



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DO MÚSCULO ADUTOR DE
JUVENIS E ADULTOS DE VIEIRAS *Nodipecten nodosus*
(LINNAEUS, 1758) EXPOSTAS AO AR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy

Roberta da Rosa Marques Moraes

Florianópolis, 2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

MORAES, ROBERTA DA ROSA MARQUES
RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DO MÚSCULO ADUTOR DE JUVENIS E
ADULTOS DE VIEIRAS *Nodipecten nodosus* (LINNAEUS, 1758)
EXPOSTAS AO AR [dissertação] / ROBERTA DA ROSA MARQUES
MORAES ; orientador, AFONSO CELSO DIAS BAINY -
Florianópolis, SC, 2012.
48 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. *Nodipecten nodosus*. 3. Metabolismo
anaeróbico. 4. Músculo adutor. 5. Exposição ao ar. I. BAINY,
AFONSO CELSO DIAS . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III.
Título.

**Respostas bioquímicas do músculo adutor de juvenis e adultos de
vieiras *Nodipecten nodosus* (LINNAEUS, 1758) expostas ao ar**

Por

ROBERTA DA ROSA MARQUES MORAES

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aqüicultura.

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Afonso Celso Dias Bainy – *Orientador*

Dr. Gilberto Caetano Manzoni

Dr. Jaime Fernando Ferreira

AGRADECIMENTOS

"... O meu máximo respeito e admiração a todos os engenheiros, especialmente ao maior de todos eles: DEUS." (Edison, 1847-1931).

Ao meu pai e minha mãe (*in memoriam*), por todo o amor, carinho e principalmente a educação que me fizeram forte para enfrentar as dificuldades e alcançar meus objetivos.

A toda minha família, pelo apoio, carinho, ensinamentos e por sempre, de alguma maneira terem colaborado por mais essa conquista.

Ao meu namorado Rodrigo Soares, pelo amor, carinho, paciência, compreensão, ajuda na logística, na solução dos imprevistos durante o experimento e por estar sempre ao meu lado.

Ao meu orientador Afonso Bairy, pelo apoio e oportunidade de realizar o trabalho com as vieiras, pela sinceridade, paciência e compreensão para realizar o novo e promissor delineamento experimental.

Ao "co-orientador" Jacó Mattos, pelo conhecimento, paciência (muita paciência!) e disposição para me ajudar a desvendar o mundo bioquímico das vieiras.

Ao professor Jaime Fernando Ferreira, por todo apoio logístico e intelectual prestados em todas as fases da dissertação.

Ao professor Gilberto Manzoni, pelo pronto atendimento à assistência logística e por compor a banca examinadora.

À professora Maria Risoleta Marques, pela formação da banca examinadora.

À Marisa Bercht, por estar sempre disposta em ajudar no desenvolvimento dos experimentos e da ciência.

Ao Eduardo Cargini Ferreira pelas discussões e disposição na colaboração do trabalho.

A toda equipe "labcaiana", em especial ao Clei, Elisa, Fabrício, Flávia, Ísis, Jacó, Lila, Maya, Miguel e Rômi, que me ajudaram a desenvolver o

delineamento experimental, dissecar, homogenizar (e muito!) e analisar as 448 vieiras.

A toda equipe do LMM, em especial ao Caio, Carlos Henrique e Chico, pela paciência e auxílio durante a nossa "invasão" no laboratório.

Ao Dr. Hernán Perez e Dra. Katherina Brokordt, por terem me recebido e fornecido importante auxílio intelectual para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus amigos chilenos: Javier, Lorena e Roberto pelo intercâmbio de conhecimentos aquícolas, principalmente sobre *ostiones*, pela amizade e por sempre me receber tão bem.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o mestrado.

"O que sabemos é uma gota, o que ignoramos um imenso oceano. A admirável disposição do universo, não pode senão sair do plano de um ser onisciente e onipotente." (Newton, 1643-1727).

" Nada é bastante para quem considera pouco
o que é suficiente."

(Kung Fu Tse)

RESUMO

A vieira *Nodipecten nodosus* é um organismo nativo do Brasil, de vida livre, com capacidade de propulsão por jato de água que permite natação e fuga em resposta a ameaças de predadores ou condições ambientais desfavoráveis e busca de alimento. Na malacocultura as vieiras apresentam um grande potencial de comercialização, devido ao seu valor e receptividade do produto. O cultivo de *N. nodosus* no Brasil, entretanto, encontra entraves, entre eles o alto custo, em parte pela necessidade do manejo dos animais ser imerso em água marinha para evitar a mortalidade por dessecação. A fim de analisar sua reação em diferentes períodos de exposição ao ar, vieiras juvenis e adultas foram expostas ao ar durante 2, 4, 8 e 12 horas e posteriormente regressadas à imersão em condições controladas de salinidade (33), temperatura (21,5°C) e oxigênio (6 mg.L⁻¹). Foram analisadas as atividades das enzimas arginina quinase (AK), piruvato quinase (PK) e octopina desidrogenase (ODH) e quantificado bioquimicamente os níveis de glicogênio do músculo adutor dos animais expostos ao ar e regressos à água durante 1, 2 e 7 dias. A sobrevivência foi verificada diariamente até 14 dias após a exposição. Juvenis de *N. nodosus* apresentaram um aumento das atividades da AK (15,61 U x mg⁻¹ proteína) e ODH (539,34 U x mg⁻¹ proteína) e diminuição da concentração de glicogênio após 12h (2,56 mg U glicosil x g⁻¹ tecido úmido) de exposição ao ar. No entanto, os adultos não apresentaram alteração na concentração de glicogênio, a atividade da PK diminuiu em 8h (302,41 U x mg⁻¹ proteína) de exposição ao ar e uma mortalidade de 60% foi observada nos animais expostos ao ar por 12h. Os juvenis expostos ao ar por 12 horas apresentaram uma reação para manutenção da atividade anaeróbica, enquanto os adultos não apresentaram alteração significativa na atividade das enzimas analisadas, sugerindo que a mortalidade possa estar relacionada a características morfofisiológicas destes animais no retorno ao ambiente controlado.

Palavras-chave: Exposição ao ar, Músculo adutor, Metabolismo anaeróbico, *Nodipecten nodosus*.

ABSTRACT

Nodipecten nodosus scallops, a native and free-living organism in Brazil, have propulsion waterjet performance that allows swimming and escape in response to threats from predators or unfavorable environmental conditions and search for food. In malacoculture, scallops represent a large potential for commercialization because of their value and acceptability of the product. Among the many factors that hinder the cultivation of scallops *N. nodosus* in Brazil is the need for handling the organisms immersed in seawater to prevent death by desiccation. In order to analyze the reaction of scallops in different periods of exposure to air, juvenile and adult scallops were exposed to air for 2, 4, 8 and 12 hours and subsequently regressed to immersion in controlled laboratory conditions. We evaluated the enzyme activities of arginine kinase (AK), pyruvate kinase (PK) and octopine dehydrogenase (ODH), the biochemical concentration of glycogen of the scallop adductor muscle exposed to air and subsequent recovery at 1, 2 and 7 days. Survival was assessed daily up to 14 days after exposure. Juveniles of *N. nodosus* showed an increase in AK ($15,61 \text{ U} \times \text{mg}^{-1}$ protein) and ODH ($539,34 \text{ U} \times \text{mg}^{-1}$ protein) activity and decreased glycogen concentration after 12 hours ($2,56 \text{ mg U glucosyl} \times \text{g}^{-1}$ wet mass) of exposure to air. However, adults showed no change in glycogen concentration, PK activity decreased after 8h ($302,41 \text{ U} \times \text{mg}^{-1}$ protein) in animals exposed to air and mortality was observed in 60% of these animals subjected to exposure to air for 12h. Juveniles exposed to air for 12 hours, showed a reaction to maintain the anaerobic activity, while adults showed no significant change in the activity of enzymes analyzed, suggesting that mortality may be associated to morphological and physiological characteristics of the animals on return to controlled environment.

