Goro lagoon, using *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Environmental Pollution*, 177, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.01.042>
- Sauvé, S., & Desrosiers, M. (2014). A review of what is an emerging contaminant. *Chem Cent J.*, 8, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-15>
- Scavia, D., Field, J. C., Boesch, D., Buddemeier, R. W., Burkett, V., Cayan, D., Fogarty, M., & Titus, J. G. (2002). Climate Change Impacts on U.S. Coastal and Marine Ecosystems. *Estuaries*, 25, 149–164.
- SCCS. (2010). Opinion on triclosan - Scientific Committee on Consumer Safety. <https://doi.org/10.2772/11162>
- Schalk, P. H. (1988). Respiratory electron transport system (ETS) activities in zooplankton and micronekton of the Indo-Pacific region. *Marine Ecology*, 44, 25–35. <https://doi.org/10.3354/meps044025>
- Schoolmeester, T., Gjerdi, H. L., Crump, J., Alfthan, B., Fabres, J., Johnsen, K., Puikkonen, L., Kurvits, T., & Baker, E. (2019). Global linkages – a graphic look at the changing Arctic (rev.1). UN Environment and GRID-Arendal, 56pp.
- Schiedek, D., Sundelin, B., Readman, J.W., Macdonald, R.W., 2007. Interactions between climate change and contaminants. *Marine Pollution*. 54, 1845–1856.
- Scott-fordsmand, J. J., & Weeks, J. M. (2000). Biomarkers in earthworms. *Environment Contamination Toxicology*, 165, 117–159.
- Seidel, D. J., Fu, Q., Randel, W. J., & Reichler, T. J. (2008). Widening of the tropical belt in a changing climate. *Nature Geoscience*, 1, 21–24. <https://doi.org/10.1038/ngeo.2007.38>
- Sellami, B., Aouani, I., Maalaoui, A., Dellali, M., Aïssa, P., Sheehan, D., Mahmoudi, E., & Hamouda, B. (2015). Safety 2-oxathiaphosphorine-2-sul fi de on biomarkers of Mediterranean clams *Ruditapes decussatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.049>
- Serafim, M. A., Company, R. M., & Bebianno, M. J. (2002). Effect of temperature and size on metallothionein synthesis in the gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. 54, 361–365. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(02\)00121-6](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00121-6)

- Sharp, T. (2018). What Is Earth's Average Temperature? Retrieved September 15, 2019, from <https://www.space.com/17816-earth-temperature.html>
- Sheehan, D., & McDonagh, B. (2008). Oxidative stress and bivalves: a proteomic approach. *Invertebrate Survival*, 5, 110–123.
- Shi, W., Zhao, X., Han, Y., Che, Z., Chai, X., & Liu, G. (2016). Ocean acidification increases cadmium accumulation in marine bivalves: a potential threat to seafood safety. *Scientific Reports*, 6, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep20197>
- Silva, A. (2016). Respostas multigeracionais em *Daphnia magna*: exposição a pulsos e misturas. PhD thesis, Universidade de Aveiro, Portugal, 238pp.
- Silva, D., Debacher, N. A., Junior, A. B., & Robers, F. (2010). Caracterização físico-química e microestrutura de conchas de moluscos bivalves. *Química Nova*, 33, 1053–1058. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000500009>
- Simčič, T., & Brancelj, A. (1997). Electron transport system (ETS) activity and respiration rate in five *Daphnia* species at different temperatures. *Hydrobiologia*, 360, 117–125. <https://doi.org/10.1023/A:1003117221455>
- Sime, L. C., Wolff, E. W., Oliver, K. I. C., & Tindall, J. C. (2009). Evidence for warmer interglacials in East Antarctic ice cores. *Nature*, 462, 342–345. <https://doi.org/10.1038/nature08564>
- Slowik, J. G., Stainken, K., Davidovits, P., Williams, L. R., Jayne, J. T., Kolb, C. E., Worsnop, D. R., Rudich, Y., DeCarlo, P. F., & Jimenez, J. L. (2004). Particle morphology and density characterization by combined mobility and aerodynamic diameter measurements. Part 2: Application to combustion-generated soot aerosols as a function of fuel equivalence ratio. *Aerosol Science and Technology*, 38, 1206–1222. <https://doi.org/10.1080/027868290903916>
- Smaoui-Damak, W., Hamza-chaffai, A., Bebianno, M. J., & Amiard, J. C. (2004). Variation of metallothioneins in gills of the clam *Ruditapes decussatus* from the Gulf of Gabés (Tunisia). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 139, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.09.015>
- Smital, T., Luckenbach, T., Sauerborn, R., Hamdoun, A. M., Vega, R. L., & Epel, D. (2004). Emerging contaminants—pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multitaxenobiotic defense in aquatic organisms. *Mutation Research*, 552, 101–117. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.006>

