



**Maria João de Pinho
Gomes Ferreira**

Influência da nutrição em camarões *Penaeus vannamei* expostos a cádmio durante o processo de cultivo.

Influence of nutrition on *Penaeus vannamei* shrimp exposed to cadmium during the cultivation process.



Universidade de Aveiro
2023

**Maria João de Pinho
Gomes Ferreira**

Influência da nutrição em camarões *Penaeus vannamei* expostos a cádmio durante o processo de cultivo.

Influence of nutrition on *Penaeus vannamei* shrimp exposed to cadmium during the cultivation process.

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Eco-toxicologia e Análise de Risco, realizada sob a orientação científica do Doutor Rui Jorge Miranda Rocha, diretor executivo da Riasearch, Lda. e da Professora Doutora Rosa de Fátima Lopes de Freitas professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Trabalho realizado no âmbito do projeto “FICA - Ferramentas inovadoras para investigação contratada em nutrição em aquacultura” referência ALG-01-0247-FEDER-047175, financiado pela União Europeia através do FEDER, COMPETE 2020 e CRES Algarve 2020, no âmbito do Portugal 2020



Dedico este trabalho aos meus pais e irmã por todo o apoio ao longo do meu crescimento escolar e pessoal.

o júri

Presidente

Professor Doutor Carlos Miguel Miguez Barroso
Professor Auxiliar c/ Agregação, Universidade de Aveiro.

Vogais

Arguente Principal: Doutora Andreia do Carmo Martins Rodrigues
Investigadora Doutorada (nível 1), Universidade de Aveiro.

Orientador: Doutor Rui Jorge Miranda Rocha
Investigador e CEO, Riasearch.

agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador Doutor Rui Rocha pela oportunidade de estágio na empresa Riasearch, bem como a todos os colaboradores pela forma como me receberam, e por todo o apoio ao longo deste trabalho.

Agradecer também á minha coorientadora Doutora Rosa Freitas pela sua disponibilidade e ajuda em todo este processo.

Agradeço também á minha família por todo o apoio ao longo do meu percurso escolar e por me ouvirem em todos os momentos, ao meu namorado por estar sempre do meu lado. E por último às minhas duas amigas e colegas de curso Sara e Raquel por todo o companheirismo.

palavras-chave

Nutrição, saúde intestinal, stresse oxidativo, dano oxidativo, ecotoxicologia, aquacultura, biomarcadores.

resumo

A aquacultura é a atividade de produção de alimentos que mostra um crescimento mais acentuado nas últimas décadas. O camarão, *Penaeus vannamei*, é a espécie de crustáceo mais cultivada a nível mundial. A poluição do meio aquático pode representar um constrangimento ao desenvolvimento da aquacultura, devido aos efeitos negativos que pode ter nos organismos cultivados. Por outro lado, a nutrição e a saúde intestinal, constituem aspetos fundamentais para o desenvolvimento sustentável da aquacultura. Por isso, é muito relevante desenvolver ferramentas e metodologias que permitam o diagnóstico rápido e credível de aspetos sub-ótimos durante o processo de cultivo. Este trabalho teve como objetivos: i) identificar os biomarcadores mais apropriados para detetar situações de stresse subletal em órgãos e tecidos de camarões (*P. vannamei*) expostos a uma situação de stresse agudo pela ingestão de cádmio, através da dieta, e ii) avaliar o efeito da introdução de uma alga calcária (*Lithothamnion calcareum*) na dieta, como forma de mitigação das consequências da exposição destes organismos ao contaminante, devido à sua biodisponibilidade de macronutrientes e elevado potencial de absorção de iões metálicos anteriormente comprovada. Os resultados obtidos mostraram que a ingestão de cádmio, em doses ambientalmente relevantes, aumenta exponencialmente a mortalidade da espécie e diminui a quantidade de alimento ingerido, algo que poderá ser relevante para a produção destes organismos em locais onde o ambiente aquático incorpora este metal. Contudo, a presença da alga nas dietas não teve nenhum efeito significativo nos organismos expostos ao contaminante. A avaliação de stresse subletal constitui uma ferramenta relevante para a otimização dos processos de cultivo. Foi possível observar que os resultados da análise de glutathione peroxidase (GPx) e da capacidade metabólica (através da atividade do sistema de transporte de eletrões-ETs) são bons indicadores para avaliação de stresse subletal ao nível do hepatopâncreas, hemolinfa e músculo. No entanto, no intestino, em teoria um dos órgãos mais afetados pela ingestão do contaminante, a peroxidação lipídica (LPO) foi o parâmetro que permitiu identificar de forma significativa as alterações subletais, resultantes da exposição ao cádmio. Os resultados deste trabalho sugerem a utilização de metodologias analíticas que podem permitir a otimização do cultivo *P. vannamei*. No entanto, recomenda-se a realização de mais trabalhos que permitam aprofundar o estudo ao nível do intestino, uma vez que a saúde intestinal é um aspeto preponderante para o sucesso do cultivo de organismos aquáticos.

keywords

Nutrition, intestinal health, oxidative stress, oxidative damage, ecotoxicology, aquaculture, biomarkers.

abstract

Aquaculture is the food production activity that has shown the most pronounced growth in recent decades. The shrimp, *Penaeus vannamei*, is the most cultivated crustacean species in the world. Pollution of the aquatic environment can represent a constraint to the development of this activity due to the negative effects it can have on cultivated organisms. On the other hand, nutrition and intestinal health is one of the aspects for the sustainable development of aquaculture. Therefore, it is very important to develop tools and methodologies that allow the fast and credible diagnosis of sub-optimal aspects during the cultivation process. This work aimed to: i) identify the most appropriate biomarkers to detect situations of sublethal stress in the organs or tissues of shrimp (*P. vannamei*) exposed to a situation of acute stress cadmium intake, through diet, and ii) to evaluate the effect of introducing a calcareous alga (*Lithothamnion calcareum*) in the diet, as a way of mitigating the consequences of exposure of these organisms to the contaminant due to their previously proven bioavailability of macronutrients and high potential for absorbing metallic ions. The results obtained showed that the presence of cadmium, in environmentally relevant doses, exponentially increases the mortality of the species and decreases the amount of feed ingested. However, the presence of the vegetal component in diets didn't have any significance effect in the organisms exposed to the cadmium. Sublethal stress assessment is a relevant tool for optimizing cultivation processes. It was possible to observe that the results of the analysis of glutathione peroxidase (GPx) and of the metabolic capacity (through the activity of the electron transport system-ETs) are good indicators for the evaluation of sublethal stress at the level of the hepatopancreas, hemolymph and muscle. However, in the intestine, in theory one of the organs most affected by the ingestion of the contaminant, lipid peroxidation (LPO) was the parameter that allowed the significant identification of sublethal changes resulting from exposure to cadmium. The results of this work suggest the use of analytical methodologies that can allow the optimization of *P. vannamei* cultivation. However, it is recommended to carry out more work that will allow a deeper study at the level of the intestine, since intestinal health is a preponderant aspect for the success of the cultivation of aquatic organisms.

Índice

1. Introdução	1
1.1 Aquacultura no mundo	1
1.1.1 Aquacultura do camarão <i>Penaeus vannamei</i>	4
1.1.2. Utilização de algas calcárias como suplemento alimentar em aquacultura	8
1.2. Aquacultura em Portugal	9
1.3. Aquacultura e contaminação de ambientes aquáticos	12
1.3.1. O Cádmiu como contaminante	13
1.4. Biomarcadores para avaliação de stresse subletal em camarões	15
2. Objetivos	17
3. Materiais e métodos	18
3.1. Desenho Experimental	18
3.1.1 Ensaio de exposição.....	19
3.1.2. Ensaio de recuperação	20
3.2. Respostas biológicas	21
3.2.1. Pesagem e extração.....	21
3.2.2 Parâmetros bioquímicos.....	22
3.2.3. Análise estatística	23
4. Resultados	25
4.1 Ensaio experimental.....	25
4.2 Respostas biológicas	25
4.2.1 Sobrevivência	25
4.2.2 Ingestão de ração	26
4.2.3 Hepatopâncreas	27
4.2.4 Músculo	29
4.2.5 Hemolinfa	31
4.2.6. Intestino	33
4.2.7 Análise multivariada	34
5. Discussão de resultados	38
5.1. Ensaio de exposição e recuperação	39
5.2. Bioquímica.....	41
6. Conclusão	48
7. Bibliografia	50
8. Anexos	64
8.1. Estágio.....	64

Índice de Figuras

Figura 1. Produção total de pescado para consumo (Fonte: FAO, 2022).	2
Figura 2. Estabelecimentos de aquacultura licenciados em Portugal no ano de 2019 (Fonte: Ambiente, 2022)	11
Figura 3. Fotografias do sistema utilizado para o ensaio experimental	18
Figura 4. Esquema dos tanques no ensaio de exposição	19
Figura 5. Esquema dos tanques no ensaio de recuperação	20
Figura 6. Fotografias da amostragem final.....	21
Figura 7. Percentagem de sobrevivência ao longo do ensaio de exposição	26
Figura 8. Média da ingestão diária de ração durante o ensaio de exposição apresentada em percentagem do peso corporal de acordo com a biomassa corporal de cada tanque.....	26
Figura 9. Média de ingestão diária da ração durante o ensaio de recuperação apresentada em percentagem do peso corporal de acordo com a biomassa corporal de cada tanque.....	27
Figura 10. A: Atividade do sistema de transporte de eletrões (ETs); B: Atividade da glutathione peroxidase (GPx); C: Atividade da glutathione S-transferases (GSTs); D: Nivel de peroxidação lípica (LPO); E: Atividade da acetilcolinesterase (AChE); Os resultados são a média + desvio padrão. Diferenças significativas ($p < 0.05$) entre condições estão representadas por diferentes letras e entre ensaios pelo asterisco.....	29
Figura 11. A: Atividade do sistema de transporte de eletrões (ETs); B: Atividade da glutathione peroxidase (GPx); C: Atividade da glutathione S-transferase (GSTs); D: Nivel da peroxidação lipídica (LPO) ; E:Atividade acetilcolinesterase (AChE) ; Os resultados são a média + desvio padrão. Diferenças significativas ($p < 0.05$) entre condições estão representadas por diferentes letras, e entre ensaios por asterisco.	31
Figura 12. A: Atividade do sistema de transporte de eletrões (ETs); B: Atividade da glutathione peroxidase (GPx); C: Atividade da glutathione S-transferase (GSTs); D: Nivel da peroxidação lipídica (LPO); E: Atividade da acetilcolinesterase (AChE); Os resultados são a média + desvio padrão. Diferenças significativas ($p < 0.05$) entre condições estão representadas por diferentes letras e entre ensaios com asterisco.	33
Figura 13. A: Atividade da glutathione S-transferase (GSTs); B: Nivel da peroxidação lipídica (LPO); C: Atividade de acetilcolinesterase (AChE); Os resultados são a média + desvio padrão. Diferenças significativas ($p < 0.05$) entre condições estão representadas por diferentes letras e entre ensaios com asterisco.	34
Figura 14. Diagrama de ordenação (PCO) baseado em descritores bioquímicos, órgãos recolhidos e dietas consumidas por organismos da espécie <i>Penaeus vannamei</i> expostos ao cádmio (Int-intestino; Mus-músculo; Hep- hepatopâncreas; Hem-hemolinfa seguidos das siglas dos tratamentos). Os vetores de correlação de Pearson são sobrepostos como variáveis suplementares ($r > 0,75$): LPO (peroxidação lipídica), GSTs (glutathione S-transferases) e AChE (acetilcolinesterase).	35
Figura 15. Diagrama de ordenação de centroides (PCO) baseado em descritores bioquímicos, órgãos recolhidos e dietas consumidas por organismos da espécie <i>Penaeus vannamei</i> em recuperação da exposição	

ao cádmio (Int-intestino; Mus-músculo; Hep- hepatopâncreas; Hem- hemolinfa seguidos das siglas dos tratamentos). Os vetores de correlação de Pearson são sobrepostos comovariáveis suplementares ($r > 0,75$): LPO (<i>peroxidação lipídica</i>), GSTs (<i>glutathiona S-transferases</i>) e AChE (<i>acetilcolinesterase</i>).	36
Figura 16. Gráfico Cluster para o ensaio de exposição (Int- intestino; Mus- músculo; Hep-hepatopâncreas; Hem- hemolinfa seguidos das siglas dos tratamentos, divisão das semelhanças entre órgãos e tratamentos.	37
Figura 17. Gráfico Cluster para o ensaio de recuperação (Int- intestino; Mus- músculo; Hep- hepatopâncreas; Hem- hemolinfa seguidos das siglas dos tratamentos), divisão das semelhanças entre órgãos e tratamentos.	37
Figura 18 Mapa da localização da empresa Riasearch (fonte: cm.murtosa).	64
Figura 19. Biotério da empresa (local da realização de ensaios), tanques retangulares (à direita) e tanques circulares (à esquerda) (Fonte: www.riasearch.pt)	65

Índice de tabelas

Tabela 1. Matriz de avaliação do desperdício alimentar	20
Tabela 2 Média e desvio-padrão de todos os parâmetros ao longo dos ensaios.....	25

1. Introdução

1.1 Aquacultura no mundo

A população mundial depara-se com vários desafios, entre os quais a crise financeira, que se junta a uma crise climática, com consequências tais como o aquecimento e acidificação do oceano, que podem causar mudanças irreversíveis (Katkov & Fussmann, 2023). Para além destas ameaças, é necessário satisfazer as necessidades alimentares de uma elevada densidade populacional, tendo a consciência da finitude de certos recursos e da possível extinção de várias espécies (FAO, 2022). A pesca e a aquacultura são uma importante fonte de alimentos de proteína animal, sendo que ao longo dos anos os métodos de pesca evoluíram e a captura de peixe tornou-se mais fácil e eficiente, mas também mais ameaçadora para o meio ambiente (Mozaffarian & Rimm, 2006; Crespi et al., 2015). Como consequência, a percentagem de stocks de peixe sobrexplorados tem aumentado ao longo dos anos devido à intensa captura. Com base na avaliação da FAO, a percentagem dos stocks pesqueiros dentro de níveis biologicamente sustentáveis diminuiu para 64,6 % em 2019, ou seja, 1,2 % abaixo do valor registado em 2017, comprometendo a prosperidade e a sustentabilidade dos recursos marinhos e da disponibilidade de peixes para consumo humano (FAO 2018; Sommer, 2019; FAO, 2022).

Os produtos da pesca e da aquacultura estão entre os mais comercializados mundialmente, com 178 milhões de toneladas colocadas no mercado em 2020. Atualmente, a aquacultura fornece cerca de 49 % dos produtos presentes no mercado crescendo em média 7,8 % ao ano, sendo por isso, um dos setores de produção de alimentos de origem animal em maior crescimento; já as capturas piscatórias têm estado estáveis, encontrando-se nas 90 milhões de toneladas desde o ano de 1995 como mostra a Figura 1 (FAO, 2018; FAO, 2022). Destes 178 milhões de toneladas, 57,5 milhões correspondem a cultivo de peixes, os moluscos atingiram 17,7 milhões de toneladas e os crustáceos 11,2 milhões de toneladas (FAO, 2022). Os camarões marinhos dominam a produção de crustáceos em aquacultura, sendo uma importante fonte de rendimento para vários países na Ásia e na América Latina, enquanto que no continente europeu ainda continua pouco explorado (FAO, 2022).

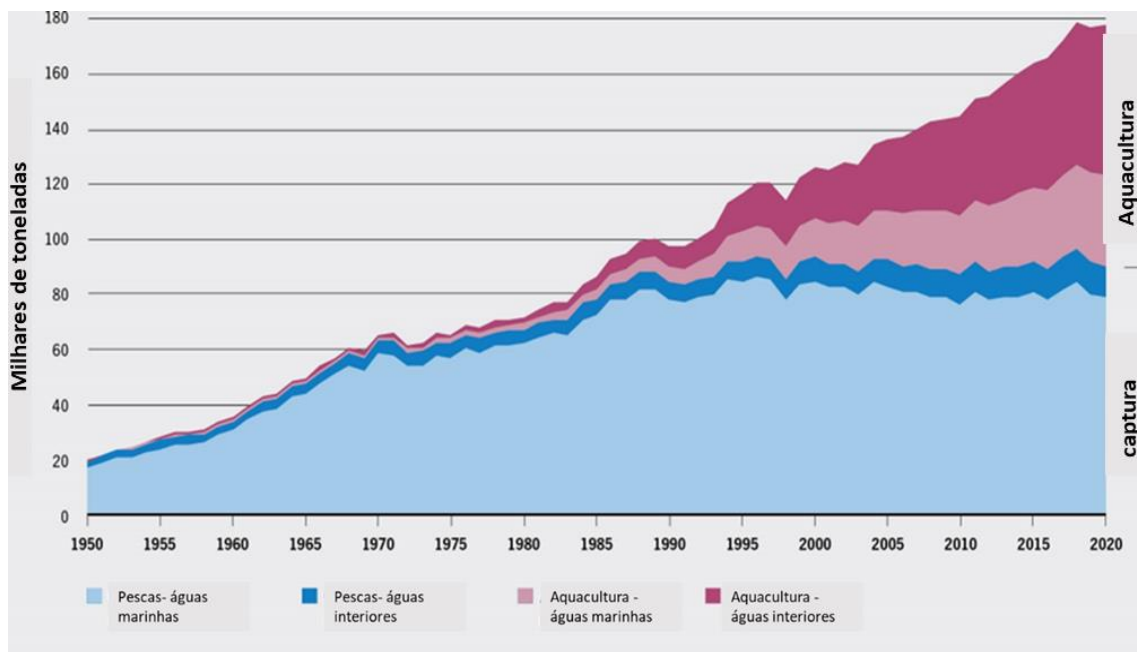


Figura 1. Produção total de pescado para consumo (Fonte: FAO, 2022).

A produção mundial em aquicultura ainda apresenta uma distribuição desigual, apesar de dispersa globalmente, em 2020, os países asiáticos foram os principais produtores, respondendo com 70 % da produção total de pesca e aquicultura de animais aquáticos, seguidos por países do continente americano (12 %), Europa (10 %), África (7 %) e Oceania (1 %). No geral, a produção total da pesca e da aquicultura teve aumentos importantes em todos os continentes nas últimas décadas (FAO, 2022). Em 2018, a Europa era responsável por apenas 3,8 % da produção mundial, sem uma alternativa para a pesca de captura, que vem diminuindo nesta região (FAO, 2020; FAO, 2022). Assim sendo é possível afirmar que a produção de aquicultura na Europa tem tido um crescimento fraco e lento comparando ao restante mundo. No entanto, é reconhecida pela sua tecnologia, qualidade de produção de rações, sustentabilidade, padrões de proteção ao consumidor e aspetos naturais adequadas para o cultivo de várias espécies. Apesar disso, os produtores europeus têm de competir com as produções de outros países onde o acesso ao espaço e à água é facilitado bem como uma menor complexidade nos processos administrativos, como licenciamentos (DGRM, 2014;FAO, 2020).

A aquicultura pode ser subdividida, consoante o regime de produção, em produção extensiva, semi-intensiva e intensiva, com crescente controlo das condições de produção, densidades de produção e fornecimento de ração, sendo o regime extensivo aquele que apresenta menor controlo, menor densidade e menor fornecimento de ração e a intensiva o maior controlo, maior densidade populacional e, conseqüentemente, maior fornecimento de ração. Por outro lado, consoante o local onde é feita esta produção, pode ser classificada por aquicultura em terra

("inshore"), aquacultura em mar aberto ("offshore") e aquacultura costeira ("onshore"). Esta atividade pode ser realizada em água doce, salobra ou salgada (Beveridge, 2004; FAO, 2018). Esta indústria tem fornecido peixes, moluscos, crustáceos e algas para o consumo humano, mas também tem gerado cada vez mais subprodutos para usos não alimentares, como a produção de farinha e óleo de peixe. Para além disso, a aquacultura desempenha uma função crítica no emprego a milhões de pessoas, onde muitas das quais vivem e dependem da aquacultura para subsistência (FAO, 2020). Mais recentemente, tem existido uma preocupação de alcançar uma "aquacultura sustentável" que tem como objetivo a produção contínua de pescado para consumo humano sem prejudicar os ecossistemas ou exceder a capacidade de renovação dos recursos naturais. Sendo este atualmente o setor alimentar com o crescimento mais rápido é relevante a implementação de métodos de produção cada vez mais sustentáveis (Díaz et al., 2012; Robles e Mylonas, 2017; Boyd et al., 2020).

A produção de organismos aquáticos tem várias vantagens comparativamente à produção de animais terrestres. Sendo que a aquacultura pode produzir em três dimensões, o que permite produzir mais organismos por unidade de área, outra das vantagens é o facto de os peixes serem ectotérmicos o que significa que estes gastam pouca energia para manterem a temperatura corporal, por isso muita da energia dada pela alimentação é usada no seu crescimento (Fernandes et al., 2018). Outra vantagem é a maior eficiência de conversão de energia (Fernandes et al., 2018). Contudo, este sector também lida com alguns problemas de produção típicos da indústria animal. Os dois maiores desafios que a aquacultura tem enfrentado são a nutrição e as doenças dos organismos cultivados (FAO, 2016). Relativamente à nutrição, um dos principais desafios centra-se na substituição da proteína proveniente da farinha de peixe por outras fontes proteicas de origem vegetal e animal (Hua et al., 2019). A investigação existente nas últimas décadas tem permitido a substituição completa ou parcial de componentes proteicos e lipídicos nas dietas (Gersdor Jorgensen, 2020). Este setor é igualmente bastante condicionado por doenças, sendo que os stocks de aquacultura apresentam maior densidade do que nas condições naturais, o que favorece surtos de doenças e conseqüentemente a morte. As doenças em culturas de elevada densidade são normalmente difíceis de controlar, incluindo parasitas, bactérias e vírus que podem espalhar-se rapidamente e completar o seu ciclo de vida num curto período de tempo, especialmente se apenas precisarem de um hospedeiro (Menezes, 2000; Toh et al., 2018). Um dos problemas para os organismos e consumidores com o controlo de doenças é o uso de medicamentos como medida profilática. Isso não só favorece a disseminação de bactérias resistentes, mas também a poluição da água a jusante da produção (FAO, 2016; Gersdor

Jorgensen, 2020). No entanto, importa referir que as unidades de produção localizadas na comunidade europeia estão sujeitas a legislação e medidas de controlo eficientes, que garantem a total segurança dos produtos para o consumidor. Contudo, continua a ser relevante que se estudem alternativas para a prevenção de doenças nos organismos, nomeadamente através do desenvolvimento de novas vacinas que se têm tornado numa das ferramentas mais importantes e promissoras. Para além das vacinas, a dieta pode influenciar os parâmetros imunológicos bem como a capacidade dos organismos resistirem às doenças. Deste modo, a procura por dietas preparadas com alimentos funcionais, que promovam a resistência ao stress e agentes causadores de doenças, assumem grande importância (Gatlin et al., 2007; Chhorn & Webster, 2008; Evensen, 2016).

Na Europa as espécies mais produzidas em aquacultura são o salmão do Atlântico (*Salmo Salar*), robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) e a dourada (*Sparus aurata*). Atualmente, devido à sua popularidade, estas espécies têm saturado o mercado e o seu lucro tem decrescido. Para superar este problema outras espécies como por exemplo a corvina (*Argyrosomus regius*), a seriola (*Seriola dumerili*), o zander europeu (*Sander lucioperca*) e o alabote do atlântico (*Hippoglossus hippoglossus*) têm sido estudadas para possível produção para assegurar a sustentabilidade na aquacultura, a sua expansão e diversidade de oferta aos consumidores (Robles e Mylonas, 2017; FAO, 2018).