Keywords: Air exposure, Adductor muscle, Anaerobic metabolism, *Nodipecten nodosus*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Exemplar de vieira *Nodipecten nodosus* (barra=1,3 cm)..... 21
- Figura 2: Evolução da produção de vieiras comercializadas em Santa Catarina entre 2006 e 2010 (t). Fonte: EPAGRI, 2010. Síntese Informativa da Maricultura. 21
- Figura 3: Músculo adutor e gônada da vieira *Nodipecten nodosus*. (barra=1,3 cm)..... 21
- Figura 4: Degradação aeróbica e anaeróbica do glicogênio em invertebrados. Fonte: Adaptado de Huss (1995). 24
- Figura 5: Via Glicolítica e os diferentes produtos finais a partir da glicólise anaeróbica. 25
- Figura 6: Atividades enzimáticas (U x mg⁻¹ proteína) (U = μmol substrato convertido em produto x min⁻¹) Arginina quinase (A), Octopina desidrogenase (B), Piruvato quinase (C) e concentração (mg U glicosil x g⁻¹ tecido úmido) de glicogênio (D) no músculo adutor de adultos e juvenis de vieira *Nodipecten nodosus* expostos ao ar por 2, 4, 8 e 12h. Os valores estão como média ± desvio padrão e as diferenças significativas (p < 0,05) foram identificadas por asterisco (*). 34
- Figura 7: Atividade Arginina quinase (AK) (U x mg⁻¹ proteína) (U = μmol substrato convertido em produto x min⁻¹) no músculo adutor de adultos e juvenis de vieira *Nodipecten nodosus* expostos ao ar por 2h (A), 4h (B), 8h (C) e 12h (D) e recuperação em 1, 2 e 7 dias. Os valores estão como média ± desvio padrão e as diferenças significativas (p < 0,05) foram identificadas por asterisco (*). 34
- Figura 8: Atividade Octopina desidrogenase (ODH) (U x mg⁻¹ proteína) (U = μmol substrato convertido em produto x min⁻¹) no

músculo adutor de adultos e juvenis de vieira *Nodipecten nodosus* expostos ao ar por 2h (A), 4h (B), 8h (C) e 12h (D) e recuperação em 1, 2 e 7 dias. Os valores estão como média ± desvio padrão e as diferenças significativas ($p < 0,05$) foram identificadas por asterisco (*)..... 35

Figura 9: Atividade Piruvato quinase (PK) (U x mg⁻¹ proteína) (U = μmol substrato convertido em produto x min⁻¹) no músculo adutor de adultos e juvenis de vieira *Nodipecten nodosus* expostos ao ar por 2h (A), 4h (B), 8h (C) e 12h (D) e recuperação em 1, 2 e 7 dias. Os valores estão como média ± desvio padrão e as diferenças significativas ($p < 0,05$) foram identificadas por asterisco (*)..... 35

Figura 10: Concentração de glicogênio (mg U glicosil x g⁻¹ tecido úmido) do músculo adutor de adultos e juvenis de vieira *Nodipecten nodosus* expostos ao ar por 2h (A), 4h (B), 8h (C) e 12h (D) e recuperação em 1, 2 e 7 dias Os valores estão como média ± desvio padrão e as diferenças significativas ($p < 0,05$) foram identificadas por asterisco (*)..... 36

Figura 11: Sobrevivência (%) de adultos (A) e juvenis (B) de *Nodipecten nodosus* em recuperação (14 dias) após exposição ao ar (T2, T4, T8, T12)..... 36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP – Adenosina Difosfato.

AK – Arginina Quinase.

ATP – Adenosina Trifosfato.

CEDAP - Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca.

DTT – Ditioneitol

EDTA-Na₂ – Ácido Etileno Diamino Tetracético

EGTA – Ácido Etileno Glicol Tetracético.

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina.

HCl – Ácido Clorídrico.

IED-BIG – Instituto de Eco-desenvolvimento da Baía da Ilha Grande.

KCl – Cloreto de Potássio.

KCN – Cianeto de Potássio.

LABCAI - Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica.

LDH - Lactato Desidrogenase.

LMM – Laboratório de Moluscos Marinhos.

MgSO₄ – Sulfato de Magnésio.

NAD – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo.

NEPAQ – Núcleo de Estudos em Patologia Aquática.

ODH – Octopina Desidrogenase.

PEP – Fosfoenolpiruvato.

PK – Piruvato Quinase.

PK/LDH – Piruvato Quinase/Lactato Desidrogenase.

SC – Santa Catarina.

t – Toneladas.

TCA – Ácido Tricloroacético.

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina.

SUMÁRIO

| | | |
|---------|--|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 | CULTIVO DE <i>NODIPECTEN NODOSUS</i> | 19 |
| 1.2 | O MÚSCULO ADUTOR DA VIEIRA <i>NODIPECTEN NODOSUS</i> | 22 |
| 1.3 | METABOLISMO ANAERÓBICO DE PECTINÍDEOS | 22 |
| 2. | OBJETIVOS | 26 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 26 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 26 |
| 3. | RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DO MÚSCULO ADUTOR DE JUVENIS E ADULTOS DE VIEIRAS <i>NODIPECTEN NODOSUS</i> EXPOSTOS AO AR | 27 |
| 3.1 | INTRODUÇÃO | 28 |
| 3.2 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 30 |
| 3.2.1 | <i>Delineamento Experimental</i> | 30 |
| 3.2.2 | <i>Ensaio Enzimáticos</i> | 31 |
| 3.2.2.1 | <i>Arginina quinase (AK) (EC 2.7.3.3)</i> | 31 |
| 3.2.2.2 | <i>Octopina desidrogenase (ODH) (EC 1.5.1.11)</i> | 31 |
| 3.2.2.3 | <i>Piruvato quinase (PK) (EC 2.7.1.40)</i> | 31 |
| 3.2.3 | <i>Análise de Proteínas</i> | 32 |
| 3.2.4 | <i>Glicogênio</i> | 32 |
| 3.2.5 | <i>Análises Estatísticas</i> | 32 |
| 3.3 | RESULTADOS | 32 |
| 3.4 | DISCUSSÃO | 37 |
| 3.5 | CONCLUSÕES | 40 |
| 3.6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 41 |
| 4. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO | 45 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cultivo de *Nodipecten nodosus*

Os pectinídeos são moluscos bivalves comumente conhecidos como vieiras, "ostiones" ou "scallops". Espécies da família Pectinidae são encontradas em todos os oceanos, sendo que as comercialmente importantes ocorrem em águas costeiras da plataforma continental (BRAND, 1991).

As vieiras são organismos de grande interesse para o desenvolvimento da aquicultura mundial. Na malacocultura elas apresentam maior valor agregado e potencial para comercialização, com boa receptividade do produto. Na última década, a exportação mundial de vieiras passou de 438.779t para 721.714t, representando 1,3% do total das exportações dentre os moluscos cultivados (FAO, 2010).

No Brasil são encontrados 5 gêneros e 15 espécies da família Pectinidae (RIOS, 2009). A ausência de estoques naturais significativos e a escassa população natural, entretanto, dificultam a exploração pesqueira dessas espécies. A vieira *Nodipecten nodosus* (Figura 1) é um exemplar, dentre os pectinídeos, que ocorre naturalmente desde a América Central, Colômbia e Venezuela, até o sul do Rio de Janeiro (SMITH, 1991) e águas subtropicais de Santa Catarina (RUPP; PARSONS, 2006).

A vieira *N. nodosus* se destaca pelo potencial para cultivo, devido à alta taxa de crescimento, podendo ser explorada de forma sustentável através da aquicultura. É uma espécie moderadamente euritérmica e estenoalina, no entanto, as condições ótimas de seu cultivo ocorrem entre 20 e 24°C (LAGREZE-SQUELLA, 2008) com salinidade superior ao limite sub-letal de 29 (RUPP; PARSONS, 2004).

Em Santa Catarina, o cultivo de moluscos marinhos é uma atividade econômica bem desenvolvida e de grande importância socioeconômica (MANZONI, 2005). A produção catarinense de moluscos confere ao estado, o segundo maior produtor da América Latina. Com base nesse potencial, o Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) iniciou em 1990 estudos para produção de sementes da vieira *N. nodosus*, a fim de fornecer subsídios para ampliar a atividade aquícola da região (RUPP; BEM, 2004). Em 2006 o cultivo da espécie foi fomentado pelo Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca (CEDAP/EPAGRI).

Além dos estudos catarinenses, o Rio de Janeiro também desenvolve pesquisas e a produção de sementes de vieira *N. nodosus*,

através do Instituto de Eco-desenvolvimento da Baía da Ilha Grande (IED-BIG), criado em 1994 em Angra dos Reis. Desde 2000 o nível de produção de sementes foi crescente, possibilitando a consolidação da Pectinicultura na região sudeste brasileira.

Em Santa Catarina, a produção de vieiras *N. nodosus* está localizada em Florianópolis e no município de Penha, que liderou a comercialização em 2011 com 3,1t, representando 65,4% da produção estadual. A comercialização, entretanto, sofreu uma redução de 26,9% em 2011 em relação a 2010 (Figura 2). Segundo a Epagri (2012), essa queda ocorreu devido à indisponibilidade de áreas aquícolas em condições ambientais adequadas para o cultivo da espécie.

As fazendas marinhas de cultivo e engorda de vieiras abastecem os restaurantes das principais capitais do Brasil. A carne destes bivalves possui alto valor nutritivo e sua composição química nutricional varia de acordo com as características ambientais e inerentes à espécie (LOURENÇO, 2010). O músculo adutor das vieiras é o maior tecido e principal produto comercializado, seguido da gônada e das conchas para ornamentação (Figura 3).

O transporte de vieiras, seja para comercialização ou destinado a outras etapas do cultivo, é um limitante na pectinicultura (MINCHIN et al., 2000). Por serem organismos de sub-litoral e raramente sofrerem exposição aérea, como ostras ou mexilhões durante os períodos entremarés, por exemplo, as vieiras requerem manejo adequado para evitar mortalidade por anóxia.

O transporte é comumente realizado em caixas contendo sacos plásticos com água do mar por períodos de até 12 horas (MAGUIRE et al., 1999). No entanto, estudos têm sido realizados buscando novos métodos de transporte a fim de diminuir a mortalidade e manter a qualidade do produto. Segundo Ocaño-Higuera et al. (2009), o inadequado manejo pós-captura diminui a qualidade do músculo, pois induz atividades enzimáticas, ocasionando a desnaturação de proteínas e diminuição do pH, relacionado principalmente com o aumento no conteúdo de octopinas e em menor quantidade de ácido láctico.



