



Universidade de Aveiro
2021

**Adriana Isabel
Rodrigues Ferreira**

Efeitos ao nível bioquímico da adição de dietas no processo de depuração de moluscos bivalves e posterior tempo de prateleira



Universidade de Aveiro
2021

**Adriana Isabel
Rodrigues Ferreira**

Efeitos ao nível bioquímico da adição de dietas no processo de depuração de moluscos bivalves e posterior tempo de prateleira

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

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto: BioDepura – Desenvolvimento de metodologias de depuração de moluscos bivalves adequadas aos requisitos fisiológicos de cada espécie (MAR-02.01.01- FEAMP 0018), financiado pelo Programa MAR2020, Portugal 2020 e União Europeia através do FEAMP - Fundo Europeu dos Assuntos Marítimos e das Pescas;



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu
dos Assuntos Marítimos
e das Pescas

Dedico este trabalho ao meu pai, que apesar de já cá não estar, me apoiou durante todo o meu percurso académico, não permitindo que nada além da minha vontade e determinação fosse um fator para me parar...

o júri

Presidente

Prof. Doutora Maria Marina Pais Ribeiro da Cunha
Professora Associada da Universidade de Aveiro

Arguente

Doutora Domitília da Conceição Coutinha Matias
Investigadora Auxiliar do Instituto Português do Mar e da Atmosfera

Orientador

Doutor Rui Jorge Miranda Rocha
Professor Auxiliar Convidado da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Quero começar por agradecer ao Doutor Rui Rocha por me ter permitido a oportunidade de participar neste projeto e um grande obrigado à Doutora Andreia Rodrigues, cuja orientação foi essencial para a escrita e aperfeiçoamento desta tese.

Um agradecimento especial à Vitória e à Silvia pela ajuda que me deram e pela paciência que tiveram comigo durante todo o processo.

Agradeço também aos amigos que colecionei durante o meu percurso nesta academia. Em particular aos elementos da “Muy Noble Família” por me aturarem nos meus momentos de desabafo, e por todos os cafés nas horas de procrastinação. Nunca me poderia esquecer da Gabi, a minha amiga do outro lado da “fronteira”, que me acompanha desde o secundário.

Quero também agradecer à família Káiros, por todas as vezes que me ouviram falar deste trabalho, apesar de já o terem feito incontáveis vezes antes e já o saberem de cor. Também por todas as sextas-feiras em que ficamos até às tantas da manhã a falar de tudo e de nada.

Por último, mas não menos importante (definitivamente, não menos importante!), à minha família por todo o apoio neste processo, e nos restantes 22 anos de aprendizagem anteriores à Tese. Em particular à minha mãe e ao meu irmão. Esta tese também à minha mãe, não preciso dizer nada, é a minha mãe... esteve sempre a par comigo quando não queria fazer as cópias na primaria, quando lhe explicava as matérias de Ciências Naturais e de História para estudar para os testes, ao fim e ao cabo, a minha licenciatura e o meu mestrado são também dela. Também é do meu irmão, que desde que nasci sempre sonhou mais para mim do que eu própria conseguia sonhar, que me ensinou a fazer o meu primeiro trabalho de português e a quem tantas vezes eu lhe ditei os seus trabalhos da universidade, quando ainda não consegui chegar com os pés ao chão enquanto estava sentada.

palavras-chave

Bivalves; *Solen marginatus*; *Crassostrea gigas*;
Stress Oxidativo; Alocação de energia celular;
Tempo de prateleira; Segurança alimentar

resumo

A contaminação microbiológica de moluscos bivalves representa uma das maiores preocupações, inerentes à segurança alimentar, desta importante fonte de receitas para a economia portuguesa. Por isso, existem zonas de captura com diferentes classificações, onde, dependendo da carga microbiológica e do conteúdo em outros contaminantes, os animais aí capturados serão ou não destinados a um processo de depuração, de modo a diminuir a concentração dessas substâncias.

A depuração de moluscos bivalves, processo durante o qual os bivalves são mantidos em água limpa, em circuito fechado ou aberto, contribui de uma forma decisiva para o aumento dos níveis de segurança alimentar associados ao consumo destes organismos frescos. No entanto, durante este processo, os bivalves permanecem em água limpa, sem qualquer tipo de alimento, o que pode contribuir para a diminuição das suas características bioquímicas e respetivo valor nutricional. Por outro lado, a adaptação das condições de depuração, tendo em conta os requerimentos de cada espécie, poderá melhorar a própria capacidade de depuração e aumentar a qualidade do produto para o consumidor.

O objetivo deste estudo passou por avaliar os efeitos de 3 regimes alimentares diferentes (sem adição de dietas, adição de uma dieta à base de *Nannochloropsis sp.*, microencapsulada, e a adição de uma dieta à base de *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E) durante o processo de depuração, assim como na qualidade e tempo de prateleira de ostra (*C. gigas*) e de lingueirão (*S. marginatus*). Para tal, procedeu-se a 2 ensaios de 24 horas de depuração, seguidos de um período de armazenamento a 5 ± 1 °C durante 6 dias. Analisaram-se os parâmetros bioquímicos, indicadores de stresse oxidativo, no início e fim da depuração, bem como a meio e no fim do período de prateleira (3º e 6º dias). Os resultados das análises nas ostras apontam a que a existam diferenças no efeito dos diferentes regimes nas ostras, evidenciando-se os efeitos benéficos da dieta de *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitaminas C e E em relação às demais. Já as análises dos lingueirões apenas apresentaram diferenças em 2 dos parâmetros testados, ainda assim os resultados indicam para maiores efeitos benéficos da dieta enriquecida com vitaminas C e E em comparação com os restantes 2 tratamentos.

Keywords

Bivalves; *Solen marginatus*; *Crassostrea gigas*; Oxidative stress; Cellular energy allocation; Shelf time; Food safety

Abstract

Microbiological contamination of bivalve molluscs represents one of the greatest concerns, inherent to food security, of this important source of income for the Portuguese economy. Therefore, there are capture zones with different classifications, where, depending on the microbiological load and the content of other contaminants, the captured animals will or will not be destined for a purification process, to reduce the concentration of these substances.

The purification of bivalve molluscs, a process during which the bivalves are kept in clean water, in a closed or open circuit, decisively contributes to increasing food safety levels associated with the consumption of these fresh organisms. However, during this process, the bivalves remain in clean water, without any type of food, which can contribute to the reduction of their biochemical characteristics and their nutritional value. On the other hand, adapting the purification conditions, considering the requirements of each species, can improve the purification capacity itself and increase the quality of the product for the consumer.

The aim of this study was to evaluate the effects of 3 different diets (no diet added, addition of a microencapsulated *Nannochloropsis sp.*-based diet, and the addition of a microencapsulated *Nannochloropsis sp.* based and vitamin C and E enriched diet) during the purification process, as well as the quality and shelf life of oysters (*C. gigas*) and razor clams (*S. marginatus*). To this end, 2 tests of 24-hour clearance were carried out, followed by a storage period at 5 ± 1 °C for 6 days. Biochemical parameters, indicators of oxidative stress, at the beginning and end of depuration, as well as at the middle and end of the shelf period (3rd and 6th days) were analysed. The results of the analyses in the oysters show that there are differences in the effect of the different diets in the oysters, showing the beneficial effects of the diet of *Nannochloropsis sp.* microencapsulated and enriched with vitamins C and E in relation to the others. The razor clams only showed differences in 2 of the tested parameters, yet the results indicate greater beneficial effects of the diet enriched with vitamins C and E compared to the other 2 treatments.

Índice

Resumo

Abstract

1. Introdução	1
1.1. Moluscos bivalves	2
1.1.1. <i>Crassostrea gigas</i>	3
1.1.2. <i>Solen marginatus</i>	5
1.2. Depuração e tempo de prateleira.....	6
1.3. Fatores de stresse durante a depuração e comercialização.....	9
1.4. Stress oxidativo	10
1.5. Objetivos	12
2. Material e Métodos	13
2.1. Área de amostragem	13
2.2. Dietas.....	14
2.3. Ensaio experimental.....	15
2.4. Preparação das amostras para os biomarcadores.....	17
2.5. Análise dos biomarcadores.....	19
2.5.1. Disponibilidade energética (Ea)	20
2.5.2. Consumo de Energia (Ec)	20
2.5.3. Alocação de energia celular	21
2.5.4. Biomarcadores de stress oxidativo	21
2.6. Avaliação de dano genético	21
2.6.1. Ensaio do Cometa.....	21
2.7. Análise estatística.....	23
3. Resultados	24
3.1. <i>Crassostrea gigas</i>	24
3.1.1. Mortalidade	24
3.1.2. Lípidos.....	24
3.1.3. Açúcares.....	25
3.1.4. Proteínas	26
3.1.5. Energia disponível	28
3.1.6. Produção de energia aeróbia.....	29
3.1.7. Alocação de energia celular	30
3.1.8. Catalase.....	31
3.1.9. Glutathione S-Transferase	32
3.1.10. Peroxidação Lipídica.....	33
3.1.11. Dano Genético	34
3.2. <i>Solen marginatus</i>	35
3.2.1. Mortalidade	35
3.2.2. Lípidos.....	36
3.2.3. Açúcares.....	37
3.2.4. Proteínas	38
3.2.5. Energia disponível	39
3.2.6. Produção de energia aeróbia.....	40
3.2.7. Alocação de energia celular	41
3.2.8. Catalase.....	42
3.2.9. Glutathione S-Transferase	43
3.2.10. Peroxidação Lipídica.....	44

3.2.11. Dano Genético	45
4. Discussão	47
4.1. <i>Crassostrea gigas</i>	47
4.1. <i>Solen marginatus</i>	57
5. Conclusão	64
6. Referências	65

Índice de Figuras

Figura 1. *C. gigas* (Ostra do Pacífico). (Direitos de: Maximilian Schupp, 2015).

Figura 2. *S. marginatus* (Lingueirão) (Direitos de: José Almeida).

Figura 3. Localização da Ria de Aveiro. (Fonte: www.ipma.pt/bivalves/zonas, 2021).

Figura 4. Microalga da espécie *Nannochloropsis oculata* (Fonte: Daniells (2015)).

Figura 5. Sistema de depuração e os seus diferentes componentes.

Figura 6. Ostra aberta num dos momentos de amostragem.

Figura 7. Lingueirão aberto num dos momentos de amostragem.

Figura 8. Placas de 96 poços utilizadas nas análises dos biomarcadores.

Figura 9. Imagens de cometas, corados com brometo de etídio, elucidando a classificação visual desde 0 (sem cauda) a 4 (quase todo o DNA na cauda).

Figura 10. Conteúdo em lípidos (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Figura 11. Conteúdo em açúcares (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia

de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Figura 12. Conteúdo em proteínas (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Figura 13. Energia disponível (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Figura 14. Produção de energia aeróbia (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Figura 15. Alocação de energia celular (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com

Nannochloropsis sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Figura 16. Catalase (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com Nannochloropsis sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com Nannochloropsis sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Figura 17. Glutathione S-transferase (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com Nannochloropsis sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com Nannochloropsis sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Figura 18. Peroxidação Lipídica (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com Nannochloropsis sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com Nannochloropsis sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Figura 19. Dano genético (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Figura 20. Conteúdo em lípidos (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Figura 21. Conteúdo em açúcares (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Figura 22. Conteúdo em proteínas (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da

depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Figura 23. Energia disponível (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Figura 24. Produção de energia aeróbia (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Figura 25. Alocação de energia celular (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Figura 26. Catalase (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Figura 27. Glutathione S-transferase (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Figura 28. Peroxidação Lipídica (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Figura 29. Dano genético (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia

de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

1. Introdução

Segundo a Direção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos (DGRM, 2014) a aquacultura consiste na criação ou cultivo de organismos aquáticos usando métodos pensados para aumentar a sua produção além da capacidade natural do meio ambiente. Esta implica a intervenção humana no processo de criação, para aumentar a produtividade individual e em grupo da biomassa cultivada (Matias, 2013). Com a crescente necessidade de produção de alimentos, resultante do constante aumento da população, a aquacultura tem-se destacado como uma das alternativas mais viáveis na produção de alimentos com alto teor de proteína, particularmente num contexto em que a pesca selvagem deixou em grande parte de ser sustentável, onde cerca de um terço do stock de pescado está classificado como sobre explorado e quase dois terços como completamente esgotados (Pauly & Zeller, 2016)

A aquacultura ganha particular relevo quando se trata de bivalves, já que desta advém a produção de cerca de 89% destes moluscos (Venier et al., 2018). A produção de espécies de bivalves é uma forma atrativa de aquacultura uma vez que, por serem animais filtradores, alimentam-se do alimento disponível no próprio ambiente aquático, e portanto, não é necessária nenhuma adição de suplementos alimentícios artificiais (Gibbs, 2007). Por essa mesma razão, esta forma de aquacultura acaba por ser menos prejudicial para o meio ambiente, comparando, por exemplo, com a piscicultura, assim como pelo facto de que os resíduos produzidos por estes animais devolvem os nutrientes e minerais ao ecossistema. Os bivalves mais produzidos no mundo são a ostra, a amêijoia, a vieira e o mexilhão (Gallardi, 2014). Em Portugal, a indústria aquícola tem aumentado gradualmente a sua relevância, atingindo em 2018 uma produção de 13 992 toneladas, das quais os moluscos bivalves representavam 67,2% nesse mesmo ano. Este aumento da produção de moluscos resultou da substituição da prática de piscicultura pela

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

1.1. Moluscos bivalves

O molusco bivalve pode ser descrito como um animal de corpo mole protegido por um exosqueleto com forma de uma concha de duas valvas, que se articulam por uma charneira e são mantidas unidas pelos músculos adutores (IPMA, 2016). A esta definição, Lees (2000) acrescenta a noção de uma elevada variabilidade de características e do tipo de habitat. A diversidade de habitat tem como exemplo, o facto de existirem espécies que conseguem adaptar-se a condições de seca, de modo a sobreviver a longos períodos fora de água, fechando firmemente as duas valvas, o que permite a retenção da água do mar em redor da parte mole do organismo (Lees, 2000). O referido mecanismo faz com que se desenvolvam vias metabólicas anaeróbias, já que ao manterem as valvas fechadas vem-se submetidos a um período de hipoxia, enquanto que com esta adaptação conseguem sobreviver a esse intervalo de tempo (Randall et al., 1997).

Como organismos filtradores, estes animais utilizam como fonte de alimento fitoplâncton, zooplâncton, detritos e bactérias coliformes, fornecidos através das correntes marinhas (Wright et al., 1982). Tendo em conta que se alimentam destas pequenas partículas presentes no meio envolvente, os moluscos bivalves bioacumulam bactérias autóctones ou de origem antropogénica sendo, por este motivo, extremamente suscetíveis à contaminação por estas (Rees et al., 2013). Bactérias coliformes, como é o caso da *Escherichia coli*, são utilizadas como indicadores da qualidade do marisco, onde estão incluídos os bivalves, e também são utilizadas para classificar a qualidade da água da qual estes organismos são retirados para consumo (Hood et al., 1983). Por serem espécies sedentárias e de larga distribuição geográfica, os moluscos bivalves são considerados bons

bioindicadores do estado de poluição e contaminação das águas que habitam (Kim et al., 2002).

Os bivalves são um alimento tenro, de fácil digestão e por norma sem grandes processamentos ou aditivos. Graças a estas características, tornam-se um produto que satisfaz a maioria das exigências dos consumidores (Murchie et al., 2005). Estes animais apresentam-se como um produto importante na dieta humana em todo o mundo, e particularmente interessante para países em desenvolvimento, onde a principal fonte de proteína animal são os organismos aquáticos, tendo em conta que os bivalves têm um conteúdo proteico semelhante ao dos ovos e do leite (FAO, 2008). Por serem ricos em minerais, vitaminas e ácidos gordos, tornam-se uma componente muito importante na dieta humana, em especial porque estes últimos ajudam a reduzir o risco de formação de coágulos, o que contribui para a proteção contra doenças cardiovasculares, bem como para a redução do colesterol (LDL) (Correia, 2016). Incluir estes moluscos na dieta torna-se também benéfico para um correto desenvolvimento, graças às proteínas nestes presentes, fundamentais para que tal aconteça (Oliveira et al., 2011; Correia, 2016).

1.1.1. *Crassostrea gigas*

As ostras fazem parte do filo *Mollusca*, que inclui aproximadamente 50.000 espécies, e são encontradas na zona entremarés de águas em todo o mundo, até uma profundidade de 30 metros. Estes moluscos são filtradores omnívoros e obtêm seu alimento da coluna de água circundante. As ostras do género *Crassostrea* são nativas das zonas inter e subtidais de águas quentes e salobras no oeste do Oceano Pacífico, mas conseguem tolerar e até podem prosperar numa ampla gama de salinidades e temperaturas (Matthiessen, 2001). Esta capacidade de tolerar diferentes condições do meio torna a *C. gigas* uma das espécies de invertebrados marinho com maior distribuição geográfica. De acordo com Ruesink et al. (2005) as

ostras do pacífico já foram introduzidas em 66 países fora da sua região de origem, e em pelo menos 17 destes as suas populações conseguiram-se tornar autossustentáveis.



Figura 1 – *C. gigas* (Ostra do Pacífico). (Direitos de: Maximilian Schupp, 2015).

Como é característico de um organismo da classe *Bivalvia*, o corpo da ostra está preso entre duas conchas calcíferas, a valva esquerda, que é profundamente escavada e segura o corpo da ostra, e direita, que funciona como uma tampa. As duas valvas encontram-se conectadas por um ligamento robusto na extremidade pontiaguda. O umbo é a parte mais antiga da concha e a ostra cresce para fora a partir do mesmo. Os órgãos internos são dispostos ao redor do músculo adutor central, que contrai o ligamento quando fechado (Boghen, 1995; Spencer, 2002). Os maiores órgãos são os ctenídios emparelhados (guelras). Eles servem ao mesmo tempo para trocas gasosas e coleta de partículas de alimentos (Spencer, 2002).

As ostras *C. gigas* são organismos dioicos (ou seja, têm dois sexos diferentes) e, por norma, alcançam a sua maturidade sexual após o primeiro ano de vida. São hermafroditas alternadas, o que significa que mudam de sexo anualmente, ainda que condições ambientais, tais como a salinidade, a temperatura e a disponibilidade de alimentos, possam afetar este ciclo. Por exemplo, ambientes com grande

abundância de alimentos tendem a produzir um rácio maior de fêmeas para machos (Boghen, 1995; Spencer, 2002).

1.1.2. *Solen marginatus*

Solen marginatus é uma espécie de lingueirão pertencente à Família *Solenidae* (López et al., 2005).



Figura 2 – *S. marginatus* (Lingueirão) (Direitos de: José Almeida).

Esta espécie pode ser encontrada em estuários, lagoas costeiras e no litoral costeiro, vivendo enterrada no substrato das zonas inter e subtidais, sendo que está perfeitamente adaptada a viver neste tipo de habitat (Macedo et al., 2014). Segundo Tebble (1966), a sua localização geográfica é abrangente, podendo ser encontrado desde as costas da Noruega e do Mar Báltico até à zona costeira da Península Ibérica e Mar Mediterrâneo, bem como do Mar Negro ao Senegal, ao largo da costa Africana.