A produção de crustáceos em aquacultura atingiu os 10 milhões de toneladas em 2020. Desde o início da expansão da aquacultura, os crustáceos têm mostrado um crescimento anual de 2,9 % (FAO, 2020; FAO, 2022). Dentro dos crustáceos, os camarões são um dos grupos explorados, nomeadamente a espécie *Penaeus vannamei* com 5,8 milhões de toneladas produzidas. A produção de crustáceos é uma fonte valiosa de trocas e exportações para alguns países em desenvolvimento na Ásia e na América Latina onde se apresenta a maior parte da produção (FAO, 2017; FAO, 2022). Esta é liderada pelo continente asiático, sendo a China, Tailândia e Indonésia os países com maiores exportações de camarão, principalmente a espécie *P. vannamei*. Os EUA são o maior mercado de camarão, tendo um grande efeito nos países exportadores dessas espécies em todo o mundo (Bondad-Reantaso et al., 2012; Fao, 2016; FAO, 2020).

1.1.1 Aquacultura do camarão *Penaeus vannamei*

A espécie *Penaeus vannamei*, também conhecida como camarão branco ou camarão branco do pacífico é uma espécie do grupo dos peneídeos dentro da ordem Decapoda, subordem Dendrobranchiata e género *Penaeus*, é uma das mais importantes comercialmente e a mais

produzida no mundo (Bondad-Reantaso et al., 2012). A sua produção tem vindo a aumentar ao longo dos anos apresentando uma produção anual superior a 10 milhões de toneladas, o que corresponde a 53 % da produção total de crustáceos (Sanudin et al., 2014; FAO, 2018). Ocupando a segunda posição em termos de produção mundial, encontra-se o *P. monodon* com uma produção de 0,7 milhões de toneladas (8 %). Seguem-se o *Macrobrachium nipponense* e o *Macrobrachium rosenbergii*, ambas as espécies com produção perto das 0,2 milhões de toneladas (2,5 %) (FAO, 2020).

O camarão *P. vannamei*, é nativo da costa leste do Oceano Pacífico, desde o México até ao norte do Peru, no entanto produz-se em outros locais como a China, Tailândia, Indonésia e Brasil (Bondad-Reantaso et al., 2012). Em termos de coloração, estes organismos apresentam uma mudança devido aos seus cromatóforos que quando contraídos conferem uma cor branca, mas quando expandem revelam uma cor azulada. Apesar desta mudança, a cor não é uma característica fiável para identificação pois pode variar de acordo com o crescimento, ambiente e doenças (Briggs et al., 2004; FAO, 2018).

A temperatura e a salinidade são importantes fatores imunossupressores que facilitam a ocorrência de doenças, sendo por isso considerados os mais importantes fatores físicos que afetam estes organismos (Qiu et al., 2011; Liu et al., 2012; Fofonoff et al., 2018). Esta espécie encontra-se em habitats marinhos tropicais onde as águas apresentam temperaturas superiores a 25 °C, possui um crescimento ótimo entre os 28 e 32 °C e apresenta menor mortalidade entre os 20 e os 30 °C. Revela uma elevada tolerância a variações de salinidade, entre 0,5 a 45, sentindo-se confortáveis entre os 7 e os 34 (FAO, 2018). No entanto, prospera melhor quando os níveis de salinidade se encontram entre os 10 e os 15, podendo viver em águas salobras bem como em regiões de água doce devido às suas características eurialinas (Valencia-Castañeda et al., 2018). No seu habitat, e ao longo do seu ciclo de vida, esta espécie é obrigada a passar por uma série de flutuações diárias e sazonais, relacionadas a estes parâmetros, o que lhe confere uma enorme capacidade de aclimação. Por isto, tanto a salinidade como a temperatura, são apontadas como os principais parâmetros abióticos que influenciam a vida destes organismos aquáticos (Cuzon et al., 2004; Bondad-Reantaso et al., 2012; G. Liu et al., 2017).

O ciclo de vida dos camarões peneídeos começa por uma migração dos indivíduos adultos para o mar onde procuram uma água com características estáveis como a salinidade e temperatura, local onde vivem e se reproduzem. Na primeira de três fases larvares, os náuplios eclodem e, à medida que passam a estádios larvares seguintes, deslocam-se para os estuários, lagoas costeiras e mangais, locais que funcionam como maternidades naturais ricas em alimento, onde crescem e

metamorfizam. Após atingirem o estágio de juvenis, iniciam a migração para o mar aberto (FAO,2018).

A maturação destes organismos inicia-se após atingirem um peso médio de 20 g nos machos e 28 g nas fêmeas, o que acontece normalmente entre os 6 e 7 meses de idade. A desova é feita quando as fêmeas atingem pesos entre os 30 e 45 g, aqui libertam entre 100000 e 250000 ovos com aproximadamente 0,22 mm de diâmetro. A incubação ocorre 16 horas após a desova e fertilização (FAO, 2018). Estes organismos passam por três estádios larvares e um de pós-larva, com várias subfases e mudas. A primeira fase larvar, náuplio, nada de forma intermitentemente e alimentam-se apenas do seu saco vitelino (Zhang et al., 2019). Quando atingem um comprimento de 500 µm os náuplios transformam-se num protozoa, onde começam a procura de alimento; aos dois milímetros entram no estágio mysis, aqui as larvas continuam planctónicas alimentando-se de fito e zooplâncton; e por último, num estágio larvar mais avançado, transformam-se numa pós-larva precoce (Dugassa & Gaetan, 2018; FAO, 2020). Cinco dias depois da sua metamorfose para pós-larvas inicia-se a formação dos seus órgãos sexuais, diferenciando-se as gónadas. Posteriormente ocorre o desenvolvimento de pós larvas a juvenis, fase em que iniciam a migração para o mar (Alves & Nishida, 2002; Zhang et al., 2006).

Quanto à sua estratégia nutritiva, esta espécie classifica-se como bentónica, carnívora ou omnívora. Na sua fase juvenil encontram-se quantidades elevadas de lama e detritos bentónicos no estômago. Com o aumento do seu tamanho começam a fazer uma dieta rica em pequenos animais aquáticos como vermes, bivalves e crustáceos (Studer, 2018). No início e fim da muda, estes organismos suspendem a ingestão de alimento parcial ou completamente. O sistema digestivo dos crustáceos apresenta várias funções como de ingestão, transporte dos nutrientes, mecânica da ingestão, hidrólise, absorção e armazenagem dos nutrientes e transporte das fezes. Internamente, os órgãos deste sistema são: a boca, o estômago, o hepatopâncreas, intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Alves & Nishida, 2002; Studer, 2018). O hepatopâncreas, análogo ao fígado dos vertebrados, combina várias funções tanto do fígado como do pâncreas e intestino dos vertebrados, e desempenha papéis importantes em vários processos metabólicos em crustáceos. Estudos concluíram que este órgão digestivo possui várias funções, incluindo absorção, digestão, armazenamento e secreção (Wu et al., 2008). Apesar de o hepatopâncreas ser responsável pela maior parte das atividades de desintoxicação em crustáceos quando estes se encontram expostos a tóxicos e poluentes, este mesmo órgão pode ter as suas funções e estrutura afetadas por certos xenobióticos, como pesticidas e aflatoxinas. Estes materiais têm demonstrado ter toxicidade hepatopacreatica, que resulta em alterações

histológicas neste mesmo órgão nos organismos estudados (Wu e Chen, 2004; Wu, et al., 2008). O intestino do camarão é um importante órgão no que diz respeito à absorção de nutrientes e imunidade. A barreira intestinal serve como barreira de primeira fila na defesa de doenças nos camarões, o que é associado com a sua integridade estrutural, proteínas imunológicas e microbiota estável (Zeng et al., 2017). Uma comunidade destas saudável pode produzir metabólitos benéficos e proteger o organismo de colonização por parte de micróbios patogênicos. Já uma microbiota instável pode levar a produção de metabólitos prejudiciais, levando a alteração da imunidade e aumento da suscetibilidade a doenças. Se a integridade estrutural do intestino for destruída, pelos mais variados stresses, o agente patogênico oportunista pode invadir e perturbar a imunidade do hospedeiro (Duan et al., 2019). Apesar da função de barreira do intestino afetar a saúde geral do camarão, os habitats do camarão são um ambiente aquático rico em patógenos. Assim sendo, o intestino pode ser afetado pelo ambiente aquático. Vários estudos mostraram que as bactérias intestinais influenciam vários aspectos da saúde animal (Duan et al., 2018). Por tudo isto informação sobre este órgão e todas as suas respostas imunológicas após o stress ambiental seria importante para melhor entendimento da função da barreira intestinal. Em outros animais, as funções microbianas foram bem estudadas, como a carpa capim, *Ctenopharyngodon idella*, e o linguado senegalês, *Solea senegalensis*. No entanto, a função da microbiota do intestino do camarão ainda não foi amplamente explorada (Duan et al., 2018; Shen et al., 2022).

A recente história da aquicultura em relação ao *P. vannamei* começou na década de 70, quando espécies capturadas na natureza na costa do Panamá foram reproduzidas com sucesso por cientistas francesas no Taiti e o ciclo de vida da espécie foi encerrado pela primeira vez. Algumas pesquisas alcançaram avanços numa possível promoção da maturação por meio da ablação do pedúnculo ocular unilateral nas fêmeas, o que induz um efeito hormonal que afeta todos os aspectos da fisiologia do camarão e, eventualmente, leva à desova. Além disso, a nutrição aprimorada e especializada dos organismos tem vindo a melhorar as posturas em quantidade e qualidade (Kannan et al., 2015; Sommer, 2019).

A produção aquícola de *P. vannamei* baseia-se fundamentalmente no crescimento de larvas obtidas a partir de organismos originalmente capturados na natureza ou, como hoje é a norma, domesticados e geneticamente melhorados ao longo de várias gerações numa instalação especializada. Os animais utilizados como reprodutores são criados, individualmente ou em grupos, nos chamados tanques de maturação, com ótimas condições de manipulação compostas por água do mar filtrada, alimentação especializada de reprodutores, fotoperíodo e temperatura

ideais e sob cuidados contínuos por pessoal treinado (Dugassa & Gaetan, 2018). A cultura de *P. vannamei* tem cada vez mais produtores, isto devido a várias vantagens competitivas inerentes a esta espécie, tais como: uma elevada taxa de crescimento, necessidades proteicas relativamente baixas, uma grande tolerância a altas densidades populacionais, possibilidade de reprodução e/ou domesticação com menos probabilidades de aparecimento de doenças, ao contrário de outras espécies, e por fim uma extrema capacidade de aclimação, em que a temperatura pode variar entre os 20 °C e os 32 °C e a salinidade entre os 7 e os 34 (González et al., 2010; Kannan et al., 2015; FAO, 2018).

Os impactos ambientais da aquacultura de camarão estão relacionadas com quatro fatores: o local onde os tanques são construídos, o tipo de gestão e tecnologia aplicada durante a produção, o tamanho/escala da produção de aquacultura e as características e capacidade de recepção de água onde os efluentes da aquacultura são descarregados (Paéz-Osuna, 2001). No caso dos camarões, estes efluentes encontram-se ricos em sólidos suspensos e nutrientes, e a sua descarga ambiental pode causar deterioração na água e mudanças na estrutura de comunidades bentónicas (Martínez-Córdova et al., 2011; Soheli & Ullah, 2012; Maia et al., 2022).

Devido ao elevado consumo desta espécie a nível mundial, é expectável que a aquacultura de camarão continue a crescer, seguindo assim todas as tendências alimentares mundiais (FAO, 2016). Deste modo, é necessário encontrar formas de mitigar as possíveis consequências devido à possível contaminação existente no meio aquático onde crescem estes organismos. Uma opção poderá ser a partir da alimentação, integrando produtos capazes de mitigar as consequências dos mais variados contaminantes durante a produção de *P. vannamei* (Almeida et al., 2012).

1.1.2. Utilização de algas calcárias como suplemento alimentar em aquacultura

As algas calcárias apresentam diversas aplicações comerciais. O calcário retirado pela extração é denominado como calcário biogénico ou biodetrítico marinho e pode ser usado em variadas situações que incluem a agricultura, tratamento de água, indústria de cosmética, implantes para cirurgia óssea, nutrição animal, fertilizantes e calcário para tratamento do solo. A utilização destas algas na alimentação animal como suplemento mineral vem sendo utilizada há mais de 200 anos nos países europeus como a França, Irlanda e Inglaterra (Almeida et al., 2012; Uchrós et al., 2012). A alga calcária é extraída do seu meio por processos manuais e mecânicos, a matéria-prima no seu estado natural é lavada, desidratada e moída. O produto pode ser utilizado no seu estado natural, após passarem por processo de lavagem, desidratação e moagem (Goetz, 2008). Este

produto apresenta várias características que potencializam a sua atuação como a sua maior biodisponibilidade dos micronutrientes que se encontram absorvidos nas paredes celulares, sendo por isso facilmente assimiláveis pelas plantas e animais, para além disto apresenta elevada porosidade que propicia maior superfície específica de atuação (Assoumani, 1997).

Existem atualmente 34 géneros descritos no grupo das algas calcárias, onde se englobam 300 a 500 espécies, com classificação dificultada devido á grande similaridade filogenética entre elas. A *Lithothamnion calcareum* é uma alga vermelha pertencente ao grupo das rodofíceas, da família Corallinacea. Tem como principal característica a presença de precipitados de carbonato de cálcio e magnésio nas suas paredes celulares (Melo & Moura, 2009; Almeida et al., 2012). Esta espécie é utilizada em compostos há mais de 200 anos na agricultura como fertilizante e como complemento à nutrição animal, possuindo grande potencial de expansão em diversas áreas, como a aquacultura.

O calcário produzido pela extração de *L. calcareum* é utilizado para recuperação do solo e fertilização na agricultura e pode ser uma alternativa no controle do pH em viveiros de aquacultura (Goetz, 2008). Melo et al. (2008) realizaram uma comparação entre o cálcio obtido a partir desta alga e outras fontes de cálcio (farinha de casca de ovo e farinha de casca de ostra) utilizadas na alimentação animal e afirmaram que esta alga embora tenha níveis inferiores de cálcio apresentou maior solubilidade.

Esta espécie apresenta também elevado potencial de absorção de iões metálicos (Veneu et al., 2019). Realizaram-se estudos que reportaram a capacidade desta alga absorver níquel, assim como o cadmio (Veneu et al., 2018; Veneu et al., 2019). No entanto, existem poucos estudos de remoção de metal por absorção desta alga.

1.2. Aquacultura em Portugal

Portugal assume-se ao longo de mais de 500 anos como uma potência no que diz respeito à exploração marítima, recuando ao tempo dos descobrimentos. É considerado um país com uma elevada ligação ao oceano e onde as pescas têm uma grande importância social, apesar de não contribuírem muito para a economia do país (Salvador & Ferreira, 2018).

Para além do enorme legado nas tradições e faina marítima, Portugal encontra a maior parte do seu território no mar. Com uma linha costeira de 1187 km, Portugal possui a 11ª maior zona económica exclusiva do mundo e a 4ª maior na União Europeia (incluindo Mar Territorial, Zona Económica Exclusiva e águas internas). Esta zona apresenta um elevado potencial para o desenvolvimento das pescas e aquacultura e corresponde a 19 vezes o seu território – 1,7 milhões

de km² (Salvador & Ferreira, 2018; Mosqueira et al., 2021). Assim é perspetivado que este venha a ser o futuro da economia portuguesa, contudo, a ligação de Portugal ao mar não fica só pela atividade marítima. Portugal é o terceiro maior consumidor de peixe a nível mundial e o primeiro no ranking europeu, mas nem com uma interessante frota de embarcações de pesca, Portugal consegue fazer frente a esta procura de pescado, pelo que a balança comercial aponta para 2/3 de todo o pescado consumido em Portugal provir de importações de outros países (FAO, 2018; Mosqueira et al., 2021).

A produção portuguesa de aquacultura em águas marinhas e salobras começou nas áreas costeiras do interior, estuários e lagoas costeiras, em sistemas extensivos. Nos anos 70, a tainha com um baixo valor comercial era a espécie mais cultivada, com 80 % da produção nacional, a produção era feita em regime extensivo e sem reprodução controlada. Nos anos 80, empresas de aquacultura de águas interiores e salobras aumentaram, sendo a truta e os bivalves os organismos mais cultivados. Já na década de 90, a aquacultura marinha melhorou e alguns sistemas extensivos evoluíram para semi-intensivo ou mesmo intensivos, com a introdução de espécies como o robalo, a dourada e mais recentemente o pregado e o linguado (DGRM, 2014).

Em 2019, existiam 1265 estabelecimentos licenciados em aquacultura para águas doces, salgadas e salobras (menos 250 do que os 1.515 estabelecimentos licenciados em 2018). A divisão manteve-se semelhante à dos anos anteriores, com cerca de 86,6 % de viveiros para produção de moluscos bivalves, os tanques para a produção de peixe correspondiam a 10 % e as estruturas flutuantes (maioritariamente destinadas à produção de moluscos bivalves) a 2,7 % do total dos estabelecimentos licenciados como mostra a Figura 2 (Ambiente, 2022). Este setor atingiu 13,9 mil toneladas de produção em Portugal no ano de 2018, com um valor estimado de 96,8 milhões de euros, o que corresponde a um aumento de 11,5 % em relação ao ano de 2017 e a produção tem tendência a aumentar nos próximos anos. Em relação aos locais de produção em 2018, 95 % correspondem à produção em águas de transição e marinhas, para além disso 27,6 % representam o cultivo de peixes marinhos e dentro destes, 90 % corresponde a dourada e pregado. Apesar disto, o maior sector de produção aquícola em Portugal foram os bivalves, correspondendo a 67,2 % da produção total com o cultivo de amêijoas, mexilhão e ostras (INE, 2020).

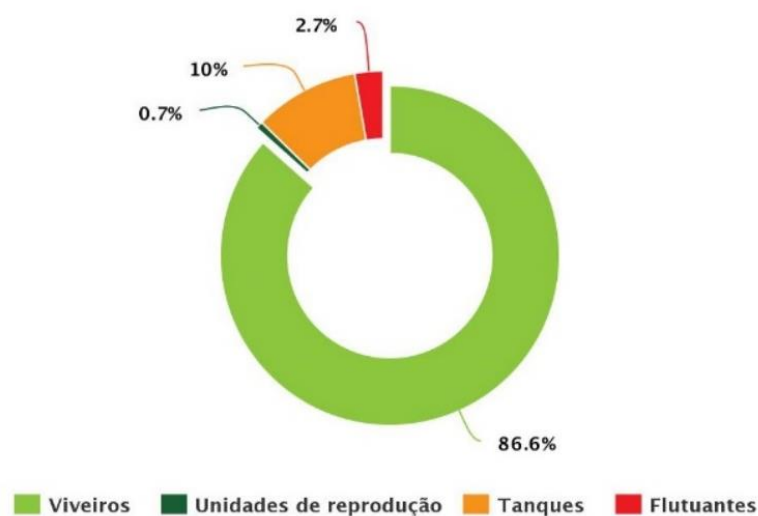


Figura 2. Estabelecimentos de aquacultura licenciados em Portugal no ano de 2019 (Fonte: Ambiente, 2022)

As aquaculturas portuguesas a operar em regime semi-intensivo encontram-se localizadas em antigas salinas no norte e sul do país, nomeadamente a Ria de Aveiro, estuário do Mondego, lagoa de Albufeira e a Ria Formosa, enquanto as aquaculturas de água doce estão dispersas pelas regiões norte e centro (INE, 2020). Na costa alentejana este setor é sustentado pela produção de robalos, douradas, amêijoas e ostras, neste local a aquacultura contribuiu com 261 toneladas para a produção total nacional em 2018. Na região centro, existem diversas lagoas e enseadas naturais, mas também um enorme desenvolvimento de infraestruturas em terra em regime intensivo (Mira e Tocha), o que contribui bastante para a produção nacional de peixes, mais especificamente o pregado e linguado. Por fim, na zona norte, existem diversas aquaculturas de pregados, uma maternidade de linguado e uma engorda do mesmo, para além disso esta região representou 96 % da produção nacional de trutas (Silva & Irineu, 2008; Gentry et al., 2017; Gonçalves, 2019).

Em Portugal, o pregado, *Scophthalmus maximus* (29,4 %) e a amêijoia, *Ruditapes decussatus* (26,9 %) foram as principais espécies produzidas em 2019, seguindo-se a dourada, *Sparus aurata* (13,5 %), as ostras portuguesas, *Crassostrea angulata* (13,2 %), o robalo, *Dicentrarchus labrax* (7,2%) e o mexilhão, *Mytilus edulis* (5,5 %). Com menor quantidade, aparecem o berbigão, *Cerastoderma edule* (2,0%) e o linguado, *Solea senegalensis* (1,9 %). A produção de moluscos bivalves representou 59,4% da produção aquícola total e aumentou cerca de 15,6 % em 2019. As amêijoas mantêm-se a espécie mais relevante (3279 toneladas), seguida das ostras (1608 toneladas) e dos mexilhões (672 toneladas) (Ambiente, 2022).

No entanto, nos últimos anos, devido à saturação de mercado por excesso de concorrência, como já referido, em relação à elevada produção de espécies como o robalo e a dourada

constatou-se uma diminuição nas margens de lucro para os produtores o que tem colaborado para a introdução e diversificação de novas espécies (Saavedra et al., 2017).

Segundo a FAO, (2020), Portugal ainda se encontra bastante atrás na lista de países produtores de organismos aquáticos em aquacultura estando inserido na categoria de “outros”, tanto a nível europeu como mundial. Esta posição tem consequências negativas quer ecológica quer economicamente, e está ligada a vários fatores. Existem várias razões pelas quais a aquacultura em Portugal é baixa, um dos motivos é porque algumas das instalações aquícolas estão localizadas em reservas naturais protegidas pela legislação portuguesa, para além disso, há ainda dificuldade em obter licenciamento para estabelecimentos e para o acesso à água (FAO, 2018; Parimi e Sreeram, 2018). No entanto, a qualidade é um dos atributos de valor que o setor apresenta face a outros, por isso cada vez existem mais produções e maior diversificação na sua oferta (Truninger et al., 2020).

1.3. Aquacultura e contaminação de ambientes aquáticos

Poluição ambiental é um problema de elevada preocupação e tem ganho ainda mais atenção nos últimos tempos, pois não é apenas a qualidade da água que está em causa, mas também a permanência saudável de todo o ecossistema. Os poluentes existentes na água podem ter as mais variadas características tendo em conta a sua proveniência. Alguns desses são de origem natural, mas grande parte são de origem antrópica (Lotze et al., 2006; Jung et al., 2014).

De entre os vários poluentes preocupantes que afetam os sistemas aquáticos, os metais ganharam notoriedade pela sua persistência no ecossistema e toxicidade (Bonilla-Petriciolet et al., 2017). O impacto dos metais nos vários ecossistemas tem sido avaliado através dos seus níveis no ar, na água e no solo e determinando os efeitos produzidos nos organismos. Para isto têm sido realizados vários ensaios laboratoriais para avaliação de doses específicas de diferentes metais nos vários ambientes. Estes trabalhos, tal como algumas determinações *in situ*, permitiram concluir os efeitos observados nos organismos não se devem apenas à presença do metal, mas também a vários fatores intrínsecos (idade, sexo, tamanho) e extrínsecos (a matéria orgânica dissolvida, o pH, a dureza da água, a temperatura e salinidade) que alteram a sua biodisponibilidade e toxicidade (Luoma & Rainbow, 2005; Bagnyukova et al., 2007). Devido a todos estes pontos, os métodos para medir e avaliar os efeitos dos metais no ambiente são bastante complexos, não só pela variável sensibilidade dos organismos, como também pela necessidade de ferramentas sensíveis, necessárias à deteção dos seus limites (Bagnyukova et al., 2007; Kazlauskienė & Vosyliene, 2008).