Figura 1: Exemplar de vieira *Nodipecten nodosus* (barra=1,3 cm).

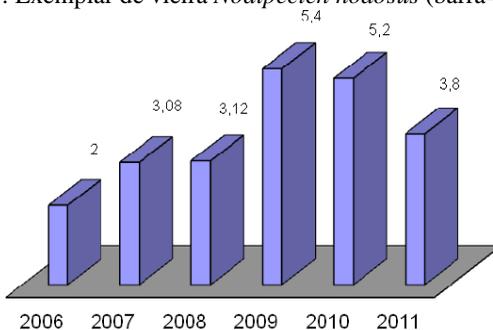


Figura 2: Evolução da produção de vieiras comercializadas em Santa Catarina entre os anos de 2006 e 2011 (t). Fonte: EPAGRI, 2012. Síntese Informativa da Maricultura.

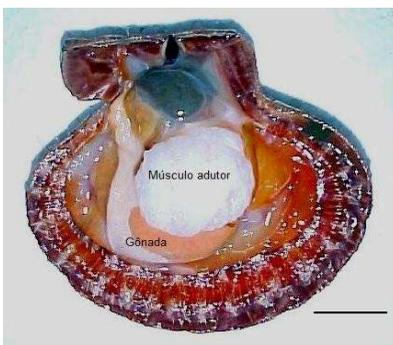


Figura 3: Aspecto interno da vieira *Nodipecten nodosus* destacando o músculo adutor e gônada da vieira. (barra=1,3 cm).

1.2 O músculo adutor da vieira *Nodipecten nodosus*

Moluscos da classe Bivalve são organismos com movimento limitado no espaço, geralmente de vida sedentária ou sésbil. A grande maioria dos pectinídeos, entretanto, possuem fibras de bisso para fixação somente durante parte de seu ciclo de vida. A capacidade natatória é uma característica dessa família que beneficia os movimentos e migrações com fins alimentares, de reprodução ou fuga (FÉLIX-PICO et al., 1999).

A natação das vieiras é realizada pela contração do músculo adutor, dividido por fibras lisas, responsável pelo fechamento das valvas, e a maior parte por fibras estriadas, responsáveis pelos movimentos rápidos durante a natação e fuga. (ZWAAN et al., 1980), permitindo a propulsão na água. Essa aptidão implica em um maior gasto de energia do que os organismos totalmente sésseis, por exemplo. Para suprir a contração do músculo adutor, o ATP provém primariamente a partir da fosfoarginina e o ADP pela arginina quinase (GRIESHABER; GÄDE, 1977).

O músculo adutor das vieiras também é responsável pela mobilização de macromoléculas como glicogênio e proteínas. Os níveis de reservas energéticas, enzimas e proteínas contráteis, porém, podem ser afetados quando outros tecidos exigem a mobilização dessas macromoléculas (MARTINEZ et al., 2000).

Comely (1974); Epp et al. (1988) e Boadas et al. (1997), demonstraram uma variação sazonal no conteúdo de glicogênio e metabolismo energético do músculo das vieiras, associados com o ciclo reprodutivo e a disponibilidade de alimento. Embora as concentrações de proteínas alterem pouco, o investimento reprodutivo tem um impacto importante sobre a capacidade metabólica do músculo adutor (GUDERLEY, 2004).

O glicogênio é armazenado e posteriormente oxidado por meio de reações enzimáticas, produzindo CO₂, água e ATP. A produção de energia é realizada pelas vias aeróbica e anaeróbica (Figura 4). Em condições aeróbicas o ATP é produzido nas mitocôndrias por meio da cadeia respiratória e fosforilação oxidativa (LEHNINGER, 2002).

1.3 Metabolismo anaeróbico de pectinídeos

A hipóxia representa um estado de baixa disponibilidade de oxigênio. Quando submetidos à hipóxia, os invertebrados passam pelo processo de anaerobiose ambiental, devido ao suprimento limitado de

oxigênio no ambiente. O ganho de energia a partir das vias metabólicas anaeróbicas é reduzido quando comparado com as vias dependentes do oxigênio para fornecimento de energia (GRIESHABER et al., 1994).

A anaerobiose em invertebrados também pode ser provocada por atividades fisiológicas, ou de natação como no caso dos pectinídeos. Isso requer maior provimento de ATP que pode ser obtido pela síntese aeróbica de ATP. Neste caso a anaerobiose é denominada "anaerobiose funcional". Ao contrário da anaerobiose ambiental, os tecidos não precisam estar submetidos à hipóxia, uma vez que a mitocôndria ainda tem oxigênio para gerar ATP, porém a uma taxa menor para satisfazer os requisitos das proteínas contráteis (GRIESHABER et al., 1994).

Em condições anaeróbicas, a produção de energia é realizada a partir da transfosforilação da fosfoarginina para o ADP pela arginina quinase, formando L-arginina e ATP (Figura 4). Essa reação promove um acúmulo de arginina que pode ser combinada ao piruvato (formado na glicólise) para produzir octopina (GRIESHABER; GÄDE, 1977; HUSS, 1995).

A atividade do músculo adutor da vieira, alimentado por processos anaeróbicos, pode ser seguida por exaustão com acúmulo de octopina (GÄDE et al., 1978; ZWAAN et al., 1980). Em *Pecten jacobaeus* o acúmulo de octopina no músculo é maior quando os movimentos de saltos são realizados no ar que na água, indicando que a exposição ao ar pode influenciar o nível de exaustão e a capacidade dos movimentos musculares (GRIESHABER; GÄDE, 1977).

As espécies intertidais possuem uma elevada tolerância à anóxia, porém em praticamente todos os invertebrados aquáticos, o estresse da dessecação quando exposto ao ar pode ser tão severo, que muitas espécies se isolam dentro das conchas fechadas. Na maré baixa, os facultativos anaeróbicos *Mytilus*, cessam a irrigação das brânquias e permanecem com as valvas fechadas, alterando o metabolismo para anaeróbico (BAYNE, 1976).

O metabolismo anaeróbico nas vieiras é predominantemente realizado para a produção de energia durante atividades como natação ou resposta à fuga para satisfazer a demanda energética emergencial (ZWAAN et al., 1980; THOMPSON et al., 1980). A via anaeróbica mais conhecida e pesquisada é a via do lactato, caracterizada por um único produto final, o lactato, a partir da via glicolítica.

A via das opinas é semelhante à via do lactato, mas difere na reação terminal em que a redução do piruvato é substituída pela condensação redutiva com um aminoácido para formar as opinas (GRIESHABER et al., 1994).

Diferentes produtos finais surgem a partir da glicólise anaeróbica na mesma espécie, durante a hipóxia ambiental e funcional (GÄDE; GRIESHABER, 1986). As vias são identificadas de acordo com o aminoácido (e enzima) utilizado e o produto formado. Nos moluscos marinhos são encontrados cinco tipos de opinas (octopina, alanopina, strombina, taupina e β -alanopina) (Figura 5).

Neste trabalho foram analisadas a sobrevivência, a atividade das enzimas arginina quinase, piruvato quinase e octopina desidrogenase e os níveis de glicogênio no músculo adutor da vieira *N. nodosus* após ser submetido à exposição ao ar por até 12 horas. Também foi avaliada a recuperação destes animais em até 7 dias após retorno a água, a fim de conhecer a reação da espécie após diferentes períodos em anaerobiose ambiental.

O presente estudo será submetido para a revista *Aquaculture*, Qualis A2 na área de Zootecnia/Recursos Pesqueiros.

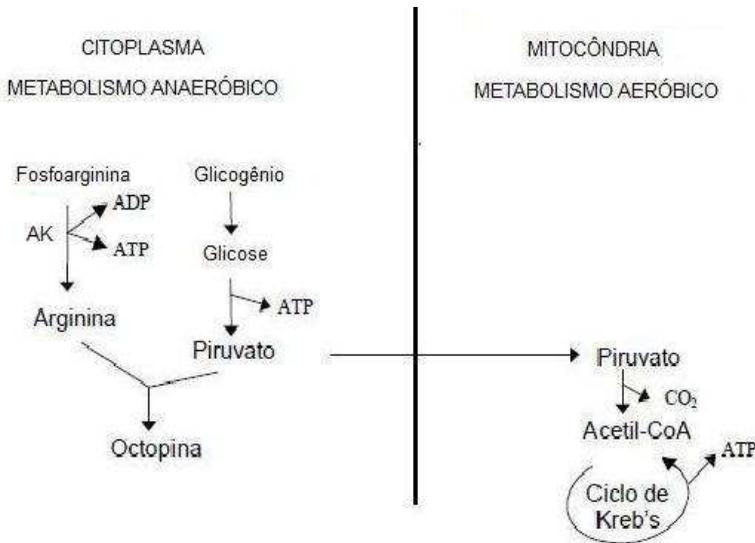


Figura 4: Degradação aeróbica e anaeróbica do glicogênio em invertebrados. Fonte: Adaptado de Huss (1995).