A concha do lingueirão é frágil e quebradiça. Com um formado retangular e muito alongadas, as conchas deste animal são equivalves e as suas extremidades são separadas quase verticalmente e abertas (Fernández-Tajes & Méndez, 2007). Cada válvula tem um dente cardinal, um ligamento externo e um perióstraco brilhante (Saeedi & Costello, 2019). O lingueirão possui ainda um grande e poderoso pé, que lhe permite, de forma rápida, enterrar-se verticalmente até profundidades

de 60 centímetros (López et al., 2005), bem como dois sifões carnudos, inalante e exalante, que se estendem para a coluna de água. O sifão inalante inala a água para a respiração e alimentação, enquanto o sifão exalante elimina a água, os excrementos, e os gâmetas (Da Costa, 2011). Quando atacados por predadores, estes animais podem perder os seus sifões, os quais podem voltar a crescer (Saeedi & Costello, 2019).

Os bivalves *Solenidae* são organismos dioicos, e o *S. marginatus* reproduz-se apenas uma vez por ano, libertando grandes quantidades de gametas, que acabam numa fertilização externa sincronizada e no subsequente recrutamento (Saeedi & Costello, 2019).

1.2. Depuração e tempo de prateleira

Como referido anteriormente, os bivalves são animais filtradores, e é daí que provem a sua alimentação. No entanto esta mesma capacidade filtradora leva a que estejam expostos ao risco de contaminação por agentes patogénicos, biotoxinas de algas e metais (Barile et al., 2009). Estes microrganismos patogénicos, sejam eles de origem endémica ou derivados de contaminação fecal podem ficar acumulados nos tecidos dos bivalves (Leoni et al., 2017). Nesse caso, o consumo de bivalves crus ou levemente cozinhados pode ser prejudicial para a saúde humana (Dore & Lees, 1995).

Por outro lado, apesar dos bivalves terem que estar vivos durante o tempo de prateleira (o período de tempo no qual o alimento mantém as características organoléticas que o caracterizam), a viabilidade por si só não é uma garantia de que os bivalves estão saudáveis, uma vez que o produto pode ter sido contaminado durante o processo de recolha ou durante o manuseio e transporte ao longo das fases de distribuição (Barile et al., 2009).

Por esse motivo, existem já várias normas e padrões de higiene e saúde para garantir a qualidade do produto e proteger a saúde pública. A classificação de zonas de produção de moluscos bivalves e a depuração obrigatória para os moluscos bivalves que não sejam considerados próprios para consumo humano são exemplos dessas mesmas regras (Barile et al., 2009).

Segundo despacho nº 15264/2013 da 2ª série do Diário da República de 22 de novembro de 2013, existe uma classificação das zonas de produção de moluscos bivalves em Portugal. Esta classificação, baseada em critérios bacteriológicos, está dividida em 5 classes:

Classe A - o teor da bactéria *E. coli* por 100g de amostra é inferior ou igual a 230. Nestas, os bivalves podem ser imediatamente apanhados e comercializados para consumo humano direto.

Classe B - quando em pelo menos 90% das amostras, por 100g de amostra, o teor de *E. coli* seja maior a 230 e inferior ou igual a 4600. Os bivalves apanhados em zonas de classe B ficam destinados a depuração, transposição ou transformação em unidade industrial.

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

Classe Proibida - o teor de *E. coli* por 100 g de amostra é superior a 46000, e assim sendo a captura de moluscos bivalves é interdita.

Não Classificada - quando existe insuficiência de dados para uma determinada zona. Nestas zonas a captura de bivalves é também interdita.

Para além da classificação de zonas de produção, verificou-se a necessidade da criação de um processo que permitisse reduzir o teor de conteúdo microbiológico, para consumo humano, e esse processo é conhecido por depuração (Correia, 2016). A depuração é um processo onde os moluscos bivalves vivos são mantidos em tanques de água do mar esterilizada em condições que maximizam a

atividade de filtração natural, o que resulta na expulsão de conteúdo intestinal, durante o tempo necessário para reduzir a contaminação de forma a torná-los próprios para consumo humano (Krus, 2017). De um modo geral é realizada durante um período de tempo que se pode estender das 24 às 48 horas, em alguns casos até várias semanas ou meses após a colheita dos bivalves, dependendo da classificação da zona onde foram colhidos (Catarina & Jesus, 2015). O principal objetivo da depuração é a remoção dos contaminantes microbianos patogénicos e dos microrganismos de deterioração, por forma a aumentar o tempo de validade do produto (Lees, 2000). Esta é realizada em sistemas próprios para o efeito, podendo estes ser sistemas fechados (de recirculação) ou abertos (de fluxo contínuo) (Barile et al., 2009). Para que a purificação dos bivalves ocorra dentro de condições controladas, a água é desinfetada durante a depuração. Isto pode ser feito por meio de um sistema de filtração UV durante 2 dias, ou através de químicos como o cloro ou o ozono (Pereira et al., 2017). Em sistemas fechados, a água utilizada deve ainda ser reposta em 5-10% durante 24 h, para colmatar os efeitos da evaporação (Barile et al., 2009).

De acordo com a legislação, as depuradoras têm de cumprir duas etapas: a validação e a verificação. A primeira consiste na realização de um estudo prévio da eficácia do sistema de depuração sob determinados parâmetros; a segunda consiste na realização de análises microbiológicas a agentes patogénicos específicos, tais como as bactérias *E. coli* e a *Salmonella spp.*, antes e após o processo de depuração (Castilho, 2010; Correia, 2016). Após o processo de depuração, os bivalves poderão ser destinados a consumo humano se apresentarem um número mais provável (NMP) de *E. coli* inferior a 230 por cada 100 gramas de tecido e líquido intervalvar, assim como uma ausência total de *Salmonella spp.*

No presente trabalho, não foram realizados testes microbiológicos, correspondentes à fase de verificação, um vez que, inseridos no projeto BioDepura, existem já trabalhos que comprovam que as condições escolhidas para a depuração

permitem alcançar os resultados desejados no que respeita ao teor microbiológico (Silvestre et al., 2021).

Durante a depuração, a temperatura e a salinidade são dois parâmetros importantes a ter em consideração (Oliveira et al., 2011). Uma vez colocado no sistema, as condições fisiológicas devem ser escolhidas de modo a maximizar a atividade dos animais (Krus, 2017). Sabe-se que, águas mais quentes, mas com temperaturas dentro dos limites fisiológicos de cada espécie, promovem um aumento da taxa metabólica dos moluscos bivalves, como a digestão e a atividade enzimática, tendo todos estes fatores um papel relevante na redução microbiana (Correia, 2016). Tendo em consideração a reduzida capacidade de adaptação que os bivalves apresentam à variação de salinidade, esta é também um fator crítico no processo de depuração (Correia, 2016). Esta é um parâmetro crítico, pois afeta o processo fisiológico dos bivalves (Monteiro, 2004). Após a depuração e durante o tempo de prateleira, a conservação e armazenamento dos bivalves vivos devem ser feitas em câmaras de conservação, onde estes devem ser mantidos a uma temperatura que não seja prejudicial à sua qualidade e viabilidade (Catarina & Jesus, 2015), geralmente entre 2 e 10 °C, dependendo da espécie (FAO, 2008.).

1.3. Fatores de stresse durante a depuração e comercialização

Apesar de garantir uma melhor qualidade microbiológica e, por conseguinte, um aumento no valor económico dos moluscos bivalves, a depuração causa stresse fisiológico que pode provocar perdas significativas e alterações na composição nutricional do produto final. Assim, a depuração dos bivalves por períodos mais longos está associada à perda de uma percentagem significativa do índice corporal e das reservas lipídicas, o que se traduz numa diminuição da qualidade nutricional (Krus, 2017). Durante a depuração, a atividade metabólica dos bivalves pode sofrer alterações, principalmente no que diz respeito ao consumo de oxigénio, que é o

principal indicador de stresse, uma vez que é comum encontrar as valvas das conchas ligeiramente abertas de modo a assegurar a respiração (Cunha, 2012). Segundo o capítulo V, Secção VII, do Anexo III do Regulamento n.º 853/2004, após a depuração, é suposto que os bivalves possuam características organoléticas associadas à frescura e à viabilidade. Entre estas características estão: a isenção de sujidade nas conchas, uma reação adequada à percussão (um som maciço quando percutidos), quantidades normais de líquido intravalvar (água limpa no seu interior), cheiro a maresia e valvas fechadas ou, quando abertas fecharem hermeticamente após serem tocadas, evidenciando vitalidade. Já durante o transporte, os bivalves não deverão estar expostos a quaisquer contaminações, esmagamento ou vibração extrema, de modo que se mantenha a qualidade e a viabilidade do produto, mantendo, idealmente, uma temperatura entre 2 e 10°C, variando consoante a espécie (FAO, 2008). Em consequência da atual complexidade do comércio de bivalves, os animais são sujeitos a diversos fatores de stresse durante este processo que começa na sua captura e termina no respetivo armazenamento, incluindo longos períodos de exposição ao ar e flutuações na temperatura, fazendo com que haja a possibilidade de que no final, durante o tempo de prateleira, o bivalve não atinja o nível de qualidade desejado (Anacleto et al., 2013; Xie et al., 2018). Todos estes fatores têm o seu efeito no bem-estar do bivalve, e deles depende a maior ou menor qualidade do produto, o que como consequência última pode levar a perdas económicas (Anacleto et al., 2013). Tomando isso em consideração, no presente trabalho foram testados os efeitos que a variável estudada, alimentação dos bivalves durante a depuração, teve no stress oxidativo na *C. gigas* e no *S. marginatus*.

1.4. Stress oxidativo

O stresse oxidativo é causado pela exposição a espécies reativas de oxigénio que podem danificar proteínas, ácidos nucleicos e as membranas fosfolipídicas. O

estilo de vida aeróbio resulta inevitavelmente em stress oxidativo, já que o anião superóxido e o peróxido de hidrogénio se formam quando o oxigénio molecular é oxidado na cadeia transportadora de eletrões (Storz & Imlay, 1999). Quando a produção de espécies reativas de oxigénio se torna excessiva, o stress oxidativo torna-se prejudicial na funcionalidade e integridade estrutural do tecido biológico (Knight et al., 2010).

Um dos maiores danos provocado por estas espécies reativas é a peroxidação lipídica, pois os ácidos gordos polinsaturados são bastante sensíveis aos radicais livres. Nestas reações, dá-se a formação de peróxidos lipídicos, que poderão ser modificados para diferentes moléculas que são tóxicas para as células, levando assim a mudanças profundas na estrutura biológica das membranas celulares, alterando as suas funções (Michiels et al., 1994). Para contrariar o stress oxidativo, as células produzem antioxidantes que desintoxicam o oxigénio reativo e reparam o dano que este provoca (Storz & Imlay, 1999), como por exemplo a glutathione (GSH) e enzimas como a glutathione S – transferase (GST), e a catalase (CAT) (Chelikani et al., 2004).

Enzimas como a CAT previnem os efeitos tóxicos desta oxidação dos fosfolípidos presentes nas membranas, proteínas e DNA, através da transformação das moléculas de peróxido de hidrogénio em água e oxigénio (Chelikani et al., 2004). Já as enzimas pertencentes à família das GSTs participam da 2ª fase de desintoxicação da célula, em que a sua função passa por proteger as macromoléculas celulares de ataques de eletrófilos reativos, bem como ajudar na excreção de substâncias fisiológicas e xenobióticas (Wilce & Parker, 1994). Isto porque, ao catalisarem os grupos tiol da GS H para centros eletrofilicos em compostos orgânicos, os conjugados da glutathione tornam-se mais hidrossolúveis, o que facilita a eliminação dos xenobióticos hidrofóbicos. Por outras palavras, estas substâncias são eliminadas através da conjugação da GST e da GS H (Wilce & Parker, 1994).

Quando a taxa de produção de espécies reativas de oxigénio excede a taxa da sua decomposição pelas enzimas antioxidantes, o stresse oxidativo estabelece-se, podendo oxidar componentes celulares chave (Alves de Almeida et al., 2007).

1.5. Objetivos

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar o efeito da alimentação com a microalga *Nannochloropsis sp. spp.* na depuração da *C. gigas* e do *S. marginatus*, para melhorar a qualidade destas espécies durante o período de comercialização (tempo de prateleira). Para tal, foram estudados os efeitos de 3 regimes alimentares diferentes (sem dieta, dieta com *Nannochloropsis sp. spp.* microencapsulada e dieta com *Nannochloropsis sp. spp.* microencapsulada e enriquecida com vitaminas C e E) após o processo de depuração de 22h, num período de 2 h antes do embalamento, nos organismos armazenados a 4°C durante 6 dias após a depuração.

Com este estudo, pretendeu-se verificar:

1) se existe alguma diferença significativa entre a depuração sem adição de dietas e a depuração com as 2 dietas testadas, no stress oxidativo, alocação de energia e no dano genético das 2 espécies, no início, durante e ao fim dos 6 dias de tempo de prateleira.

2) se a adição de dietas no processo de depuração se torna mais vantajosa em termos de stress oxidativo, alocação de energia, dano genéticos e mortalidade das 2 espécies durante o período de comercialização, quando comparada com o procedimento atualmente aceito.

3) qual das dietas adicionadas se revela mais benéfica para cada uma das espécies nos parâmetros anteriormente referidos.

2. Material e Métodos

2.1. Área de amostragem

Neste trabalho 2 espécies de bivalves foram sujeitas a depuração, a *C. gigas* e o *S. marginatus*, ambas colhidas na Ria de Aveiro, classificada como zona B (Figura 3). A depuração das ostras foi realizada em outubro, mês cuja temperatura média da água do mar era $20 \pm 1^\circ\text{C}$. As ostras pesavam em média $59,2 \pm 9,8$ g e mediam uma média de $82,6 \pm 6,5$ mm.

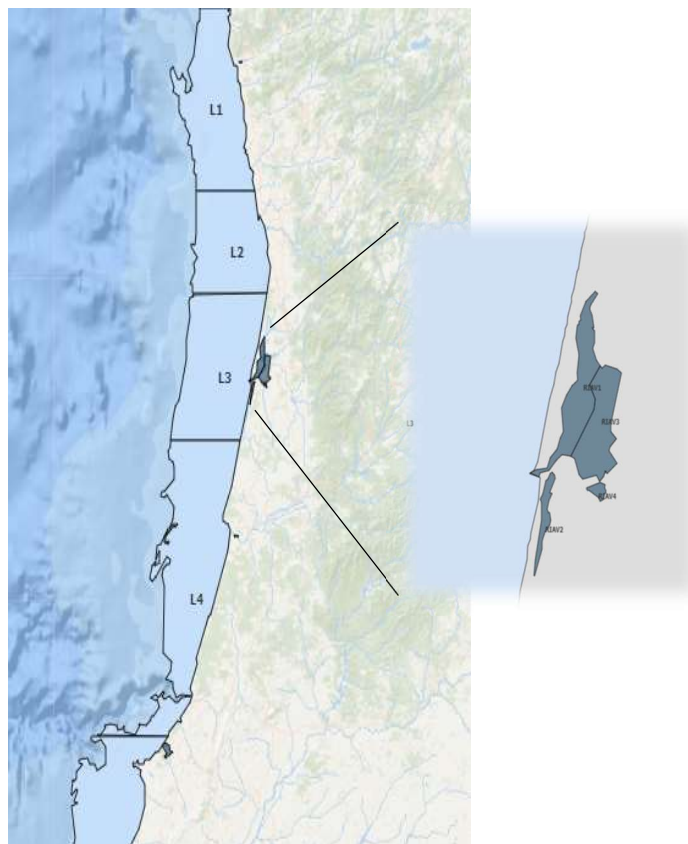


Figura 3 – Localização da Ria de Aveiro. (Fonte: www.ipma.pt/bivalves/zonas, 2021)

Já o processo de depuração do lingueirão teve lugar em abril e por esta altura a temperatura média da água do mar era $17 \pm 1^\circ\text{C}$. Estes animais pesavam em média $31,6 \pm 5,6$ g e mediam uma média $122,9 \pm 7,8$ mm.

2.2. Dietas

Neste trabalho foram testadas 2 dietas à base de *Nannochloropsis sp.* nos organismos depurados. Ambas as dietas continham *Nannochloropsis sp.* microencapsulada (de 40 µm de tamanho), no entanto a 2ª dieta era ainda enriquecida com vitaminas C e E.



Figura 4 - Microalga da espécie *Nannochloropsis oculata* (Fonte: Daniells (2015)).

A *Nannochloropsis sp.* (Figura 4) é uma microalga marinha proposta como uma alternativa ao óleo de peixe, graças às suas grandes quantidades de ácidos gordos ômega-3 na forma de ácido icosapentaenóico (EPA) (Chua & Schenk, 2017), um ácido gordo polinsaturado bastante relevante no consumo humano para a prevenção de doenças (Sukenik et al., 1999). Devido ao seu conteúdo proteico, que pode chegar a 36% da sua biomassa, a *Nannochloropsis sp.* é uma alga de grande interesse para o cultivo em larga escala (Schulze et al., 2016).

Para além do seu teor em ácidos gordos e proteínas, esta alga também é uma reconhecida fonte de vários pigmentos como as zeaxantina e a astaxantina, conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes (Lubian et al., 2000).

Silva et al. (2020), testaram 2 microalgas microencapsuladas (*Nannochloropsis sp.* e *Tetraselmis sp.*), para cada uma 2 tamanhos diferentes (20µm e 40µm), e

perceberam que as ostras não apresentavam preferências entre nenhuma das 2 algas e/ou tamanhos, mas os lingueirões mostravam ter preferência pela *Nannochloropsis* sp, microencapsulada com 40 µm de tamanho, e foi com base nesse estudo que optou pelas dietas à base desta alga.

2.3. Ensaio experimental

Durante este trabalho foram realizados 2 ensaios de depuração, um por cada espécie testada. Em cada um destes testaram-se 3 regimes alimentares: sem alimentação (sem dieta), uma dieta composta por *Nannochloropsis* sp. microencapsulada (Dieta 1) e uma dieta constituída por *Nannochloropsis* sp. microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E (Dieta 2). Para os ensaios de depuração, foram usados 3 g de cada dieta.

Para cada ensaio experimental foram usados 3 sistemas de depuração (1 por regime alimentar), com um tanque 250 L de capacidade por sistema (Figura 5).