Metais como o cádmio e o chumbo representam uma ameaça ambiental visto que são altamente tóxicos mesmo em quantidades pequenas (Song et al., 2014). A contaminação contínua por metais e a falta de remediação leva à sua persistência e bioacumulação em cadeias tróficas, aumentando o risco para a saúde humana. O ambiente e a saúde de organismos são afetados, desde plantas a animais (Heinrichs et al., 2020). Como já referido, apesar do facto de que os metais ocorrem naturalmente no ambiente, eles também são descarregados pelos processos antropogénicos. Vários elementos ocorrem em quantidades residuais em organismos vivos e alguns deles são essenciais para a sua sobrevivência. Por outro lado, alguns são elementos não-essenciais que não são necessárias para qualquer atividade biológica e podem levar alterações nos organismos (Song et al., 2014; Y. Wang et al., 2017; Heinrichs et al., 2020).

A transferência de elevadas quantidades de metais para ecossistemas aquáticos pode provocar uma série de efeitos toxicológicos em vários elementos da cadeia alimentar, tais como: crescimento desordenado, diminuição nas taxas de reprodução, mortalidade, entre outras. Ou seja, a absorção e o armazenamento de elevadas concentrações de metais pesados em alguns tecidos e órgãos, que não são eliminados, permanecem acumulados no organismo dos seres vivos afetados (Vasseur & Cossu-Leguille, 2006).

1.3.1. O Cádmio como contaminante

O cádmio pertence ao grupo 2 da tabela periódica é um metal não essencial, possui um estado de oxidação +2, é quimicamente semelhante ao zinco, macio, flexível, inodoro, estável e muito resistente à corrosão. É um metal não essencial tóxico, que raramente ocorre na natureza na sua forma pura, no entanto pode encontrar-se numa forma metálica ou em pó e usualmente sob a forma de ião metálico bivalente. Devido à sua toxicidade, este metal é considerado uma ameaça, tanto para as comunidades bacterianas presentes nos solos, como também para outros organismos, isto porque a transferência de iões metálicos ao longo da cadeia trófica é uma realidade e um problema de saúde pública (Nair et al., 2013).

Ao contrário de outros metais que são considerados indispensáveis em pequenas quantidades, o cádmio não tem qualquer função fisiológica conhecida e para além disso não existem evidências de o cádmio ser benigno para os organismos. No entanto, em concentrações suficientes, este metal é tóxico nas suas várias formas desde os microrganismos até os mais elevado níveis tróficos (Adamis et al., 2004).

Alguns dos efeitos tóxicos atribuídos ao cádmio estão relacionados com a sua capacidade para induzir stresse oxidativo, isto porque a sua presença no meio intracelular contribui para o

acréscimo da concentração celular de ERO (espécies de oxigénio reativas) e consequentemente altera mecanismos intracelulares (Pourahmad & O'Brien, 2000). Portanto, os efeitos nas células podem incluir peroxidação lipídica, danos na molécula de ADN, oxidação de grupos sulfídricos, adução oxidativa de aminoácidos resíduos próximos a locais de ligação de metais, entre outros (Cabiscol et al., 2000). Alguns autores afirmam ainda que este metal pode substituir os iões de zinco e de ferro presentes em metaloenzimas, inativando-as e ainda provocando um aumento de iões de ferro livres, o que *per si* aumenta o estado de stresse oxidativo celular (Adamis et al., 2004; Jha et al., 2016). Tal como outros compostos, a acumulação de cádmio está interligada, como referido, à sobreprodução de ERO assim como peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e radicais hidroxilo (•OH). As ERO podem causar múltiplos danos em diversas estruturas da célula, como proteínas, lípidos e ADN (Gobe & Crane, 2010). A célula possui várias enzimas que catalisam reação para controlar a presença de ERO, como a catalase que converte H₂O₂ em água e oxigénio (Patra et al., 2011). O cádmio liga-se ao complexo III do eletrão mitocondrial de transporte o que causa o aumento de ERO referido, e interrompendo o equilíbrio entre as enzimas antioxidantes e a quantidade de ERO (Wang et al., 2004). Apesar disto, Liu et al. (2001), concluíram que cada organismo apresenta diferentes suscetibilidades á toxicidade do cádmio devido aos diferentes perfis genéticos e não a diferentes níveis de metalotioninas nos tecidos.

Relativamente à exposição a este metal, esta ocorre geralmente através de via oral, inalatória e por contacto dérmico, sendo a absorção por contacto dérmico insignificante (Adamis et al., 2004). A ingestão de alimentos e água contaminada constituem a principal fonte de exposição por via oral, nos géneros alimentícios provenientes de animais, o cádmio encontra-se em maiores concentrações nas vísceras tais como o fígado e rins e em espécies de moluscos e crustáceos. Ambos cultivados em aquacultura, por isto é necessário e importante estudar o comportamento dos mesmos quando expostos a este contaminante, para que esta exposição seja detetada numa fase inicial e minimizar as suas consequências. De facto, este metal tem estado bastante envolvido como a causa de numerosas mortes humanas, e vários efeitos nocivos em peixes e outros organismos marinhos (Adamis et al., 2004; Rubio et al., 2006).

Os estudos feitos até ao momento em relação aos teores de cádmio na água têm revelado resultados muito díspares (de 5 a 4000 ng/L). Quando se trata de água de abastecimento o valor é menor que 1 ng/L mas depende muito do local (Fernandes et al., 2006).

As concentrações de cádmio nas costas europeias podem atingir valores até 250 ng/L (Nordic Council of Ministers, 2003), enquanto ambientes costeiros e estuarinos contaminados podem

apresentar concentração mais elevadas (Comissão das Comunidades Europeias, 2005; Vicente-Martorell et al., 2009).

1.4. Biomarcadores para avaliação de stresse subletal em camarões

Os biomarcadores são definidos como alterações biológicas (molecular, celular, fisiológica ou comportamental) que expressam os efeitos tóxicos causados por contaminantes nos organismos expostos (Cajaraville et al., 2000a). Aqueles que respondem à exposição de substâncias xenobióticas, constituem um sistema de alerta precoce de um stresse químico nos organismos (Bebiano et al., 2004). Estes podem ser utilizados após uma exposição a poluentes, isto porque podem esclarecer as relações de causa-efeito e dose-efeito de forma a avaliar o risco para a saúde e também para fins de monitorização (Van der Oost et al., 2003a). Vários biomarcadores podem ser utilizados em estudos ecotoxicológicos, todos eles baseados em processos envolvidos na eliminação dos contaminantes do interior da célula. Durante o processo é possível avaliar os efeitos causados pelos contaminantes, através da medida da atividade e da expressão de enzimas envolvidas ou de subprodutos das reações de biotransformação, conjugação, oxidação lipídica e ativação de defesas antioxidantes (Abessa, 2006).

O estudo de biomarcadores tem sido considerado por vários autores uma forma de avaliar como a integração de fatores bióticos: ciclo reprodutor, crescimento, idade, sexo e fatores abióticos: temperatura, salinidade, pH, dieta, oxigénio dissolvido influenciam os organismos e a sua capacidade de resposta (Chouba & Mzoughi, 2013; Chalghmi et al., 2016; McCarthy & Shugart, 2019).

O uso de biomarcadores para a avaliação de alterações nos crustáceos tem sido evidenciado por se tratar de organismos bentónicos e de baixa dispersão, o que são características importantes para determinação da qualidade ambiental do ecossistema aquático (Cremona et al., 2008). A compreensão dos mecanismos relacionados aos efeitos subletais causados por substâncias químicas sobre o metabolismo do camarão ajudaria desenvolver ferramentas de diagnóstico sensíveis e precisas com capacidade preditiva na avaliação dos efeitos tóxicos, contribuindo assim para uma melhor gestão dos ambientes de produção (Tu et al., 2012).

Como exemplo do uso de biomarcadores em camarão exposto a químicos e contaminantes existem já vários estudos como: Tu et al. (2012) que utilizou a Acetilcolinesterase (AChE) e biomarcadores de stress oxidativo para investigar efeitos combinados de temperatura, salinidade

e deltametrina; outro exemplo foi Sturve et al. (2021) que avaliou os efeitos negativos causados por pesticidas e metais utilizando os biomarcadores: AChE e glutathione S-transferases (GSTs) entre outros.

Vários organismos quando expostos a condições de stresse, como a exposição ao cádmio, normalmente aumentam a produção de ERO De forma a evitar danos celulares estes ativam as suas defesas antioxidantes, incluindo a atividade das enzimas antioxidantes como por exemplo a glutathione peroxidase (GPx) (Regoli & Giuliani, 2014). Para além desta ativação estes organismos também utilizam as suas enzimas de biotransformação, GSTs como forma de defesa (Townsend & Tew, 2003; Sturve et al., 2008). Em relação á peroxidação lipídica (LPO) tem sido usada como biomarcador de dano celular, isto porque quando os mecanismos de defesa referidos anteriormente são insuficientes para proteger as células os lípidos presentes nas membranas celulares são atacados pelas ROS, promovendo um processo de oxidação autocatalítica (Moreira et al., 2016).

A atividade da AChE é usada como biomarcador de exposição a compostos neurotóxicos em vários organismos aquáticos. Esta enzima é importante para o funcionamento do sistema neuromuscular e é responsável pela transmissão neural de acetilcolina para colina em sinapses colinérgicas e junções neuromusculares (Matozzo et al., 2005).

O parâmetro sistema de transporte de eletrões (ETS) foi um dos escolhidos pois a avaliação da atividade do mesmo tem sido usada para obter uma indicação do estado metabólico dos organismos isto é, quando estes são expostos a condições de elevado stress, eles podem aumentar o metabolismo, neste caso ETS, nas mitocôndrias, para a manutenção da homeostasia, sobrevivência e reprodução, ou podem diminuir ou manter a atividade do ETS ativando adaptações comportamentais como válvulas de encerramento (Gagné et al., 2006).

Tendo isto em consideração a utilização de biomarcadores para avaliar efeitos da exposição a um contaminante por camarões é relevante e importante a nível científico pois pode fornecer informação do estado do ambiente que o rodeia, mas também ao nível da aquacultura pois são organismos com relevância comercial.

2. Objetivos

Este trabalho teve como principais objetivos: i) identificar os principais biomarcadores e órgãos/tecidos que podem ser usados para identificar situações de stresse subletal em camarões, com particular ênfase no sistema digestivo, tendo como principal foco o intestino; ii) avaliar o efeito da introdução de uma alga calcária (*Lithothamnium calcareum*) na dieta, como forma de mitigação das possíveis consequências causadas pelos contaminantes, designadamente cádmio. Para isto, foram realizados dois ensaios com a espécie *Penaeus vannamei*: o primeiro ensaio teve a duração de 96 h, e os organismos foram expostos a Cádmio em concentrações ambientalmente relevantes através da alimentação; para isso foram testadas quatro dietas: 1) controlo (dieta tipo comercial), 2) controlo+cádmio (500 mg/kg), 3) controlo+*L.calcareum* , 4) controlo+ *L.calcareum* + Cádmio (500 mg/kg); o segundo ensaio durou 7 dias e os organismos que restaram do ensaio anterior foram alimentados apenas com a dieta 1 (controlo) e a dieta 3 (controlo+*L.calcareum*). Para a análise bioquímica foram recolhidos hepatopâncreas, intestino, hemolinfa e músculo, e os biomarcadores analisados foram a peroxidação lipídica (LPO), a glutatona S-transferases (GSTs), a acetilcolinesterase (AChE), a glutatona peroxidase (GPx) e o sistema de transporte de eletrões (ETS).

3. Materiais e métodos

Este trabalho realizou-se maioritariamente na empresa Riasearch, localizada na Murtosa, o Anexo 8.1 apresenta uma pequena descrição da empresa e das suas instalações bem como uma pequena explicação do tipo de projetos realizados na mesma.

3.1. Desenho Experimental

Os ensaios realizaram-se num sistema de doze tanques, com 200L de capacidade, em circuito fechado. O sistema de filtração, instalado num tanque de 400L de volume, era composto por dois filtros mecânicos de 25 μm (TMC), dois escumadores (Red Sea Reefer Skimmer), um filtro biológico, um esterilizador UV (110 W) (Biosystem), um refrigerador (Frimar 2000) e duas resistências de aquecimento com termostato (Eheim thermocontrol), para controlo da temperatura. Utilizou-se um caudal de recirculação constante e cada tanque foi aerificado individualmente com pedras difusoras, de forma a manter os níveis ótimos de oxigénio, tudo isto se encontra visível na Figura 3.

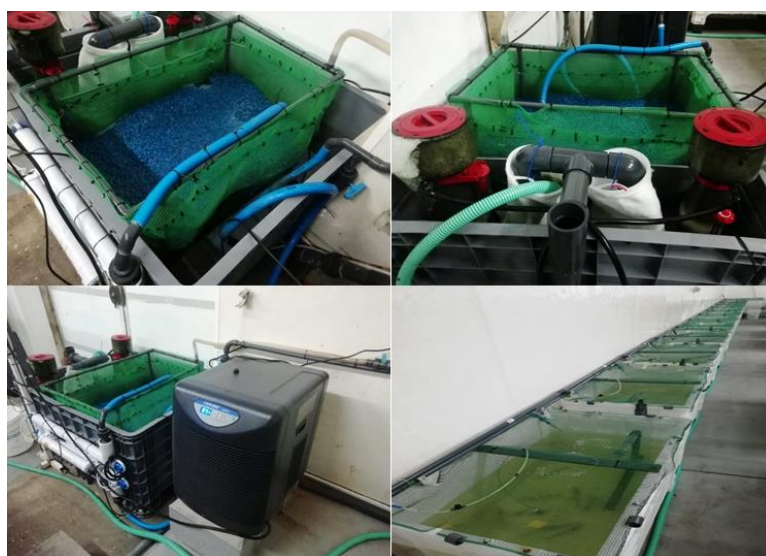


Figura 3. Fotografias do sistema utilizado para o ensaio experimental

Durante os ensaios realizaram-se rotinas diárias, que incluíam a observação dos animais para deteção de eventuais alterações de comportamento ou fisiologia, medições dos parâmetros físico-químicos da água (oxigénio dissolvido, salinidade, temperatura e o pH) com uma sonda multi-paramétrica portátil (HANNA instruments, Portugal). Após o registo dos parâmetros, procedia-se à renovação parcial da água do sistema, 5 a 10 % do volume total. Durante a

renovação procedia-se à substituição dos filtros mecânicos de todos os sistemas e à limpeza de todos os tanques retirando-se o excesso de alimento bem como os restantes resíduos sólidos.

Antes de iniciar os ensaios realizou-se uma amostragem inicial onde se pesou todos os organismos disponíveis, com uma balança digital (avantor, VWR) de capacidade máxima de 3,000 ± 0,001 kg, e dividiu-se os mesmos pelos vários tanques de forma a ter uma média de pesos semelhante em todos eles.

3.1.1 Ensaio de exposição

O ensaio decorreu num sistema com 12 tanques experimentais com 200 L de capacidade. Utilizaram-se 11 camarões por tanque, com um peso médio de (28,190 ± 2,320 g). As condições iniciais da água eram: temperatura 26,64 °C, salinidade 26,13, pH 7,39, e oxigénio dissolvido 5,52 mg/L. Testaram-se 4 dietas em triplicado distribuídas aleatoriamente: uma dieta com uma formulação comercial, que denominamos controlo (CTR), esta dieta com a junção de 500 mg/kg de cádmio (CTR+Cd), uma dieta com inclusão da alga *Lithothamnium calcareum* (LC) e por último a dieta referida anteriormente também com 500 mg/kg de cádmio (LC+Cd). A Figura 4 apresenta a distribuição das dietas pelos 12 tanques.



Figura 4. Esquema dos tanques no ensaio de exposição

Este ensaio decorreu durante 96 h, alimentou-se os organismos três vezes ao dia (9 h, 12 h, 15 h), e avaliou-se o desperdício alimentar, isto é, ração não ingerida pelos organismos e quantidade de fezes existentes, pois estes organismos podem ingerir as suas fezes. Esta avaliação fez-se a partir de uma matriz de avaliação representada na Tabela 1. Esta quantifica de -2 a 1 o desperdício alimentar e os restantes resíduos sendo o -2 com muito desperdício e 1 sem qualquer desperdício. De acordo com o valor escolhido a dose de ração diária era aumentada ou diminuída. Esta avaliação fez-se uma hora depois de cada refeição. No final de 3 refeições calculava-se a média, estimando-se assim o valor da dose para o dia seguinte.

Tabela 1. Matriz de avaliação do desperdício alimentar

Valor médio	Resultado
-2	Descer 20 %
-1	Descer 10 %
0	Manter
1	Subir 10 %

Após as 96 h de exposição ao cádmio fez-se uma amostragem intermédia. Neste ponto de amostragem recolheram-se 2 organismos por tanque com a ajuda de um camaroeiro e de cada um destes recolheu-se: hemolinfa (com uma seringa de 1 mL contendo 20 µL de solução tamponada de citrato de Sódio, utilizada com anticoagulante), o hepatopâncreas, o intestino e uma porção de músculo (amostrados com tesoura, pinça e bisturi). No caso do intestino, caso se detetasse a presença de fezes, este era limpo por raspagem, com um bisturi. As amostras foram recolhidas para microtubos de 1,5 mL, sofreram um tratamento térmico com azoto líquido e foram posteriormente armazenados a -80 °C para posterior análise.

3.1.2. Ensaio de recuperação

Terminado o ensaio de exposição fez-se um ensaio de recuperação: primeiramente redistribuiu-se os organismos de forma a ter o mesmo número de animais em cada tanque. Começando assim este segundo ensaio com 5 organismos por tanque e com 2 dietas, CTR e LC, distribuídas pelos doze tanques como mostra a Figura 5, retirando apenas o cádmio da sua alimentação.

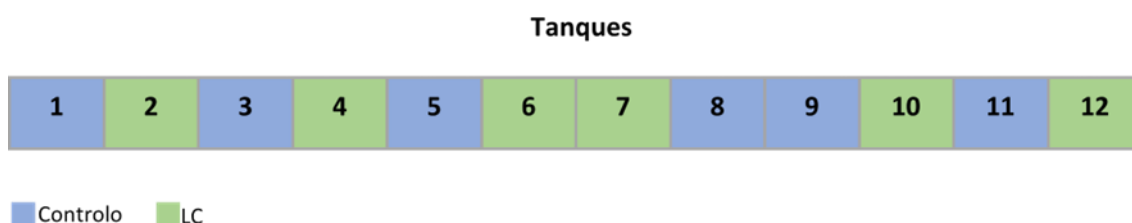


Figura 5. Esquema dos tanques no ensaio de recuperação

Este segundo ensaio teve a duração de 7 dias, e todas as condições do meio se mantiveram iguais ao ensaio de exposição inclusive o horário de alimentação bem como a matriz seguida. Após os sete dias realizou-se uma amostragem final, representada na Figura 6 seguindo o mesmo protocolo da amostragem usado no ensaio de exposição.

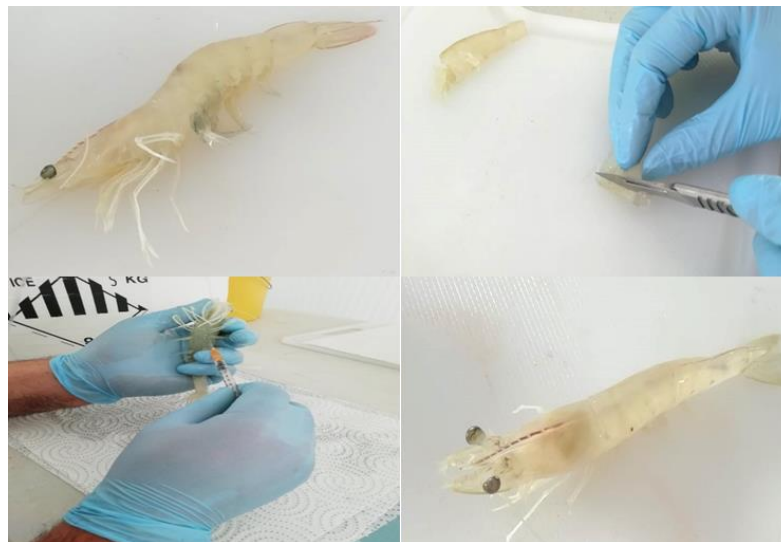


Figura 6. Fotografias da amostragem final

3.2. Respostas biológicas

Com o objetivo de analisar as alterações bioquímicas induzidas nos camarões após ambos os ensaios, avaliou-se variados biomarcadores. Biomarcadores relacionados com a capacidade metabólica (atividade do sistema de transporte de elétrons (STE)), o stresse e dano oxidativo, (atividade de enzimas antioxidantes, glutathione peroxidase (GPx), e de biotransformação: glutathione S-transferases (GSTs) e níveis de peroxidação lipídica (LPO)) e neurotoxicidade (atividade da enzima acetylcholinesterase (AChE)).

3.2.1. Pesagem e extração

Antes de iniciar a extração foi feita uma pesagem com uma balança analítica, de cada amostra já homogeneizada bem como a sua divisão em diferentes microtubos para a avaliação dos vários biomarcadores. Para o músculo, hepatopâncreas e hemolinfa foi feita uma divisão de 0,2 g num microtubo e 0,1 g num segundo microtubo, já o intestino pela sua pequena dimensão foi apenas pesado e colocou-se toda a amostra num só tubo novamente, ficando com uma média de 0,1 g por microtubo. A pouca quantidade de amostra deste órgão apenas possibilitou a análise de três biomarcadores (LPO, GSTs e a AChE) enquanto nos restantes órgãos foi também possível realizar o STE e a GPx. Após esta divisão as amostras foram novamente para o frio a -80 °C até análise.

Para cada biomarcador a extração efetuou-se utilizando soluções tampão específicos com uma proporção de 1:2 (p/v) para todos os órgãos exceto para o hepatopâncreas em que esta foi de 1:4 (p/v). Para a determinação da atividade das enzimas GPx, GSTs e AChE os sobrenadantes foram extraídos com tampão de fosfato de potássio (50 nmol/L dehidrogenofosfato de potássio; 50 mmol/L fosfato de potássio dibásico; 1 mmol/L (EDTA (sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético dihidratado)); 1 % (v/v) Triton X-100; 1 % (p/v) polivinilpirrolidona (PVP); 1mmol/L ditiotreitól (DTT); pH 7,0). Em relação ao LPO os sobrenadantes foram extraídos em ácido tricloroacético (TCA) a 20 % (p/v). Para a determinação da atividade do ETS foi usado 0,1 mol/L Tris-HCl tampão (pH 8,5, 15 % (w/v) PVP, 153 µmol/L sulfato de magnésio (MgSO) e 0,2 % (v/v) Triton X-100). Todas as amostras foram sonicadas usando um TissueLyser II (Qiagen) por 90 s, e seguidamente centrifugadas por 20 min a 10000 g (3000 g para o ETS) a 4 °C. Os sobrenadantes foram armazenados a -80 °C ou imediatamente usadas. Todas as medições foram feitas usando um leitor de microplacas (Biotek).

Para garantir a validade destes resultados, a determinação dos parâmetros bioquímicos realizou-se em duplicado.