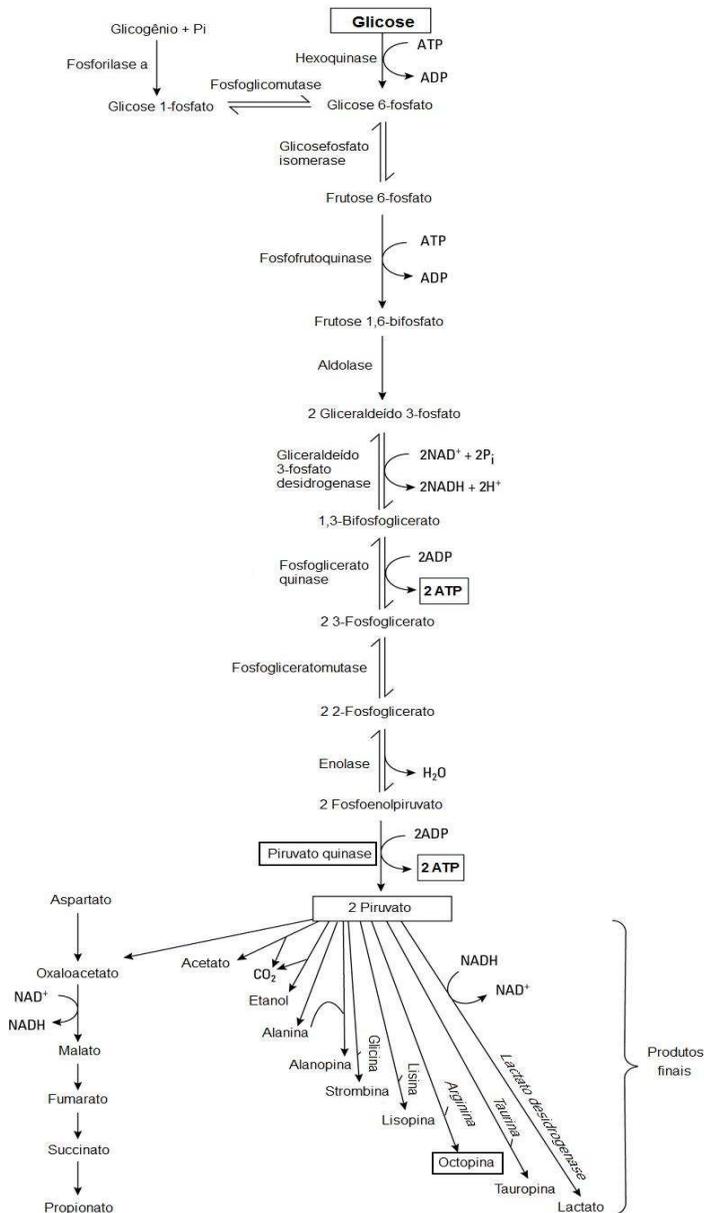


Figura 5: Via Glicolítica e os diferentes produtos finais a partir da glicólise anaeróbica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Contribuir para o conhecimento dos efeitos da exposição ao ar na sobrevivência e nas respostas bioquímicas da vieira *Nodipecten nodosus*.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a atividade das enzimas Arginina quinase, Piruvato quinase e Octopina desidrogenase do músculo adutor de juvenis e adultos de *N. nodosus* expostos ao ar e após recuperação em meio normóxico por até 7 dias.
- Quantificar bioquimicamente os níveis de glicogênio do músculo adutor de juvenis e adultos de *N. nodosus* submetidos expostos ao ar e posteriormente mantidos em normóxia por até 7 dias.
- Avaliar a sobrevivência de juvenis e adultos de *N. nodosus* após diferentes períodos de exposição ao ar e recuperação em meio normóxico por 14 dias.

3. RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DO MÚSCULO ADUTOR DE JUVENIS E ADULTOS DE VEIRAS *Nodipecten nodosus* EXPOSTOS AO AR

Moraes, R.R.M.¹; Mattos, J.J.¹; Ferreira, J.F.²; Bainy, A.C.D.^{1*}

¹Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88034-257

²Laboratório de Moluscos Marinhos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88061-600

*Autor para correspondência: A.C.D Bainy (e-mail bainy@mbx1.ufsc.br)

RESUMO

Adultos e juvenis de vieira *Nodipecten nodosus* foram expostos ao ar por 2, 4, 8 e 12h retornando ao ambiente controlado em laboratório para avaliação da recuperação ao tratamento por até 14 dias. Foram analisadas a atividade das enzimas arginina quinase (AK), piruvato quinase (PK) e octopina desidrogenase (ODH) e a concentração de glicogênio no músculo adutor dos animais expostos ao ar e após 1, 2 e 7 dias de recuperação no retorno ao ambiente controlado. A sobrevivência foi verificada até 14 dias após a exposição. Adultos de *N. nodosus* apresentaram uma diminuição na atividade da PK após 8h de exposição ao ar (302,41 U x mg⁻¹ proteína) e não sofreram alteração na concentração de glicogênio durante a exposição e recuperação dos tratamentos. Em contrapartida, apresentaram menor sobrevivência (40%) em relação aos juvenis. As atividades da AK e ODH aumentaram no músculo adutor dos juvenis expostos ao ar por 12h (15,61 e 539,34 U x mg⁻¹ proteína, respectivamente), enquanto a concentração de glicogênio diminuiu (2,56 mg U glicosil x g⁻¹ tecido úmido). As alterações bioquímicas observadas em juvenis de *N. nodosus* expostos ao ar por até 12 horas sugerem que os mesmos enfrentam um estresse metabólico. Os adultos, entretanto, não apresentaram alteração significativa no metabolismo anaeróbico quando submetidos à anaerobiose ambiental em condições controladas. Desta forma, sugere-se que a maior mortalidade dos adultos poderia estar associada as diferenças morfofisiológicas destes animais.

Palavras-chave: Exposição ao ar, Músculo adutor, Metabolismo anaeróbico, *Nodipecten nodosus*.

3.1 Introdução

A vieira *Nodipecten nodosus*, como os demais pectínídeos, possuem a capacidade natatória utilizada principalmente em resposta à fuga. Essa atividade é realizada pelos movimentos rápidos provocados pela contração do músculo adutor estriado (ZWAAN et al., 1980). Além da função contrátil, o músculo adutor mobiliza macromoléculas como proteínas e glicogênio para atender sua demanda energética (MARTINEZ et al., 2000).

As reservas de glicogênio e o controle da atividade enzimática são essenciais para a sobrevivência de moluscos marinhos e terrestres à anóxia (BROOKS; STOREY, 1997). A mobilização de glicogênio no músculo adutor de vieiras é acompanhada pela recuperação do exaustivo exercício de abertura e fechamento das valvas e subsequente recuperação aeróbica. Durante a gametogênese e desova, indivíduos adultos de *Chlamys islandica* sofrem uma redução do glicogênio muscular, que pode influenciar na recuperação aeróbica devido à diminuição da capacidade metabólica do músculo adutor, implicando na redução da capacidade de locomoção e fuga dos predadores (BROKORDT et al., 2000).

As reservas bioquímicas também podem ser afetadas de acordo com o período de desenvolvimento gonadal em relação à disponibilidade de alimento. Em *Chlamys varia*, durante a reprodução na Primavera, quando o alimento é abundante, apenas reservas de carboidratos são usados para o desenvolvimento gonadal, enquanto no Outono, todas as reservas diminuem (proteínas, lipídios e glicogênio) na mesma fase de desenvolvimento (SHAFEE, 1981).

Os níveis das enzimas glicolíticas que participam da recuperação do músculo adutor em *Chlamys islandica* e *Euvola ziczac*, como piruvato quinase e octopina desidrogenase apresentam seus níveis mais altos em indivíduos imaturos em relação ao período de maturação gonadal e desova. Em contrapartida, a arginina quinase, que gera a maior parte do ATP requerido para a resposta de fuga, aumenta gradualmente sua atividade durante as fases de maturação e desova (BROKORDT et al., 2000).

A limitação de oxigênio pode ocorrer de diferentes maneiras, como a exposição aérea de espécies intertidais na maré baixa, a exposição a condições ambientais nocivas, ou necessidade de prolongados períodos de fechamento das valvas devido a, por exemplo, níveis elevados de toxinas, poluentes e ataque de predadores (GREENWAY; STOREY, 1999).

O metabolismo anaeróbico dos invertebrados pode ser alterado dependendo das condições em que sofrem anaerobiose. Quando submetidos à hipóxia, o suprimento limitado de oxigênio no ambiente caracteriza a anaerobiose ambiental. Enquanto a anaerobiose provocada por atividades fisiológicas ou natação, como nos pectinídeos, é denominada anaerobiose funcional (GRIESHABER et al., 1994).

De acordo com o aminoácido e enzima utilizada nas vias anaeróbicas para síntese de ATP, diferentes produtos finais podem ser formados. Enomoto et al. (2000) analisaram as vieiras *Patinopecten yessoensis* durante aclimação para anaerobiose e constataram um rápido aumento da taxa glicolítica associado a uma maior formação de opinas, sendo a octopina o principal produto final. Grieshaber; Gäde (1977) verificaram em *Pecten jacobaeus*, que o acúmulo de octopina no músculo é maior quando os movimentos de saltos são realizados no ar do que na água, indicando que a exposição ao ar pode influenciar o nível de exaustão e a capacidade dos movimentos musculares.