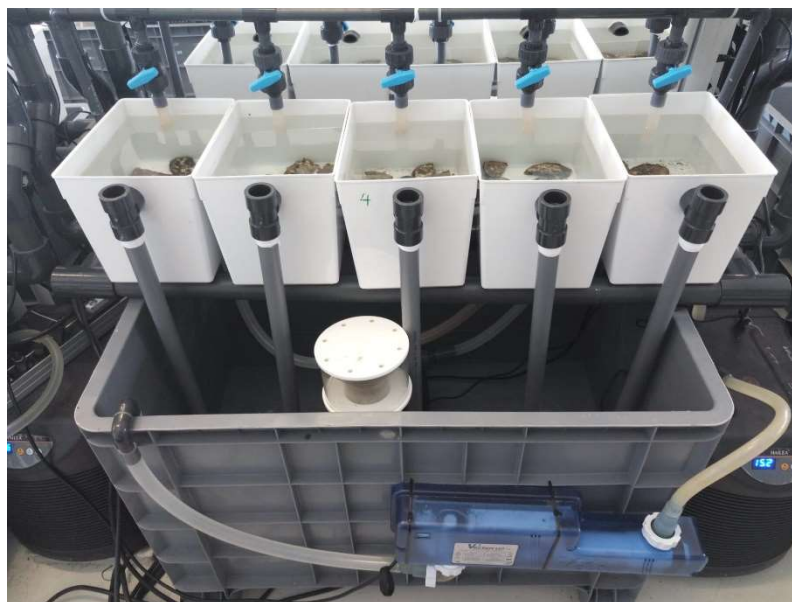


Figura 5 – Sistema de depuração e os seus diferentes componentes.

Para além do tanque grande, cada sistema foi equipado com uma bomba de recirculação, um refrigerador para controlo da temperatura da água, um sistema de filtração UV e um escumador de proteínas para remoção de matéria orgânica (estes 2 últimos eram desligados no momento em que as dietas eram introduzidas no sistema). Para efeito de réplicas, 5 tanques mais pequenos, localizados acima do tanque de 250 L, foram incluídos em cada sistema.

Optou-se pelo uso de água salgada sintética, durante o processo de depuração, que foi obtida a partir de água doce purificada por sistema de osmose reversa e passada por uma bolsa de rede com carvão, para absorção de partículas, à qual foi adicionado um sal sintético, adequado para a manutenção de invertebrados marinhos ("Red Sea Coral Pro Salt"). A água salgada sintética foi produzida num tanque de 500 L e seguidamente distribuída por todos os módulos de depuração.

Antes de cada ensaio foram medidos os parâmetros físico-químicos da água para a depuração das 2 espécies, aproximadamente 15 °C e salinidade 35, bem como o pH 8.

Os ensaios experimentais foram realizados durante 24 h, sendo que as dietas foram introduzidas no sistema após 22 h de depuração, de acordo com o período ótimo de alimentação da ostra e do lingueirão (2 h), determinado em trabalhos preliminares inseridos no projeto no qual esta dissertação se desenvolveu. Já o tempo de prateleira correspondeu a 6 dias após o fim da depuração. Foram realizadas amostragens às 0 h e às 24 h (correspondendo ao início e fim do processo de depuração), bem como às 96 h (3º dia de tempo de prateleira) e 168 h (6º dia de tempo de prateleira) de experiência.

2.4. Preparação das amostras para os biomarcadores

A primeira amostragem, correspondente ao tempo 0, t_{0h} , foi realizada antes de introdução dos organismos nos sistemas de depuração e para tal foram amostrados 5 animais de cada espécie. Ao fim de 24 h, t_{24h} , foram amostrados 5 organismos de cada espécie por condição, sendo os restantes armazenados a 4 ± 1 °C durante 6 dias (período máximo que os bivalves podem permanecer em prateleira para serem vendidos). Nos 2 restantes momentos de amostragem, t_{96h} e t_{168h} , foram também amostrados 5 ostras e 5 lingueirões por dieta, em cada momento.

Garantidas as condições de assepsia, as ostras foram abertas (Figura 6), em bancada regularmente esterilizada, com o auxílio de uma faca, separando as conchas. Utilizando um bisturi, as brânquias foram separadas do tubo da ostra, as primeiras foram reservadas em eppendorfs e o tubo digestivo guardado em tubos Falcon previamente identificados.



Figura 6 -Ostra aberta num dos momentos de amostragem.

As primeiras foram congeladas lentamente numa solução anticongelante de PBS e DMSO (9:1, v: v) e mantidas em material de isolamento térmico, inicialmente a -20 °C por uma semana e depois a -80 °C, para a análise do dano genético (teste cometa). Já o tubo digestivo, antes de ser guardado nos tubos de Falcon 15 mL, e

imediatamente congelado em azoto líquido, sendo depois armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, até à análise dos biomarcadores.

Cada lingueirão foi aberto (Figura 7), o seu pé separado do tubo digestivo e descartado, e as brânquias removidas e congeladas lentamente numa solução anticongelante de PBS e DMSO (9:1, v: v) e mantidas em material de isolamento térmico, inicialmente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por uma semana e depois a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, para a análise do dano genético (teste cometa). O tubo digestivo foi separado da concha, sendo então colocados em tubos de 15 mL devidamente numerados e imediatamente congelados em azoto líquido e armazenadas a -80°C , até à análise dos biomarcadores.



Figura 7 – Lingueirão aberto num dos momentos de amostragem.

Todas as amostras de tecido de ambas as espécies foram pesadas e colocadas de novo nos tubos Falcon para serem homogeneizadas individualmente em gelo, usando $10.000\text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura e o sonicador (modo pulsado de 10% por 30 s, 250 Sonifier, Branson Ultrasonics) (Rodrigues et al., 2015). O objetivo era estudar quantitativamente os seguintes parâmetros:

- Lípidos;

- Açúcares;
- Proteínas;
- Energia disponível (Ea);
- Consumo de energia (Ec);
- Alocação de energia celular (CEA);
- Catalase (CAT);
- Glutathiona-S-transferase (GST);
- Peroxidação lipídica (LPO).

Portanto, foram retiradas três alíquotas de cada amostra para análise dos teores de lipídeos, açúcares e proteínas, bem como da atividade ETS. Uma alíquota contendo 4% de hidroxitolueno butilado (BHT) em metanol foi usada para a determinação de LPO. O homogenato restante foi diluído em tampão K-fosfato 0,2 M, p H 7,4, e centrifugado por 10 min a 10.000 g (4 °C). O sobrenadante pós-mitocondrial (PMS) foi dividido em microtubos e mantido a -80 °C até análises posteriores dos biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo.

2.5. Análise dos biomarcadores



Figura 8 - Placas de 96 poços utilizadas nas análises dos biomarcadores.

Todas as determinações dos biomarcadores foram realizadas espectrofotometricamente, em microensaios montados em placas de fundo plano de 96 poços (Figura 8), com leitor de microplaca MultiSkan Spectrum (Thermo Fisher Scientific, EUA).

2.5.1. Disponibilidade energética (Ea)

O conteúdo lipídico total de cada organismo foi determinado adicionando-se clorofórmio, metanol e água ultrapura na proporção 2:2:1, respetivamente. Após a centrifugação, a fase orgânica de cada amostra foi transferida para tubos de vidro limpos e H₂SO₄ foi adicionado antes da incubação por 15 min a 200 °C. A absorbância foi então medida a 375 nm e a tripalmitina foi usada como um padrão lipídico. A quantificação dos carboidratos foi realizada adicionando 5% de fenol e H₂SO₄ às amostras, tendo como padrão a glicose, sendo a absorbância lida em 492 nm. O método de Bradford (Bradford, 1976) foi usado para quantificação do teor de proteína total usando albumina de soro bovino como padrão e absorbância medida a 520 nm. As frações de energia disponíveis foram convertidas em valores energéticos equivalentes usando a energia de combustão correspondente: 39500 mJ / g de lipídio, 17500 mJ / g de glicogénio, 24000 mJ / g de proteína (Gnaiger, 1983).

2.5.2. Consumo de Energia (Ec)

A atividade do sistema de transporte de eletrões (ETS) foi medida usando o ensaio de redução INT (Iodonitrotetrazolium), no qual o ETS foi medido como a taxa de redução do INT na presença do detergente não iónico Triton X-100, com a absorbância lida a 490 nm. A taxa de consumo de oxigénio celular foi calculada com base na relação estequiométrica em que para 2 µmol de formazan formado, 1 µmol

de oxigênio é consumido. O valor de E_c foi obtido pela conversão em valores energéticos, utilizando o equivalente oxentálpico específico para uma mistura média de lipídios, proteínas e carboidratos de 480 kJ / mol O_2 (Gnaiger, 1983).

2.5.3. Alocação de energia celular

A energia disponível (como a soma de açúcares, lipídios e proteínas) e o consumo de energia (como atividade ETS) foram determinados pelos métodos descritos por De Coen & Janssen (1997) com pequenas modificações para microplaca (Rodrigues et al., 2015). O valor final do CEA foi então calculado como: $CEA = E_a E_c$ (Verslycke et al., 2004)

2.5.4. Biomarcadores de stress oxidativo

A concentração de proteína de PMS foi determinada de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976), usando γ -globulina bovina como padrão. A atividade da catalase (CAT) foi determinada em PMS medindo a decomposição do substrato H_2O_2 a 240 nm (Clairborne, 1985). A atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi determinada em PMS após a conjugação de GS H com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) a 340 nm (Habig et al., 1974). A peroxidação lipídica endógena (LPO) foi determinada medindo as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) a 535 nm (Bird & Draper, 1984).

2.6. Avaliação de dano genético

2.6.1. Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com a técnica descrita por (Collins 2004) e adaptado por (Guilherme et al. 2010), com os devidos ajustes no

procedimento. Foi adotado um sistema de dez mini-géis por lâmina, baseado em um modelo criado por (Shaposhnikov et al. 2010), a fim de aumentar o rendimento do ensaio.

Cada indivíduo foi representado por 2 mini-géis replicados, sendo 5 indivíduos diferentes representados em cada lâmina. Assim, a suspensão de células branquiais foi obtida através de alguns cortes efetuados numa pequena porção de tecido em, 1 mL de PBS. Posteriormente, adicionou-se 0,07 mL de 1% agarose LMP (Low Melting Point) a 0,02 mL da suspensão anterior, resultando dez mini-géis colocados em laminas previamente tratadas com agarose NMP (Normal Melting Point) em duas linhas de 5, sem lamelas.

Os mini-géis foram deixados por ± 5 min, a 4 °C, a fim de solidificar a agarose, e em seguida imersos em solução de lise (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 0,01 M Tris, 1% Triton X-100, p H 10), a 4 °C, durante 1 hora, no escuro. Depois da lise, as lâminas foram colocadas na tina de eletroforese, imersas em solução de eletroforese (20 min) para tratamento alcalino. Permitiu-se que o ADN migrasse a uma voltagem fixa de 25 V, com 1,04 V/cm e uma corrente de 300 mA (conseguida ajustando o volume da solução na tina de eletroforese), durante 15 min.

Posteriormente, as lâminas foram coradas com brometo de etídio (0,0875 mL distribuídos pela lâmina), cobertas com uma lamela, e cinquenta nucleoides foram observados e classificados por mini-gel, utilizando um microscópio de fluorescência Zeiss Axio Scope.A1 (ampliação de 400×). O dano no ADN foi quantificado pela classificação visual dos nucleoides em cinco classes de cometas, de acordo com a intensidade e o comprimento da cauda, ou seja, de 0 (sem cauda) a 4 (quase todo o ADN na cauda) (Collins 2004) (Figura 9).



Figura 9 - Imagens de cometas, corados com brometo de etídio, elucidando a classificação visual desde 0 (sem cauda) a 4 (quase todo o DNA na cauda).

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

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

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

2.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do software SoftStat versão 8.0. Para cada parâmetro obtido através do procedimento laboratorial explicado acima, foi realizado o seguinte procedimento:

- os dados foram testados para seus outliers com o método ROUT (Q = 1%);
- a normalidade dos dados foi testada com o teste W de Shapiro-Wilk;
- nos casos em que não foi observada normalidade dos dados, foi aplicada uma transformação dos dados (através das funções $Y = \sqrt{Y}$ ou $Y = \ln(Y)$), na tentativa de normalização;
- posteriormente, nos casos em que nem mesmo a transformação garantiu a distribuição normal dos dados, foram escolhidos os testes não paramétricos;
- a fim de avaliar se dieta e / ou o tempo de vida de prateleira causou uma resposta diferente para o biomarcador em análise, foi executada uma "ANOVA de uma via". O intervalo de confiança para estes testes foi de 95%.

3. Resultados

3.1. *Crassostrea gigas*

3.1.1. Mortalidade

Durante o ensaio experimental ocorreu mortalidade de 1 individuo da condição sem dieta às 96 h.

3.1.2. Lípidos

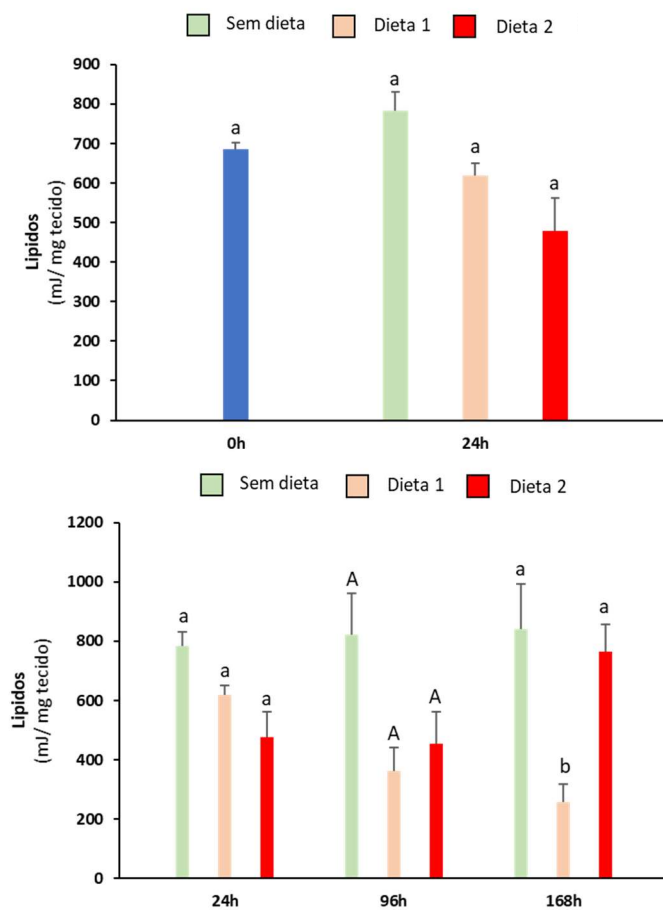


Figura 10 - Conteúdo em lípidos (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

A adição das diferentes dietas durante o período de depuração não causou uma alteração significativa do conteúdo de lípidos das ostras após 24 horas de depuração ($F_{(3,13)} = 2,68$; $p = 0,11$) (Figura 10).

Após 168 h de experiência, observou-se uma alteração significativa no conteúdo de lípidos das ostras alimentadas com a dieta 1 em relação às ostras não alimentadas e às ostras alimentadas com a dieta 2, em que o conteúdo de lipídios para a dieta 1 era menor do que o verificado para os restantes regimes nutricionais ($F_{(8,31)} = 3,73$; $p = 0,0067$) (Figura 10).

3.1.3. Açúcares

Quanto ao conteúdo de açúcares, as análises mostraram que, para as ostras alimentadas com a dieta 1, houve uma alteração significativa no conteúdo de açúcares das ostras após as 24 horas, que se revelou mais alto do que o t_0 ($F_{(3,15)} = 9,61$; $p = 0,002$) (Figura 11).

As análises mostraram ainda que, durante o tempo de prateleira, para a dieta 1 houve uma alteração significativa no conteúdo de açúcares das 24 h para as 96 h e das 96 h para as 168 h.

Nas amostras das 24 h verificaram-se diferenças significativas entre as ostras sem dieta e as alimentadas com a dieta 1 e 2, sendo que as ostras que não foram alimentadas apresentavam um conteúdo em açúcares mais baixo do que o correspondente às 2 dietas.

Já ao fim de 168 h de experiência observou-se uma diferença significativa entre o conteúdo de açúcares para a dieta 1 e 2, em que os animais alimentados com a dieta 1 mostraram valores mais baixos em açúcares do que os alimentados com a dieta 2 ($F_{(8,35)} = 8,43$; $p < 0,001$).

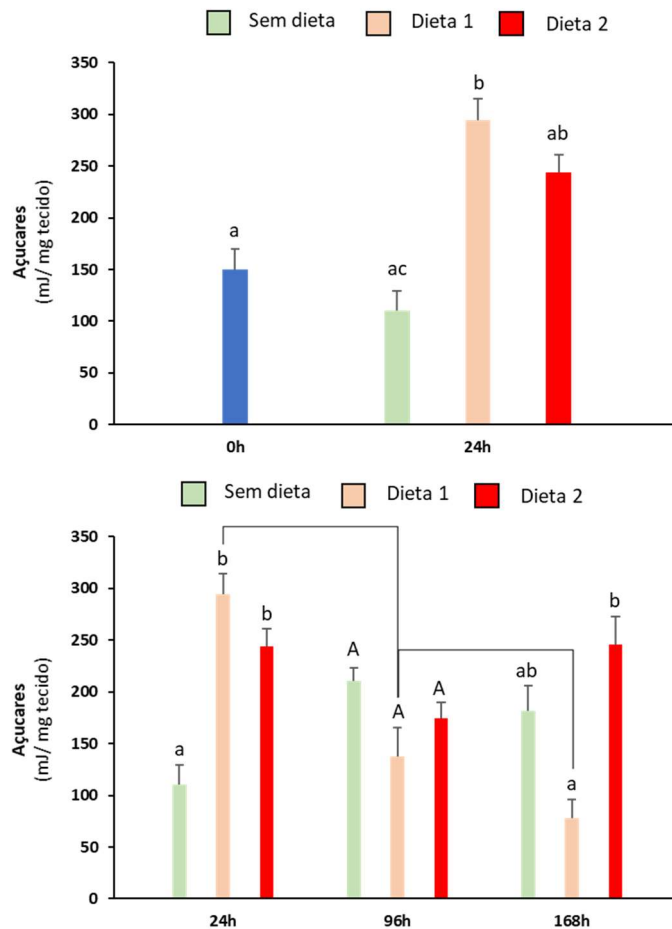


Figura 11 - Conteúdo em açúcares (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

3.1.4. Proteínas

As análises do conteúdo de proteínas nas ostras alimentadas com as diferentes dietas mostraram que houve alterações significativas no conteúdo de proteínas das ostras não alimentadas e das que foram alimentadas com a dieta 1 após 24 horas ($F_{(3,13)} = 14,55$; $p = 0,0008$) (Figura 8).

Quanto ao conteúdo de proteínas das ostras ao longo do tempo de prateleira perceberam-se alterações significativas para o regime sem dieta das 24 h e para as

96 h, das 24 h para as 168 h e das 96 h para as 168 h. Também em relação à dieta 1 se observaram diferenças significativas entre as 24 h e as 96 h, bem como para a dieta 2 em que se verificaram alterações significativas entre as 24 h e as 168 h, bem como das 96 h para as 168 h.

Já entre dietas, às 24 h de experiência houve uma diferença significativa entre o tratamento sem dieta e a dieta 2, em que o sem dieta mostrou maior teor em proteínas, enquanto isto às 96 h o conteúdo em proteínas mostrou-se mais baixo para a dieta 1 do que para as ostras não alimentadas ($F_{(8,31)} = 16,25$; $p < 0,001$) (Figura 12).