3.2.2 Parâmetros bioquímicos

Capacidade metabólica

A atividade do sistema de transporte de eletrões (STE) mediu-se baseado no protocolo desenvolvido por King e Packard, (1975) e modificações realizadas por De Coen e Janssen, (1997). A absorbância leu-se a 490 nm durante 10 min com intervalos de 25 s. O sal de tetrazólio, 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil cloreto de tetrazólio (INT) foi utilizado para quantificar a atividade respiratória dos organismos marinhos, este sal é reduzido por enzimas desidrogenases presentes no ETS de organismos aérobios. As enzimas convertem o sal em formazan, a quantidade formada utilizou-se para determinar a atividade do ETS usando $\epsilon=15,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados expressos em nmol/min/g FW.

Capacidade antioxidante

A atividade da enzima GPx quantificou-se seguindo o protocolo desenvolvido por Paglia & Valentine et al, (1967). A absorbância mediu-se a 340 nm em intervalos de 10s durante 5 min. A GPx catalisa a redução do hidroperóxido de cumeno oxidando a glutatona reduzida (GSH) para formar glutatona dissulfeto (GSSG). Esta glutatona oxidada (GSSG) é reduzida pela glutatona redutase (GR) e pelo NADPH formando NADP⁺ e reciclando GSH. Esta reação resulta no decréscimo da absorbância que é diretamente proporcional à atividade da GPx que se determinou

usando um coeficiente de extração $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os resultados exprimiram-se como U/g de FW, onde U representa a quantidade de enzimas que causam a formação de 1 μmol NADPH oxidado por min.

Capacidade de biotransformação

A atividade das enzimas GSTs mediu-se seguindo Habig et al. (1974) com adaptações realizadas por Carregosa et al. (2014). A absorbância mediu-se por espectrofotometria a 340 nm durante 5 min em intervalos de 10 s. As GSTs catalisam a reação da conjugação do substrato 1-Cloro-2,4-dinitrobenzina (CDNB) com o grupo tiol da glutatona reduzida (GSH), formando tioéter. A quantidade de tioéter formado calculou-se usando o coeficiente $\epsilon = 9,6 \text{ Mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$, que pode ser monitorizado pelo aumento da absorbância, a taxa de aumento é diretamente proporcional à atividade de GSTs. A atividade enzimática expressou-se em U/g FW, onde U se definiu como a quantidade de enzimas que causa a formação de 1 μmol de dinitrofenol tioéter por min.

Danos celulares

Os níveis de LPO determinou-se de acordo com o método descrito em Ohkawa et al. (1979) através da quantificação de substâncias reativas de ácido tiobarbiturico (TBARS), que são formadas na reação entre produto final do LPO (o malondialdeído (MDA)) com ácido tiobarbiturico (TBA). A absorbância mediu-se a 532 nm e a quantidade de MDA formada foi calculada usando o coeficiente de extinção $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram dados em MDA nmol/g de FW.

Neurotoxicidade

A atividade da enzima AChE mediu-se usando substratos de iodeto de acetiltiocolina (ATChI, 5 mmol/L), seguindo o método de Ellman et al. (1961) com alterações realizadas por Mennillo et al. (2017). A atividade enzimática registou-se a 412 nm durante 5 min e a atividade específica foi corrigido para a hidrólise espontânea dos substratos (o diânio amarelo do ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, TNB) e expressou-se em nmol por min/g em FW usando $\epsilon = 13,6 \times 10^3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.2.3. Análise estatística

Como referido anteriormente os resultados foram divididos em dois conjuntos de dados experimentais, o ensaio de exposição e o ensaio de recuperação. Todos os resultados bioquímicos (ETs, GPx, GSTs, LPO, AChE) para ambos os ensaios em todas as condições submeteram-se a testes de hipóteses usando análise multivariada permutacional de variáveis com a PERMANOVA+add-on no PRIMER V6 (Anderson et al., 2008). Um desenho hierárquico

unidirecional, com as condições alimentares como principal fator fixo, foi seguido nesta análise. Os valores de pseudo-F nos testes principais da PERMANOVA foram avaliados em termos de significância. Quando o teste principal revelou diferenças estatisticamente significativas, foram realizadas comparações pareadas. Valores inferiores a 0,05 foram considerados significativamente diferentes. As hipóteses testadas foram: i) em cada um dos ensaios as diferentes dietas alimentares originaram respostas bioquímicas semelhantes; ii) cada dieta alimentar originou respostas bioquímicas semelhantes entre ensaios.

A matriz contendo os resultados bioquímicos foi normalizada e a matriz de similaridade de distância euclidiana calculada. Essa matriz de similaridade foi simplificada através do cálculo da matriz de distância entre centroides com base na condição de exposição, que foi então submetida à análise de ordenação, realizada por Coordenadas Principais (PCO). Vetores de correlação de Pearson de respostas biológicas (correlação > 0,75) foram fornecidas como variáveis suplementares sendo sobreposto no topo do gráfico PCO.

Para a análise multivariada, às condições estudadas realizaram-se análises de MDS (Multidimensional scaling), utilizando uma matriz triangular de similaridades de Bray-Curtis, no sentido de representar graficamente o grau de semelhança entre as amostras.

De seguida continuou-se com a estatística multivariada fez-se uma análise de clusters uma técnica estatística multivariada, que permite diferenciar ou classificar condições estudadas em um grupo, em um número específico de subgrupos ou conglomerados mutuamente exclusivos, de modo que os subgrupos formados tenham características de grande similaridade interna (Manly, 2008). Existem duas possíveis técnicas de cluster, o método hierárquico e o não-hierárquico, neste trabalho usou-se o hierárquico que consiste em testar todas as possibilidades de agrupamento, e como solução o pesquisador pode avaliar qual a quantidade de grupos mais pertinentes para sua pesquisa (Tumminello et al., 2010).

4. Resultados

4.1 Ensaio experimental

Ao longo de todo o ensaio registaram-se os dados de parâmetros físico-químicos da água no sistema utilizado (temperatura, pH, salinidade, oxigénio dissolvido), que se encontram descritos na tabela 2.

Tabela 2 Média e desvio-padrão de todos os parâmetros ao longo dos ensaios.

Parâmetro	Média (ensaio 1)	Desvio-padrão (ensaio 1)	Média (ensaio 2)	Desvio-padrão (ensaio 2)
Temperatura	26,81	0,99	28,00	0,51
pH	7,47	0,14	7,72	0,08
Salinidade	26,33	0,28	26,20	0,17
Oxigénio Dissolvido	5,56	0,41	5,90	0,47

4.2 Respostas biológicas

4.2.1 Sobrevivência

Apenas durante o ensaio de exposição se observou a ocorrência de mortalidade (entre 40 a 55 %), sendo que no de recuperação a mortalidade foi nula. A figura seguinte apresenta a percentagem de sobrevivência após 96 h do ensaio de exposição nas diferentes condições alimentares a que os organismos estiveram submetidos. Os organismos alimentados com a dieta controlo (CTR) e a dieta com alga sem contaminante (LC) obtiveram uma sobrevivência de 100 % enquanto os que consumiram a dieta controlo+cádmio (CTR+CD) atingiram os 65 % de sobrevivência e por último os que se alimentaram da alga+cádmio (LC+CD) atingiram uma percentagem de sobrevivência de 45 %.

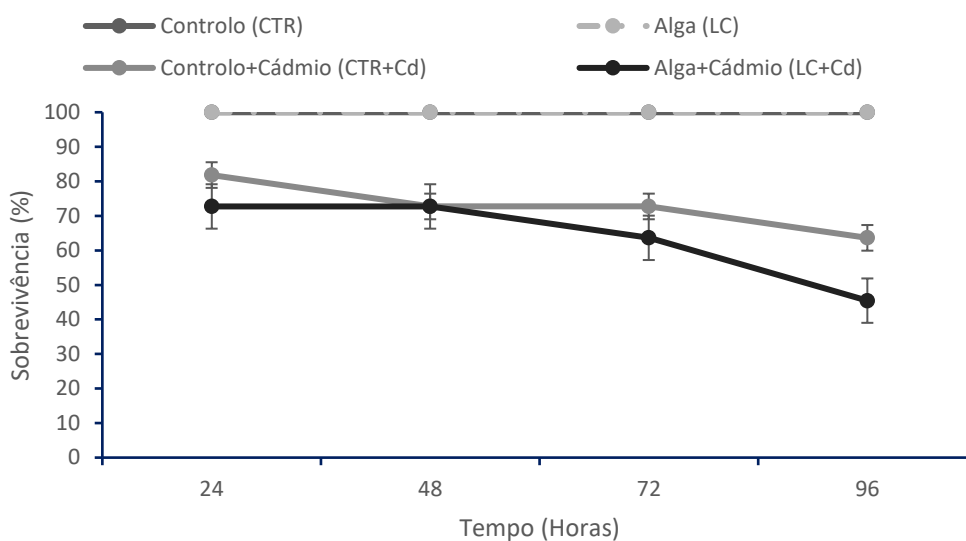


Figura 7. Percentagem de sobrevivência ao longo do ensaio de exposição

4.2.2 Ingestão de ração

Durante o ensaio de exposição, observou-se uma diminuição na ingestão de ração nos organismos sujeitos aos tratamentos com cádmio (CTR+Cd e LC+Cd). Por outro lado, registou-se um aumento da ração ingerida nos organismos expostos aos tratamentos sem a adição de cádmio (Figura 8).

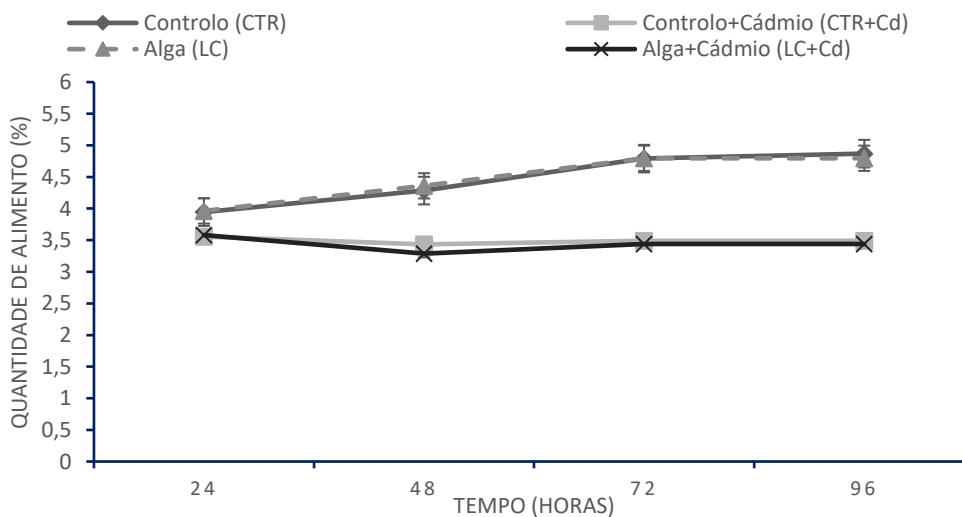


Figura 8. Média da ingestão diária de ração durante o ensaio de exposição apresentada em percentagem do peso corporal de acordo com a biomassa corporal de cada tanque

No ensaio de recuperação os valores médios de ingestão de ração nos organismos sujeitos aos tratamentos com cádmio continuaram a sua tendência de diminuição iniciada na exposição. A

ração controlo e a ração da alga mostram oscilações. No início apresentaram um ligeiro aumento de quantidade de ração ingerida, no entanto, após este aumento de quantidade de ração, ambos os tratamentos apresentam uma diminuição da ingestão de alimento, terminando o ensaio com um valor menor de quantidade de ração ingerida comparativamente ao valor inicial (Figura 9).

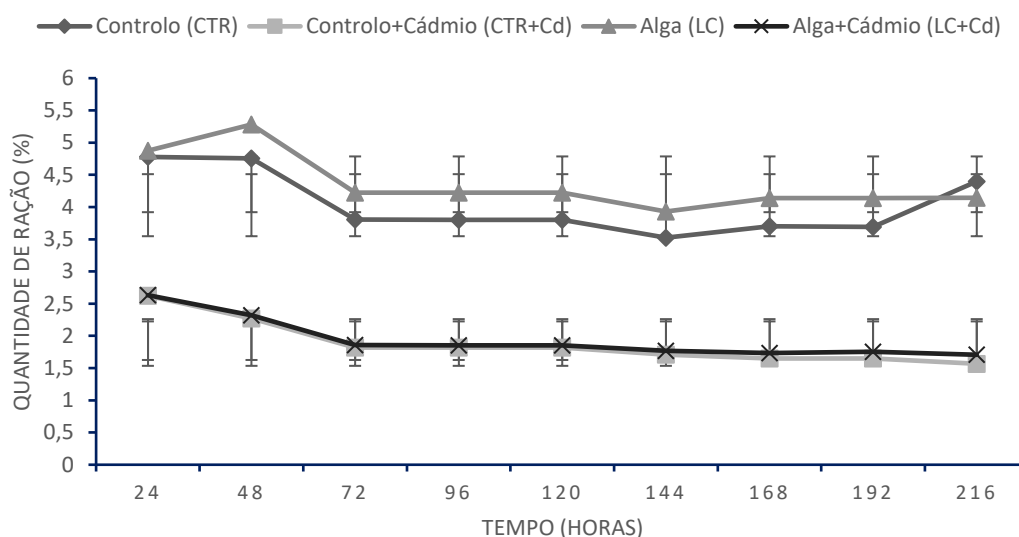


Figura 9. Média de ingestão diária da ração durante o ensaio de recuperação apresentada em percentagem do peso corporal de acordo com a biomassa corporal de cada tanque

4.2.3 Respostas bioquímicas no hepatopâncreas

No ensaio de exposição, registaram-se valores de atividade do STE significativamente mais elevados em organismos expostos aos tratamentos com cádmio, comparativamente ao tratamento controlo. No entanto, no ensaio de recuperação, não se registaram diferenças significativas nos valores da atividade do STE entre tratamentos. Entre ensaios também não se verificaram diferenças significativas (Figura 10-A).

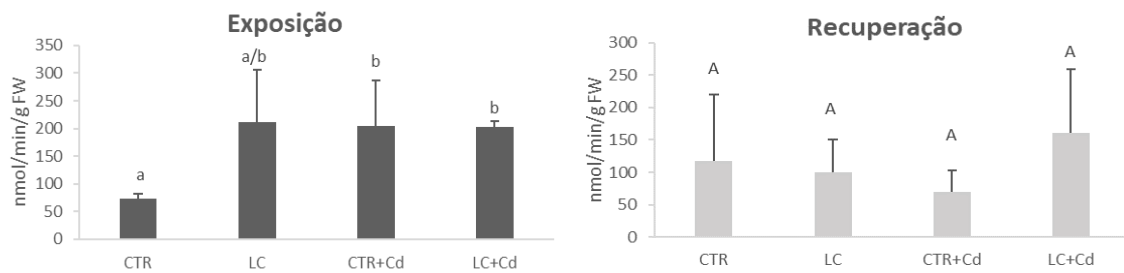
No ensaio de exposição registaram-se valores de GPx significativamente mais elevados nos organismos sujeitos ao tratamento LC+Cd comparativamente com as restantes. O ensaio de recuperação não mostrou diferenças significativas para a atividade da enzima GPx entre tratamentos. Já no que diz respeito às diferenças entre ensaios estas foram significativas apenas para os organismos expostos ao tratamento LC+Cd que mostrou uma diminuição da atividade da GPx entre o primeiro e o segundo ensaio (Figura 10-B).

Não foram registadas diferenças estatísticas para os valores de LPO e GSTs entre tratamentos. Também não se registaram diferenças significativas entre os ensaios de exposição e de recuperação nestes biomarcadores, com valores maiores em organismos expostos ao tratamento

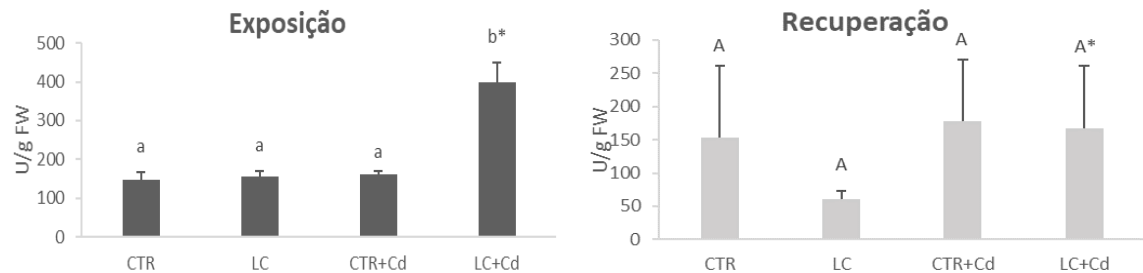
LC+Cd para as GSTs e em organismos sujeitos aos tratamentos LC e CTR+Cd no LPO (Figura 10-C, D).

No ensaio de exposição não se registraram diferenças significativas na atividade da AChE entre os organismos expostos aos tratamentos. No ensaio de recuperação, observaram-se valores de atividade de AChE significativamente maiores nos organismos expostos a LC+Cd comparando com todos os restantes tratamentos. Para além disso os valores do controlo neste mesmo ensaio mostraram-se significativamente maiores que os dos organismos sujeitos ao tratamento LC. Entre ensaios os valores da atividade de AChE não sofreram diferenças significativas (Figura 10-E).

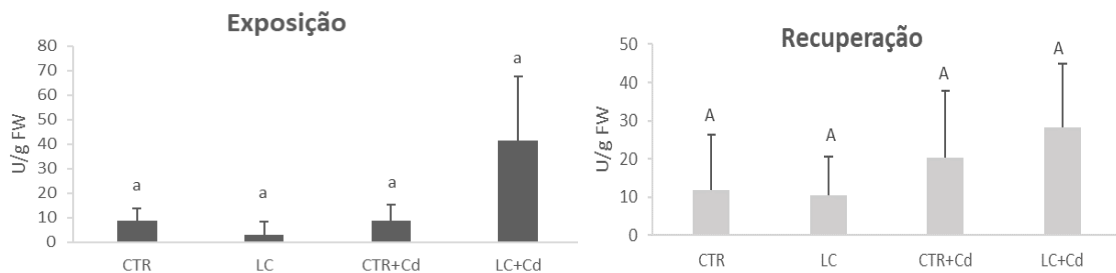
A) STE



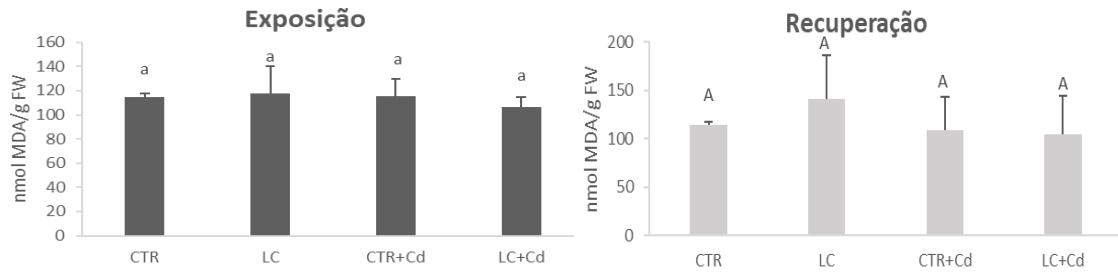
B) GPx



C) GSTs



D) LPO



E) AChE

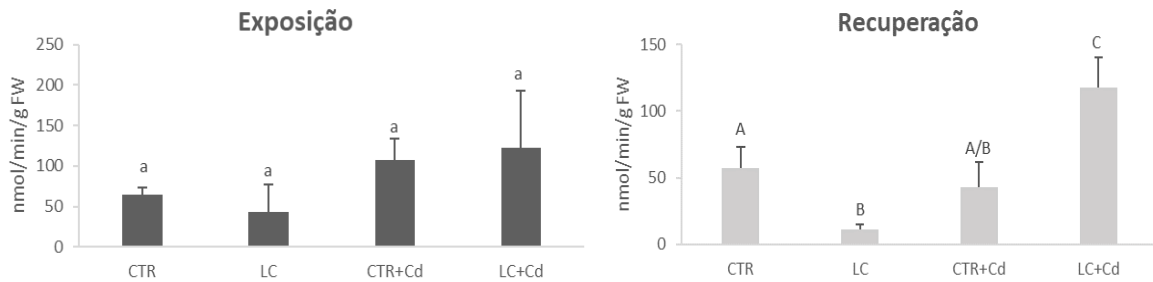


Figura 10. A: Atividade do sistema de transporte de elétrons (STE); B: Atividade da glutatona peroxidase (GPx); C: Atividade da glutatona S-transferases (GSTs); D: Nivel de peroxidação lípica (LPO); E: Atividade da acetilcolinesterase (AChE); Os resultados são a média + desvio padrão. Diferenças significativas ($p < 0.05$) entre condições estão representadas por diferentes letras e entre ensaios pelo asterisco.

Legenda: CTR (controlo); LC (alga); CTR+Cd (controlo + cádmio); LC+Cd (alga + cádmio).

4.2.4 Respostas bioquímicas no músculo

Os valores da atividade de STE mostraram-se significativamente menores registados nos organismos expostos aos tratamentos com cádmio comparativamente com o controlo, durante o ensaio de exposição. Na recuperação não existiram diferenças significativas para este parâmetro entre tratamentos. Já entre ensaios os valores da atividade de STE sofreram um aumento significativo na recuperação nos organismos expostos ao tratamento do CTR+Cd (Figura 11-A).

No ensaio de exposição registaram-se valores da atividade da GPx significativamente menores nos organismos sujeitos aos tratamentos com cádmio comparativamente ao controlo e ao tratamento com a alga. O ensaio de recuperação registou também valores na atividade da GPx significativamente menores nos organismos sujeitos ao tratamento CTR+Cd comparativamente com o tratamento com o LC. Entre ensaios não se registaram diferenças significativas em termos de atividade de GPx (Figura 11-B).

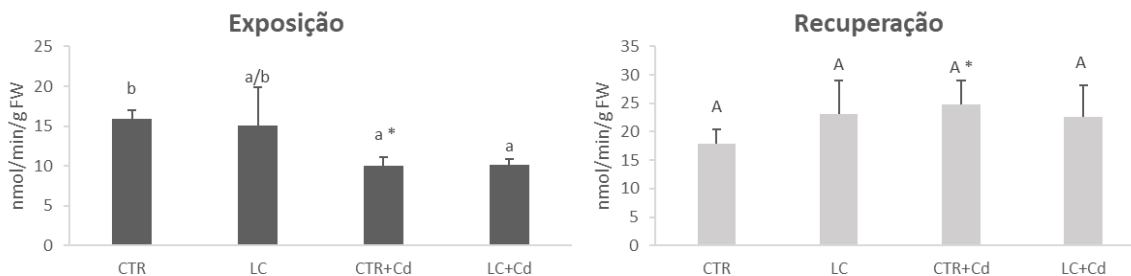
No ensaio de exposição verificaram-se valores de atividade das GSTs significativamente menores nos organismos expostos aos tratamentos com cádmio comparativamente ao controlo e

ao tratamento com a alga. No ensaio de recuperação registaram-se valores deste mesmo parâmetro significativamente maiores nos organismos sujeitos ao tratamento LC comparando com os restantes. Entre ensaios houve apenas diferenças significativas da atividade das enzimas GSTs que aumentou nos organismos expostos ao tratamento CTR+Cd no ensaio de recuperação comparativamente ao de exposição (Figura 11-C).