A anóxia induzida por modificação covalente altera a função da glicogênio fosforilase, fosfofrutoquinase e piruvato quinase, sendo um fator importante no controle da taxa de glicólise em moluscos tolerantes à anóxia (GREENWAY; STOREY, 1999). A fosforilação da piruvato quinase na anóxia é um importante mecanismo que regula a utilização do fosfoenolpiruvato. Dessa forma controla a mudança da aerobiose, pela piruvato quinase, para anaerobiose, via fosfoenolpiruvato carboxiquinase, vias do catabolismo fosfoenolpiruvato (GREENWAY; STOREY, 1999).

Outra via de produção de energia em condições anaeróbicas é a partir da transfosforilação da fosfoarginina e ADP pela arginina quinase, formando L-arginina e ATP (ZWAAN et al., 1980). Após o intenso movimento das valvas, durante a natação, parte da recuperação da arginina fosfato ocorre durante o fechamento das valvas com acúmulo de octopina (BROKORDT et al., 2000).

Diferente de outros bivalves cultivados, como ostras e mexilhões, as vieiras são organismos de sublitoral e não possuem grande tolerância à anóxia, porém inexistem dados científicos a respeito desta capacidade adaptativa em *N. nodosus*. Essas características implicam limitações no manejo e transporte do produto, restringindo a pectinicultura no Brasil.

O objetivo geral deste trabalho foi o de contribuir para o conhecimento dos efeitos da exposição ao ar na sobrevivência e nas respostas bioquímicas do músculo adutor de juvenis e adultos de vieira *Nodipecten nodosus* expostas ao ar, visando colaborar para o

desenvolvimento de tecnologias que maximizem a realização do manejo desta espécie e a aquicultura.

3.2 Materiais e Métodos

Em maio/2012, juvenis (comprimento de concha = 30 mm) e adultos (comprimento de concha = 60 mm) da vieira *N. nodosus* (LINNAEUS, 1758), cultivados e fornecidos por produtores do município de Penha (SC), foram aclimatados no Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) durante oito dias até o início do tratamento e recuperação. Os animais foram mantidos em calhas, separados por grupos de tratamento, em condições controladas de temperatura (21,5°C), salinidade 33, oxigênio (6 mg/L), alimentação com misturas de microalgas (300mL/min) e fluxo de água contínuo (1,6 L/min). O delineamento experimental foi realizado no LMM e o material coletado foi armazenado no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI) do Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola (NEPAQ/UFSC), onde também foram desenvolvidas as análises bioquímicas.

3.2.1 Delineamento Experimental

Juvenis e adultos de vieira *N. nodosus* foram expostos ao ar durante 2, 4, 8 e 12h (entre 8 e 20h do mesmo dia), (T2, T4, T8 e T12, respectivamente). Os indivíduos controle foram mantidos nas condições controladas de temperatura, salinidade, oxigênio, alimentação e fluxo de água contínuo, respectivamente nos mesmos períodos. Após cada período de exposição, juvenis e adultos (n=7) e seus controles foram dissecados. Enquanto um grupo era dissecado para coleta do tecido (músculo adutor), o restante retornou para o ambiente controlado para recuperação. Após 1 dia (1d), 2 dias (2d) e 7 dias (7d), nos mesmos horários do tratamento (T2, T4, T8 e T12), foram dissecados grupos juvenis e adultos (n=7) e seus controles para avaliar a recuperação do tratamento. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido sendo posteriormente armazenadas em freezer -80°C, no (LABCAI). A mortalidade foi avaliada diariamente até 14 dias após a exposição através da verificação da reação da vieira ao estímulo muscular e de abertura e fechamento das valvas.

3.2.2 Ensaios Enzimáticos

Amostras do músculo adutor foram homogenizadas em uma solução de 10 vol de 50 mM Imidazol-HCl, 2 mM EDTA-Na₂, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1% Triton X-100, pH 6,6, utilizando homogenizador Tissue Tearor[®] de acordo com Brokordt et al. (2000). O homogenizado foi centrifugado a 9.000 g a 4°C por 20 min. A fração sobrenadante (Fração S9) foi utilizada para análise das enzimas arginina quinase (AK), piruvato quinase (PK) e octopina desidrogenase (ODH). A atividade enzimática foi quantificada utilizando espectrofotômetro em microplaca (SPECTRAMAX M5[®]), verificando a oxidação de NADH a 340 nm. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 6,22 mmol⁻¹. cm⁻¹. A atividade enzimática foi expressa na unidade internacional (μmol de substrato convertido em produto min⁻¹) x mg⁻¹ proteína. Os ensaios enzimáticos foram adaptados das condições utilizadas por Brokordt et al. (2000) para *Chlamys islandica*.

3.2.2.1 Arginina quinase (AK) (EC 2.7.3.3)

O ensaio enzimático da AK foi realizado em tampão Tris 130 mM, KCl 76 mM, acetato Mg 26 mM, pH 8.0; fosfoenolpiruvato (PEP) 1,25 mM, ATP 5 mM e PK/LDH 5U diluídos em imidazol-HCl 100 mM, pH 7.0; arginina 10 mM, NADH 0,25 mM diluídos em Tris 130 mM, pH 8.0 (FUJIMOTO, 2005).

3.2.2.2 Octopina desidrogenase (ODH) (EC 1.5.1.11)

O ensaio enzimático da ODH foi realizado em tampão contendo imidazol-HCl 50 mM, EDTA-Na₂ 2 mM, EGTA 5 mM, KCN 1 mM, Piruvato Sódico 5 mM (omitido para controle), Arginina-HCl 6 mM, NADH 0.2 mM, pH 6.6 (BROKORDT et al., 2000).

3.2.2.3 Piruvato quinase (PK) (EC 2.7.1.40)

O ensaio enzimático da PK foi realizado em tampão contendo imidazol-HCl 50 mM, MgSO₄ 13 Mm, KCl 100 mM, pH 7.0, PEP 5 mM (omitido para controle), ADP 5 mM, NADH 0.2 mM, lactato desidrogenase (LDH) 5U, pH 6.6 (BROKORDT et al., 2000).

3.2.3 *Análise de Proteínas*

A concentração de proteínas na fração S9 das amostras de músculo adutor foi quantificada utilizando-se o método de Peterson (1977) (Lowry modificado) e solução de albumina bovina sérica como padrão.

3.2.4 *Glicogênio*

A determinação de glicogênio foi realizada segundo Ocaño-Higuera et al. (2009). O músculo adutor foi homogenizado em TCA 10%, centrifugado a 3.000g a -5°C por 15 min, purificado em etanol e submetido à reação com Antrona 0,1%. A absorbância foi registrada a 620 nm utilizando o espectrofotômetro em microplaca SPECTRAMAX M5[®]. A quantificação foi expressa em mg de unidades (U) glicosil x g⁻¹ tecido úmido, utilizando glicose como padrão.

3.2.5 *Análises Estatísticas*

Os dados das atividades enzimáticas e da quantificação de glicogênio foram analisados seguindo os pressupostos de normalidade e homocedasticidade através do teste de shapiro-wilk e teste-f. O teste whelch's foi utilizado quando rejeitado a homocedasticidade. Com os resultados obtidos foi realizado o teste paramétrico teste t de Student, comparando os indivíduos expostos ao ar e aqueles em recuperação do tratamento, com seus respectivos controles.

O programa estatístico utilizado foi o GraphPad.Prism versão 5.01.

3.3 Resultados

As atividades AK e ODH (Figura 6-A e B) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$), enquanto o glicogênio (Figura 6-D) diminuiu significativamente em juvenis de vieira *N. nodosus* após 12h de exposição ao ar. Durante a recuperação após a hipóxia, esses indivíduos apresentaram uma queda da atividade AK em 1 e 7 dias de recuperação (Figura 7-D). Juvenis de *N. nodosus* que ficaram expostos ao ar por 2h apresentaram uma diminuição da atividade AK em 2 dias de recuperação (Figura 7-A), entretanto, não haviam apresentado diferença significativa durante a exposição ao ar. Adultos de *N. nodosus* que ficaram expostos ao ar por 4 e 8h sofreram alteração da atividade

AK durante a recuperação em 2 e 7 dias (Figura 7-B e C), respectivamente, porém, não haviam apresentado diferença significativa da atividade quando expostos ao ar.

A atividade ODH nos juvenis de *N. nodosus* apresentou um aumento significativo em 7 dias de recuperação após exposição por 8 e 12h (Figura 8-C e D), no entanto, durante os períodos de exposição ao ar somente os indivíduos de 12h haviam apresentado alteração na atividade ODH. Adultos de *N. nodosus* apresentaram uma queda significativa da atividade durante a recuperação de 7 dias (Figura 8-A).