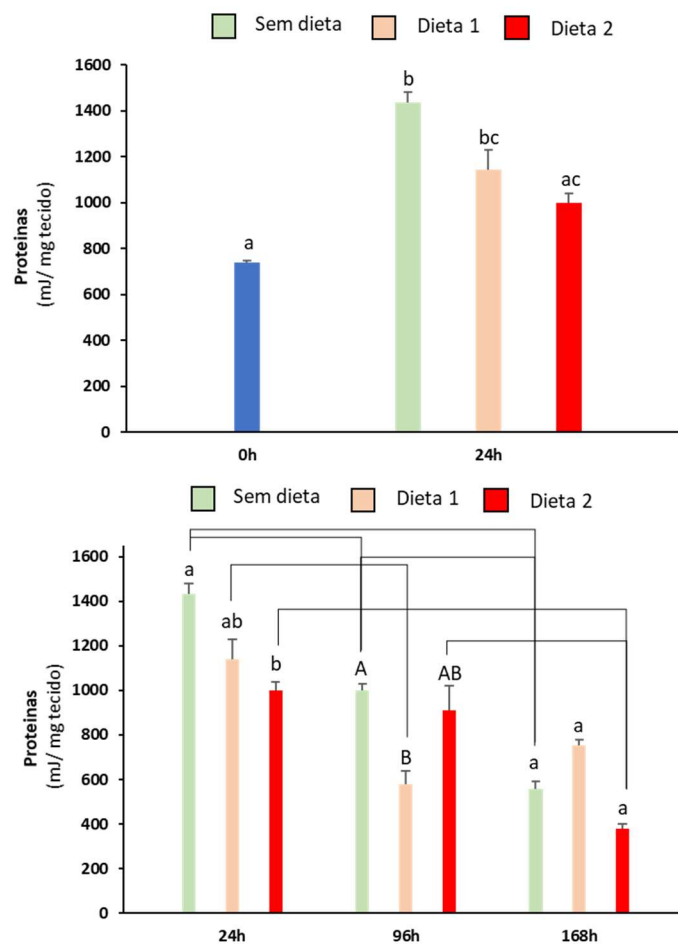


Figura 12 - Conteúdo em proteínas (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h - início da depuração; 24 h - fim da depuração; 96 h - 3º dia de tempo de prateleira; 168 h - 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

3.1.5. Energia disponível

As análises às ostras alimentadas com as diferentes dietas mostraram que houve uma alteração significativa na alocação de energia das ostras após 24 horas ($F_{(3,14)} = 3,44$; $p = 0,06$). Estas análises mostraram que os valores de energia disponível foram significativamente superiores para as ostras que não foram alimentadas, ao fim de 24 h (Figura 13).

Durante o tempo de prateleira, não houve alterações significativas na energia disponível das ostras ($F_{(8,30)} = 5,11$; $p = 0,001$).

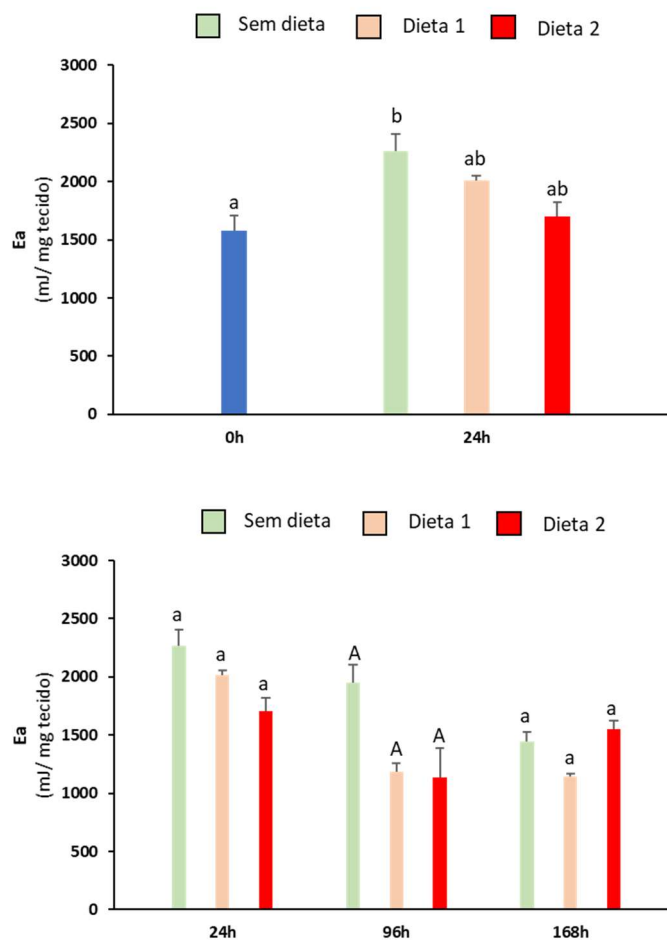


Figura 13 – Energia disponível (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

3.1.6. Produção de energia aeróbia

A análise de produção de energia aeróbica (E_c) nas ostras alimentadas com as diferentes dietas mostraram que, após 24 horas, houve alterações significativas para a dieta 1 e o tratamento sem dieta ($F_{(3,18)} = 8,26$; $p = 0,0025$).

Ao fim dos 6 dias de tempo de prateleira, verificaram-se diferenças significativas para no regime sem dieta entre as 24 h e as 168 h ($F_{(8,39)} = 2,99$; $p = 0,014$) (Figura 14).

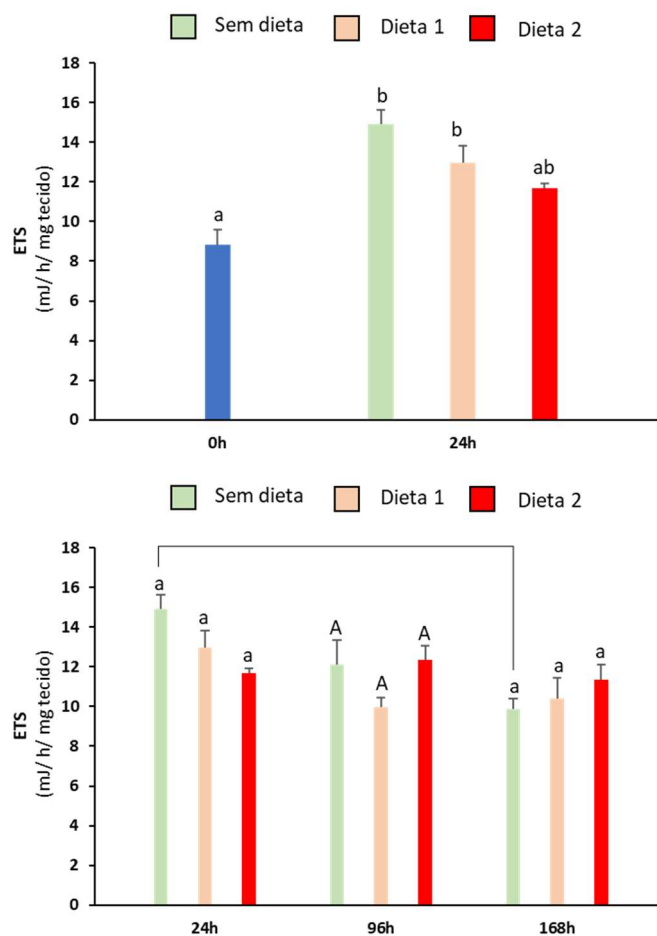


Figura 14 – Produção de energia aeróbia (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos..

3.1.7. Alocação de energia celular

A análise às ostras alimentadas com as diferentes dietas mostrou que houve diferenças significativas na alocação de energia celular (CEA) para a dieta 2 após 24 horas ($F_{(3,14)} = 6,45$; $p = 0,013$) (Figura 15).

As análises para os diferentes momentos de tempo de prateleira não revelam quaisquer alterações significativas na alocação de energia celular das ostras alimentadas com as diferentes dietas ($F_{(8,31)} = 2,18$; $p = 0,07$).

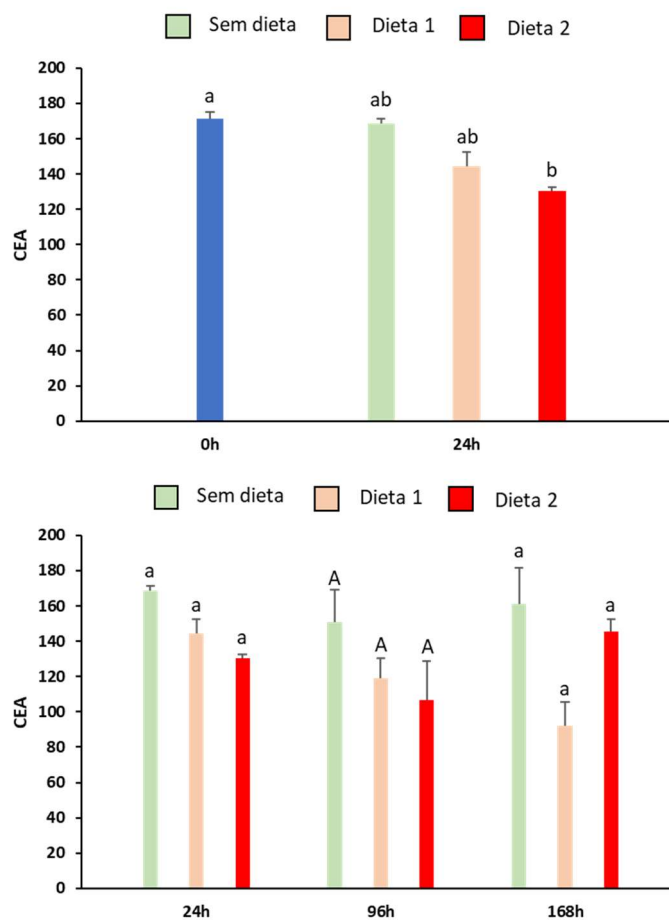


Figura 15 – Alocação de energia celular (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

3.1.8. Catalase

As análises da atividade da enzima catalase (CAT) revelaram que, após uma depuração de 24 horas, houve uma alteração significativa da atividade desta enzima nas ostras alimentadas com a dieta 1 ($F_{(3,10)} = 10,77$; $p < 0,001$). As análises mostraram que após 24 horas de depuração, as ostras que não foram alimentadas apresentavam uma atividade de CAT significativamente diferente do que foi verificado para a dieta 1, sendo esta última maior.

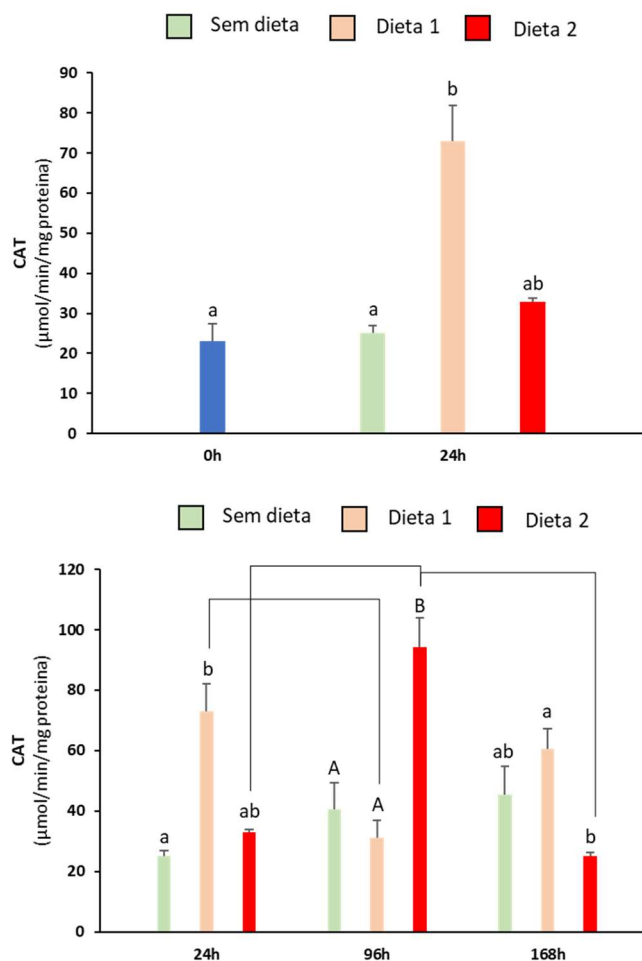


Figura 16 – Catalase (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos..

Ao fim de 96 h de experiência observou-se uma atividade desta enzima significativamente maior para as ostras alimentadas com a dieta 2 em comparação com o que se verificou nas ostras alimentadas com a dieta 1 e nas ostras sem dieta. Houve ainda diferenças significativas entre as dietas 1 e 2 para as 168 h de experiência, em que a 2ª dieta apresentava uma atividade da CAT inferior aos restantes tratamentos para este tempo.

A atividade da enzima diminuiu significativamente durante os primeiros 3 dias de tempo prateleira (das 24 às 96 h de tempo experimental) nas ostras alimentadas com a dieta 1, já as ostras alimentadas com a dieta 2 apresentaram um aumento na atividade da CAT das 24 h para as 96 h, tendo sofrido uma diminuição desta até as 168 h de experiência ($F_{(8,34)} = 7,69$; $p < 0,001$) (Figura 16).

3.1.9. Glutathione S-Transferase

A análise à atividade da glutathione S-transferase (GST) nas ostras mostrou que após 24 horas de depuração houve uma alteração significativa na atividade da enzima nas ostras alimentadas com a dieta 1, apresentando maiores níveis da mesma em relação ao t_0 ($F_{(3,36)} = 15,03$; $p < 0,0001$) (Figura 17).

Foi ainda possível perceber que após 24 h as ostras alimentadas com a dieta 1 mostravam uma maior atividade da enzima do que as ostras que não foram alimentadas ($F_{(8, 36)} = 2,86$; $p = 0,0002$).

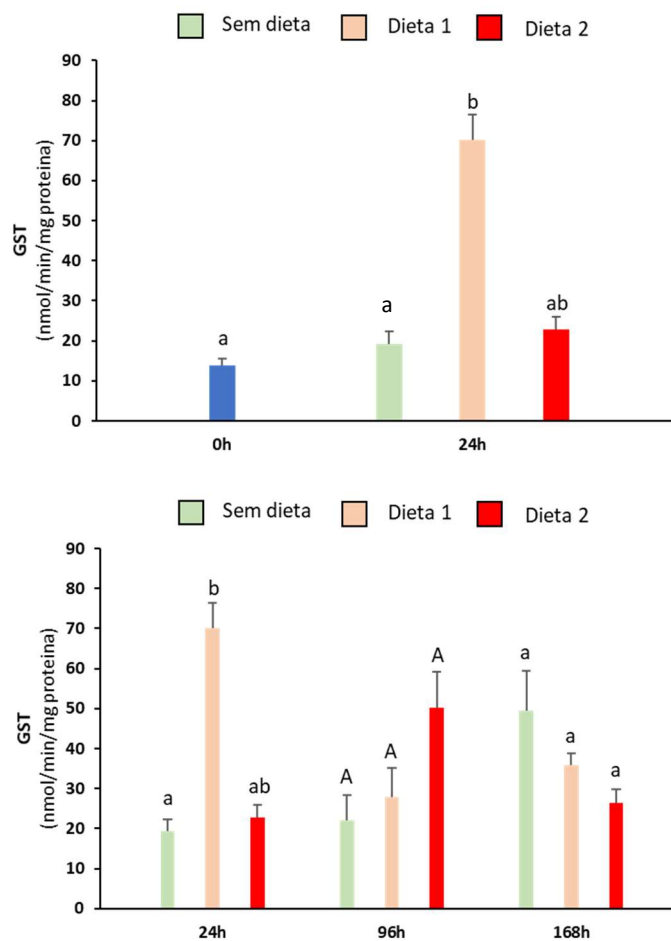


Figura 17 - Glutathiona S-transferase (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

3.1.10. Peroxidação Lipídica

Quanto às análises da peroxidação lipídica (LPO), após 24 horas não houve alguma alteração significativa desta nas ostras depuradas ($F_{(3,18)} = 2,18$; $p = p < 0,001$) (Figura 18).

As ostras alimentadas sujeitas ao tratamento sem dieta mostraram uma

diminuição no LPO entre as 24 h e as 168 h, o mesmo aconteceu para a dieta 2 entre as 96 h e as 168 h de experiência ($F_{(8, 39)} = 6,427; p < 0,001$).

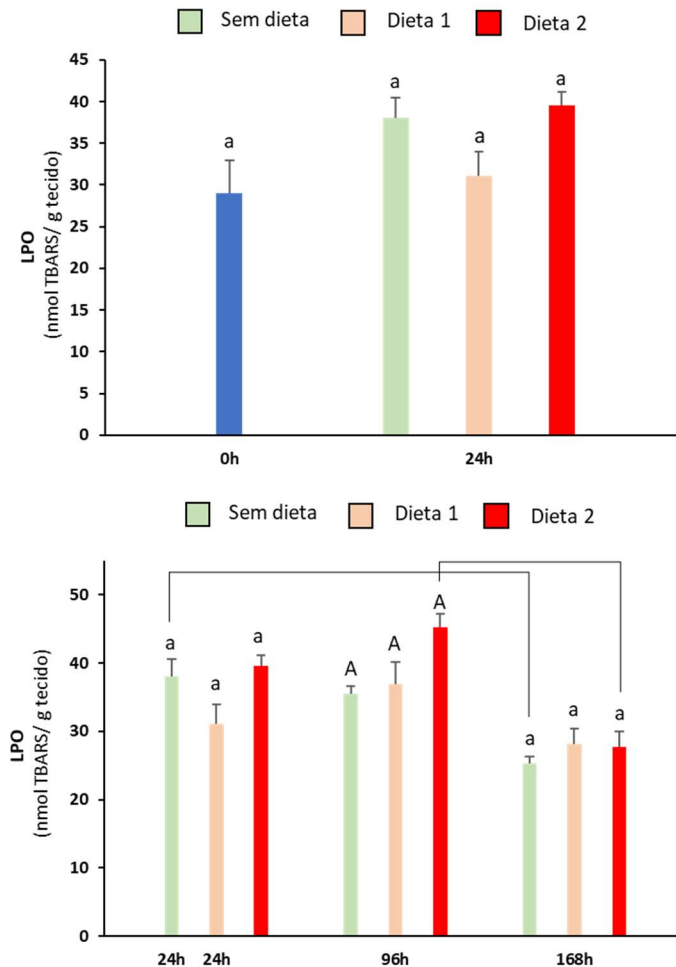


Figura 148 - Peroxidação Lipídica (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

3.1.11. Dano Genético

As análises do dano genético das ostras depuradas mostram que não houve alterações significativas do dano genético, nem durante a depuração, nem ao longo

do tempo de prateleira ($T_{\text{deapuração}}: F_{(3,18)} = 1,39; p = 0,29, T_{\text{prateleira}}: F_{(8,35)} = 1,69; p = 0,14$) (Figura 19).