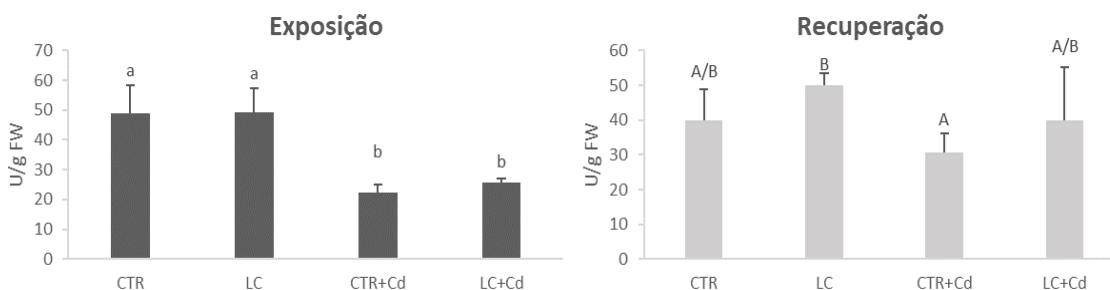
Relativamente aos níveis de LPO não se registaram diferenças significativas para nenhum dos ensaios entre os diferentes tratamentos testados, nem entre ensaios (Figura 11-D).

Os valores da atividade da AChE foram significativamente maiores para os organismos expostos ao tratamento CTR+Cd comparativamente aos tratamentos LC e LC+Cd. Para além disso, neste mesmo ensaio verificaram-se valores de atividade da AChE significativamente menores nos organismos sujeitos ao tratamento LC comparando com os tratamentos CTR e o CTR+Cd. O ensaio de recuperação não mostrou diferenças significativas entre os organismos expostos aos diferentes tratamentos. Já entre os ensaios verificou-se uma diminuição significativa nos valores de atividade da AChE para os organismos expostos ao tratamento CTR+Cd no ensaio de recuperação, e um aumento significativo da atividade deste parâmetro para o tratamento LC+Cd para o mesmo ensaio (Figura 11-E).

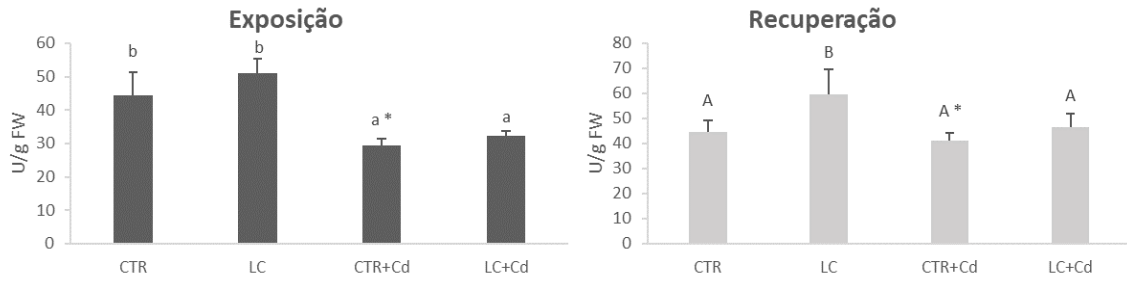
A) STE



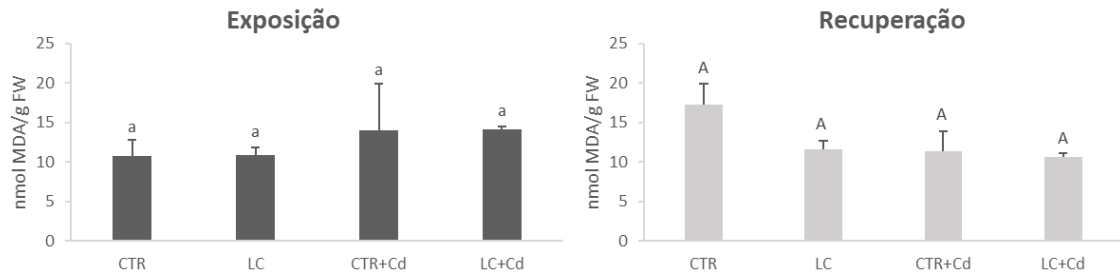
B) GPx



C) GSTs



D) LPO



E) AChE

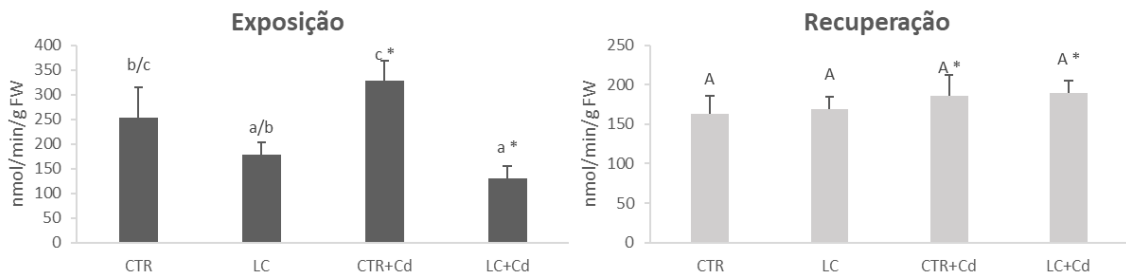


Figura 11. A: Atividade do sistema de transporte de elétrons (ETs); B: Atividade da glutiona peroxidase (GPx); C: Atividade da glutiona S-transferase (GSTs); D: Nível da peroxidação lipídica (LPO); E: Atividade acetilcolinesterase (AChE); Os resultados são a média + desvio padrão. Diferenças significativas ($p < 0.05$) entre condições estão representadas por diferentes letras, e entre ensaios por asterisco.

Legenda: CTR (Controlo); LC (alga); CTR+Cd (controlo + cádmio); LC+Cd (alga + cádmio)

4.2.5 Respostas bioquímicas na hemolinfa

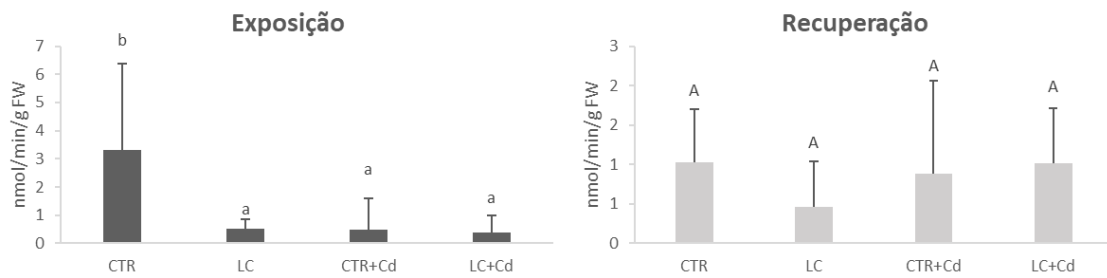
No ensaio de exposição verificaram-se valores da atividade de STE significativamente maiores para os organismos sujeitos ao tratamento controlo comparativamente com os organismos expostos aos restantes tratamentos. No ensaio de recuperação não se observaram diferenças significativas entre os organismos expostos aos vários tratamentos. Entre ensaios verificou-se uma diminuição nos valores da atividade de STE para os organismos expostos ao tratamento

controlo durante o ensaio de recuperação, no entanto esta diminuição não é suficiente para ser significativa (Figura12-A).

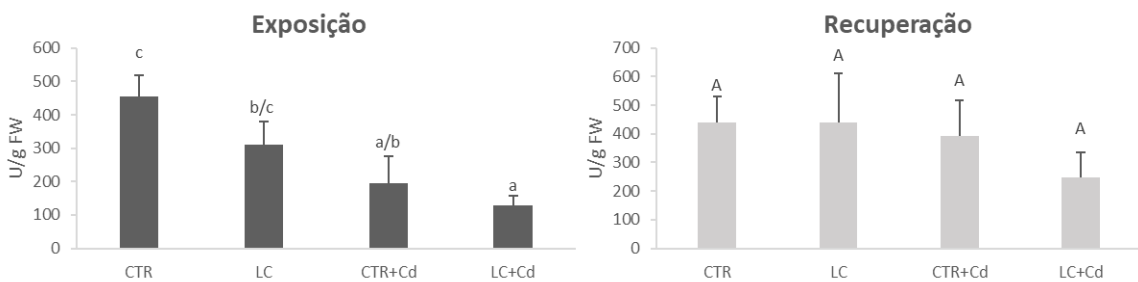
Relativamente à atividade da enzima GPx, no ensaio de exposição, observaram-se valores significativamente mais elevados nos organismos do controlo comparativamente aos dois tratamentos que continham cádmio (CTR+Cd e LC+Cd). Comparando organismos sujeitos aos tratamentos LC e ao LC+Cd observaram-se valores significativamente menores para os organismos expostos ao tratamento LC+Cd. Em relação ao ensaio de recuperação, não existem diferenças significativas entre tratamentos. A comparação entre ensaios também não revelou valores significativamente diferentes para esta enzima (Figura 12-B).

Não foram encontradas diferenças significativas para três dos biomarcadores analisados, LPO, GSTs e AChE tanto entre os organismos expostos aos vários tratamentos como entre ensaios (Figura 12-C, D, E).

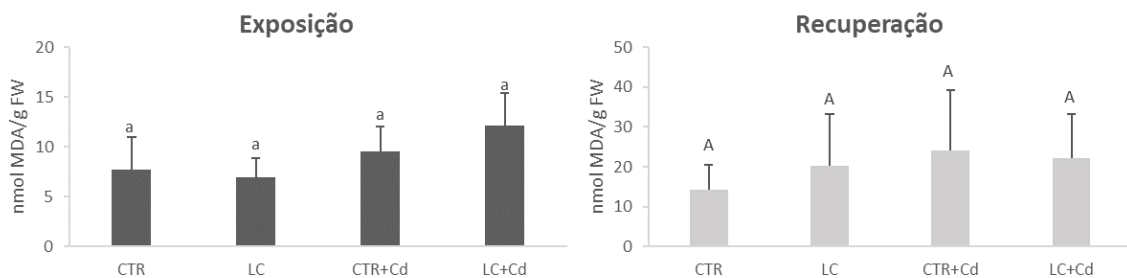
A) STE



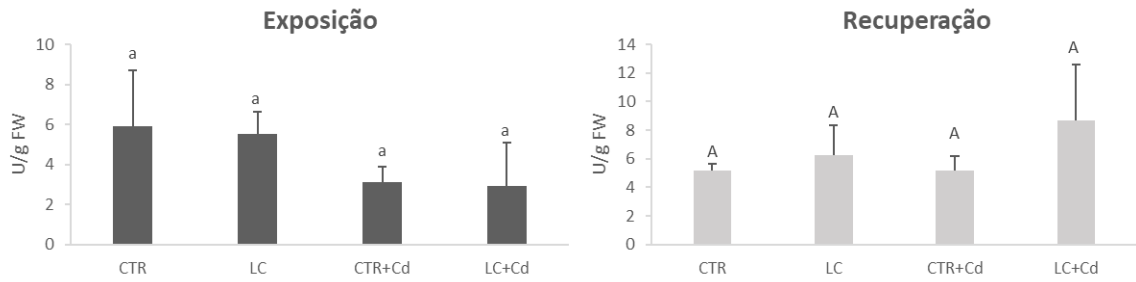
B) GPx



C) GSTs



D) LPO



E) AChE

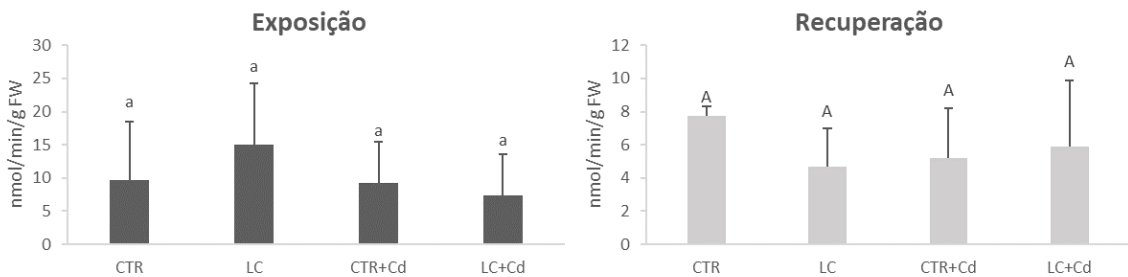


Figura 12. A: Atividade do sistema de transporte de elétrons (ETs); B: Atividade da glutiona peroxidase (GPx); C: Atividade da glutiona S-transferase (GSTs); D: Nivel da peroxidação lipidica (LPO); E: Atividade da acetilcolinesterase (AChE); Os resultados são a média + desvio padrão. Diferenças significativas ($p < 0.05$) entre condições estão representadas por diferentes letras e entre ensaios com asterisco.

Legenda: CTR (controlo); LC (alga); CTR+Cd (controlo + cádmio); LC+Cd (alga + cádmio)

4.2.6. Respostas bioquímicas no intestino

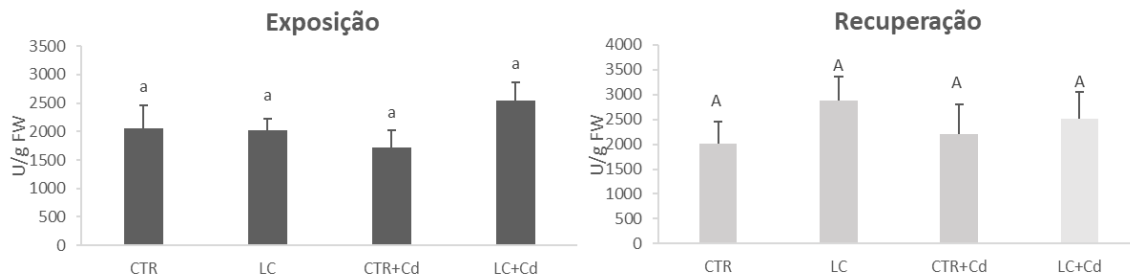
Não existiram diferenças significativas em termos de atividade das enzimas GSTs entre organismos sujeitos aos diferentes tratamentos em nenhum dos ensaios nem entre ensaios (Figura 14-A).

No ensaio de exposição registaram-se valores de níveis de LPO significativamente menores nos organismos sujeitos aos tratamentos com cádmio comparativamente com os do controlo. No ensaio de recuperação os valores de nível do LPO foram significativamente maiores para os organismos do controlo e do tratamento LC comparativamente ao tratamento CTR+Cd. Entre ensaios, os níveis de LPO foram significativamente mais elevados nos organismos expostos ao tratamento LC no ensaio de recuperação comparativamente com o de exposição (Figura 14-B).

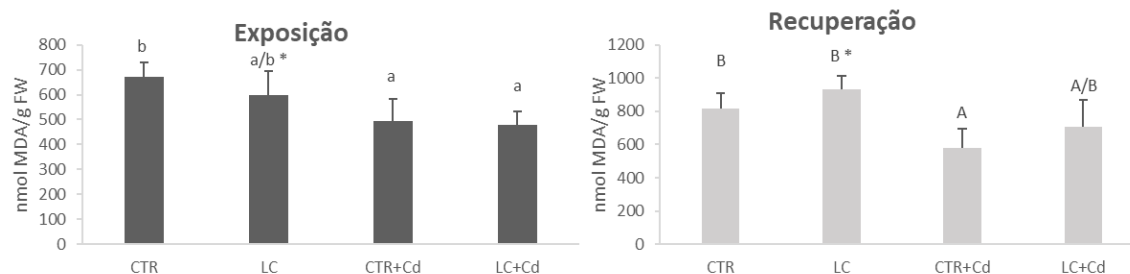
No ensaio de exposição, registaram-se valores de atividade da AChE significativamente maiores para os organismos sujeitos ao tratamento LC+Cd comparativamente com o CTR+Cd. No ensaio de recuperação os valores deste parâmetro foram significativamente menores nos organismos expostos aos tratamentos que integram o controlo comparativamente com o LC+Cd.

Entre ensaios a atividade da AChE registou uma diminuição no ensaio de recuperação significativa em ambos os tratamentos com cádmio (Figura 13-C).

A) GSTs



B) LPO



C) AChE

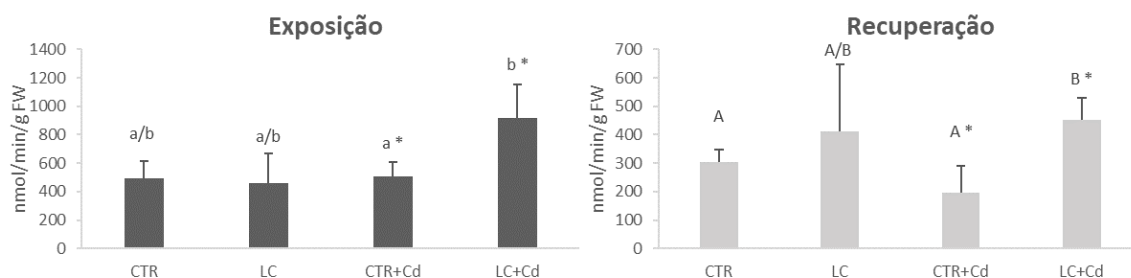


Figura 13. A: Atividade da glutatona S-transferase (GSTs); B: Nível da peroxidação lipídica (LPO); C: Atividade de acetilcolinesterase (AChE); Os resultados são a média + desvio padrão. Diferenças significativas ($p < 0.05$) entre condições estão representadas por diferentes letras e entre ensaios com asterisco.
 Legenda: CTR (controlo); LC (alga); CTR+cd (controlo + cádmio); LC+Cd (alga + cádmio).

4.2.7 Análise multivariada

No ensaio de exposição (Figura 14), o primeiro PCO1 que representa 91.9 % da variabilidade, separa claramente o intestino (IntCTR; IntLC; IntCTR+Cd; IntLC+Cd) (lado positivo) dos restantes órgãos (lado negativo). O eixo do PCO2 explica uma variabilidade de 7.4 % separando o músculo (MusCTR; MusCTR+Cd; MusLC; MusLC+Cd) e o tratamento LC+Cd relativo ao intestino (IntLC+Cd) (lado negativo) das restantes (lado positivo). Em relação aos parâmetros, LPO, GSTs e AChE todos

apresentam maior correlação com o PCO1, lado positivo ($r > 0.75$). Em relação ao PCO2 o vetor com maior correlação são as GSTs, no entanto esta apresenta um valor bastante baixo.

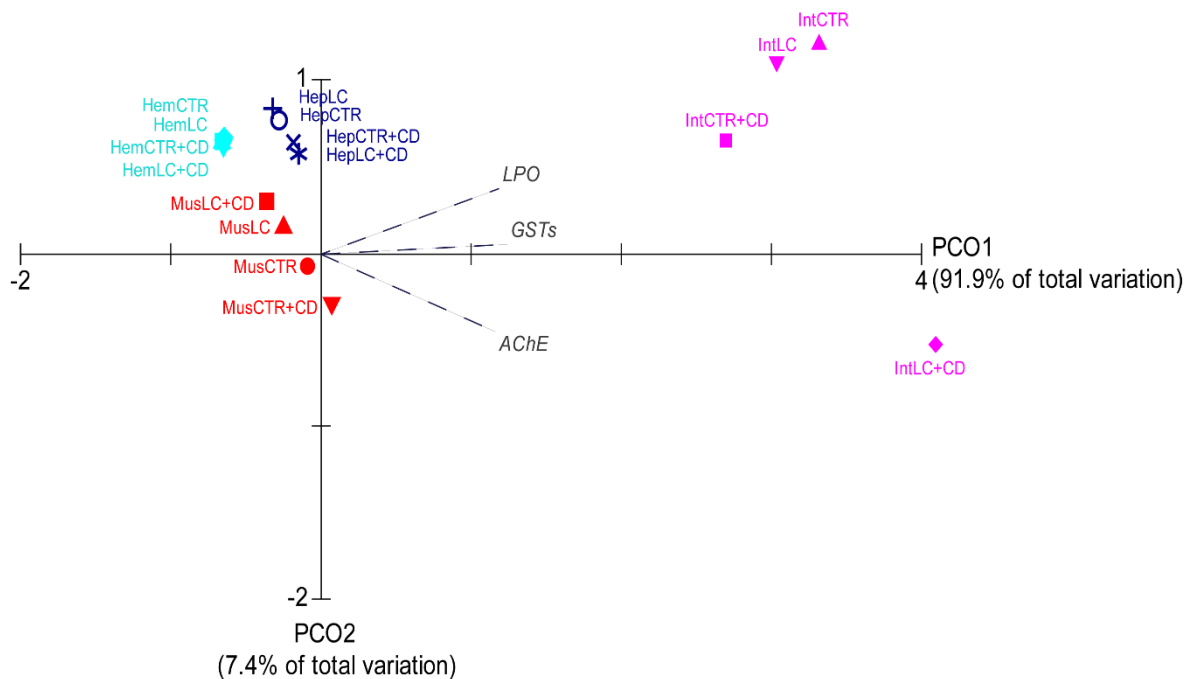


Figura 14. Diagrama de ordenação (PCO) baseado em descritores bioquímicos, órgãos recolhidos e dietas consumidas por organismos da espécie *Penaeus vannamei* expostos ao cádmio (Int-intestino; Mus- músculo; Hep- hepatopâncreas; Hem-hemolinfa seguidos das siglas dos tratamentos). Os vetores de correlação de Pearson são sobrepostos como variáveis suplementares ($r > 0,75$): LPO (peroxidação lipídica), GSTs (glutaciona S-transferases) e AChE (acetilcolinesterase).

No ensaio de recuperação (Figura 15), o PCO1 apresenta uma variabilidade de 91.7 % e uma forma semelhante ao de exposição, no entanto aqui os tratamentos referentes ao intestino encontram-se mais separadas entre si no lado positivo, e os tratamentos no músculo e hepatopâncreas passaram para o lado positivo. O PCO2 apresenta uma variabilidade de 7.5 % e juntamente às condições do músculo e à condição LC+Cd do intestino juntou-se a mesma condição do hepatopâncreas (HepLC+Cd) do lado negativo, permanecendo as restantes do lado positivo. Os parâmetros mantiveram todos uma maior correlação com o PCO1, lado negativo ($r > 0.75$). Com o PCO2 o vetor que apresentou maior correlação foi o LPO, no entanto tal como na exposição este valor foi bastante baixo.