A atividade PK em juvenis de *N. nodosus* diminuiu significativamente em 7 dias de recuperação à exposição ao ar por 4h (Figura 9-B). Por outro lado, nos indivíduos adultos expostos por 8h ao ar, a atividade AK diminuiu, tornando a aumentar significativamente durante a recuperação em 7 dias (Figura 9-C). Os adultos de *N. nodosus*, em 1 dia de recuperação após 2h de exposição ao ar, apresentaram uma queda da atividade da PK (Figura 9-A), enquanto aqueles expostos por 12h mostraram um aumento da atividade em 2 dias e uma queda significativa em 7 dias de recuperação (Figura 9-D).

A concentração do glicogênio no músculo adutor dos indivíduos adultos de *N. nodosus* não apresentou diferença significativa durante a exposição ao ar e posterior recuperação. Os juvenis, por outro lado, além da concentração de glicogênio no músculo adutor diminuir após 12 horas de exposição ao ar, também diminuiu durante a recuperação em 7 e 2 dias após a exposição por 2 e 8 horas (Figura 10-A e C), respectivamente.

Adultos de *N. nodosus* expostos ao ar por 12h apresentaram uma mortalidade de 60% após o retorno à normóxia, observado nos 14 dias subsequentes ao tratamento (Figura 11-A). Entre os juvenis, 10% daqueles submetidos à hipóxia por 8h morreram ao longo do período de recuperação (Figura 11-B).

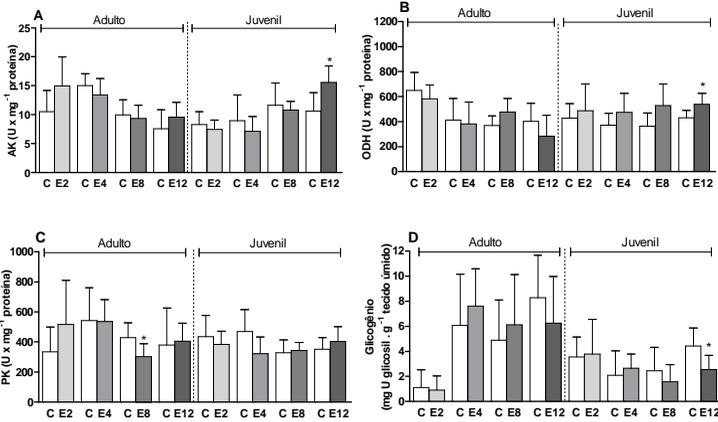


Figura 6: Atividades enzimáticas (U x mg-1 proteína) (U = μ mol substrato convertido em produto x min-1) Arginina quinase (A), Octopina desidrogenase (B), Piruvato quinase (C) e concentração (mg U glicosil x g-1 tecido úmido) de glicogênio (D) no músculo adutor de adultos e juvenis de vieira *Nodipecten nodosus* expostos ao ar por 2, 4, 8 e 12h. Os valores estão como média \pm desvio padrão e as diferenças significativas ($p < 0,05$) foram identificadas por asterisco (*).

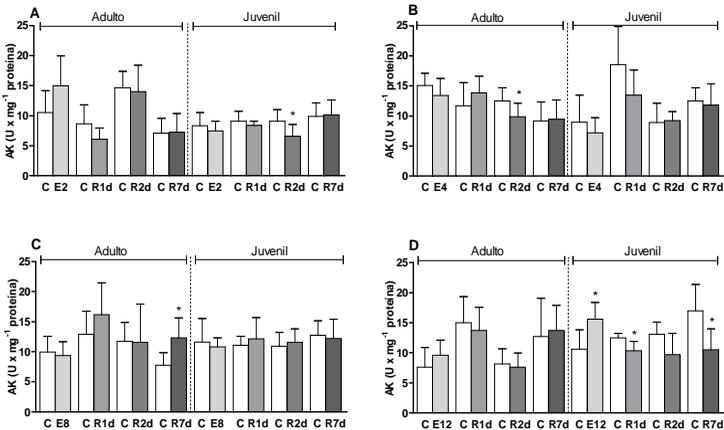
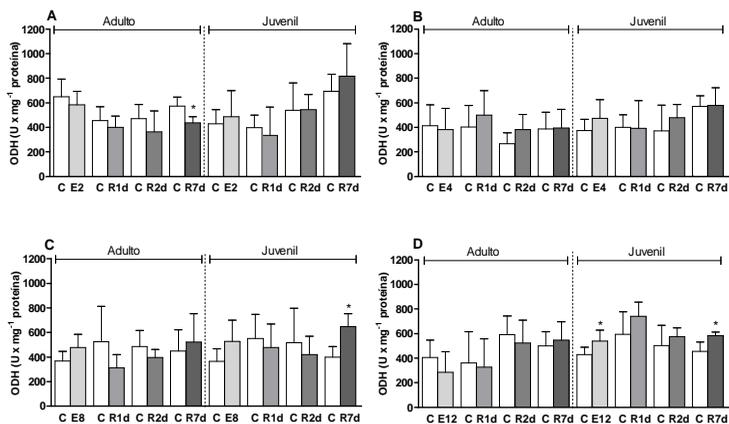


Figura 7: Atividade Arginina quinase (AK) (U x mg-1 proteína) (U = μ mol substrato convertido em produto x min-1) no músculo adutor de adultos e juvenis de vieira *Nodipecten nodosus* expostos ao ar por 2h (A), 4h (B), 8h (C) e 12h (D) e recuperação em 1, 2 e 7 dias. Os valores estão como média \pm desvio

F

padrão e as diferenças significativas ($p < 0,05$) foram identificadas por asterisco (*).



F

figura 8: Atividade Octopina desidrogenase (ODH) ($U \times mg^{-1} \text{ proteína}$) ($U = \mu\text{mol}$ substrato convertido em produto $\times \text{min}^{-1}$) no músculo adutor de adultos e juvenis de vieira *Nodipecten nodosus* expostos ao ar por 2h (A), 4h (B), 8h (C) e 12h (D) e recuperação em 1, 2 e 7 dias. Os valores estão como média \pm desvio padrão e as diferenças significativas ($p < 0,05$) foram identificadas por asterisco (*).

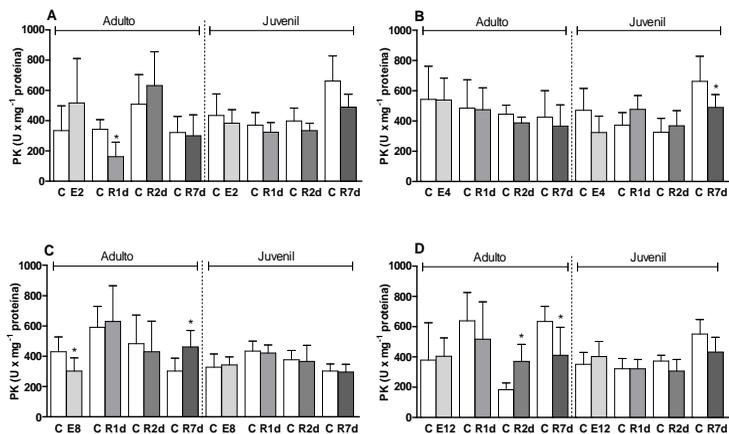


Figura 9: Atividade Piruvato quinase (PK) ($U \times mg^{-1} \text{ proteína}$) ($U = \mu\text{mol}$ substrato convertido em produto $\times \text{min}^{-1}$) no músculo adutor de adultos e juvenis de vieira *Nodipecten nodosus* expostos ao ar por 2h (A), 4h (B), 8h (C)

e 12h (D) e recuperação em 1, 2 e 7 dias. Os valores estão como média \pm desvio padrão e as diferenças significativas ($p < 0,05$) foram identificadas por asterisco (*).

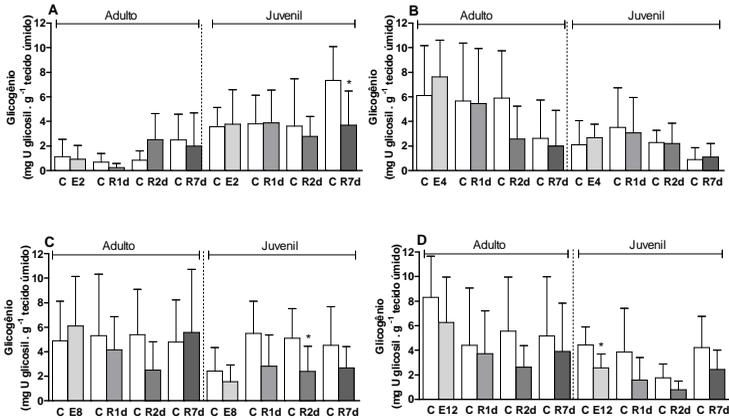


Figura 10: Concentração de glicogênio (mg U glicosil x g⁻¹ tecido úmido) do músculo adutor de adultos e juvenis de vieira *Nodipecten nodosus* expostos ao ar por 2h (A), 4h (B), 8h (C) e 12h (D) e recuperação em 1, 2 e 7 dias. Os valores estão como média \pm desvio padrão e as diferenças significativas ($p < 0,05$) foram identificadas por asterisco (*).