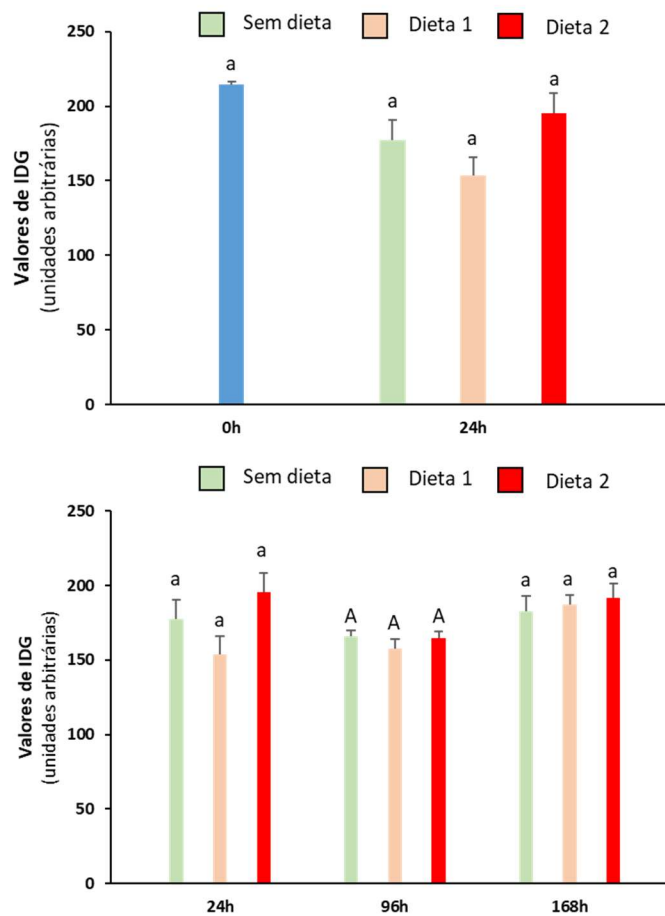


Figura 1915 - Dano genético Conteúdo em lípidos (média \pm desvio padrão) nas ostras depuradas e alimentadas com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

3.2. *Solen marginatus*

3.2.1. Mortalidade

Durante o ensaio experimental ocorreu mortalidade de 2 indivíduos da condição sem dieta às 168 h.

3.2.2. Lípidos

A adição das diferentes dietas, não causou uma alteração do conteúdo de lípidos dos lingueirões após 24 horas de depuração ($F_{(3,15)} = 3,91$; $p = 0,04$).

Após as 168 h de experiência, observou-se que o conteúdo de lípidos dos lingueirões alimentados com a dieta 1 era significativamente menor do que o verificado para a dieta 2 ($F_{(8,31)} = 3,90$; $p = 0,005$) (Figura 20).

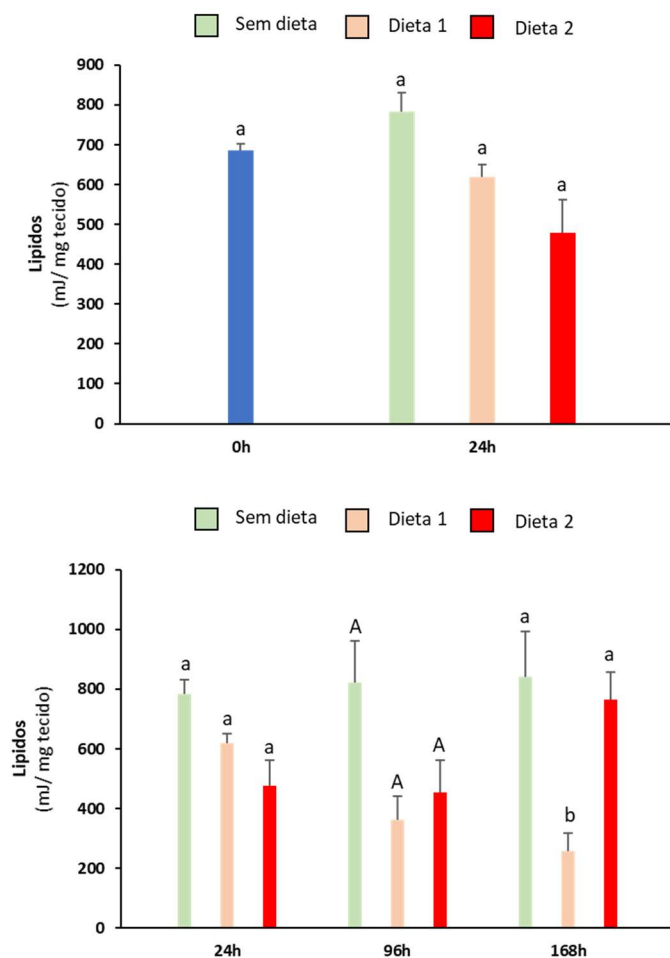


Figura 20 - Conteúdo em lípidos (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

3.2.3. Açúcares

Quanto às análises do conteúdo de açúcares nos lingueirões alimentados com as diferentes dietas, tanto após 24 horas, como ao longo dos 6 dias de tempo de prateleira, não houve nenhuma alteração significativa no valor deste parâmetro ($T_{\text{depuração}}: F_{(3,20)} = 0,35; p = 0,79; T_{\text{prateleira}}: F_{(8,45)} = 1,86; p = 0,096$) (Figura 21).

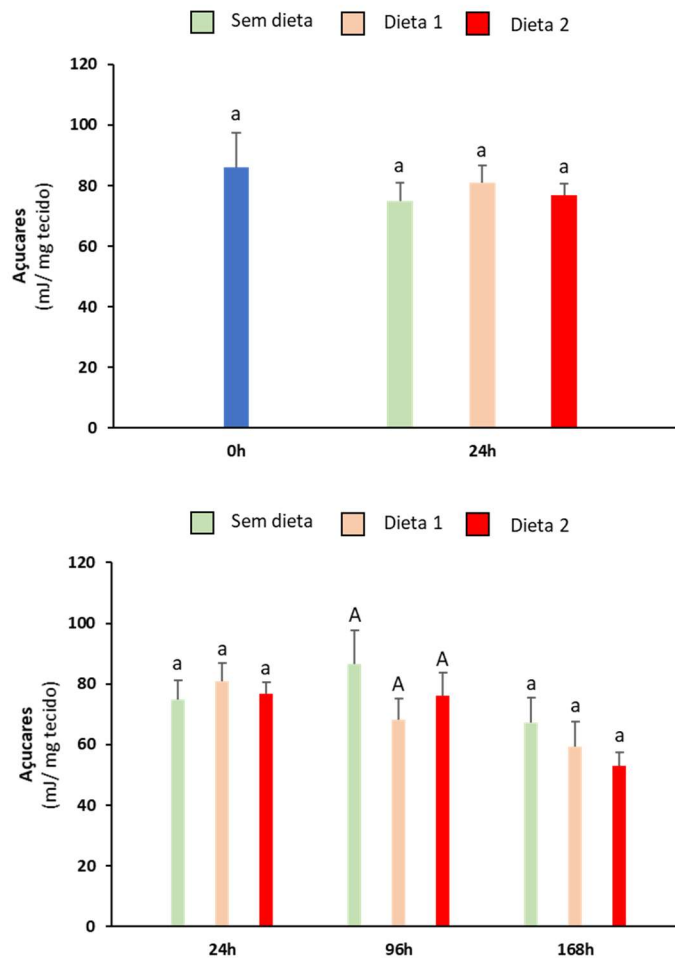


Figura 16 - Conteúdo em açúcares (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h - início da depuração; 24 h - fim da depuração; 96 h - 3º dia de tempo de prateleira; 168 h - 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

3.2.4. Proteínas

As análises do conteúdo de proteínas nos lingueirões alimentados com as diferentes dietas mostraram que houve alterações significativas no conteúdo de proteínas dos lingueirões alimentados com a dieta 1 após 24 horas, para a qual os valores eram menores do que os respectivos ao t_0 ($F_{(3,14)} = 3,98$; $p = 0,042$) (Figura 22).

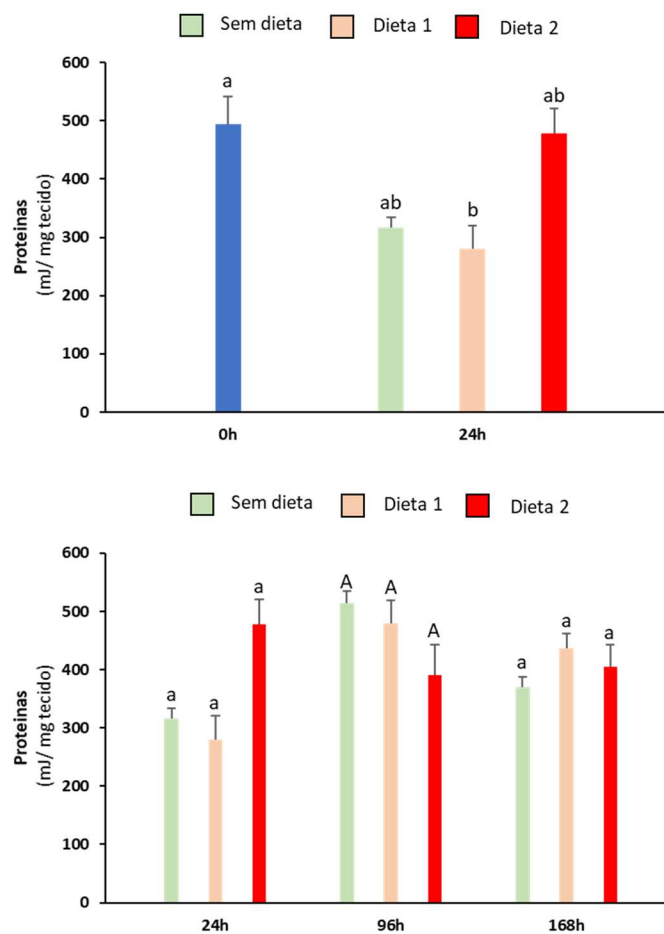


Figura 17 - Conteúdo em proteínas (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Quanto ao conteúdo de proteínas das ostras ao longo do tempo de

prateleira, não se verificaram quaisquer alterações significativas entre as 24 h e as 168 h de experiência ($F_{(8, 35)} = 2,29$; $p = 0,053$) (Figura 22).

3.2.5. Energia disponível

As análises aos lingueirões alimentados com as diferentes dietas mostraram que não houve alguma alteração significativa na alocação de energia das ostras após 24 horas ($F_{(3, 15)} = 1,59$; $p = 0,25$) (Figura 23).

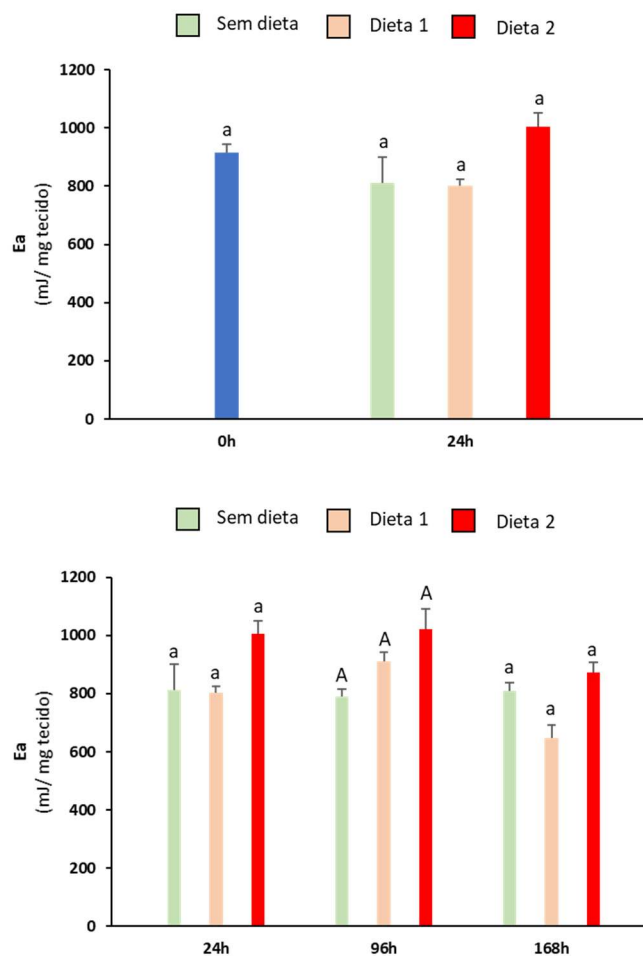


Figura 2318 - Energia disponível (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h - início da depuração; 24 h - fim da depuração; 96 h - 3º dia de tempo de prateleira; 168 h - 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Durante o tempo de prateleira não se verificaram quaisquer alterações significativas na energia disponível dos lingueirões ($F_{(8,35)} = 2,87$; $p = 0,019$).

3.2.6. Produção de energia aeróbia

A análise de produção de energia aeróbica (E_c) nos lingueirões alimentados com as diferentes dietas mostraram que, após 24 horas, não houve alterações significativas para as diferentes dietas ($F_{(3, 20)} = 1,23$; $p = 0,33$).

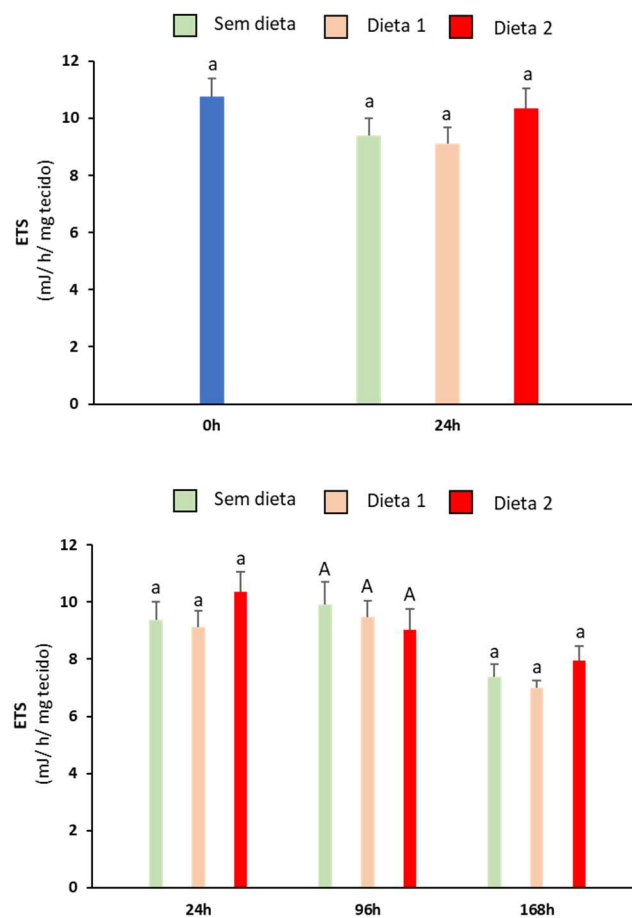


Figura 194 - Produção de energia aeróbia (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h - início da depuração; 24 h - fim da depuração; 96 h - 3º dia de tempo de prateleira; 168 h - 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Ao fim dos 6 dias de tempo de prateleira, não se verificaram quaisquer diferenças significativas na produção de energia aeróbia dos lingueirões ($F_{(8,45)} = 3,02$; $p = 0,011$) (Figura 24).

3.2.7. Alocação de energia celular

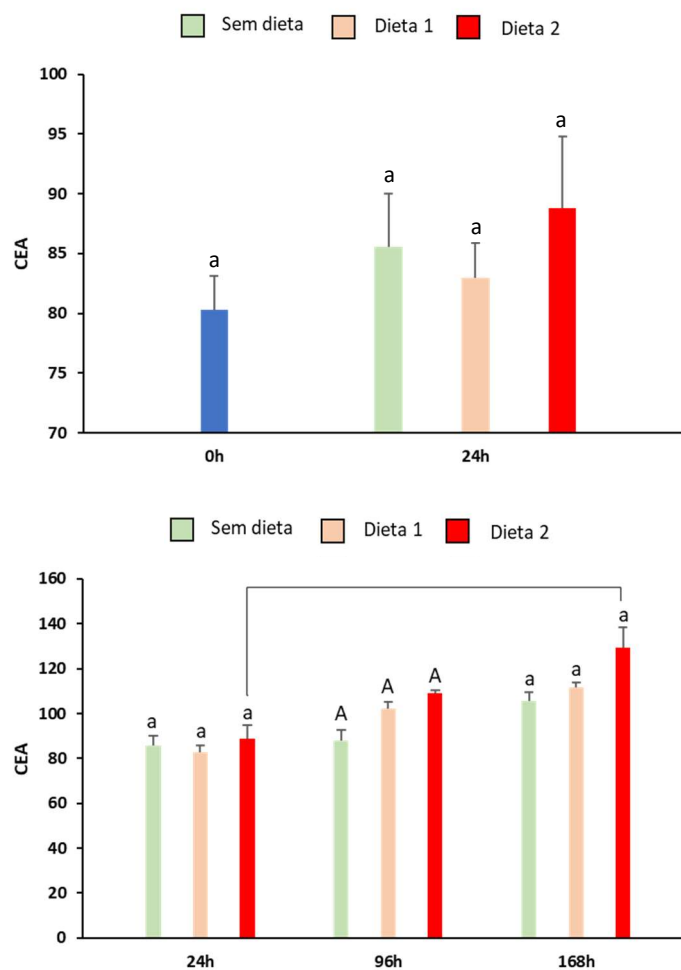


Figura 25 - Alocação de energia celular (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

A análise aos lingueirões alimentados com as diferentes dietas não mostrou que houve diferenças significativas na alocação de energia celular (CEA) para os 3

tratamentos após 24 horas ($F_{(3,16)} = 0,45$; $p = 0,72$) (Figura 25).

As análises para os diferentes momentos de tempo de prateleira revelaram que houve alterações significativas na alocação de energia celular dos lingueirões alimentados com a dieta 2, que no caso aumentou entre as 24 h e as 168 h ($F_{(8, 35)} = 5,89$; $p < 0,001$).

3.2.8. Catalase

As análises da atividade da enzima catalase (CAT) revelaram que, após uma depuração de 24 horas, houve uma alteração significativa da atividade desta enzima

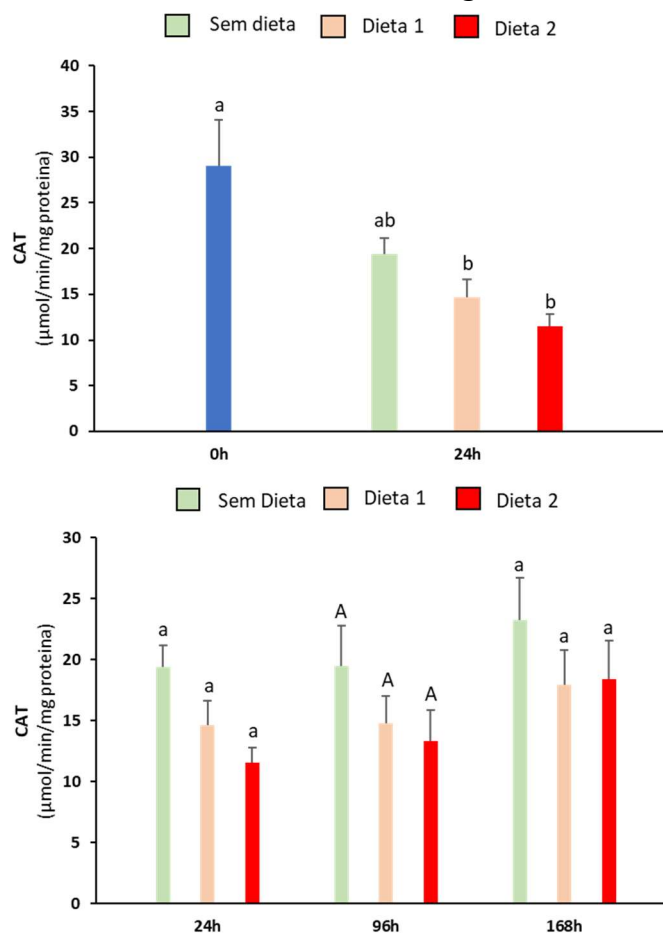


Figura 26 - Catalase (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

nos lingueirões alimentados com as dietas 1 e 2, sendo esta atividade menor do que o verificado para o t₀ ($F_{(3,16)} = 4,21$; $p = 0,029$).