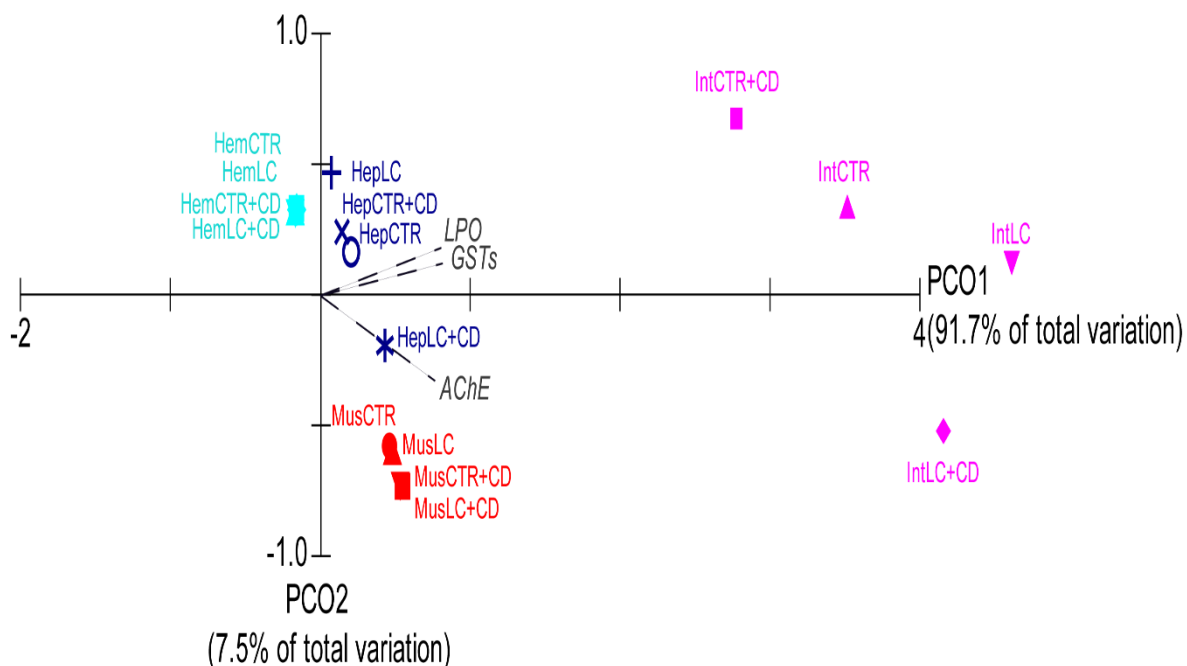


Figura 15. Diagrama de ordenação de centroides (PCO) baseado em descritores bioquímicos, órgãos recolhidos e dietas consumidas por *organismos da espécie Penaeus vannamei* em recuperação da exposição ao cádmio (Int-intestino; Mus-músculo; Hep- hepatopâncreas; Hem- hemolinfa seguidos das siglas dos tratamentos). Os vetores de correlação de Pearson são sobrepostos comovariáveis suplementares ($r > 0,75$): LPO (peroxidação lipídica), GSTs (glutationa S-transferases) e AChE (acetilcolinesterase).

Em relação aos gráficos cluster em formato de dendrograma, no ensaio de exposição, Figura 16, temos uma clara divisão formando dois principais grupos. O primeiro grupo junta todas os tratamentos do órgão intestino e o segundo grupo os de todos os outros órgãos/tecidos. O primeiro grupo referido mostra uma separação entre os organismos expostos ao tratamento LC+Cd (IntLC+Cd) e os restantes. Já o segundo grupo divide-se em dois subgrupos, um com dois tratamentos referentes ao do músculo, o CTR e o CTR+Cd (MusCTR e MusCTR+Cd respetivamente) e outro com as restantes de todos os órgãos/tecidos. Por último, neste segundo subgrupo é evidente uma separação entre órgãos/tecidos.

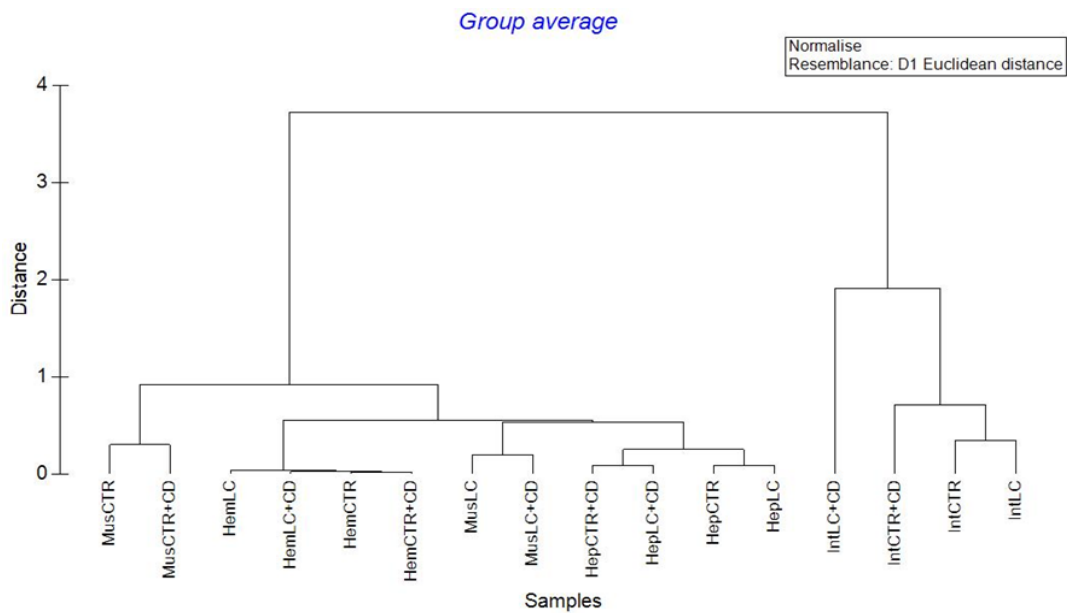


Figura 16. Cluster para o ensaio de exposição (Int- intestino; Mus- músculo; Hep-hepatopâncreas; Hem- hemolinfa seguidos das siglas dos tratamentos, divisão das semelhanças entre órgãos e tratamentos.

No ensaio de recuperação, Figura 17, continua a ser visível principal divisão entre os dois grupos o intestino e os restantes órgãos e tecidos. No grupo do intestino há uma distinção entre a condição LC (IntLC) e o CTR (IntCTR). No segundo grupo há uma diferenciação em dois subgrupos onde num deles temos as condições do musculo (MusCTR; MusCTR+Cd; MusLC; MusLC+Cd) juntamente com a condição LC+Cd do hepatopâncreas (HepLC+Cd) e no outro grupo os restantes. Dentro deste segundo subgrupo é também visível uma divisão por órgão ou tecido.

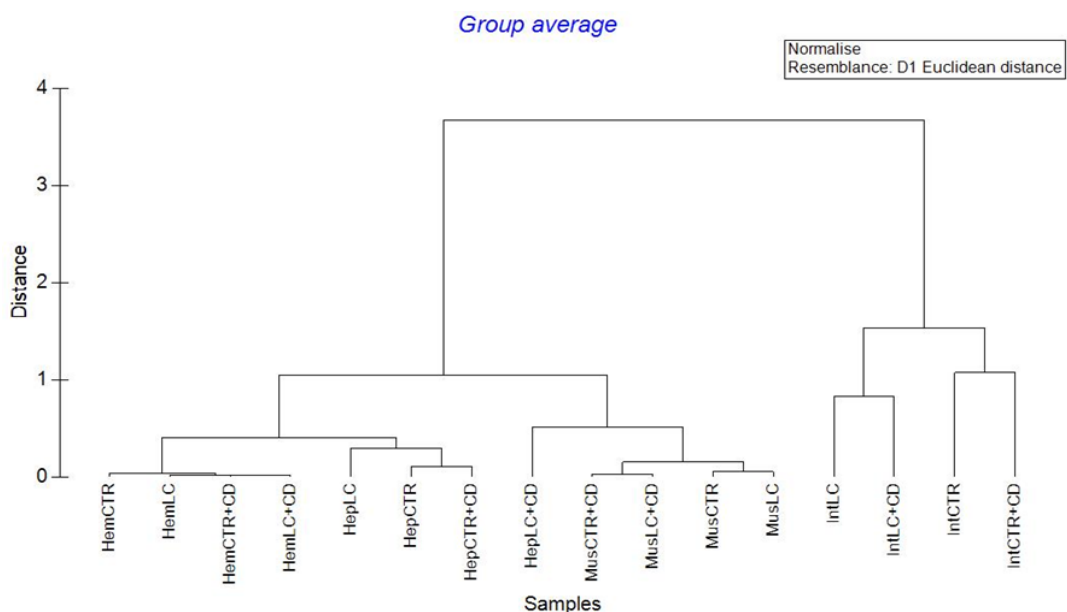


Figura 17. Cluster para o ensaio de recuperação (Int- intestino; Mus- músculo; Hep- hepatopâncreas; Hem- hemolinfa seguidos das siglas dos tratamentos), divisão das semelhanças entre órgãos e tratamentos.

5. Discussão de resultados

O grande aumento da procura por produtos alimentares de origem aquática e a crescente importância da aquacultura na resposta a essa exigência pedem práticas sustentáveis. Por ser uma atividade em evolução, existe um esforço constante para otimizar os métodos de produção e as dietas utilizadas neste setor (Rocha & Dinis, 2019). Para atingir este objetivo de otimização serão necessários vários estudos científicos inclusive histológicos que de forma relativamente rápida e fácil, nos leva a identificação de alterações em tecidos e órgãos. As análises histopatológicas são consideradas ferramentas sensíveis para detetar a presença e os efeitos de compostos químicos em órgãos alvo. Os biomarcadores histopatológicos vêm sendo utilizados em estudos de campo para avaliar o efeito tóxico dos poluentes no ambiente aquático, e têm a capacidade de diferenciar lesões nos órgãos, induzidas por doenças e outros fatores do meio ambiente, daquelas provocadas pela exposição aos poluentes. Alterações histopatológicas resultam de uma variedade de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, que podem levar a formação de lesões nas células, nos tecidos ou órgãos (Werneck et al., 2012). A exposição de um organismo a um xenobiótico pode levar a alterações ao nível do stress oxidativo, bem como alterações no metabolismo do organismo o que pode, por sua vez, impactar a sua capacidade de ativar mecanismos de defesa (Livingstone & Black, 2003; Hoarau et al., 2004; Freitas et al., 2019).

Este trabalho teve como objetivo identificar qual ou quais as respostas bioquímicas com maior potencial para avaliar o stress pré letal em camarões, mais especificamente na espécie *Penaeus vannamei*. Para isso, usou-se um metal poluente presente no meio ambiente, o cádmio, numa concentração ambientalmente relevante incorporada na sua alimentação. Estes ensaios são importantes pois o comportamento dos organismos a níveis de contaminação que podem afetar significativamente o seu crescimento é um procedimento útil para compreender os mecanismos inerentes à sua tolerância, uma vez que estes são frequentemente despoletados quando os organismos estão sujeitos a níveis elevados de stress.

Por outro lado, pretendemos também fazer uma avaliação prévia do potencial da espécie de alga, *Lithothamnium calcareum* também incorporada numa dieta durante estes ensaios, como ingrediente funcional, com possível capacidade para mitigar os efeitos nefastos da exposição a um contaminante, designadamente na saúde intestinal.

5.1. Ensaio de exposição e recuperação

Os parâmetros físico químicos recolhidos ao longo dos ensaios encontram-se dentro dos intervalos de valores adequados para a espécie utilizada, temperatura entre os 26 °C e os 32 °C e a salinidade entre os 7 e 34 (Gautier & Boyd, 2000; Dugassa & Gaetan, 2018).

A duração escolhida para os ensaios teve em conta os períodos necessários à ocorrência de alterações fisiológicas como resposta a fatores de stress desta natureza. Por isso, fez-se um teste standard de 96 h. Já a concentração de cádmio utilizada baseou-se num trabalho realizado por Yu et al. (2016). Contudo, enquanto que no presente trabalho obteve-se uma sobrevivência < 65 % para as dietas com cádmio, no trabalho referido anteriormente a sobrevivência foi > 90 % para todos os conjuntos de organismos que ingeriram cádmio. Esta diferença poderá ser justificada pela diferente forma de produção e integração do cádmio na ração. No trabalho referido, o cádmio foi misturado com os restantes ingredientes secos e só depois o óleo foi adicionado e misturado, após obter uma mistura homogénea adicionaram água desionizada e misturaram novamente, esta mistura foi depois transformada em pellets. Enquanto no presente trabalho, o cádmio foi integrado nos grânulos de ração, potenciado a sua ingestão e minimizando o risco de lixiviação, possibilitando que os efeitos fossem observados com maior rapidez.

Para além disto no trabalho referido foi utilizado o zinco como possível protetor dos organismos aos efeitos do cádmio. Neste trabalho, decidiu-se testar estes efeitos protetores possivelmente induzidos pela alga *Lithothanion calcareum* no camarão. Esta escolha foi feita devido a todas as características desta alga já referidas anteriormente, onde se salienta as suas possíveis capacidades para neutralizar as possíveis consequências como a indução de stress oxidativo dos metais como o níquel e cádmio. No entanto, depois de analisar a sobrevivência obtida pelo consumo da mesma é possível afirmar que esta poderá potenciar o efeito negativo do cádmio pois a mortalidade foi superior à dos organismos que ingeriram a dieta CTR+Cd.

Alguns estudos já demonstraram que polissacarídeos sulfatados isolados de algas vermelhas apresentam atividades anti-inflamatórias. Um exemplo é o trabalho realizado por Almeida et al. (2012) que estudou a caracterização química de polissacarídeos de *L. calcareum*, identificando um potencial de atividade anti-inflamatória (ou seja, redução no número de células inflamatórias) desses componentes. No entanto, sabe-se que um dos principais problemas clínicos associados a agentes anti-inflamatórios são distúrbios gastrointestinais. Algo que poderá estar relacionado com os resultados obtidos neste estudo, onde a ingestão da alga com cádmio provocou uma

maior mortalidade mostrando que a alga vermelha, também pode apresentar algumas formas de toxicidade.

A sobrevivência registrada no ensaio de recuperação, 100 %, demonstra que estes organismos apresentam uma elevada taxa de recuperação aos danos causados pelo cádmio, pois assim que as dietas utilizadas deixaram de conter cádmio a mortalidade é nula. Para além disso este resultado para no ensaio de recuperação mostra que apesar da ingestão da alga poder provocar consequências estas não foram letais.

O protocolo de alimentação seguido neste trabalho teve em consideração o facto de que a utilização eficiente da ração em animais aquáticos depende em grande parte na rapidez com que é ingerida antes que ocorra a lixiviação de nutrientes. Este ponto é ainda mais importante quando se utiliza organismos como o camarão que apresentam maior tempo para ingestão do alimento que os peixes, algo que pode contribuir para um aumento da lixiviação da ração na água. Muitos outros fatores como o tamanho das partículas, o tempo de alimentação, a sua frequência e a quantidade de alimento fornecido podem também afetar a sobrevivência e o crescimento destas espécies (Aalimahmoudi et al., 2016). Juntamente com estes, a frequência no fornecimento do alimento é um parâmetro chave na estratégia da gestão nutritiva que tem uma influência nos processos de digestão e absorção da ração (Ding et al., 2017; Moorhead & Zeng, 2017; Navarro-Guillén et al., 2017). Vários estudos descreveram que a distribuição da quantidade certa de alimentação diária em múltiplas refeições ao longo do dia, promovendo o crescimento do camarão, melhora a eficiência de conversão alimentar e a qualidade da água (Carvalho & Nunes, 2006; Ding et al., 2017).

A matriz utilizada no presente estudo para a alimentação dos organismos permitiu avaliar a progressão da alimentação e mostrou que, durante o ensaio de exposição os organismos alimentados sem contaminante aumentaram a quantidade de ração diária ingerida. Os restantes diminuíram a quantidade ingerida, o que pode mostrar que a presença do cádmio no organismo pode levar a um menor apetite, algo já mencionado para outros metais em estudos tanto em animais como humanos como Jesus et al. (2011) e Aboubakar et al. (2022).

No ensaio de recuperação os resultados mostraram que os efeitos subletais se prolongam. Isto porque os organismos que anteriormente estavam a ser alimentados com dietas com o contaminante continuaram com uma menor quantidade de ração diária ingerida comparando com os organismos que nunca consumiram o contaminante. Assim, é possível afirmar que a diminuição de apetite é um efeito mais permanente e duradouro. No entanto, seria importante

um ensaio de maior duração para calcular o tempo necessário, para as retas de quantidade de ração diária se sobreporem ou tornarem mais próximas.

5.2. Respostas bioquímicas

As respostas antioxidantes são potenciais indicadores de stresse oxidativo em organismos marinhos, existindo variada literatura que apoia a validade dos biomarcadores como indicadores de respostas do organismo a um contaminante ou stressor (Cajaraville et al., 2000; Downs et al., 2001).

Uma das formas de verificar o efeito tóxico criado pela exposição a um contaminante é por meio de um estudo com biomarcadores. Segundo Monserrat et al. (2007), os biomarcadores são medidas de fluidos corporais, células, tecidos ou até mesmo parâmetros comportamentais que indicam em termos bioquímicos ou celulares a presença de contaminantes, sendo por isso importantes ferramentas de avaliação de contaminação em ambientes aquáticos. Para avaliar a biodisponibilidade e toxicidade de poluentes em organismos aquáticos, biomarcadores em todos os níveis de organização biológica tornaram-se valiosas ferramentas ecotoxicológicas. Como possíveis indicadores de exposição em ambientes de aquacultura o uso de biomarcadores neste sector é uma ferramenta importante para o seu desenvolvimento e bem-estar dos organismos.

A escolha dos biomarcadores a utilizar neste projeto teve por base as características de cada um dos órgãos e tecidos recolhidos nos organismos.

O STE pode fornecer informações sobre o consumo de energia de cada organismos sob condições de stress, uma vez que o organismo nestas condições precisa de mais energia para recuperar e manter a homeostasia o que pode prejudicar os sistemas envolvidos na aquisição, conversão e conservação de energia (Sokolova et al., 2012).

No presente estudo, os resultados obtidos para o biomarcador STE mostraram respostas diferentes nos vários órgãos estudados. No hepatopâncreas verificou-se um aumento da atividade da enzima nos organismos expostos aos tratamentos com cádmio (CTR+Cd e LC+Cd) e no tratamento apenas com a alga (LC) comparativamente aos organismos expostos ao controlo (CTR) durante o ensaio de exposição. O que poderá indicar da ativação da capacidade metabólica do camarão, uma vez que o sistema de transporte mitocondrial é um dos principais geradores de EROS, levando à ativação de enzimas antioxidantes (Regoli & Giuliani, 2014; Sokolova et al., 2012). Este resultado mostra que com este biomarcador é possível observar um aumento de produção de EROS neste órgão quando exposto a um contaminante e a presença da alga pode não reduzir este efeito, mas sim potenciar o mesmo. No segundo ensaio, o de recuperação, é possível

identificar uma alteração nestas condições que revelam um início de uma aproximação ao controlo.

No músculo e hemolinfa é visível uma diminuição da atividade da enzima de STE durante o ensaio de exposição, o que mostra uma limitação do camarão para aumentar o metabolismo na presença do cádmio, alga e da conjugação de ambos em comparação com o controlo. A diminuição desta atividade impediu o uso das reservas energéticas destes organismos, o que comprova a tese descrita no trabalho realizado por Duquesne et al. 2004 também com este metal apesar de utilizar outro organismo, de que quando se encontram sob elevados níveis de stress os organismos conseguem evitar o gasto das suas reservas energéticas. Para além disso, a diminuição de STE pode ser uma defesa dos organismos de maneira a reduzir a geração de EROs, podendo contribuir para diminuir os danos celulares.

Estes resultados quando analisados para o organismo como um todo significam que existiu um aumento na produção de EROs mas sem o total consumo das energias de reserva. Com isto e tendo em consideração os gráficos apresentados para este biomarcador é possível afirmar que o STE é um bom biomarcador de stress subletal, principalmente para o hepatopâncreas, onde é visível uma maior variação, que será mais fácil de identificar. Em relação ao uso da alga calcária em todos os órgãos o seu uso mesmo sem contaminante obteve resultados idênticos aos das dietas que continham o cádmio.

A bioacumulação de alguns contaminantes implica a produção de ROS e consequente aumento/diminuição de algumas enzimas antioxidantes. A enzima GPx tem um importante papel nesta resposta antioxidante evitando assim a bioacumulação de H₂O₂ nas células (Stankiewicz et al., 2002; Selvakumar et al., 2006). Vários autores encontraram alterações na atividade da enzima GPx em diferentes organismos como resultado da exposição aos metais pesados (Ahmad et al., 2017; Gravato et al., 2006, Yu et al., 2016).

Em relação à atividade da GPx, observou-se um aumento nos organismos expostos ao tratamento LC+Cd, indicando o seu envolvimento na eliminação de EROs no hepatopâncreas. Para além disso, este tratamento da alga com cádmio também variou significativamente entre ensaios para este órgão. Assim, é possível afirmar que a junção da alga com este metal proporcionou um maior efeito na atividade da enzima GPx no organismo do que apenas os que se encontravam expostos ao controlo não sendo o elemento ideal a utilizar em situação de exposição como forma de combater o stressor. No entanto, os resultados para o ensaio de recuperação mostram que o hepatopâncreas apresenta uma boa recuperação em possíveis casos de exposição aguda ou crónica em cenários de produção. Este resultado poderá estar ligado com o facto de que o

hepatopâncreas dos crustáceos apresenta uma elevada importância na destoxificação de xenobióticos, no metabolismo de metais, além de também armazenar energia e atuar na digestão dos alimentos (Bhavan & Geraldine, 2001; Anderson et al., 1997). Para além disso, autores como Chavez-Crooker et al. (2003) e Pourang & Dennis (2005), afirmam que este órgão é o principal no que diz respeito ao armazenamento, metabolismo e destoxificação de metais em decápodes, tal como referido anteriormente.

Em relação ao músculo e hemolinfa, o comportamento para esta enzima foi semelhante. Em ambos se verificou uma inibição desta enzima com a presença do cádmio, o que pode estar relacionado com o excesso de produção de EROs, provocando stress oxidativo. A inibição da atividade da enzima da GPx pode ter implicações para a célula, pois como referido, pode levar a uma situação de dano oxidativo. O equilíbrio do estado redox celular pode ser comprometido, ainda mais se a atividade da glutathione redutase (GR) não mudar, pois a enzima GPx tem um papel importante na manutenção da relação GSH/GSSG (Stankiewicz et al., 2002; Hermes-Lima, 2004). Atli e Canli (2010) observaram inibição da atividade da enzima GPx na exposição aguda aos metais e aumento na atividade para exposições crónicas. Os dois órgãos, músculo e hemolinfa mostraram bons resultados no ensaio de recuperação visto que se aproximaram dos valores dos organismos expostos aos tratamentos sem cádmio, CTR e o LC.

Os resultados para esta enzima mostraram que nos organismos expostos ao cádmio o músculo e a hemolinfa revelam maior produção de EROs enquanto que no hepatopâncreas há um esforço para eliminar essas substâncias e reduzir o stress oxidativo. Este aumento da atividade da enzima GPx no hepatopâncreas verificou-se significativa apenas em um dos tratamentos, LC+Cd, e por isso tendo em consideração os objetivos do presente estudo a GPx pode ser considerada um bom biomarcador para o músculo e hemolinfa.

A LPO é um dos principais efeitos do dano oxidativo causado por ROS, e leva à perda de função de várias estruturas celulares, e o seu aumento é sinal de um desequilíbrio no mecanismo da célula para prevenir danos induzidos por ROS (Ruas et al., 2008; Santi et al., 2011).

No presente estudo apenas o intestino mostrou diferenças significativas para o nível de peroxidação lipídica (LPO). Revelando uma diminuição durante a exposição ao cádmio para os organismos expostos aos tratamentos, CTR+Cd e LC+Cd, mostrando que não existiu produção excessiva de EROs o que conseqüentemente não levou à peroxidação lipídica (Ruas et al., 2008; Santi et al., 2011). Esta inibição foi recuperada no segundo ensaio apenas pela dieta com a presença da alga, mas não pelo controlo, o que mostra uma possível vantagem no uso desta alga calcária na alimentação.