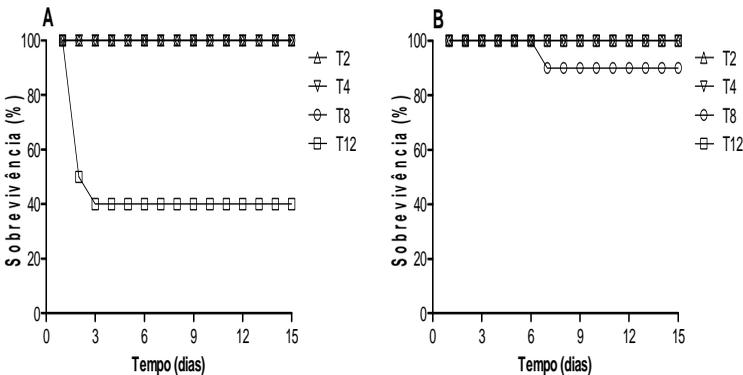


Figura 11: Sobrevivência (%) de adultos (A) e juvenis (B) de *Nodipecten nodosus* em recuperação (14 dias) após exposição ao ar (T2, T4, T8, T12).

3.4 Discussão

A pectinicultura é uma atividade recente na malacocultura brasileira. Entre algumas limitações para estabelecer um cultivo, são observadas irregularidades na produção e fornecimento de sementes, a indisponibilidade do produto no mercado, a determinação de áreas de cultivo e dificuldades de manejo devido à mortalidade observada durante a exposição ao ar (EPAGRI, 2010).

Outros bivalves cultiváveis, como os mexilhões e ostras, que vivem na zona intermareal em regulares estados de hipóxia e dessecação, possuem estratégias de diminuição do metabolismo nestas condições (BROOKS; STOREY, 1997). Entretanto, os pectinídeos não são adaptados a situações extremas de hipóxia. Assim, a compreensão dos mecanismos bioquímicos durante as fases iniciais de hipóxia em vieiras *N. nodosus* torna-se uma etapa importante e necessária para o desenvolvimento de novas estratégias de manejo, mantendo a qualidade do produto e minimizando a mortalidade durante este processo.

Segundo Brooks; Storey (1997) o metabolismo anaeróbico em moluscos marinhos é alimentado principalmente pelas grandes reservas de glicogênio, presentes em tecidos específicos, e o controle da atividade de enzimas da glicogenólise e glicólise anaeróbica é fundamental para sua sobrevivência em condições de hipóxia e anóxia.

A maior atividade AK no músculo adutor de juvenis de vieira *N. nodosus* em 12 horas de exposição ao ar, sugere um aumento na produção de ATP a partir da reserva de fosfoarginina (ZWANN et al., 1980). Contudo, a reação desta enzima exige a remoção contínua de L-arginina para dar seguimento à formação de ATP, que deve ocorrer principalmente pela reação catalisada pela ODH (THOAI; ROBIN, 1959). De acordo com o aumento da atividade da ODH nos juvenis que ficaram expostos 12 horas ao ar, pôde-se verificar a manutenção do metabolismo anaeróbico, durante esse período através da formação de octopina e reoxidação do NADH em NAD⁺ mantendo a atividade glicolítica. A resposta desses animais em 1 e 7 dias, cuja atividade AK diminuiu significativamente em relação ao controle, pode estar refletindo a lenta recuperação dos níveis de fosfoarginina durante o retorno ao processo aeróbico, semelhante à recuperação lenta da oxigenação da hemolinfa do músculo adutor (GRIESHABER, 1978).

Em 2008, Pérez et al. avaliaram a resposta de juvenis de *Placopecten magellanicus* submetidas ao estresse do manejo no cultivo e a recuperação em 3 horas. Foi verificada a redução do desempenho contrátil, dos níveis de fosfoarginina, porém com recuperação em 3h.

Assim como observado nas vieiras *N. nodosus*, Pérez et al. (2008) também concluíram que a exposição ao ar torna sensível o fechamento das valvas em *P. magellanicus*, no entanto, o retorno para a normóxia permite a recuperação do desempenho da natação.

A queda da atividade da PK em adultos (T8) comprometendo a formação de octopina e a diminuição da atividade da ODH (T12), ainda que não significativa, poderia estar indicando uma possível exaustão metabólica devido à diminuição do nível das enzimas que participam da recuperação do músculo em resposta à fuga (BROKORDT et al., 2000). Brokordt; Guderley (2004) não observaram associação entre a atividade da PK e o estado reprodutivo de *Chlamys islandica*. Por outro lado, Greenway; Storey (1999) observaram uma diferença significativa na atividade das enzimas envolvidas no metabolismo do glicogênio onde a resposta à anóxia foi a supressão da atividade PK em *Crassostrea virginica*.

Após a gametogênese e desova em *C. islandica*, a atividade da ODH diminui, reduzindo a recuperação glicolítica durante a restauração de ATP e arginina fosfato quando os suprimentos de oxigênio estão esgotados ou ausentes (BROKORDT et al., 2000). A queda, mesmo que não significativa, da atividade da ODH em adultos de *N. nodosus* submetidos à hipóxia por 12h pode estar associada ao estágio reprodutivo desses animais. Segundo Guderley (2004), o investimento reprodutivo em vieiras tem um forte impacto sobre as capacidades metabólicas do músculo adutor, embora as concentrações de proteína alterem pouco. Simidu (1961); Hiltz; Dyer (1971) destacam os altos níveis de octopinas observados no músculo adutor dos pectinídeos após sua morte. A impossibilidade de manter a reoxidação do NADH em NAD^+ , reciclando octopina, pode estar associada a uma condição de exaustão energética refletida na mortalidade de 60% desses animais no retorno ao meio normóxico.

Os animais utilizados no estudo foram coletados na metade da estação de Outono que pode ser relacionada ao pequeno efeito da hipóxia sobre as enzimas glicolíticas analisadas. Greenway, Storey (1999) verificaram a interação entre as variáveis ambientais (estação do ano e anóxia) em *Crassostrea virginica*, observando os efeitos da anóxia sobre as enzimas do metabolismo intermediário, sugerindo a importância da estação como um fator modificador da resposta à anóxia. Minchin et al. (2000) também verificaram a relação entre a exposição ao ar e a época do ano sugerindo a temperatura como principal fator responsável na diferença da atividade do músculo devido às alterações na reserva de glicogênio.

Os níveis de glicogênio quantificados mostraram ser menores no músculo adutor dos indivíduos juvenis expostos ao ar durante 12 horas. Esta diminuição possivelmente está associada à resposta e habilidade dos pectinídeos em aumentar a glicólise para formação de ATP (BROOKS; STOREY, 1997; ENOMOTO et al., 2000), como pôde ser verificada com o aumento da atividade da AK. Brokordt et al. (2000) verificaram que a diminuição do glicogênio no músculo adutor afeta negativamente a fisiologia muscular e essas modificações das capacidades metabólicas musculares que coincidem com o investimento reprodutivo, no caso dos indivíduos adultos, são acompanhadas por uma redução na capacidade das vieiras se recuperarem do exercício extenuante.

Segundo Livingstone et al. (1990), o metabolismo anaeróbico que segue as vias do lactato e opinas, produzem altas e médias taxas de energia utilizadas para a manutenção da atividade metabólica. Além das vias metabólicas analisadas, foram realizados testes para verificar a presença da via Lactato desidrogenase (LDH) que, segundo ENOMOTO et al. (2000), serve também no processo fermentativo regenerando NAD^+ para produção energética por períodos prolongados de tempo. Storey; Dando (1982), também verificaram que a atividade da ODH em *Mytilus edulis* é 15 vezes maior que a LDH, evidenciando que a ODH substitui funcionalmente a LDH no metabolismo anaeróbico. No entanto, não foi observada atividade da LDH no músculo adutor de adultos e juvenis de *N. nodosus* expostos ao ar, corroborando com Wongso et al. (1999) e Enomoto et al. (2000) que observaram que a atividade da ODH é maior que a LDH em pectinídeos submetidos à anaerobiose.

Strahl et al. (2011) detectaram a atividade LDH significativamente elevada nos hemócitos de *A. islandica* submetida à hipóxia e anóxia. No entanto, somente no músculo adutor foi detectado octopina, sendo que o metabólito não aumentou de acordo com o estresse induzido. Os autores sugerem funções específicas de ODH e LDH como lactato ou octopina oxidases ou, alternativamente, como piruvato redutases devido à atividade enzimática anaeróbica estar desigualmente distribuída nos tecidos dos bivalves. Reciclar octopina e lactato, ao invés de excretar seria uma suposta estratégia da *A. islandica* conter o metabolismo quando exposta à anóxia.

O tratamento ao qual a vieira *N. nodosus* foi submetida, estando sujeita não apenas à hipóxia, mas também à dessecação, se iguala as condições de manejo simulando situações de baixo custo de transporte conforme apresentado por Maeda-Martínez et al. (2000). Ao avaliarem o

transporte de sementes de *Argopecten ventricosus*, verificaram que fatores como dessecação e exposição ao ar atmosférico aumentam a mortalidade em relação àquelas que perderam água por não estarem fechadas e com suporte de oxigênio puro (MAEDA-MARTÍNEZ et al., 2000). Dessa forma, a mortalidade dos adultos de vieira *N. nodosus* pode estar associada à morfologia que não permite a manutenção de suas valvas fechadas como acontece com os juvenis, evitando a dessecação. Maguire et al. (1999) também registraram uma alta mortalidade em *P. maximus* (64 mm comprimento de concha) após 15h de exposição ao ar, enquanto Minchin et al. (2000) no seu estudo com vieiras (40 – 55 mm comprimento de concha) registraram 2% de mortalidade em 10 dias de recuperação após 15h expostas ao ar.