- Smith, P. F. (2012). Architecture in a Climate of Change. In architecture in a climate of change. <https://doi.org/10.4324/9780080499314>
- Smolders, R., Bervoets, L., Coen, W. De, & Blust, R. (2004). Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environmental Pollution*, 129, 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2003.09.027>
- Sobral, P., Widdows, J. (1997). Effects of elevated temperatures on the scope for growth and resistance to air exposure of the clam *Ruditapes decussatus* (L.), from southern Portugal. *Scientia Marina*, 61, 163-171.
- Sobral, P., Widdows, J. (2000). 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. *Experimental Marine Biology and Ecology*, 245, 111–125. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(99\)00154-9](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(99)00154-9)
- Sonawane, S. M., & Sonawane, M. (2018). Effect of heavy metal copper sulphate on glycogen activity of bivalve *L. marginalis*. *Pharmacy*, 8, 21–27.
- Sorte, C. J. B., Jones, S. J., & Miller, L. P. (2011). Geographic variation in temperature tolerance as an indicator of potential population responses to climate change. *Experimental Marine Biology and Ecology*, 400, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.02.009>
- Sousa, A. I., Santos, D. B., Silva, E. F., Sousa, L. P., Cleary, D. F. R., Soares, A. M. V. M., & Lillebø, A. I. (2017). “Blue carbon” and nutrient stocks of salt marshes at a temperate coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). *Nature Publishing Group*, 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep41225>
- Swiacka, K., Szaniawska, A., & Caban, M. (2019). Evaluation of bioconcentration and metabolism of diclofenac in mussels *Mytilus trossulus* - laboratory study. *Marine Pollution*, 141, 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.02.050>
- Talmage, S. C., & Gobler, C. J. (2011). Effects of Elevated Temperature and Carbon dioxide on the growth and survival of larvae and juveniles of three species of northwest Atlantic Bivalves. 6, e26941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026941>
- Tang, B. R., & Ulrik, H. (2018). Relationship between oxygen concentration, respiration and filtration rate in blue mussel *Mytilus edulis*. *Journal of Oceanology and Limnology*, 36, 395–404. <https://doi.org/10.1007/s00343-018-6244-4>

- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 279, 1005–1028. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005>
- Tixier, C., Singer, H. P., Oellers, S., & Müller, S. R. (2003). Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental Science and Technology*, 37, 1061–1068. <https://doi.org/10.1021/es025834r>
- Tomanek, L., Zuzow, M. J., Ivanina, A. V., Beniash, E., & Sokolova, I. M. (2011). Proteomic response to elevated PCO₂ level in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative stress. *Experimental Biology*, 214, 1836–1844. <https://doi.org/10.1242/jeb.055475>
- Trombini, C., Hampel, M., & Blasco, J. (2019). Assessing the effect of human pharmaceuticals (carbamazepine, diclofenac and ibuprofen) on the marine clam *Ruditapes philippinarum*: an integrative and multibiomarker approach. *Aquatic Toxicology*, 208, 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.01.004>
- Turley, C., Eby, M., Ridgwell, A.J., Schmidt, D.N., Findlay, H.S., Brownlee, C., Riebesell, U., Fabry, V.J., Feely, R.A., Gattuso, J.-P., 2010. The societal challenge of ocean acidification. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 787–792.
- US EPA. (1998). US Environmental Protection Agency. SCE policy issues related to the food quality protection act. Office of pesticide programs science policy on the use of cholinesterase inhibition for risk assessment of organophosphate and carbamate pesticides. OOP Docket # 00560. Federal Register, 63, 214.
- Vargas, C. I. C., Vaz, N., & Dias, J. M. (2017). An evaluation of climate change effects in estuarine salinity patterns: Application to Ria de Aveiro shallow water system. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 189, 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.03.001>
- Vaz, N., & Dias, J. M. (2008). Hydrographic characterization of an estuarine tidal channel. *Marine Systems*, 70, 168–181. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2007.05.002>
- Vaz, N., Dias, J. M., & Leitão, P. C. (2009). Three-dimensional modelling of a tidal channel: The Espinheiro Channel (Portugal). *Continental Shelf Research*, 29, 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2007.12.005>
- Velez, C., Figueira, E., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. (2016). Native and introduced clams biochemical responses to salinity and pH changes. *Science of The Total Environment*, 566–567, 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.019>