Como possível justificação para esta diminuição e analisando o trabalho realizado por Hermes-Lima, (2004) durante o período de maior atividade alimentar há uma maior produção de ATP e, com isso, ocorre um aumento da possibilidade de formação de ROS, o que na falta de defesas antioxidantes suficientes, principalmente quando a geração destes também ocorre por fatores exógenos (como exposição a metais) leva à peroxidação lipídica (LPO). Sabendo que no presente estudo durante a exposição os organismos expostos aos tratamentos com cádmio reduziram o seu apetite e consumiram menor quantidade de ração é possível afirmar que a diminuição de alimento poderá ter limitado a produção de ATP, não aumentando os EROs e, conseqüentemente, não levando à peroxidação lipídica. O intestino é um importante órgão no que diz respeito à absorção de nutrientes e imunidade, pois uma microbiota intestinal saudável pode produzir metabolitos benéficos e proteger o organismo de colonização por parte de micróbios patogénicos. Os resultados obtidos para a LPO podem levar a uma microbiota instável e esta provocar a produção de metabolitos prejudiciais. Se a integridade estrutural do intestino for destruída por variados stresses, o agente patogénico oportunista pode invadir e transtornar a imunidade do hospedeiro, sendo também esta uma possível justificação para a morte dos organismos neste estudo, algo que não pode ser confirmado pela falta de análises para deteção de patógenos (Duan et al., 2019).

A falta de resultados para os restantes órgãos revela que apesar das enzimas já referidas anteriormente mostrarem a produção de EROs não é suficiente para provocar a peroxidação lipídica.

No ensaio de recuperação apenas os organismos expostos anteriormente ao tratamento LC+Cd mostraram uma aproximação ao CTR, o que pode indicar que a alga calcária escolhida é uma vantagem na alimentação destes organismos.

Com toda esta informação é possível afirmar que a LPO é um bom biomarcador para identificação e avaliação de stress sub letal neste órgão, o intestino.

A glutathione-S-transferase é uma das enzimas com maior capacidade de destoxificação quando se trata de contaminantes xenobióticos (Blanchette et al., 2007). O seu principal papel neste processo é a defesa celular contra a toxicidade induzida por químicos e a sua defesa consiste em desativar o composto xenobiótico hidrofóbico, que poderia resultar em espécies genotóxicas. Este processo é conseguido através de um ataque nucleofílico do enxofre (S) e da glutathione reduzida (GSH) ao substrato eletrofílico. Podendo resultar em substituição ou adição nucleofílica dependendo do substrato hidrofóbico (Hayes et al., 2005; Blanchette et al., 2007; LaCourse et al., 2009).

Neste estudo, não houve alteração significativa na atividade da enzima GST para nenhum órgão, exceto para o músculo, o que sugere que nos restantes órgãos o cádmio não é capaz de induzir a atividade das GSTs. Para o músculo verificou-se uma diminuição significativa da atividade das GSTs nos organismos expostos aos tratamentos com a presença do cádmio, durante o ensaio de exposição. Isto mostra que o metal cádmio induziu stress oxidativo neste órgão, sustentando a possibilidade de que as EROs produzidas superaram a capacidade de resposta antioxidante desta enzima, o que provoca danos que resultam na diminuição da sua atividade. Esta tese pode ser sugerida uma vez que Hermes-Lima & Storey. 1993, demonstraram que a atividade desta pode ser inibida pela ação de EROs, como por exemplo H_2O_2 e pelo radical hidroxilo, hipótese também testada e relacionada por Li et al. (2010).

No entanto, e devido ao observado em outros biomarcadores como a LPO, a diminuição da atividade desta isoenzima pode também estar relacionada com uma depleção da GSH. A GSH é um importante antioxidante não-enzimático (Apel & Hirt, 2004), mas o seu principal papel como composto antioxidante depende da expressão das enzimas metabólicas de fase II, que facilitam a conjugação desta com ROS e as GSTs (Modesto & Martinez, 2010). Assim, uma depleção de GSH levará a uma diminuição da atividade destas isoenzimas (Van der Oost et al., 2003; Oliveira et al., 2010)

Devido à diferença significativa existente entre ensaios para o tratamento CTR+Cd, e tendo em conta que no ensaio de recuperação esta condição apresentou valores mais próximos do tratamento CTR, é possível sugerir uma recuperação. No entanto, este processo não é visível no tratamento LC+Cd, apesar de apresentar um início de recuperação, pois os valores aproximaram-se da condição LC mas não os atingiram. Entre a condição LC e LC+Cd no ensaio de recuperação existiram diferenças significativas, o que indica que o uso desta alga para este tecido altera os valores da enzima GSTs e aumenta o seu tempo de recuperação quando exposta a contaminantes. Assim, e tendo em consideração o objetivo do trabalho, as GSTs são um bom biomarcador para avaliar de forma mais precisa níveis de stress subletais, de forma a agir rápida e eficazmente.

A inibição da AChE leva a uma acumulação do ACh o que por sua vez, estimula os neurónios sensíveis na junção neuromuscular, o que resulta em espasmos e tremores. Em invertebrados, a acumulação de ACh pode induzir o padrão de envenenamento do nervo com hiperatividade, tremores, convulsões e paralisia, que podem levar à morte (Hoguet & Key, 2007; Colovic et al., 2013). Neste estudo verificaram-se diferenças significativas para este biomarcador no hepatopâncreas, no músculo e no intestino. No primeiro órgão referido, o hepatopâncreas,

apenas se verificaram diferenças no ensaio de recuperação, onde foi visível uma diminuição da atividade da enzima nos organismos anteriormente expostos ao CTR+Cd, o que pode indicar que houve capacidade de resposta por parte do organismo à neurotoxicidade durante o ensaio de exposição, mas que esta se esgotou antes da recuperação. Sendo este um dos possíveis motivos pelos quais os organismos deixam de ter a capacidade para se protegerem, podendo assim surgir danos. Este atraso no aparecimento de efeitos para este biomarcador, neste órgão, exclui o mesmo de possíveis ferramentas para avaliação de stress. No que diz respeito às condições com a alga para o hepatopâncreas há uma inibição na dieta sem a presença do cádmio de um ensaio para o outro mostrando a possibilidade de esta provocar neurotoxicidade nos organismos só por si. Neste trabalho e devido à ausência de mortalidade para a condição alga (LC) é possível afirmar que a acumulação de ACh não foi suficiente, ou seja, esta alga não provocou inibição suficiente que levasse à morte dos organismos. A junção desta alga com o cádmio (LC+Cd) provoca um aumento na atividade desta enzima. Este aumento é provavelmente devido à tentativa dos organismos de reduzir o excesso de neurotransmissor nas fendas sinápticas (Pan et al., 2012; Rajkumar, 2013).

O aumento desta enzima foi também visível no intestino em organismos expostos ao tratamento LC+CD durante o ensaio de exposição. Esta mesma condição mostrou uma inibição desta enzima no ensaio de recuperação juntamente com o tratamento CTR+Cd. Este resultado sugere que os efeitos do cádmio para estes organismos no que diz respeito a esta enzima demoraram mais do que as 96 h do ensaio a serem revelados. No entanto, a mortalidade existente no ensaio de exposição poderá ser um efeito desta inibição. Isto porque, como referido anteriormente a acumulação de ACh pode levar à morte.

A análise ao musculo revelou diferenças significativas entre organismos expostos aos vários tratamentos, os resultados mostram diferenças significativas entre os organismos expostos ao CTR e o LC+Cd ou ao tratamento LC e o CTR+Cd e estes não são comparáveis, pelo que é importante apenas realçar é a diminuição desta enzima para os organismos expostos ao tratamento LC+Cd comparativamente aos expostos ao CTR o que indica que o LC+Cd poderá ter efeitos ao nível da neurotoxicidade.

Com isto podemos dizer que os órgãos mais adequados para este biomarcador são o hepatopâncreas e o intestino.

A correlação obtida no gráfico PCO mostra que todos os biomarcadores estudados contribuem para a identificação de diferenças nas condições testadas. Apesar disto podemos dividir o gráfico de exposição em dois grupos, o intestino e os restantes órgãos e tecidos, o que vem confirmar a diferença deste órgão para com os restantes, possuindo características próprias que o levam a estar mais relacionado com biomarcadores que os restantes não se relacionam como o LPO.

Já no ensaio de recuperação é possível dividir o gráfico não em dois, mas em três grupos, o intestino, o músculo juntamente com uma condição do hepatopâncreas, LC+Cd, que se relacionam com a AChE, e os restantes que se relacionam com o LPO e as GSTs. Estes resultados vieram confirmar os obtidos nos gráficos de barras para cada parâmetro pois correspondem a situações onde se verificou diferenças significativas. Para além disso, em fase de recuperação devido á ausência de contaminantes, os órgãos aproximam-se mais nos seus resultados.

O dendrograma veio corroborar a separação entre o intestino e os restantes órgãos. Este resultado revela que a divisão não é feita entre condições de alimentação, mas sim entre órgãos, em ambos os gráficos. No entanto, no ensaio de exposição para além dessa separação com o intestino, é também visível uma divisão de duas condições no musculo de todas as outras condições dos restantes órgãos, algo que desaparece no ensaio de recuperação. O que pode indicar que nestas condições no músculo se detetaram diferenças relativamente aos restantes e esta diferença poderá ser estudada no futuro.

Com mais pormenor pode ressaltar-se que tanto no PCO como no dendrograma de exposição a condição da LC+Cd para o intestino se destaca das restantes, podendo significar que a junção desta alga ao cádmio apresenta características diferentes no organismo em comparação com a junção deste metal ao controlo. Também isto merece ser estudado em projetos futuros com maior pormenor.

6. Conclusão

Os ensaios realizados na empresa Riasearch permitiram concluir que o stress causado a estes organismos com o consumo de um contaminante provoca não só a sua mortalidade como a diminuição da quantidade de alimento ingerida, pelo que tendo em consideração os resultados obtidos é necessário o estudo de possíveis métodos de identificação deste contacto bem como formas de atenuar as suas consequências. No que diz respeito á recuperação, o seu começo foi visível com a mortalidade a ser nula, no entanto estes não recuperaram totalmente pois não atingiram a quantidade de alimento dos restantes, mostrando que o período de recuperação é maior que o testado.

Em relação aos biomarcadores, existem candidatos que podem ser selecionados e validados em estudos futuros para monitorizar a saúde do camarão cultivado, que pode levar á minimização do impacto negativo da contaminação por metais.

O ETS mostrou resultados interessantes para todos os órgãos onde este foi analisado, no entanto, estes resultados foram difusos, pois verificou-se um aumento no hepatopâncreas e uma diminuição nos restantes.

A GPX mostrou resultados validáveis para o músculo, no entanto a sua diminuição está relacionada com aumento de ROS e isto não foi comprovado pelo LPO. Este paradoxo deve ser estudado e analisado em futuros projetos, algo também registado para a hemolinfa. O resultado deste biomarcador para o hepatopâncreas mostra que, as características da alga escolhida poderão afetar as consequências da exposição deste metal nos organismos. Isto porque como discutido anteriormente aqui houve um aumento da atividade desta enzima, no entanto como o mesmo não se verificou para o outro tratamento com cádmio será necessário um estudo mais profundo para compreender se este aumento não se deve apenas á junção e não só á presença do cádmio. Esta mesma afirmação também se aplica á neurotoxicidade no intestino.

A GST apenas foi viável para o musculo, e devido ao resultado obtido para o LPO, a diminuição das GST apenas indica uma depleção da GSH.

Para o intestino, que é o foco deste projeto dentro dos biomarcadores analisados o LPO, foi aquele que melhor identificou os efeitos deste metal mostrando que a diminuição de alimento ingerido levou a uma inibição deste biomarcador não produzindo ROS. Para os restantes órgãos este biomarcador mostrou não ser o ideal.

Conclui-se assim que é necessário um melhor e mais aprofundado estudo de quais os biomarcadores mais adequados para cada órgão. Ficou também visível que a presença da alga afeta os resultados obtidos e esta merece também um estudo mais profundo e minucioso sobre as suas características e o que estas podem trazer para a aquacultura destes organismos. O tempo de recuperação no segundo ensaio foi diminuto apesar de algumas melhorias serem visíveis este deveria ser mais longo para uma total recuperação. Por fim, e tendo como foco o intestino podemos dizer que este órgão é um bom indicador da presença de ROS e de stress existente no camarão quando exposto a contaminantes pelo que deve ser o escolhido para a avaliação quando necessária.

Este trabalho apresentou algumas ferramentas que podem contribuir para uma melhor qualidade do produto de aquacultura, e também para uma possível forma de identificação de níveis de stress no meio de produção de forma a evitar elevadas perdas. Pois poderá ser possível detetar atempadamente a presença de contaminantes tornando assim este setor mais sustentável e evitando danos para os organismos.

7. Bibliografia

- Aalimahmoudi, M., Reyshahri, A., Salehipour Bavarsad, S., Maniat, M., & Mazdak Aalimahmoudi, C. (2016). Effects of feeding frequency on growth, feed conversion ratio, survival rate and water quality of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). *IJFAS*, 4(3), 293–297.
- Adamis, P. D. B., Gomes, D. S., Pinto, M. L. C. C., Panek, A. D., & Eleutherio, E. C. A. (2004, December 1). The role of glutathione transferases in cadmium stress. *Toxicology Letters*, 154(1–2), 81–88. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2004.07.003>
- Ahmad, I., Babitha Rani, A. M., Verma, A. K., & Maqsood, M. (2017). Biofloc technology: an emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. *Aquaculture International 2017* 25:3, 25(3), 1215–1226. <https://doi.org/10.1007/S10499-016-0108-8>
- Aji, Aboubakar; Surgun, Serdar; Dane, S. (2022). Exposure to Heavy Metals in Nigeria through Land, Water and Fish-Web of Science Core Collection. *Journal of Research in Medical and Dental Science*, 10(8), 28. <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000862589200010>
- Almeida, F., Schiavo, L. V., Vieira, A. D., Araújo, G. L., Queiroz-Junior, C. M., Teixeira, M. M., Cassali, G. D., & Tagliati, C. A. (2012). Gastroprotective and toxicological evaluation of the *Lithothamnion calcareum* algae. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1399–1404. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2012.02.028>
- Alves, Rômulo; Nishida, A. K. (2002). A ecdise do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* L. (Decapoda, Brachyura) na visão dos caranguejeiros. *Interciencia*, 27(3), 110–117. <https://doi.org/0378-1844/02/03/110-08> \$ 3.00/0
- Alves, R. R. D. N., & Nishida, A. K. (2002). A ecdise do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* L. (Decapoda, Brachyura) na visão dos caranguejeiros. *Current Anthropology*, 27(3), 110–117. <https://doi.org/10.1086/204722>
- Ambiente, A. P. do. (2022). *Relatório do Estado do Ambiente*. <https://rea.apambiente.pt/?language=pt-pt>
- Anderson, M. J., Gorley, R. N., & Clarke, K. R. (2008). *PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods*.
- António, F., & Gonçalves, P. (2019). *Aquacultura em Portugal - Principais fatores que contribuíram para a sua estagnação e perspetivas futuras*. <https://repositorio->

aberto.up.pt/handle/10216/118677

- Bagnyukova, T. V., Luzhna, L. I., Pogribny, I. P., & Lushchak, V. I. (2007). Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to arsenite. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48(8), 658–665. <https://doi.org/10.1002/EM.20328>
- Bebianno, M. J., G eret, F., Hoarau, P., Serafim, M. A., Coelho, M. R., Gnassia-Barelli, M., & Rom eo, M. (2004). Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: a potential bioindicator species. *Biomarkers : Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 9(4–5), 305–330. <https://doi.org/10.1080/13547500400017820>
- Beveridge, M. (2004). *Cage Aquaculture* (3rd ed.). Wiley-Blackwell.
- Blanchette, B., Feng, X., & Singh, B. R. (2007). Marine glutathione S-transferases. *Marine Biotechnology*, 9(5), 513–542. <https://doi.org/10.1007/S10126-007-9034-0>
- Bondad-Reantaso, M. G., Subasinghe, R. P., Josupeit, H., Cai, J., & Zhou, X. (2012). The role of crustacean fisheries and aquaculture in global food security: past, present and future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 158–165. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2012.03.010>
- Bonilla-Petriciolet, A., Mendoza-Castillo, D. I., & Reynel- vila, H. E. (2017). Adsorption processes for water treatment and purification. In *Adsorption Processes for Water Treatment and Purification*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-58136-1>
- Boyd, C. E., D’Abramo, L. R., Glencross, B. D., Huyben, D. C., Juarez, L. M., Lockwood, G. S., McNevin, A. A., Tacon, A. G. J., Teletchea, F., Tomasso, J. R., Tucker, C. S., & Valenti, W. C. (2020). Achieving sustainable aquaculture: Historical and current perspectives and future needs and challenges. *Journal of the World Aquaculture Society*, 51(3), 578–633. <https://doi.org/10.1111/JWAS.12714>
- Briggs, Mathew; Funge-Smith, Simon; Philips, Michael; Subasinghe, R. (2004). Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. In *FAO. Publica  o RAP*.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, 3(1), 3–8.
- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., & Viarengo, A. (2000a). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment*, 247(2–3), 295–311. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00499-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00499-4)

- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., & Viarengo, A. (2000b). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment*, *247*(2–3), 295–311. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00499-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00499-4)
- Carregosa, V., Figueira, E., Gil, A. M., Pereira, S., Pinto, J., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. (2014). Tolerance of *Venerupis philippinarum* to salinity: osmotic and metabolic aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, *171*, 36–43. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2014.02.009>
- Carvalho, E. A., & Nunes, A. J. P. (2006). Effects of feeding frequency on feed leaching loss and grow-out patterns of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed under a diurnal feeding regime in pond enclosures. *Aquaculture*, *252*(2–4), 494–502. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2005.07.013>
- Chalghmi, H., Zrafi, I., Gourves, P. Y., Bourdineaud, J. P., & Saidane-Mosbahi, D. (2016). Combined effects of metal contamination and abiotic parameters on biomarker responses in clam: *Ruditapes decussatus* gills: An integrated approach in biomonitoring of Tunis lagoon. *Environmental Science: Processes and Impacts*, *18*(7), 895–907. <https://doi.org/10.1039/C6EM00139D>
- Chhorn, L., & Webster, C. D. (2008). Tilapia: Biology, Culture and Nutrition. *African Journal of Aquatic Science*, *33*(1), 103–103. <https://doi.org/10.2989/AJAS.2008.33.1.14.415>
- Chouba, L., & Mzoughi, N. (2013). Assessment of heavy metals in sediment and in suspended particles affected by multiple anthropogenic contributions in harbours. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *10*(4), 779–788. <https://doi.org/10.1007/S13762-013-0233-0>
- Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, *11*(3), 315. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>
- Cremona, F., Planas, D., & Lucotte, M. (2008). Assessing the importance of macroinvertebrate trophic dead ends in the lower transfer of methylmercury in littoral food webs. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *65*(9), 2043–2052. <https://doi.org/10.1139/F08-116>
- Crespi, V., Aguilar-Manjarrez, J., Cai, J., Chromo, V., Franz, N., Lovatelli, A., & Subasinghe, R. P. (2015). Aquaculture Newsletter. *FAO*, *53*.
- Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C., & Guillaume, J. (2004). Nutrition of *Litopenaeus*

- vannamei reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*, 235(1–4), 513–551.
<https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2003.12.022>
- D, K., & P, T. (2015). Procedure for Maturation and Spawning of Imported shrimp *Litopenaeus* vannamei in Commercial Hatchery, South East Coast of India. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 06(04). <https://doi.org/10.4172/2150-3508.1000146>
- De Coen, W. M., & Janssen, C. R. (1997). The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6, 43–55.
- DGRM. (2014). *Plano estratégico para aquicultura portuguesa*.
- Díaz, V., Ibáñez, R., Gómez, P., Urriaga, A. M., & Ortiz, I. (2012). Kinetics of nitrogen compounds in a commercial marine Recirculating Aquaculture System. *Aquacultural Engineering*, 50, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.03.004>
- Ding, Z., Kong, Y., Zhang, Y., Li, J., Cao, F., Zhou, J., & Ye, J. (2017). Effect of feeding frequency on growth, body composition, antioxidant status and mRNA expression of immunodependent genes before or after ammonia-N stress in juvenile oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. *Fish & Shellfish Immunology*, 68, 428–434.
<https://doi.org/10.1016/J.FSI.2017.07.045>
- Downs, C. A., Fauth, J. E., & Woodley, C. M. (2001). Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: A molecular biomarker system. *Marine Biotechnology*, 3(4), 380–397. <https://doi.org/10.1007/S10126-001-0008-3>
- Duan, Y., Liu, Q., Wang, Y., Zhang, J., & Xiong, D. (2018). Impairment of the intestine barrier function in *Litopenaeus vannamei* exposed to ammonia and nitrite stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 78, 279–288. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2018.04.050>
- Duan, Y., Wang, Y., Liu, Q., Zhang, J., & Xiong, D. (2019). Changes in the intestine barrier function of *Litopenaeus vannamei* in response to pH stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 88, 142–149. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2019.02.047>
- Dugassa, H., & Gaetan, D. (2018). Biology of White Leg Shrimp , *Penaeus vannamei* : Review. *Journal of Fish and Marine Sciences*, 10(2), 05–17.
<https://doi.org/10.5829/idosi.wjfm.2018.05.17>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

- Estatística, I. nacional de. (2020). *ESTATÍSTICAS DA PESCA-2019*.
- Evensen, Ø. (2016). Development of fish vaccines: Focusing on methods. In *Birkhauser Advances in Infectious Diseases*. Springer Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0980-1_3
- Fao. (2016). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016*.
- FAO. (2017). *Aquaculture Newsletter* (FAO (ed.)). Rome.
- FAO. (2020). The state of world fisheries and aquaculture. In *FAO*.
<https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- FAO. (2022). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*. FAO.
<https://doi.org/10.4060/CC0461EN>
- Fernandes, A. C., Ribeiro, R., Rodrigues, S., & Fernandes, A. C. (2018). *Relatório do estado do ambiente PORTUGAL 2018*. <https://sniambgeoviewer.apambiente.pt/>
- Fernandes A.S., Caneiras C., Oliveira, N.G., Costa J., Cabral M.F., C. M. (2006). *CÁDMIO: Fontes de exposição e efeitos tóxicos para o homem*. <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-quimicos/cadmio.aspx>
- Fofonoff P. W., Ruiz G. M., Steves B., Simkanin C., C. J. T. (2018). *Penaeus Vannemei*. NEMESIS.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries and Aquaculture Department. (2018). *The state of world fisheries and aquaculture 2018 : meeting the sustainable development goals*.
https://books.google.com/books/about/The_State_of_World_Fisheries_and_Aquacul.html?hl=pt-PT&id=Y3hjDwAAQBAJ
- Freitas, R., Silvestro, S., Coppola, F., Meucci, V., Battaglia, F., Intorre, L., Soares, A. M. V. M., Pretti, C., & Faggio, C. (2019). Biochemical and physiological responses induced in *Mytilus galloprovincialis* after a chronic exposure to salicylic acid. *Aquatic Toxicology*, 214, 105258.
<https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2019.105258>
- Gagné, F., Blaise, C., Fournier, M., & Hansen, P. D. (2006). Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(2), 179–186.
<https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2006.01.008>
- Gautier, D., & Boyd, C. E. (2000). Effluent composition and water quality standards. *Department of Fisheries and Allied Aquacultures*.
- Gentry, R. R., Froehlich, H. E., Grimm, D., Kareiva, P., Parke, M., Rust, M., Gaines, S. D., & Halpern, B. S. (2017). Mapping the global potential for marine aquaculture. *Nature Ecology and Evolution*, 1(9), 1317–1324. <https://doi.org/10.1038/S41559-017-0257-9>

- Gersdor Jorgensen, L. Von. (2020). Zebrafish as a Model for Fish Diseases in Aquaculture. *Pathogens*, 609(9). <https://doi.org/10.3390/pathogens9080609>
- Gobe, G., & Crane, D. (2010). Mitochondria, reactive oxygen species and cadmium toxicity in the kidney. *Toxicology Letters*, 198(1), 49–55. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2010.04.013>
- Goetz, P. (2008). Phytothérapie de l'ostéoporose. *Phytotherapie*, 6(1), 33–38. <https://doi.org/10.1007/s10298-008-0283-5>
- Gravato, C., Teles, M., Oliveira, M., & Santos, M. A. (2006). Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla anguilla* L. - the influence of pre-exposure to β -naphthoflavone. *Chemosphere*, 65(10), 1821–1830. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2006.04.005>
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R., & Flanagan Jowsey, H. (2005). GLUTATHIONE TRANSFERASES. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 45, 51–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>
- Heinrichs, M. E., Mori, C., & Dlugosch, L. (2020). Complex Interactions Between Aquatic Organisms and Their Chemical Environment Elucidated from Different Perspectives. *YOUMARES 9 - The Oceans: Our Research, Our Future*, 279–297. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20389-4_15
- Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. *Functional Metabolism*, 319–368. <https://doi.org/10.1002/047167558X.CH12>
- Hermes-Lima, M., & Storey, K. B. (1993). In vitro oxidative inactivation of glutathione S-transferase from a freeze tolerant reptile. In *Molecular and Cellular Biochemistry* (Vol. 124, Issue 9). Kluwer Academic Publishers.
- Hoarau, G., Piquet, A. M. T., Van Der Veer, H. W., Rijnsdorp, A. D., Stam, W. T., & Olsen, J. L. (2004). Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in northern Europe: A comparison of resolving power between microsatellites and mitochondrial DNA data. *Journal of Sea Research*, 51(3–4), 183–190. <https://doi.org/10.1016/J.SEARES.2003.12.002>
- Hoguet, J., & Key, P. B. (2007). Activities of biomarkers in multiple life stages of the model crustacean, *Palaemonetes pugio*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 353(2), 235–244. <https://doi.org/10.1016/J.JEMBE.2007.09.011>
- Hua, K., Cobcroft, J. M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D. R., Mangott, A., Praeger, C., Vucko, M. J., Zeng, C., Zenger, K., & Strugnell, J. M. (2019). The Future of Aquatic Protein: Implications for Protein Sources in Aquaculture Diets. *One Earth*, 1(3), 316–329. <https://doi.org/10.1016/J.ONEEAR.2019.10.018>
- Jesus, J., Santos, S., & Rodrigues, A. L. (2011). Metais Pesados na Água. *Revista Lusófona de*

Ciência e Medicina Veterinária, 50, 18–22.