Durante o tempo de prateleira, as análises não mostraram diferenças significativas na atividade da CAT nos lingueirões sujeitos aos 3 regimes nutricionais ($F_{(8, 39)} = 1,35$; $p=0,26$) (Figura 26).

3.2.9. Glutaciona S-Transferase

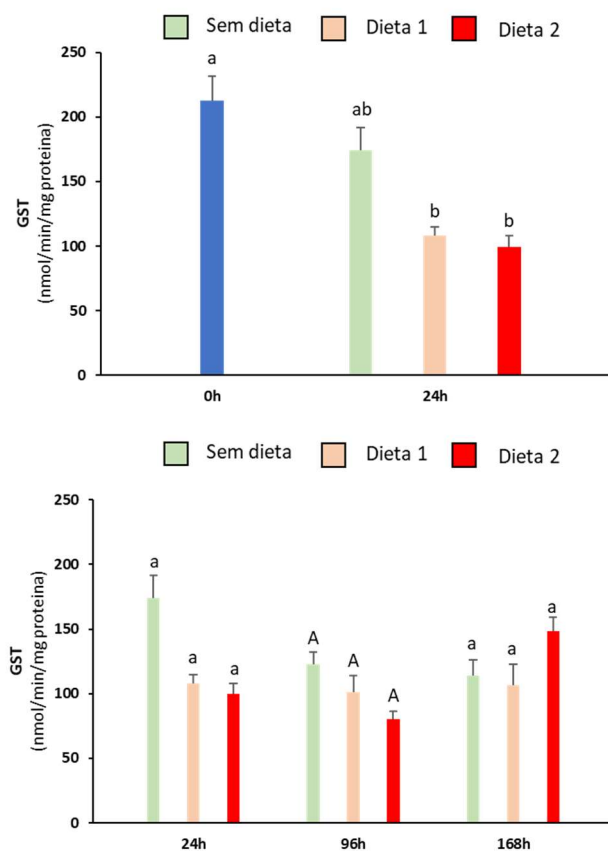


Figura 207 - Glutaciona S-transferase (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

A análise à atividade da glutaciona S-transferase (GST) nos lingueirões mostrou que após 24 horas de depuração houve uma alteração significativa na atividade da

enzima nos lingueirões alimentados com as dietas 1 e 2, apresentando menores níveis da mesma em relação ao t_0 ($F_{(3,36)} = 15,03$; $p < 0,0001$) (Figura 27).

Durante o tempo de prateleira, não foram verificadas diferenças significativas na atividade da GST nos lingueirões ($F_{(8,31)} = 2,75$; $p = 0,028$).

3.2.10. Peroxidação Lipídica

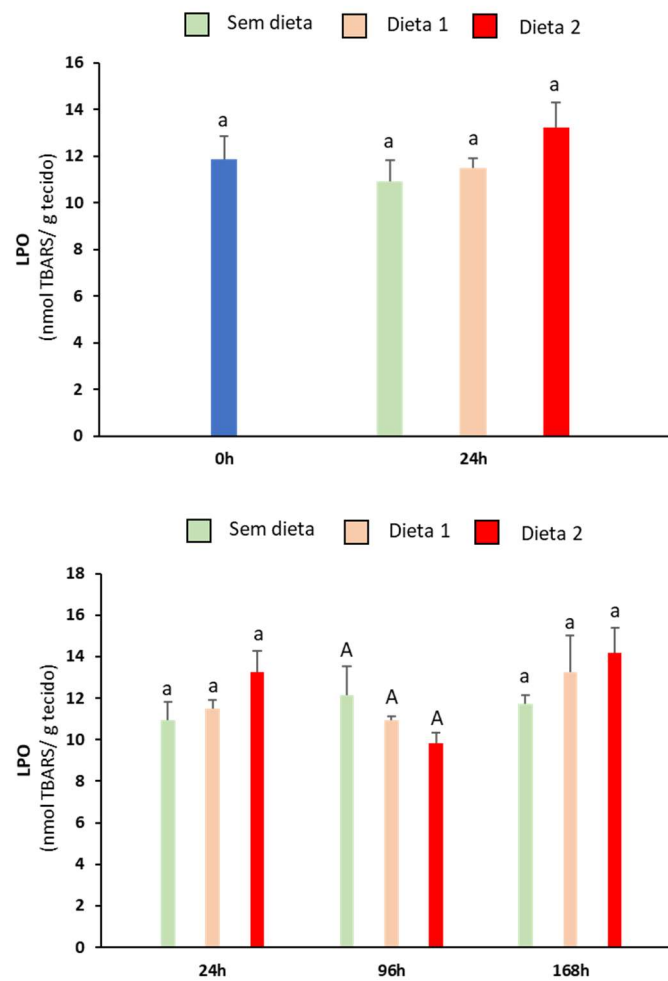


Figura 28 - Peroxidação Lipídica (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

Quanto às análises da peroxidação lipídica (LPO), nem após 24 horas nem ao longo do tempo de prateleira foi possível verificar diferenças significativas no LPO dos lingueirões sujeitos aos 3 tratamentos ($T_{\text{depuração}}$: $F_{(3,19)} = 0,89$; $p = 0,47$; $T_{\text{prateleira}}$: $F_{(8,44)} = 1,69$; $p = 0,14$) (Figura 28).

3.2.11. Dano Genético

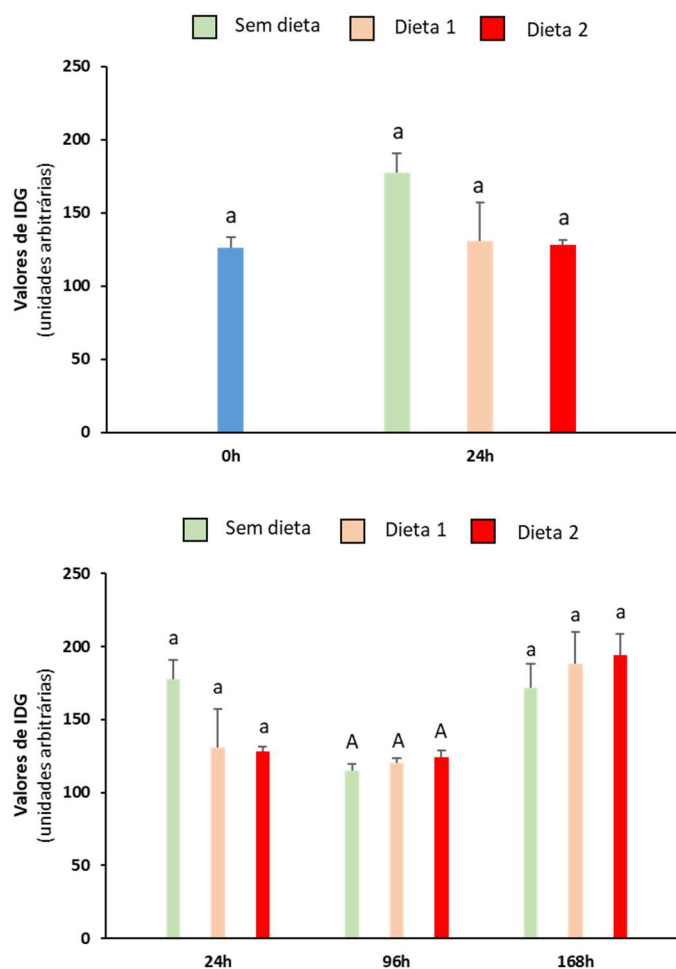


Figura 29 - Dano genético (média \pm desvio padrão) nos lingueirões depurados e alimentados com os diferentes regimes alimentares (sem dieta, Dieta 1 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e Dieta 2 - dieta com *Nannochloropsis sp.* microencapsulada e enriquecida com vitamina C e E), para os diferentes momentos de amostragem (0 h – início da depuração; 24 h – fim da depuração; 96 h – 3º dia de tempo de prateleira; 168 h – 6º dia de tempo de prateleira). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente diferentes entre tratamentos.

As análises do dano genético dos lingueirões depurados mostram que após 24 horas não houve alterações significativas do dano genético, nem durante a depuração, nem ao longo do tempo de prateleira. ($T_{\text{depuração}}: F_{(3,19)} = 3,86; p = 0,28$, $T_{\text{prateleira}}: F_{(8,44)} = 22,22; p = 0,005$) (Figura 29).

4. Discussão

4.1. *Crassostrea gigas*

As análises do conteúdo lipídico das ostras não mostraram alterações significativas após as 24 horas de depuração, nem ao longo do tempo de prateleira. No entanto foram observadas diferenças no conteúdo em lípidos das ostras entre dietas ao fim de 168 h de experiência. Verificou-se que as ostras alimentadas com a dieta 1 apresentavam menor conteúdo lipídico ao fim do tempo de prateleira do que o verificado para os outros regimes alimentares.

Esta alteração do conteúdo lipídico sugere a existência de um stresse moderado nos animais alimentados com a dieta 1, durante o tempo de comercialização, pois são as reservas lipídicas umas das primeiras a ser utilizadas quando um animal começa a entrar em estado de stresse (Sokolova, 2013). Estes resultados sugerem que, embora em teoria a adição de uma dieta à base de algas possa ser benéfica para as reservas de energia, o menor gasto de lípidos nas ostras verificou-se para aquelas que não foram alimentadas.

Anjos (2014), para a sua tese de mestrado testou os efeitos de diferentes dietas na *Crassostrea angulata* durante 11 semanas. Distribuídas homogeneamente por 4 tratamentos diferentes, as ostras foram condicionadas em 3 tanques de 25 L para cada tratamento, em água do mar natural a 21 ± 1 °C. Cada tratamento correspondia a uma combinação de diferentes proporções de várias microalgas, e em cada sistema foi inserido cerca 4% do peso seco das ostras em peso seco das microalgas. A autora observou que durante as primeiras 5 semanas de experiência o conteúdo em lípidos, de um modo geral, aumentou para as 4 dietas, diminuindo depois até à 9 semana de experiência voltando a observar-se uma pequena subida no conteúdo lipídico no final do tempo experimental. A autora justifica esta variação do conteúdo de lípidos entre os tempos experimentais com a maturação sexual ao longo das 11 semanas dos indivíduos testados.

Não foram encontrados mais estudos que relacionassem o conteúdo em lípidos com a variação nutricional em bivalves, no entanto num estudo que avaliou o efeito de várias dietas na composição bioquímica do *Penaeus mondon* tanto na fase protozoa como na fase misis, verificou-se a dieta com base na microalga *Nannochloropsis sp.* teve piores resultados do que as demais dietas em relação ao conteúdo em lípidos (Abraham, 2012). Também Qiao et al. (2019) identificou que para os juvenis do *Scophthalmus maximus* o aumento da dieta composta por *Nannochloropsis* implica uma diminuição no conteúdo lipídico.

A análise do conteúdo de açúcares nas nossas ostras mostrou que após 24 horas (tempo de depuração) e até às 168 h de experiência (tempo de prateleira) houve alterações significativas no conteúdo de açúcares das ostras. Verificou-se que ao fim das 24 h de depuração, o conteúdo em açúcares era mais alto para as dietas 1 e 2, em comparação com o t_0 . Já durante o tempo de prateleira, observou-se uma clara diminuição no conteúdo em açúcares para as ostras alimentadas com a dieta 1.

Entre dietas, foi possível perceber diferenças entre o tratamento sem dieta e os demais tratamentos, para as 24 h, já que as ostras não alimentadas apresentavam um conteúdo em açúcares bastante menor do que o verificado para as dietas 1 e 2. Ainda ao fim de 168 h de experiência as ostras alimentadas com a dieta 1 mostravam um conteúdo em açúcares claramente inferior ao respetivo à dieta 2.

Esta alteração do conteúdo de açúcares, durante o tempo de depuração, sugere que a adição de dietas durante a depuração possa ser benéfica, em primeira instância, já que não só não se observou gasto de açúcares durante as primeiras 24 h, como para os organismos alimentados com as 2 dietas de *Nannochloropsis sp.* observou-se um aumento no conteúdo de açúcares. Este efeito benéfico torna-se ainda mais evidente, quando comparado com os resultados obtidos nas ostras não alimentadas, que apresentaram valores do conteúdo em açúcares, visivelmente

menores do que as ostras sujeitas aos outros 2 tratamentos ao fim do tempo de depuração.

No entanto, a diminuição do conteúdo em açúcares nas ostras alimentadas com a dieta 1, entre as 24 h e as 168 h, sugere a existência de um stresse moderado nestes bivalves, pois as reservas de açúcares são umas das primeiras a ser utilizadas quando um animal começa a entrar em estado de stresse (Sokolova, 2013). Estes resultados levam-nos pensar que, embora uma alimentação com a dieta 1 possa ser melhor, inicialmente, do que a não introdução de uma dieta de todo, pois existe uma clara diferença entre o conteúdo de açúcares das ostras alimentadas com as dietas 1 e 2 e as ostras que não foram alimentadas, à medida que o tempo avança e se encontram expostos ao ar e a uma baixa temperatura, estes animais vão utilizando maiores quantidades das suas reservas lipídicas, podendo levar a perdas de algumas das suas qualidades organoléticas. De um modo geral, avaliando pelo gasto de açúcares, a dieta que teve melhores resultados ao longo de toda a experiência foi a dieta 2.

Não foram encontrados quaisquer estudos que relacionassem a alimentação com o conteúdo de açúcares em bivalves. No entanto, no estudo de Abraham (2012) referido anteriormente, em que se avaliou o efeito de varias algas (entre elas a *Nannochloropsis sp.*) na fase larvar do *P. mondon*, verificou-se que para a microalga usada no presente trabalho o conteúdo em açúcares foi significativamente mais baixo do que para as restantes dietas testadas.

Estes resultados vão parcialmente ao encontro do obtido no presente trabalho, uma vez que a dieta para a qual o conteúdo em açúcares foi menor foi a dieta 2 (composta por *Nannochloropsis sp.*), no entanto os melhores resultados no nosso trabalho, para este parâmetro, correspondem à dieta 3 (composta também por *Nannochloropsis sp.*, mas com a adição de vitaminas C e E).

As análises de proteínas mostraram que houve alterações significativas tanto entre os tempos da experiência, como entre as dietas em estudo. Ao fim das 24 h

de depuração, o conteúdo em proteínas nas ostras sujeitas ao tratamento sem dieta e à dieta 1 era expressivamente maior do que o verificado para o t_0 .

Das 24 h às 168 h de experiência (tempo de prateleira) percebeu-se uma diminuição generalizada do conteúdo em proteínas para os 3 tratamentos. Esta diminuição foi gradual para as ostras não alimentadas, que consecutivamente apresentaram descidas no conteúdo proteico ao longo do tempo, enquanto para as ostras alimentadas com a dieta 2, a descida foi particularmente acentuada das 96 h para as 168 h de tempo experimental.

Entre os regimes nutricionais, às 24 h (início do tempo de prateleira), as ostras que apresentavam maiores valores no conteúdo de proteínas eram as que não foram alimentadas, enquanto isto às 96 h o regime que mostrou menores valores neste parâmetro foi a dieta 1, já ao fim de 168 h, não foram observadas diferenças significativas.

Comparando os resultados obtidos para as proteínas com os resultados das análises dos lípidos e dos açúcares, entre as 24 h e as 168 h, percebemos que estes resultados não estão de acordo com o esperado, tendo em conta que as proteínas são as últimas reservas a serem mobilizadas pelos animais, pois são somente utilizadas quando o animal se encontra já num estado de stresse crítico (Sokolova, 2013). No presente estudo, tal não se verificou, uma vez que ao longo do tempo de prateleira o conteúdo de lípidos nas ostras não diminuiu, bem como o conteúdo em açúcares que apenas diminuiu para um dos tratamentos. Isto sugere que as ostras já pudessem estar em stress antes da depuração, tendo em conta que nos momentos de amostragem se verificou uma diminuição mais generalizada no conteúdo de proteínas, do que para o conteúdo em açúcares e lípidos ao longo do tempo de prateleira (Sokolova, 2013).

Já fazendo uma comparação entre os regimes alimentares, o nosso estudo sugere que a ausência de alimento seja mais benéfica em relação ao conteúdo em proteínas tanto durante a depuração, como nos primeiros dias de tempo de

comercialização, já que para esses períodos as ostras que não foram alimentadas mostraram valores do conteúdo em proteínas maiores do que o verificado para as 2 dietas.

Não foram encontrados trabalhos que estudassem o efeito de dietas no conteúdo proteico de bivalves. Existem sim estudos que relacionam estas 2 variáveis em crustáceos e em peixes. Segundo Abraham (2012) o conteúdo em proteína do *P. mondon* quando alimentado com 4 dietas diferentes foi maior para a dieta de *Nannochloropsis sp.* em comparação com as restantes, tanto para a fase protozoa como para a fase mysis, estes resultados são justificados pelo autor com a composição bioquímica da microalga *Nannochloropsis sp.*, que em comparação com as demais algas apresentava a maior percentagem de proteínas. Já nos peixes, um trabalho realizado em organismos na fase pós-larvar da espécie *Solea senegalensis*, em que foram testadas 4 dietas (uma dieta comercial como controlo, e 3 outras dietas que usando como base a dieta de controlo tiveram adicionados 3% de uma alga cada uma: *Nannochloropsis gaditana*, *Phaeodactylum tricornutum* e *Chlorella vulgaris*) não mostrou quaisquer alterações no conteúdo em proteínas entre as dietas testadas (Peixoto et al., 2021). Resultados estes que coincidem com Qiao et al. (2019) que testando o efeito de dietas com diferente percentagem de *Nannochloropsis sp.* no *S. maximus*, não observou diferenças significativas no conteúdo proteico para diferentes dietas, o autor considerou estes resultados positivos, uma vez que os peixes não gastaram mais proteína do que os que não foram sujeitos à adição de *Nannochloropsis sp.* na sua dieta.

As alterações nos conteúdos de cada reserva energética traduziram-se numa alteração significativa na energia disponível nas ostras que não foram alimentadas após 24 horas de depuração, em que estas apresentaram maiores valores da energia disponível às 24 h em comparação com o t_0 . Durante o tempo de prateleira não houve diferenças significativas entre os tempos de amostragem, nem entre os regimes nutricionais em cada tempo.