- Velez, C., Figueira, E., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. (2016a). Combined effects of seawater acidification and salinity changes in *Ruditapes philippinarum*. *Aquatic Toxicology*, 176, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.016>
- Velez, C., Figueira, E., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. (2016b). The impacts of As accumulation under different pH levels: Comparing *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* biochemical performance. *Environmental Research*, 151, 653–662. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.06.041>
- Velez, C., Figueira, E., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. (2017). Effects of seawater temperature increase on economically relevant native and introduced clam species. *Marine Environmental Research*, 123, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.11.010>
- Velez, C., Galvão, P., Longo, R., Malm, O., Soares, A. M. V. M., Figueira, E., & Freitas, R. (2015). *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus* under Hg environmental contamination. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 11890–11904. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4397-7>
- Velez, C., Pires, A., Sampaio, L., Cardoso, P., Moreira, A., Leandro, S., Figueira, E., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. (2015). The use of *Cerastoderma glaucum* as a sentinel and bioindicator species: Take-home message. *Ecological Indicators*, 62, 228–241. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.10.051>
- Verlecar, X. N., Jena, K. B., & Chainy, G. B. N. (2007). Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. *Chemico-Biological Interactions*, 167, 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.01.018>
- Vinagre, C., Leal, I., Mendonça, V., & Flores, A. A. V. (2015). Effect of warming rate on the critical thermal maxima of crabs, shrimp and fish. *Journal of Thermal Biology*, 47, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.10.012>
- Wang, J., & Wang, S. (2016). Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: A review. *Journal of Environmental Management*, 182, 620–640. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.07.049>
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *The Journal of Cell Biology*, 217, 1915–1928. doi:10.1083/jcb.201708007
- Waycott, M., Duarte, C. M., Carruthers, T. J. B., Orth, R. J., Dennison, W. C., Olyarnik, S., Calladine, A., Fourqurean, J. W., Heck, K. L., Hughes, A. R., Kendrick, G. A.,

- Kenworthy, W. J., Short, F. T., & Williams, S. L. (2009). Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *PNAS*, 106, 12377–12381. <https://doi.org/doi.org/10.1073/pnas.0905620106>
- Waykar, B., & Deshmukh, G. (2012). Evaluation of bivalves as bioindicators of metal pollution in freshwater. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88, 48–53. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0447-0>
- Wenguan, L., & Maoxian, H. (2012). Effects of ocean acidification on metabolic rates of three species of bivalve from southern coast of China. *Oceanology and Limnology*, 30, 206–211. <https://doi.org/10.1007/s00343-012-1067-1>
- WMO. (2018). World Meteorological Organization: greenhouse gas bulletin, No.14. Retrieved September 16, 2019, from <https://public.wmo.int/en/resources/library/wmo-greenhouse-gas-bulletin>
- WMO. (2019). Frequently Asked Questions: What is climate? Retrieved from World Meteorological Organization. Retrieved September 20, 2019, from http://www.wmo.int/pages/prog/wcp/ccl/faq/faq_doc_en.html
- Wolanski, E., & Elliott, M. (2015). Estuarine Ecohydrology: An Introduction. In *Estuarine Ecohydrology: An Introduction: Second Edition (Second Edition)*. Elsevier, 321pp.
- WWF. (2019). Blue Planet: Coasts - Some of the most productive and biologically rich areas on Earth. Retrieved October 18, 2019, from https://wwf.panda.org/our_work/oceans/coasts/
- Xu, X., Yang, F., Zhao, L., & Yan, X. (2016). Seawater acidification affects the physiological energetics and spawning capacity of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* during gonadal maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 196, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.02.014>
- Yang, G. (2016). Global challenges and solutions of emerging contaminants: An editorial overview and beyond. *Chemosphere*, 168, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.076>
- Yang, Y., Fu, J., Peng, H., Hou, L., Liu, M., & Zhou, J. L. (2011). Occurrence and phase distribution of selected pharmaceuticals in the Yangtze Estuary and its coastal zone. *Hazardous Materials*, 190, 588–596. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.03.092>
- Yu, B. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74, 139–162. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.1.139>

- Yu, J., Bouwer, E., & Coelhan, M. (2006). Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage. *Agricultural Water*, 86, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2006.06.015>
- Yusof, A. M., Yanta, N. F., & Wood, A. K. H. (2004). The use of bivalves as bio-indicators in the assessment of marine pollution along a coastal area. *Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 259, 119–127. <https://doi.org/10.1023/B:JRNC.0000015816.16869.6f>
- Zakroff, C., Mooney, T. A., & Wirth, C. (2017). Ocean acidification responses in paralarval squid swimming behavior using a novel 3D tracking system. *Hydrobiologia*, 17, 3342–3349. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3342-9>
- Zhang, D., Li, S., Wang, G., Guo, D., Xing, K., & Zhang, S. (2012). Biochemical responses of the copepod *Centropages tenuiremis* to CO₂-driven acidified seawater. *Water Science and Technology*, 65, 30–37. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.821>
- Zilnik, L. F., Jazbinsek, A., Hvala, A., Vrecer, A., & Klamt, A. (2007). Solubility of sodium diclofenac in different solvents. *Fluid Phase Equilibria*, 261, 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2007.07.020>
- Zwaan, A. De, & Wusman, T. C. M. (1976). Anaerobic metabolism in bivalvia (mollusca): Characteristics of anaerobic metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 54, 313–324. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(76\)90247-9](https://doi.org/10.1016/0305-0491(76)90247-9)