- Jha, P., C. Samal, A., C. Santra, S., & Dewanji, A. (2016). Heavy Metal Accumulation Potential of Some Wetland Plants Growing Naturally in the City of Kolkata, India. *American Journal of Plant Sciences*, 07(15), 2112–2137. <https://doi.org/10.4236/ajps.2016.715189>
- JP, W., & HC, C. (2004). Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chemosphere*, 57(11), 1591–1598. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2004.07.033>
- Jung, A. V., Cann, P. Le, Roig, B., Thomas, O., Baurès, E., & Thomas, M. F. (2014). Microbial contamination detection in water resources: interest of current optical methods, trends and needs in the context of climate change. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(4), 4292–4310. <https://doi.org/10.3390/IJERPH110404292>
- Katkov, E., & Fussmann, G. F. (2023). The effect of increasing temperature and pCO₂ on experimental pelagic freshwater communities. *Limnology and Oceanography*, 9999, 1–15. <https://doi.org/10.1002/LNO.12344>
- Kato, S., & Naito, Z. (1974). Glutathione S-Transferases: THE FIRST ENZYMATIC STEP IN MERCAPTURIC ACID FORMATION. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130–7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Kazlauskienė, N., & Vosyliene, M. Z. (2008). Characteristic Features of the Effect of Cu and Zn Mixtures on Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* in Ontogenesis. *Polish Journal of Environmental Studies*, 17(2), 291–293.
- LaCourse, E. J., Hernandez-Viadel, M., Jefferies, J. R., Svendsen, C., Spurgeon, D. J., Barrett, J., John Morgan, A., Kille, P., & Brophy, P. M. (2009). Glutathione transferase (GST) as a candidate molecular-based biomarker for soil toxin exposure in the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 157(8–9), 2459–2469. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2009.03.015>
- Li, Z. H., Velisek, J., Zlabek, V., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., & Randak, T. (2010). Hepatic antioxidant status and hematological parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after chronic exposure to carbamazepine. *Chemico-Biological Interactions*, 183(1), 98–104. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2009.09.009>
- Liu, B., Zhu, X., Lei, W., Yang, Y., Han, D., Jin, J., & Xie, S. (2012). Effects of different weaning strategies on survival and growth in Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris* Günther) larvae. *Aquaculture*, 364–365, 13–18. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2012.04.051>

- Liu, G., Zhu, S., Liu, D., Guo, X., & Ye, Z. (2017). Effects of stocking density of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) on immunities, antioxidant status, and resistance against *Vibrio harveyi* in a biofloc system. *Fish and Shellfish Immunology*, *67*, 19–26.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.038>
- Liu, J., Corton, C., Dix, D. J., Liu, Y., Waalkes, M. P., & Klaassen, C. D. (2001). Genetic background but not metallothionein phenotype dictates sensitivity to cadmium-induced testicular injury in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *176*(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1006/TAAP.2001.9262>
- Livingstone, M. B. E., & Black, A. E. (2003). Markers of the validity of reported energy intake. *The Journal of Nutrition*, *133 Suppl 3*(3 SUPPL.). <https://doi.org/10.1093/JN/133.3.895S>
- Lotze, H. K., Lenihan, H. S., Bourque, B. J., Bradbury, R. H., Cooke, R. G., Kay, M. C., Kidwell, S. M., Kirby, M. X., Peterson, C. H., & Jackson, J. B. C. (2006). Depletion degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. *Science*, *312*(5781), 1806–1809.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1128035>
- Luoma, S. N., & Rainbow, P. S. (2005). Why Is Metal Bioaccumulation So Variable? Biodynamics as a Unifying Concept. *Environmental Science and Technology*, *39*(7), 1921–1931.
<https://doi.org/10.1021/ES048947E>
- Maia, M. L., Almeida, A., Soares, C., Silva, L. M. S., Delerue-Matos, C., Calhau, C., & Domingues, V. F. (2022). Minerals and fatty acids profile of Northwest Portuguese coast shrimps. *Journal of Food Composition and Analysis*, *112*, 104652. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2022.104652>
- Manly, B. J. . (2008). *Métodos Estatísticos Multivariados - Uma Introdução* (3rd editio). Porto Alegre: Artmed. <https://azdoc.tips/download/metodos-estatisticos-multivariados-uma-introducao-5c177879edee3?hash=8dd46a459d68987eb62587772547e02c>
- Martínez-Córdova, L. R., López-Elías, J. A., Leyva-Miranda, G., Armenta-Ayón, L., & Martínez-Porchas, M. (2011). Bioremediation and reuse of shrimp aquaculture effluents to farm whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* : a first approach. *Aquaculture Research*, *42*(10), 1415–1423. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2109.2010.02730.X>
- McCarthy, J. F., & Shugart, L. R. (2019). Biological Markers of Environmental Contamination. *Biomarkers of Environmental Contamination*, 3–14.
<https://doi.org/10.1201/9781351070263-2>
- Menezes, J. (2000). *Manual sobre doenças de peixes ósseos* (IPIMAR (ed.); 3rd editio). publicações avulsas do IPIMAR.
- Mennillo, E., Casu, V., Tardelli, F., De Marchi, L., Freitas, R., & Pretti, C. (2017). Suitability of

- cholinesterase of polychaete *Diopatra neapolitana* as biomarker of exposure to pesticides: In vitro characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP*, 191, 152–159. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2016.10.007>
- Monserrat, J. M., Martínez, P. E., Geracitano, L. A., Lund Amado, L., Martinez Gaspar Martins, C., Lopes Leães Pinho, G., Soares Chaves, I., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., & Bianchini, A. (2007). Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 146(1-2 SPEC. ISS.), 221–234. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2006.08.012>
- Moorhead, J. A., & Zeng, C. (2017). Weaning captive bred forktail blenny, *Meiacanthus atrodorsalis*, to a commercial formulated diet: Optimizing timing, feeding frequency and ration. *Aquaculture*, 473, 259–265. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2017.01.032>
- Mosqueira, M., Maria, M., & Bonneville, G. (2021). *Potencial da aquacultura offshore ou em zonas costeiras de Portugal*.
- Mozaffarian, D., & Rimm, E. B. (2006). Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA*, 296(15), 1885–1899. <https://doi.org/10.1001/JAMA.296.15.1885>
- Nair, A. R., DeGheselle, O., Smeets, K., Van Kerkhove, E., & Cuypers, A. (2013). Cadmium-Induced Pathologies: Where Is the Oxidative Balance Lost (or Not)? *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 6116–6143. <https://doi.org/10.3390/IJMS14036116>
- Navarro-Guillén, C., Yúfera, M., & Engrola, S. (2017). Daily feeding and protein metabolism rhythms in Senegalese sole post-larvae. *Biology Open*, 6(1), 77–82. <https://doi.org/10.1242/BIO.021642>
- Nordic Council of Ministers. (2003). Cadmium Review. *Cowi*, 4, 26.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Oliveira, M., Ahmad, I., Maria, V. L., Pacheco, M., & Santos, M. A. (2010). Antioxidant Responses Versus DNA Damage and Lipid Peroxidation in Golden Grey Mullet Liver: A Field Study at Ria de Aveiro (Portugal). *Springer Science+business*, 59, 454–463. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9491-8>
- Organisation), F. A. O. (Food & A. (2018). The state of world fisheries and aquaculture- Meeting the sustainable goals. *Nature and Resources*, 210.
- Paézpaéz-Osuna, F. (2001). *The Environmental Impact of Shrimp Aquaculture: Causes, Effects, and*

- Mitigating Alternatives*. <https://doi.org/10.1007/s002670010212>
- Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70(1), 158–169. <https://doi.org/10.5555/URI:PII:0022214367900765>
- Pan, J. F., Buffet, P. E., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Gilliland, D., Joubert, Y., Pilet, P., Guibbolini, M., Risso De Faverney, C., Roméo, M., Valsami-Jones, E., & Mouneyrac, C. (2012). Size dependent bioaccumulation and ecotoxicity of gold nanoparticles in an endobenthic invertebrate: The Tellinid clam *Scrobicularia plana*. *Environmental Pollution*, 168, 37–43. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2012.03.051>
- Parimi, S., & Sreeram, A. (2018). Agility in the Factors Effecting the Quality and Safety of Fish Products. *Indian Journal of Commerce & Management Studies*, IX(2), 1. <https://doi.org/10.18843/IJCMS/V9I2/01>
- Patra, R. C., Rautray, A. K., & Swarup, D. (2011). Oxidative Stress in Lead and Cadmium Toxicity and Its Amelioration. *Veterinary Medicine International*, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/457327>
- Pourahmad, J., & O'Brien, P. J. (2000). A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu²⁺ and Cd²⁺. *Toxicology*, 143(3), 263–273. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(99\)00178-X](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(99)00178-X)
- Qiu, J., Wang, W. N., Wang, L. J., Liu, Y. F., & Wang, A. L. (2011). Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* exposed to acute low temperature stress. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 154(1), 36–41. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2011.02.007>
- Rajkumar, J. S. I. (2013). Reduced glutathione and acetylcholinesterase expressions in *Perna indica* exposed to trivalent arsenic. *International Journal of Biological Research*, 1(1). <https://doi.org/10.14419/IJBR.V1I1.703>
- Robles, R., & Mylonas, C. (2017). Exploring the biological and socio-economic potential of new/emerging candidate fish species for the expansion of the European aquaculture industry. *Impact*, 2017(1), 14–16. <https://doi.org/10.21820/23987073.2017.1.14>
- Rocha, R. J. M., & Dinis, M. T. (2019). Aquacultura Sustentável: da subsistência à produção comercial. In *Captar* (1647-323X, Vol. 8, Issue 1).
- Rubio, C., Hardisson, A., Reguera, J. I., Revert, C., Lafuente, M. A., & González-Iglesias, T. (2006). Cadmium dietary intake in the Canary Islands, Spain. *Environmental Research*, 100(1), 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.01.008>

- Saavedra, M., Pereira, T. G., Carvalho, L. M., Pousão-Ferreira, P., Grade, A., Teixeira, B., Quental-Ferreira, H., Mendes, R., Bandarra, N., & Gonçalves, A. (2017). Wild and farmed meagre, *Argyrosomus regius*: A nutritional, sensory and histological assessment of quality differences. *Journal of Food Composition and Analysis*, *63*, 8–14.
<https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2017.07.028>
- Salvador, R., & Ferreira, A. M. (2018). O PROJETO DE EXTENSÃO OPORTUNIDADE (S) PARA PORTUGAL PLATAFORMA CONTINENTAL. *25*, 538–546.
- Santi, A., Menezes, C., Duarte, M., Leitemperger, J., Lópes, T., & Loro, V. (2011). Oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in human erythrocytes exposed to clomazone (in vitro). *Interdisciplinary Toxicology*, *4*(3), 149–153. <https://doi.org/10.2478/V10102-011-0023-9>
- Sanudin, N., Tuzan, A. D., & Yong, A. S. K. (2014). Feeding Activity and Growth Performance of Shrimp Post Larvae *Litopenaeus vannamei* Under Light and Dark Condition. *Journal of Agricultural Science*, *6*(11). <https://doi.org/10.5539/JAS.V6N11P103>
- Selvakumar, E., Prahalathan, C., Sudharsan, P. T., & Varalakshmi, P. (2006). Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. *Toxicology*, *217*(1), 71–78. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2005.08.020>
- Shah, M. R., Lutzu, G. A., Alam, A., Sarker, P., Kabir Chowdhury, M. A., Parsaeimehr, A., Liang, Y., & Daroch, M. (2017). Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology* *2017 30:1*, *30*(1), 197–213. <https://doi.org/10.1007/S10811-017-1234-Z>
- Shen, H., Dou, Y., Li, H., Qiao, Y., Jiang, G., Wan, X., Cheng, J., Fan, X., Li, H., Wang, L., Shi, W., Qin, Y., & Shen, J. (2022). Changes in the intestinal microbiota of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) with different severities of *Enterocytozoon hepatopenaei* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, *191*(January), 107763.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2022.107763>
- Silva, H. A., & Irineu, B. (2008). Produção, salubridade e comercialização de moluscos bivalves em Portugal. *Publicações Avulsas Do IPIMAR*, *Nº20*.
- Sohel, M. S. I., & Ullah, M. H. (2012). Ecohydrology: A framework for overcoming the environmental impacts of shrimp aquaculture on the coastal zone of Bangladesh. *Ocean & Coastal Management*, *63*, 67–78. <https://doi.org/10.1016/J.OCECOAMAN.2012.03.014>
- Sokolova, I. M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., & Sukhotin, A. A. (2012). Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic

- invertebrates. *Marine Environmental Research*, 79, 1–15.
<https://doi.org/10.1016/J.MARENRES.2012.04.003>
- Sommer, N. P. (2019). Evaluation of Nematodes and Artificial Artemia as Feed for Pacific White Shrimp in a Biofloc Nursery System Evaluation of Nematodes and Artificial Artemia as Feed for Pacific White Shrimp in a Biofloc Nursery System. In *Msc. thesis, University of Algarve, Faro, Portugal* (Issue January).
- Song, Y., Choi, M. S., Lee, J. Y., & Jang, D. J. (2014). Regional background concentrations of heavy metals (Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Pb) in coastal sediments of the South Sea of Korea. *Science of the Total Environment*, 482–483(1), 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.068>
- Stankiewicz, A., Skrzydlewska, E., & Makiela, M. (2002). Effects of amifostine on liver oxidative stress caused by cyclophosphamide administration to rats. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 19(2), 67–82.
<https://doi.org/10.1515/DMDI.2002.19.2.67/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- Studer, B. (2018). *FishEthoBase: Litopenaeus vannamei*. <http://fishethobase.net/db/21/>
- Toh, S. C., Lihan, S., Soh, K. M., Uyub, N., Chai, L. C., & Müller, M. (2018). Screening and characterisation of two *Pseudomonas aeruginosa* from aquaculture and water environment. *Malaysian Journal of Microbiology*, 14(2), 329–334. <https://doi.org/10.21161/MJM.144186>
- Truninger, M., Baptista, J. A., Evans, D. M., Jackson, P., & Nunes, N. C. (2020). What is a Fresh Fish? Knowledge and Lived Experience in the UK and Portugal. *Sustaining Seas: Oceanic Space and the Politics of Care*, 87–98.
- Tu, H. T., Silvestre, F., Meulder, B. De, Thome, J. P., Phuong, N. T., & Kestemont, P. (2012). Combined effects of deltamethrin, temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Chemosphere*, 86(1), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.09.022>
- Tumminello, M., Lillo, F., & Mantegna, R. N. (2010). Correlation, hierarchies, and networks in financial markets. *Journal of Economic Behavior and Organization*, 75(1), 40–58.
<https://doi.org/10.1016/j.jebo.2010.01.004>
- Valencia-Castañeda, G., Frías-Espericueta, M. G., Vanegas-Pérez, R. C., Pérez-Ramírez, J. A., Chávez-Sánchez, M. C., & Páez-Osuna, F. (2018). Acute Toxicity of Ammonia, Nitrite and Nitrate to Shrimp *Litopenaeus vannamei* Postlarvae in Low-Salinity Water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 101(2), 229–234.
<https://doi.org/10.1007/S00128-018-2355-Z/TABLES/3>
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003a). Fish bioaccumulation and biomarkers in

- environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003b). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. In *Environmental Toxicology and Pharmacology* (Vol. 13, Issue 2). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Vasseur, P., & Cossu-Leguille, C. (2006). Linking molecular interactions to consequent effects of persistent organic pollutants (POPs) upon populations. *Chemosphere*, 62(7), 1033–1042. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2005.05.043>
- Vicente-Martorell, J. J., Galindo-Riaño, M. D., García-Vargas, M., & Granado-Castro, M. D. (2009). Bioavailability of heavy metals monitoring water, sediments and fish species from a polluted estuary. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2–3), 823–836. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2008.05.106>
- Wang, L., Renault, G., Garreau, H., & Jacquet, M. (2004). Stress induces depletion of Cdc25p and decreases the cAMP producing capability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 150(10), 3383–3391. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27162-0>
- Wang, Y., Huang, Q., Lemckert, C., & Ma, Y. (2017). Laboratory and field magnetic evaluation of the heavy metal contamination on Shilaoren Beach, China. *Marine Pollution Bulletin*, 117(1–2), 291–301. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.080>
- Werneck, P. R., Lopes, N. M. M., De Moraes, K. R., Faustino, A., & Morgado, F. (2012). Histopathologic Analysis of Gills of *Solea solea* and *Solea senegalensis* Wild Marine and Aquaculture Populations. *Microscopy and Microanalysis*, 18(S5), 51–52. <https://doi.org/10.1017/S1431927612012913>
- Wu, Jui-Pin; Chen, Hon-Cheng; Huang, D.-J. (2008). Histopathological and biochemical evidence of hepatopancreatic toxicity caused by cadmium and zinc in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Chemosphere*, 73(7), 1019–1026. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.08.019>
- Yu, Y. ying, Chen, S. jun, Chen, M., Tian, L. xia, Niu, J., Liu, Y. jian, & Xu, D. hui. (2016). Effect of cadmium-polluted diet on growth, salinity stress, hepatotoxicity of juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Protective effect of Zn(II)-curcumin. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 125, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.043>
- Zeng, S., Huang, Z., Hou, D., Liu, J., Weng, S., & He, J. (2017). Composition, diversity and function of intestinal microbiota in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different culture stages. *PeerJ*, 2017(11). <https://doi.org/10.7717/peerj.3986>

Zhang, P., Zhang, X., Li, J., & Huang, G. (2006). The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*, 256(1–4), 579–587.

<https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2006.02.020>

Zhang, X., Yuan, J., Sun, Y., Li, S., Gao, Y., Yu, Y., Liu, C., Wang, Q., Lv, X., Zhang, X., Ma, K. Y., Wang, X., Lin, W., Wang, L., Zhu, X., Zhang, C., Zhang, J., Jin, S., Yu, K., ... Xiang, J. (2019). Penaeid shrimp genome provides insights into benthic adaptation and frequent molting. *Nature Communications* 2019 10:1, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08197-4>

8. Anexos

8.1. Estágio

Os ensaios deste trabalho foram realizados num estágio de aproximadamente 5 meses na empresa RiaSearch. Esta empresa foi fundada em 2016 e localiza-se no Cais da Ribeira de Pardelhas, Murtosa, Aveiro, Portugal (Figura 18). É uma empresa de investigação, desenvolvimento e inovação em aquacultura, apresenta uma equipa especializada em conduzir ensaios de pesquisas relacionadas com a nutrição, crescimento e saúde tanto em crustáceos como em peixes. Para o desenvolvimento dos vários projetos nas suas instalações esta empresa colabora com vários parceiros industriais e instituições governamentais.



Figura 18 Mapa da localização da empresa Riasearch (fonte: cm.murtosa).

As instalações da RiaSearch estão divididas em quatro setores principais: uma sala para ensaios de alimentação e crescimento, uma área para tratamento de águas, uma estufa e o laboratório/escritório. No local de realização de ensaios encontram-se um total de cinquenta e cinco tanques circulares de 200-350L (Figura 19) podendo ser utilizados num único sistema ou em 2 sistemas independentes, e doze retangulares com 160L em sistemas de RAS. Na área de tratamento de água localiza-se todo o equipamento utilizado na recolha, tratamento e monitorização da mesma, incluindo as bombas usadas para a circulação da água pelo sistema.

No exterior está instalada uma estufa dividida em 2 zonas, uma zona para cultivo de plantas halófitas e uma para cultivo de crustáceos em RAS onde se encontram 12 tanques retangulares com um volume de 50 L para a realização de ensaios experimentais com PLs, assim como 4

tanques circulares de 600L para a aclimação, quarentena ou crescimento, podendo funcionar ainda como stock para o armazenamento temporário de pós-larvas, a zona de cultivo de plantas contem atualmente 9 leiras para cultivo de *Salicornia ramosissima*.

Por fim no laboratório são realizados os testes de qualidade da água bem como a pesagem da quantidade de dieta necessária diariamente para alimentar os tanques, na área de escritório há um sistema SCADA que é um sistema automático que controla os níveis de oxigénio, as bombas e a temperatura 24h por dia com um alarme associado.



Figura 19. Biotério da empresa (local da realização de ensaios), tanques retangulares (à direita) e tanques circulares (à esquerda) (Fonte: www.riasearch.pt)

Os sistemas desta unidade funcionam em sistema fechado de recirculação (do inglês RAS – Recirculating Aquaculture System), o que significa que apenas uma pequena percentagem de água dos tanques é substituída diariamente por água nova. O volume de água utilizado no sistema é continuamente tratado, sendo forçado a passar por uma combinação de processos físicos e biológicos. Como referido dispõe de três sistemas RAS independentes que permitem uma enorme flexibilidade em vários parâmetros ambientais, fornecendo condições experimentais controladas, sendo possível manipular a salinidade, temperatura e níveis de oxigénio, de modo a garantir as melhores condições à espécie a produzir, reduzindo o stress e maximizando o crescimento.

Atualmente esta empresa tem executado ensaios experimentais de nutrição com várias espécies, como o robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), a dourada (*Sparus aurata*) e linguado (*Solea senegalensis*), mas dedica-se principalmente ao camarão-branco (*Penaeus vannamei*), espécie utilizada ao longo deste trabalho. Para além disto, está também em curso um ensaio de crescimento com holófitas e a sua incorporação em dietas.