Estes resultados sugerem a existência de um estado de stresse baixo a moderado nas ostras.

Em relação à produção de energia aeróbica, estimada através da atividade da cadeia transportadora de eletrões, as análises mostraram que após 24 h de depuração houve um aumento da produção de energia aeróbica para os animais provenientes dos tratamentos sem adição de alimento e alimentados com a dieta 1. Durante o tempo de prateleira, verificou-se uma diminuição na produção de energia aeróbica entre as ostras no início e o fim do tempo de prateleira para as ostras que não foram sujeitas à adição de dietas.

Quanto à alocação de energia celular, no presente estudo houve alterações significativas às 24 horas para a dieta 3, em que os valores foram menores do que o correspondente ao t0. No entanto, para o tempo de prateleira, não houve quaisquer alterações na CEA.

Apesar das alterações observadas para cada uma das frações energéticas e em termos de produção de energia aeróbica, o balanço final entre estas e que se reflete na alocação de energia celular mostram que durante o tempo de prateleira as ostras não sofreram um stresse particularmente relevante, pois quando em stresse, dá-se uma alteração da alocação ótima de energia (Sokolova, 2013), o que não foi o caso.

Como já foi referido, defesas celulares antioxidantes, como a enzima CAT e a GSH, protegem a célula do stresse oxidativo, inativando a espécies reativas de oxigénio ou reparando as biomoléculas (Da Silva et al. 2005). Durante a exposição a um stresse moderado, antioxidantes e outros mecanismos de proteção celular são ainda mais expressados, impedindo a ocorrência de stresse oxidativo através da manutenção do balanço do estado de redox (Sokolova, 2013). Os resultados obtidos da atividade da enzima CAT mostram alterações consideráveis nos vários momentos de amostragens, bem como entre os próprios tratamentos. Verificámos que, após a 24 horas de depuração, a atividade da CAT aumentou nas ostras às quais foi adicionada a dieta 1, tendo diminuído posteriormente durante o tempo de

prateleira, entre 24 h e 96 h de experiência. Já para a dieta 2, apresentou uma subida de atividade da enzima entre as 24 h e as 96 h, tendo mostrado uma diminuição da mesma entre o das 96 h às 168 h de tempo experimental.

Isto sugere que durante as 24 h de depuração, o stress oxidativo tenha aumentado nas ostras às quais foi adicionada a dieta 1, e que o mesmo aconteceu entre as 24 h e as 96 h de experiência nos animais que recebera a dieta 2. Por outro lado, é possível perceber das 96 h às 168 h este stress, não só não aumentou, com diminuiu, já a atividade da CAT desceu durante este período

Houve ainda diferenças significativas entre os regimes nutricionais ao longo do tempo. às 24 h a atividade da CAT nas ostras alimentadas com a dieta 1 era claramente maior do que a verificada para as ostras que não foram alimentadas, enquanto às 96 h a atividade da enzima foi maior para a dieta 2 do que para os restantes tratamentos, ainda que ao fim do tempo de prateleira esta tenha diminuído, passando a ser o tratamento para o qual a atividade da CAT foi mais baixa às 168 h de experiência.

Estes resultados sugerem que o stress oxidativo foi maior nas ostras alimentadas com a dieta 1 às 24 h e às 168 h de experiência, em comparação com os outros 2 tratamentos. No entanto, uma vez que as ostras alimentadas com a dieta 2 apresentaram uma atividade da CAT claramente maior do que os demais tratamentos as 96 h, podemos concluir que o stress oxidativo foi maior para estas nesse momento. Através destes resultados não é possível perceber uma dieta em específico que tenha sido mais benéfica ou prejudicial em termos de stress oxidativo ao longo do tempo, uma vez que a atividade da enzima foi mais alta para diferentes dietas em diferentes momentos.

Amaro et al. (2019), desenvolveram um estudo com ostras já em fase reprodutiva, em que distribuíram 720 ostras por 12 tanques de 25 L (60 ostras por tanque) e as alimentaram durante 11 semanas com 4 dietas distintas (1 dieta para cada 3 tanques). As ostras estavam condicionadas nos tanques com água do mar

natural, de salinidade monitorizada de $33 \pm 0,5$ ppt e uma temperatura de 21 ± 1 °C, e eram alimentadas uma vez por dia com um peso de dieta correspondente a cerca de 4% do peso seco de ostra. Cada uma das dietas foi formulada com percentagens diferentes da macroalga *Ulva rígida* seca e das microalgas *Tisochrysis lutea*, *Skeletonema costatum* e *Chatoceros calcitrans*: a dieta 1 (100% da macroalga), dieta 2 (50% macroalga e 50% microalgas), dieta 3 (25% macroalga e 75% microalgas) e a dieta 4 (100% microalgas). Os autores perceberam que quanto à atividade da catalase, houve diferenças significativas entre as dietas 2 e 1 e a dieta 3, e que quando comparadas com o grupo de controlo (dieta 4) houve diferenças em relação a dieta 2 para a qual a CAT foi significativamente menor. Os resultados do presente trabalho vão ao encontro dos referidos acima, uma vez que para o estudo dos Amaro et al. (2019) a atividade da CAT foi mais baixa para uma das dietas com maior capacidade antioxidante, e o pior resultado foi obtido também para uma das dietas com maior capacidade antioxidante. Face a estes resultados Amaro et al. (2019) propuseram que as diferenças na atividade enzimática possam variar consoante a espécie de alga utilizada, já que algumas macroalgas geram metabolitos para evitar o herbivorismo provocando agressões oxidativas (Sureda et al., 2009). Também Box et al. (2009) sugeriu que os compostos bioativos das algas, apesar de muitas vezes referenciados com fontes antioxidantes, possam frequentemente ser considerados fontes de espécies reativas de oxigénio nos moluscos.

A glutathione S-transferase (GST) é da família de enzimas fase-II, que conjuga compostos eletrofílicos com a glutathione (GSH), e participa na proteção celular contra os efeitos tóxicos de xenobióticos e subprodutos metabólicos oxidativos (Zanette et al., 2011). Após as análises à atividade da GST nas ostras, observou-se uma alteração a atividade da mesma nas ostras alimentadas com a dieta 1 após 24 horas de depuração, sendo que a atividade da enzima diminuiu para esta em relação ao t_0 . As análises revelaram ainda uma maior atividade da GST nas ostras

alimentadas com a dieta 1, em comparação com a atividade desta enzima nas ostras às quais não foi adicionada dieta. Avaliando pela atividade da GST, é possível perceber que houve um maior stress oxidativo nas ostras alimentadas com a dieta 1.

Para o mesmo estudo referido anteriormente, a atividade da GST mostrou-se menor para as dietas 3 e 4 do que para as dietas 1 e 2, sendo a que a dieta 4 mostrava os valores mais baixos enquanto que a dieta 2 apresentou a maior atividade de GST (Amaro et al., 2019). Esses resultados traduzem na atividade da GST traduzem os já obtidos pelos autores para a enzima CAT, ou seja, as dietas com maior composição em microalgas (*Tisochrysis lutea*, *Skeletonema costatum* e *Chatoceros calcitrans*) apresentaram um stress oxidativo mais baixo do que o obtido para as dietas com maior percentagem de macroalga (*Ulva rígida*).

Não foram encontrados mais trabalhos que testassem o efeito das dietas na atividade da GST em bivalves, no entanto no estudo de Peixoto et al. (2021) realizado em peixes da espécie *S. senegalensis* (pós larvar), em que foram testadas 4 dietas (uma dieta comercial como controlo, e 3 outras dietas que usando como base a dieta de controlo tiveram adicionados 3% de uma alga cada uma: *Nannochloropsis gaditana*, *P. tricornutum* e *C. vulgaris*), os resultados apontaram a que não existissem diferenças nos níveis de stress oxidativo entre os peixes alimentados com as diferentes dietas, já que não se verificaram diferenças significativas na atividade da GST entre os tratamentos.

A peroxidação lipídica é um marcador de dano oxidativo nas membranas celulares em invertebrados, e é um dos maiores contribuidores na perda de função da célula em função de uma situação de stresse oxidativo (Zanette et al. 2011) No presente estudo, observou-se que não houve alterações significativas nos níveis de LPO após as 24 h de depuração. Verificou-se sim, no entanto, diferenças significativas durante o tempo de prateleira para o tratamento sem dieta, entre as

24 h e as 168 h de experiência, e para a dieta 2 entre as 96 h e as 168 h de tempo experimental.

O estudo de Amaro et al. (2019) não mostrou diferenças significativas quanto à peroxidação lipídica, o que corrobora os nossos resultados, uma vez que também não foram encontradas diferenças entre as dietas. Também em peixes, no estudo de Peixoto et al. (2021) em que foram testadas 4 dietas (uma dieta comercial como controle, e 3 outras dietas que usando como base a dieta de controle tiveram adicionados 3% de uma alga cada uma: *Nannochloropsis gaditana*, *P. tricornutum* e *C. vulgaris*), os resultados evidenciam que não houve diferenças significativas entre os tratamentos nos níveis de LPO no *S. senegalensis*.

Já para o dano genético, analisado através do teste do cometa, o presente estudo não mostrou quaisquer alterações para os diferentes tempos e/ou tratamentos.

O resultado obtido não foge do esperado, uma vez que neste trabalho estão a ser testadas dietas com a intenção de melhorar as qualidades organolépticas dos bivalves para comercialização, portanto já não se esperavam resultados e/ou alterações muito altas no dano genético. Por outro lado, foi possível perceber que as dietas e as quantidades com que foram administradas não foram prejudiciais.

Em relação ao dano genético, não foi encontrada informação que pudesse corroborar ou contrariar os resultados do presente estudo, que aborda os tratamentos de diferentes dietas em bivalves durante a depuração e tempo de prateleira.

Ainda assim existe informação em relação aos efeitos das dietas em peixes, como é o caso do estudo de (Pereira, 2016), para a sua tese de mestrado testou o efeito de 2 dietas, dieta S - "standard" e dieta A - à base da dieta S, mas composta a 5% de algas (*Ulva spp.*, *Gracilaria spp.* e *Fucus spp.*) em igual percentagem, no dano genético da *Sparus aurata*. Tal como no presente estudo, Pereira (2016) não observou diferenças no dano genético entre as dietas.

4.1. *Solen marginatus*

Não se observaram alterações significativas no conteúdo de lípidos dos lingueirões após as 24 horas de depuração. No entanto ao fim dos 168 h foi possível perceber que o conteúdo em lípidos era menor para a dieta 1 em comparação com os demais tratamentos.

Esta alteração do conteúdo lipídico sugere a existência de um stresse moderado às 168 h nos animais alimentados com a dieta 1, uma vez que as reservas lipídicas são umas das primeiras a ser utilizadas quando um animal começa a entrar em estado de stresse (Sokolova, 2013).

Estes resultados indicam que, embora inicialmente não haja grandes diferenças entre os 3 tratamentos no conteúdo em lípidos dos lingueirões, à medida que o tempo avança e se encontram expostos ao ar e a uma baixa temperatura, estes animais vão utilizando maiores quantidades das suas reservas lipídicas, podendo levar a perdas de algumas das suas qualidades organoléticas, o que no caso se notou para a dieta 1, indicando que ao fim do tempo de comercialização, estes organismos estejam sob um maior stress do que os que foram alvo dos outros tratamentos.

Os valores de conteúdo em lípidos nos lingueirões, de um modo geral, coincidem com os resultados das análises nas ostras realizadas para o presente trabalho, para as não se observaram alterações ao longo do tempo experimental, mas que indicaram um conteúdo em lípidos diferente entre os animais sujeitos a cada um dos 3 tratamentos.

Costa (2012) realizou uma experiência com o *S. marginatus*, em que analisou o efeito de diferentes regimes nutricionais no seu conteúdo em lípidos. Esse ensaio durou cerca de 8 dias, em que os lingueirões estiveram expostos a 3 regimes

alimentares diferentes: uma dieta mista com 10 células de *I. galbana*, *P. lutheri* e *C. calcitrans*, mais 20 células de *T. suecica*; uma monodieta com 80 células de *I. galbana* e o último regime alimentar que consistiu em 8 dias de fome. O conteúdo em lípidos nas larvas de lingueirão foi significativamente maior para qualquer uma das dietas do que para as larvas que não foram alimentadas durante 8 dias. Estes resultados não correspondem ao obtidos para o presente estudo, no entanto apesar de falarmos da mesma espécie, tratam-se de fases diferentes do seu ciclo de vida, nomeadamente por se tratar de uma fase larvar, em que os organismos gastam mais lípidos, bastante relevantes na sua metamorfose, pelo que a ausência de um suplemento adicional pode mesmo provocar diferenças consideráveis quando comparado com o crescimento de larvas que receberam dietas suplementares (Costa et al., 2012).

Um estudo que avaliou o efeito de várias dietas na composição bioquímica de *P. mondon* tanto na fase protozoa como na fase misis, verificou-se a dieta com base na microalga *Nannochloropsis sp.* teve piores resultados do que as demais dietas em relação ao conteúdo em lípidos (Abraham, 2012). Ainda Qiao et al. (2019) identificou que para os juvenis do *S. maximus* o aumento da dieta composta por *Nannochloropsis* implica uma diminuição no conteúdo lipídico.

A análise do conteúdo de açúcares nos lingueirões mostrou que nem após 24 horas, nem a partir destas até às 168 h houve alterações significativas no conteúdo de açúcares, sugerindo que, ao contrário do evidenciado nos resultados das ostras, as diferentes dietas não causaram stress intenso o suficiente para que estes animais utilizassem as suas reservas de açúcares durante o tempo das experiências, o que já era esperado. No entanto com isto, também não é possível evidenciar que alguma das dietas cause um menor stress em relação às restantes.

Não foram encontrados quaisquer estudos que relacionassem a alimentação com o conteúdo de açúcares em bivalves. No entanto, no estudo de Abraham (2012) referido anteriormente, verificou-se que o conteúdo em açúcares para a microalga

Nannochloropsis sp. foi significativamente mais baixo do que para as restantes dietas testadas. Estes resultados não corroboram os obtidos para trabalho, em que ao contrário de Abraham (2012), não nos foi possível encontrar diferenças no conteúdo de açúcares entre as dietas testadas.

As análises de proteínas mostraram que houve uma alteração significativa no conteúdo proteico dos lingueirões alimentados com a dieta 1 após 24 h de depuração, tendo este diminuído em relação ao t_0 . Não foram, no entanto, verificadas quaisquer diferenças significativas no conteúdo em proteínas durante o tempo de prateleira.

Não foram encontrados trabalhos que estudassem o efeito de dietas no conteúdo em proteínas nos moluscos bivalves, no entanto existem estudos que relacionam estas 2 variáveis em crustáceos e em peixes. De acordo com Abraham (2012) o conteúdo em proteína de *P. mondon* foi maior quando estes crustáceos foram alimentados com uma dieta de *Nannochloropsis sp.* em comparação com as restantes dietas testadas no seu estudo, face a estes resultados e analisando a composição bioquímica da alga, o autor justificou que também o conteúdo em proteínas na *Nannochloropsis sp.* era maior do que o observado nas algas presentes nas demais dietas. Já um trabalho realizado em organismos na fase pós-larvar de *S. senegalensis*, em que foram testadas 4 dietas (uma dieta comercial como controlo, e 3 outras dietas com a adição de *N. gaditana*, *P. tricornutum* e *C. vulgaris*) não mostrou quaisquer diferenças no conteúdo em proteínas dos peixes alimentados com as diferentes dietas (Peixoto et al., 2021), coincidindo com os resultados de Qiao et al. (2019) que testando o efeito de dietas com diferente percentagem de *Nannochloropsis sp.* em *S. maximus*, também não observou diferenças significativas no conteúdo proteico nos organismos sujeitos às várias condições.

Os resultados obtidos para a dieta 1 ao fim das 24 h de depuração sugerem que estes animais sofreram um stress maior ao fim do tempo de depuração em comparação com t_0 , uma vez que chegaram a utilizar as reservas proteicas para sua

sobrevivência, sendo que as proteínas são as últimas reservas a serem mobilizadas pelos animais, pois são somente utilizadas quando o animal se encontra já num estado de stresse crítico (Sokolova, 2013).

Nota-se, portanto, uma diferença no gasto das proteínas dos lingueirões em relação às ostras, uma vez que, apesar de, para ambos os animais, se ter observado a diminuição do conteúdo em proteínas, em fases diferentes da experiência. Não só isso, como também na ostra observou-se um aumento do conteúdo em proteínas nas primeiras 24 h, e é possível destacar um tratamento em que os resultados foram mais benéficos para a ostra ao longo do tempo experimental, e tal não se verifica com os resultados obtidos para o lingueirão.

As alterações nos conteúdos de cada reserva energética traduziram-se nos resultados obtidos na energia disponível, já que esta não sofreu alterações nem durante as 24 h de depuração, nem durante o tempo de prateleira, quer entre tempo, quer entre tratamentos. Estes resultados sugerem a existência de um estado de stresse baixo a moderado nos lingueirões.

Quanto à produção de energia aeróbica, calculada através da atividade da cadeia transportadora de elétrons, as análises mostraram que após 24 h de depuração não houve diferenças na produção de energia aeróbia para os animais provenientes dos tratamentos sem adição de alimento, nem para os animais sujeitos às 2 dietas. Durante o tempo de prateleira, também não se verificou nenhuma alteração na produção de energia aeróbia entre as 24 h e as 168 h.

Em relação à alocação de energia celular, neste trabalho não se verificaram alterações significativas às 24 horas, para nenhum regime alimentar, em relação ao t0. No entanto, para o tempo de prateleira, houve um aumento da alocação de energia das 24 h para as 168 h nos lingueirões alimentados com a dieta 2.

Apesar das alterações observadas para cada uma das frações energéticas e em termos de produção de energia aeróbia, o balanço final entre estas e que reflete as alocações de energia celular, mostram que durante o tempo de prateleira os

lingueirões não sofreram um stresse particularmente relevante, pois quando em stresse, dá-se uma alteração da alocação ótima de energia (Sokolova, 2013), o que não se observou, pelo contrário, para a dieta 2 a alocação de energia celular aumentou, podendo indicar que esta dieta seja benéfica para os lingueirões contribuindo para um menor stress.

As diferenças nas alocações de energia celular entre os lingueirões e as ostras, refletem as mesmas diferenças observadas na análise de cada uma das reservas energéticas.

Defesas celulares antioxidantes, como a enzima CAT e a GSH, protegem a célula do stresse oxidativo, inativando a espécies reativas de oxigénio ou reparando as biomoléculas (Da Silva et al. 2005). Durante a exposição a um stresse moderado, antioxidantes e outros mecanismos de proteção celular são ainda mais expressados, impedindo a ocorrência de stresse oxidativo através da manutenção do balanço do estado de redox (Sokolova, 2013).

Os resultados obtidos da atividade da enzima CAT mostram alterações significativas entre o t0 e o fim da depuração, embora não se observem diferenças significativas ao longo o tempo de prateleira.

Verificamos que, quer após 24 horas, a atividade da CAT foi diminuiu para as dietas 1 e 2, no entanto não houve alterações significativas ao entre as 24 h e as 168 h (tempo de comercialização).

Os resultados do presente trabalho vão parcialmente ao encontro dos obtidos por Amaro et al. (2019), uma vez que para esse estudo a atividade da CAT das 0 às 24 h diminuiu nos lingueirões alimentados com as dietas 1 e 2, indicando uma diminuição no stress oxidativo nos mesmos. O que evidencia a capacidade antioxidante das dietas á base de *Nannochloropsis* sp.

As análises à atividade da GST nos lingueirões revelaram uma alteração significativa na atividade da mesma nos lingueirões alimentados com as dietas 1 e 2 após 24 horas, observando-se que foram estes tratamentos que apresentaram um

menor valor da atividade desta enzima. Isto sugere que o stress nos lingueirões foi menor com a adição de dietas à base de *Nannochloropsis sp.* microencapsulada. No entanto, das 24 h às 168 h não se registou qualquer alteração na atividade desta enzima.

Estes resultados indicam-nos então que os tratamentos para os quais o stress foi mais baixo foram aqueles em que os organismos foram alimentados com dietas de algas microencapsuladas, já que as atividades da CAT e da GST foram também menores após a depuração, mantendo-se posteriormente estáveis.

Fazendo um balanço dos resultados da CAT e da GST para a ostra e para o lingueirão, fica em evidencia que as primeiras sofreram um maior stress quando alimentadas com a dieta 1 do que o lingueirão, no entanto para ambas as espécies houve uma redução do stress oxidativo com a adição da dieta 2.

No trabalho de Amaro et al. (2019) os resultados para atividade da GST traduzem os já obtidos pelos autores para a enzima CAT, ou seja, as dietas com maior composição em microalgas (*T. lutea*, *S. costatum* e *C. calcitrans*) apresentaram um stress oxidativo mais baixo do que o obtido para as dietas com maior percentagem de macroalga (*U. rígida*).

A peroxidação lipídica é um marcador de dano oxidativo nas membranas celulares em invertebrados, e é um dos maiores contribuidores na perda de função da célula em função de uma situação de stress oxidativo (Zanette et al. 2011) Neste estudo, observou-se que não houve alterações significativas nos níveis de LPO em nenhum dos momentos de amostragem, nem entre dietas. Isto deixa em evidencia que ao longo da depuração e do tempo de prateleira o stress não foi suficiente para alterar os valores da atividade desta enzima, ao contrário do verificado para as ostras.

De um modo geral os resultados dos lingueirões e das ostras foram positivos, já que em ambos os animais não se observou um aumento na peroxidação lipídica. O estudo de Amaro et al. (2019) não mostrou diferenças significativas quanto à

peroxidação lipídica, o que confirma os nossos resultados, uma vez que também não foram encontradas diferenças entre as dietas. Do mesmo modo os estudos sobre a influência das dietas na peroxidação lipídica no *Dicentrarchus labrax* e no *S. senegalensis*, alimentados a longo prazo com dietas à base de diferentes algas, entre as quais a *Nannochloropsis sp.*, não mostraram haver diferenças significativas no LPO entre ditas dietas (Peixoto et al., 2021; Abreu, 2008).

As análises ao dano genético revelaram que não houve nenhuma alteração significativa ao fim das 24 h de depuração, ou durante os 6 dias de tempo de prateleira. O resultado obtido não foge do esperado, uma vez que neste trabalho estão a ser testadas dietas com a intenção de melhorar as qualidades organolépticas dos bivalves para comercialização, portanto já não se esperavam resultados e/ou alterações muito altas no dano genético. Por outro lado, foi possível perceber que as dietas e as quantidades com que foram administradas não foram prejudiciais.

Em relação ao dano genético, não foram encontrados estudos sobre o efeito de dietas no dano genético em bivalves. Existe sim informação em relação aos efeitos das dietas em peixes, como é o caso do estudo de Pereira (2016), que testou o efeito de 2 dietas, dieta S - "standard" e dieta A - à base da dieta S, mas composta a 5% de algas (*Ulva spp.*, *Gracilaria spp.* e *Fucus spp.*) em igual percentagem, no dano genético de *Sparus aurata*. Tal como no presente estudo, Pereira (2016) não observou diferenças no dano genético entre as dietas.

5. Conclusão

Fazendo um balanço final dos resultados obtidos para os diferentes biomarcadores analisados, pode-se sugerir que a melhor dieta para alimentar ostras ao fim da depuração é a dieta de *Nannochloropsis sp.* enriquecida com vitaminas C e E, uma vez que não só foi uma das dietas para as quais se verificou uma diminuição no stress oxidativo ao longo do tempo de experiência, mas também apresentou um dos melhores resultados em relação à composição bioquímica e à alocação de energia das ostras ao longo do tempo de prateleira.

Enquanto isto, os resultados obtidos para os lingueirões mostram-nos que o stress oxidativo era menor ao fim da depuração do que no tempo inicial para os animais alimentados com as dietas de *Nannochloropsis sp.* *Nannochloropsis sp.*. Nos vários parâmetros analisados para estes organismos, houve sempre muito poucas diferenças significativas nos resultados, tanto entre dietas como ao longo do tempo. Ainda assim as poucas diferenças marginais apontam para melhores resultados para a dieta 3, *Nannochloropsis sp.* enriquecida com vitamina C e E, apesar destas diferenças se verificarem em apenas em 2 parâmetros.

Sendo este um estudo inovador, conclui-se que, apesar de resultados promissores, são necessários mais estudos que relacionem o efeito da alimentação durante a depuração em bivalves como a ostra e o lingueirão, mas também em outras espécies, no stress oxidativo e composição bioquímica dos organismos, bem como testes organoléticos para os mesmos.

Isto para que, no futuro, seja possível depurar e manter em prateleira estes animais da melhor forma possível, de modo que não percam as qualidades nutritivas e organoléticas que lhes são tão características, e que a tantos consumidores agradam.

6. Referências

- Abraham, C. (2012). Dedicated to. *Water Quality Indices*, (November), v. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-54304-2.03001-3>
- Abreu, S. (2008). Bioacumulação e dinâmica de mercúrio em ecossistemas lagunares costeiros. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10773/3646>
- Alves de Almeida, E., Celso Dias Bainy, A., Paula de Melo Loureiro, A., Regina Martinez, G., Miyamoto, S., Onuki, J., Di Mascio, P. (2007). Oxidative stress in Perna perna and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*.2006.02.040, 146(4), 588–600. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.040>
- Amaro, H. M., Rato, A., Matias, D., Joaquim, S., Machado, J., Gonçalves, J. F. M., ... Catarina Guedes, A. (2019). Alga diet formulation – An attempt to reduce oxidative stress during broodstock conditioning of Pacific oysters. *Aquaculture*, 500(July 2018), 540–549. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.060>
- Anacleto, P., Maulvault, A. L., Barrento, S., Mendes, R., Nunes, M. L., Rosa, R., & M., & Exotic, A. (2013). Physiological responses to depuration and transport of native and exotic clams at different temperatures. *Aquaculture*, 408–409, 136–146.
- Anjos, C. M. C. (2014). Broodstock conditioning of the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819): influence of diets, 44.
- Barile, N. B., Scopa, M., Nerone, E., Mascilongo, G. (2009). Study of the efficacy of a closed cycle depuration system on bivalve molluscs. *Veterinaria Italiana*, 45, 555–566.
- Bird, R. P., & Draper, H. H. (1984). Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods in Enzymology*, 105, 299–305. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05038-2](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05038-2)
- Boghen, A. D. (1995). *Cold-Water Aquaculture in Atlantic Canada* (2nd ed.). Canadian, The Development, Institute for Research on Regional.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Castilho, F. (n.d.). *Controlo de Qualidade de Moluscos Bivalves Vivos. Monografia*. Matosinhos.
- Catarina, L., & Jesus, A. (2015). Implementação da Norma NP EN ISO 22000 : 2005 em centros de depuração de bivalves: Estudo de caso., 1–66. Retrieved from <https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/8101>
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 61(2), 192–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
- Chua, E. T., & Schenk, P. M. (2017). A biorefinery for Nannochloropsis: induction, harvesting, and extraction of EPA-rich oil and high-value protein. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.124>
- Correia, M. H. O. C. (2016). Otimização do processo de depuração de moluscos bivalves. Retrieved from https://ria.ua.pt/bitstream/10773/17150/1/Dissertação_Maria_Helena_Correia.pdf
- Costello, M., & Saeedi, H. (2019). 2019 Saeedi Biology, Ecology, Importance Razor Clams.
- Cunha, V. D. A. C., & 81%29.pdf. (2012). Redução do teor de contaminantes químicos provenientes do Estuário do Tejo. (Dissertação de mestrado, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal). Disponível a partir de <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/5326/1/final%20tese%201%20%2081%29.pdf>.
- Da Costa, F. (2011). *Razor clams: Biology, aquaculture and fisheries*.
- De Coen, W. M., & Janssen, C. (1997). The use of biomarkers in Daphnia magna toxicity testing, IV: cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed Daphnia populations. *JOURNAL OF AQUATIC ECOSYSTEM STRESS AND RECOVERY*, 6(1), 43–55.
- DGRM. (2014). Plano Estratégico para a Aquicultura Portuguesa, 2014-2020.

- Dore, W. J., & Lees, D. N. (1995). Behavior of *Escherichia coli* and male-specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalve molluscs before and after deputation. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(8), 2830–2834. <https://doi.org/10.1128/aem.61.8.2830-2834.1995>
- FAO. (n.d.). FAO (2008). Disponível em <http://www.fao.org>. <http://www.fao.org/3/i0201e/i0201e.pdf>.
- Fernández-Tajes, J., & Méndez, J. (2007). Identification of the Razor Clam Species *Ensis arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus*, *E. macha*, and *Solen marginatus* Using PCR-RFLP Analysis of the 5S rDNA Region. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(18), 7278–7282. <https://doi.org/10.1021/jf0709855>
- Gallardi, D. (2014). Effects of Bivalve Aquaculture on the Environment and Their Possible Mitigation: A Review. *Fisheries and Aquaculture Journal*, *5*. Retrieved from <https://doi.org/10.4172/2150-3508.1000105>
- Gibbs, M. T. (2007). Sustainability performance indicators for suspended bivalve aquaculture activities. *Ecological Indicators*, *7*(1), 94–107.
- Gnaiger, E. (1983). Calculation of Energetic and Biochemical Equivalents of Respiratory Oxygen Consumption. In Eric h Gnaiger & H. Forstner (Eds.), *Polarographic Oxygen Sensors* (pp. 337–345). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, *249*(22), 7130–7139. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/4436300>
- Hood, M. A., Ness, G. E., & Blake, N. J. (1983). Relationship among fecal coliforms, *Escherichia coli*, and *Salmonella* spp. in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, *45*, 122–126.
- INE. (2020). Portal do Instituto Nacional de Estatística.
- IPMA. (2016). Instituto Português do Mar e da Atmosfera.
- Kim, S. K., Oh, J. R., Shim, W. J., Lee, D. H., Yim, U. H., Hong, S. H., Shin, Y. B. & Lee, D. S., & Organochlorine. (2002). Geographical distribution and accumulation features of organochlorine

- residues in bivalves from coastal areas of South Korea. *Marine Pollution Bulletin*, 45, 268–279.
Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00279-X](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00279-X)
- Knight, J., Caseldine, C., & Boykoff, M. (2010AD). Forum review: Forum review. *Geographical Journal*, 176(3), 267–269.
- Krus, P. (2017). Faculdade de Medicina Veterinária Instituto Superior de Agronomia Caracterização Microbiológica de Bivalves Vivos: Efeito do Transporte e Variação Temporal Entre Espécies
Patrícia Krus Policarpo DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA-
PRODUÇÃO AN. Retrieved from
[https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/15226/1/Caracterização Microbiológica de Bivalves Vivos_Efeito do Transporte e Variação Temporal Entre Espécies.pdf](https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/15226/1/Caracterização_Microbiológica_de_Bivalves_Vivos_Efeito_do_Transporte_e_Variação_Temporal_Entre_Espécies.pdf)
- Lees, D. (2000). Viruses and bivalve shellfish. *International Journal of Food Microbiology*, 59, 81–1168.
- Leoni, G., De Poli, A., Mardirossian, M., Gambato, S., Florian, F., Venier, P., ... Gerdol, M. (2017). Myticalins: A Novel Multigenic Family of Linear, Cationic Antimicrobial Peptides from Marine Mussels (*Mytilus* spp.). *Marine Drugs*, 15(8). <https://doi.org/10.3390/md15080261>
- López, J., Rodríguez, C., & Carrasco, J. F. (2005). Comparación del ciclo reproductor de *Solen marginatus* (Pulteney, 1799) (Mollusca: Bivalvia) en las rías del Eo y Villaviciosa (Asturias, noroeste de España): Relación con las variables ambientales. *Boletín - Instituto Español de Oceanografía*, 21(1–4), 317–327.
- Lubian, L.M., Montero, O., Moreno-Garrido, I., Huertas, I.E., Sobrino, C., Gonzalez-del Valle, M., & Pares, G. (2000). Nannochloropsis (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *Journal of Applied Phycology*, 12, 249–255.
- Macedo, D., Tavares, L., McDougall, G. J., Vicente Miranda, H., Stewart, D., Ferreira, R. B., ... Santos, C. N. (2014). (Poly)phenols protect from α -synuclein toxicity by reducing oxidative stress and promoting autophagy. *Human Molecular Genetics*, 24(6), 1717–1732.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddu585>
- Matias, M. A. G. (2013). Influência da variação sazonal no valor nutricional e avaliação da estabilidade da amêijoia-boia produzida em aquacultura, 100. Retrieved from

[https://iconline.ipleiria.pt/bitstream/10400.8/1062/1/Projeto Marta Matias.%0Apdf](https://iconline.ipleiria.pt/bitstream/10400.8/1062/1/Projeto%20Marta%20Matias.pdf)

Matthiessen, G. C. (2001). *Oyster Culture*. London.

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

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

Murchie, L. W., Cruz-Romero, M., Kerry, J. P., e Linton, M. (2005). High pressure processing of shellfish: A review of microbiological and other quality aspects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6, 257–270. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856405000457>.

Oliveira, J., Cunha, A., Castilho, F., Romalde, J. L., & Pereira, M. J. (2011). Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives - A mini-review. *Food Control*, 22, 805–816.

Pauly, D., & Zeller, D. (2016). Catch reconstructions reveal that global marine fisheries catches are higher than reported and declining. *Nature Communications*, 7(1), 10244. <https://doi.org/10.1038/ncomms10244>

Peixoto, D., Pinto, W., Gonçalves, A. T., Machado, M., Reis, B., Silva, J., ... Costas, B. (2021). Microalgal biomasses have potential as ingredients in microdiets for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) post-larvae. *Journal of Applied Phycology*, 33(4), 2241–2250. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02431-1>

Pereira, C., Moreirinha, C., Teles, L., Rocha, R. J. M., Calado, R., Romalde, J. L., Nunes, M., & Almeida, A. (2017). Application of phage therapy during bivalve depuration improves *Escherichia coli* decontamination. *Food Microbiology*, 61, 102–112.

Pereira, V. (2016). *No Title Efeitos protetores de suplementação alimentar com macroalgas marinhas na integridade genética de dourada (Sparus aurata)*. Tese de Mestrado.

- Qiao, H., Hu, D., Ma, J., Wang, X., Wu, H., & Wang, J. (2019). Feeding effects of the microalga *Nannochloropsis* sp. on juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Algal Research*, *41*(May). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101540>
- Randall, D., Burggren, W., e French, K. (1997). *Eckert Animal Physiology*.
- Rees, G., Pond, K., Kay, D., e Bartram, J. (2013). *Safe Management of Shellfish and Harvest*.
- Rodrigues, A. C. M., Gravato, C., Quintaneiro, C., Golovko L., O., Žlábek, V., Barata, C., Soares, A. M. V. M. & Pestana, J. T. (2015). Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment*, *508*, 506–513. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.021>
- Ruesink, J. L., Lenihan, H. S., Trimble, A. C., Heiman, K. W., Micheli, F., Byers, J. E., & Kay, M. C. (2005). Introduction of non-native oysters: Ecosystem effects and restoration implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *36*, 643–689. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152638>
- Schulze, A., Beliu, G., DA, H., Schubert, J., LH, P., Prodromou, C., & Neuweiler, H. (2016). Cooperation of local motions in the Hsp90 molecular chaperone ATPase mechanism. *Nature Chemical Biology*, *12*(8), 628–635.
- Silvestre, J. A., Pires, S. F. S., Pereira, V., Colaço, M., Costa, A. P. L., Soares, A. M. V. M., ... Rodrigues, A. C. M. (2021). Meeting the Salinity Requirements of the Bivalve Mollusc *Crassostrea gigas* in the Depuration Process and Posterior Shelf-Life Period to Improve Food Safety and Product Quality. *Water*, *13*(8). <https://doi.org/10.3390/w13081126>
- Sokolova, I. M. (2013). Energy-Limited Tolerance to Stress as a Conceptual Framework to Integrate the Effects of Multiple Stressors. *Integrative and Comparative Biology*, *53*(4), 597–608. <https://doi.org/10.1093/icb/ict028>
- Spencer, B. E. (2002). *Molluscan Shellfish Farming*. Oxford, UK, UK: Blackwell PublishingK.
- Storz, G., & Imlay, J. A. (1999). Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology*, *2*(2), 188–194. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(99\)80033-2](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(99)80033-2)

- Sukenik, S., Flusser, D., & Abu-Shakra, M. (1999). THE ROLE OF SPA THERAPY IN VARIOUS RHEUMATIC DISEASES. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 25(4), 883–897. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0889-857X\(05\)70108-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0889-857X(05)70108-3)
- Tebble, N., & Museum, E. (1966). British Bivalve Seashells. A Handbook for Identification. *XF2006173962*.
- Venier, P., Gerdol, M., Domeneghetti, S., Sharma, N., Pallavicini, A., & Rosani, U. (2018). *Biotechnologies from marine bivalves. Goods and Services of Marine Bivalves*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96776-9_5
- Verslycke, T., Ghekiere, A., & Janssen, C. R. (2004). Seasonal and spatial patterns in cellular energy allocation in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) of the Scheldt estuary (The Netherlands). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 306(2), 245–297. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.01.014>
- Wilce, M. C., & Parker, M. W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1205(1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)90086-8)
- Wright, R. T., Coffin, R. B., Ersing, C. P., & Pearson, D. (1982). Field and laboratory measurements of bivalve filtration of natural marine bacterioplankton. *Limnology and Oceanography*, 27, 91–98. Retrieved from <https://doi.org/10.4319/lo.1982.27.1.0091>
- Xie, H., Zhou, D., Hu, X., Liu, Z., Song, L., & Zhu, B. (2018). Changes in Lipid Profiles of Dried Clams (*Macra chinensis* Philippi and *Ruditapes philippinarum*) during Accelerated Storage and Prediction of Shelf Life. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(29), 7764–7774. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03047>