A resposta ao estresse hipóxico em bivalves ainda possui muitas questões em aberto. Em 2005, David et al., utilizando a técnica de hibridização subtrativa supressiva em ostras do Pacífico *Crassostrea gigas* mantidas em estresse hipóxico, identificaram genes específicos relacionados a hipóxia em brânquias, manto e glândula digestiva de animais após 7-10 dias de exposição. Nesta situação extrema de hipóxia foram identificadas 616 sequências correspondendo a 12 principais funções fisiológicas. Oito destes genes, pertencentes a diferentes funções fisiológicas foram validados por reação de PCR quantitativo, a saber, respiração (anidrase carbônica), metabolismo de carboidratos (glicogênio fosforilase), metabolismo lipídico (delta-9 desaturase), metabolismo oxidativo e sistema antioxidante (glutathione peroxidase), regulação protéica (BTF3, fator de transcrição), regulação de ácidos nucleicos (homólogo ao myc), sequestro de metais (metalotioneína) e resposta ao estresse (proteínas de choque térmico 70). Estudos deste tipo necessitam ser realizados com a espécie *N. nodosus*, uma vez que o presente estudo se constitui no primeiro trabalho realizado visando elucidar algumas respostas a hipóxia com esta espécie tão importante economicamente para o desenvolvimento da pectinicultura no litoral brasileiro.

3.5 Conclusões

Os resultados deste trabalho em um estudo realizado em condições controladas de temperatura, salinidade, oxigênio e alimentação, mostram que juvenis de *N. nodosus* suportam a exposição ao ar em ambiente controlado por até 8 horas sem prejuízo significativo para a manutenção do metabolismo anaeróbico. Os adultos, entretanto, não apresentaram o mesmo desempenho. A maior mortalidade

observada nos adultos pode estar relacionada às características morfofisiológicas que influenciam a fisiologia muscular, capacidade metabólica e recuperação ao estresse energético, quando os animais são submetidos à exposição ao ar. No retorno ao ambiente aeróbico estas condições podem causar uma diminuição na sobrevivência e qualidade do produto. No entanto, foi observado que juvenis apresentaram, além da alta sobrevivência, uma rápida recuperação metabólica no retorno às condições controladas do trabalho. Com base nestes resultados propomos que estas análises sejam realizadas ao longo de um ciclo de cultivo, observando os resultados para serem aplicados na pectinicultura brasileira.

3.6 Referências Bibliográficas

BROKORDT, K. B. et al. Effect of reproduction on escape responses and muscle metabolic capacities in the scallop *Chlamys islandica* Müller 1776. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 251. p. 205-225. 2000.

BROKORDT, K, B.; GUDERLEY, H. Binding of glycolytic enzymes in adductor muscle of Iceland scallop *Chlamys islandica* is altered by reproductive status. **Marine Ecology Progress Series**. v. 268. p. 141-149. 2004.

BROOKS, S. P. J.; STOREY, K. B. Glycolytic controls in estivation and anoxia: a comparison of metabolic arrest in land and marine molluscs. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 118A. p. 1103-1114. 1997.

DAVID, E. et al. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. **The FEBS journal**. v.272. p. 5635-5652. 2005.

ENOMOTO, T.; NAKAO, C.; OHYAMA, H. Regulation of glycolysis during acclimation of scallops (*Patinopecten yessoensis* Jay) to anaerobiosis. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 127B. p. 45-52. 2000.

EPAGRI. **Síntese Informativa da Maricultura 2010**. 9p. 2010.

FUJIMOTO, N.; TANAKA, K.; SUZUKI, T. Amino acid residues 62 and 193 play the key role in regulating the synergism of substrate binding in oyster arginine kinase. **FEBS Letters**. v. 579. p. 1688-1692. 2005.

GREENWAY, S. C.; STOREY, K. B. The effect of prolonged anoxia on enzyme activities in oysters (*Crassostrea virginica*) at different seasons. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 242. p. 259-272. 1999.

GRIESHABER, M.; GÄDE, G. Energy supply and the formation of octopine in the adductor muscle of the scallop, *Pecten jacobaeus* (Lamarck). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 58B. p. 249-252. 1977.

GRIESHABER, M. Breakdown and formation of high-energy phosphates and octopine in the adductor muscle of the scallop, *Chlamys opercularis* (L.), during escape swimming and recovery. **Journal of Comparative Physiology**. v. 126. p. 269-276. 1978.

GRIESHABER, M. K. et al. Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. **Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology**. v. 125. p.43-147. 1994.

GUDERLEY, H. Locomotor performance and muscle metabolic capacities: impact of temperature and energetic status. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 139. p. 371-382. 2004.

HILTZ, D.F.; DYER, W.J. Octopine in postmortem adductor muscle of the sea scallop (*Placopecten magellanicus*). **Journal of Fisheries Research Boarding of Canada**. v. 28. p. 869-874. 1971.

LIVINGSTONE, D. R. et al. Further studies on the phylogenetic distribution of pyruvate oxidoreductase activities. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 97B. p. 661-666. 1990.

MAEDA-MARTINEZ, A. N.; SICARD, M. T.; REYNOSO-GRANADOS, T. A shipment method for scallop seed. **Journal of Shellfish Research**. v. 19. p. 765-770. 2000.

MAGUIRE, J. A. et al. The effect of transportation on the juvenile scallop *Pecten maximus* (L.). **Aquaculture Research**. v. 30. p. 325-333. 1999.

MARTINEZ, G. et al. Effect of diet and temperature upon muscle metabolic capacities and biochemical composition of gonad and muscle in *Argopecten purpuratus* Lamarck 1819. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 247. p. 29-49. 2000.

MINCHIN, D. et al. Effect of air exposure on scallop behaviour, and the implications for subsequent survival in culture. **Aquaculture International**. v. 8. p. 169-182. 2000.

OCAÑO-HIGUERA, V. et al. Bioquímica Posmortem em Pectínidos. In: MAEDA-MARTÍNEZ, A. N.; LODEIROS-SEIJO, C. (Eds). **Biología y Cultivo de los Moluscos Pectínidos Del Género Nodipecten**. Cap 13. p. 287-326. 2009.

PÉREZ, H. M. et al. Force production during escape responses by *Placopecten magellanicus* is a sensitive indicator of handling stress: Comparison with adductor muscle adenylate energy charge and phosphoarginine levels. **Aquaculture**. v. 282. p. 142-146. 2008.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**. v. 83. p. 346-357. 1977.

SIMIDU, W. Nonprotein nitrogenous compounds. In: BORGSTROM, G. (Eds). **Fish as Food**. Production, Biochemistry, and Microbiology. Academic Press. New York, USA. v. 1. p. 353-384. 1961.

SHAFEE, M. S. Seasonal changes in the biochemical composition and calorific content of the black scallop *Chlamys varia* (L.) from Lanvec, Bay of Brest. **Oceanologica Acta**. v. 4. p. 331-341. 1981.

STOREY, K.B., DANDO, P.R. Substrate specificities of octopine dehydrogenases from marine invertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.73B. p.521-528. 1982.

STRAHL, J. et al. Metabolic and physiological responses in tissues of the long-lived bivalve *Artica islandica* to oxygen deficiency. **Comparative Biochemistry and Physiology, A**. 2011.

THOAI, N.V., ROBIN, Y. Métabolisme des dérivés guanidyles. Biosynthèse de l'octopine et répartition de l'enzyme l'operant chez les invertébrés. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 35. p. 446–453. 1959.

WONGSO, S. et al. Glycolytic enzymes in the tissue of three species of scallop (Bivalvia: Pectinidae). **Fisheries Science**. v. 65. p. 123-128. 1999.

ZWAAN, A. de. et al. Physiological and biochemical aspects of the valve snap and closure responses in the giant scallop *Placopecten magellanicus*. **Journal of Comparative Physiology**. v. 137. p. 105-114. 1980.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

BAYNE, B. L.; THOMPSON, R. J.; WIDDOWS, J. Physiology: I. In: B. L. Bayne (Eds.). **Marine mussels: their ecology and physiology**. Cambridge University Press, Cambridge. p. 121-206. 1976.

BOADAS, M. A. et al. Seasonal variation in the properties of muscle mitochondria from the tropical scallop *Euvola (Pecten) ziczac*. **Marine Biology**. v. 128. p. 247-255. 1997.

BRAND, A. R. **Scallop ecology: distribution and behaviour**. In: SHUMWAY, S. E. (Eds). *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam. p. 517-584. 1991.

COMELY, C. A. Seasonal variations in the flesh weights and biochemical content of the scallop *Pecten maximus* L. in the Clyde sea area. **Journal of the International Council for the Exploration of the Sea**. v. 35. p. 281-285. 1974.

EPAGRI. 2012. **Síntese Informativa da Maricultura 2010**. 9p. 2010.

EPP, J. BRICELJ, V. M.; MALOUF, R. E. Seasonal partitioning and utilization of energy reserves in two age classes of the bay scallop *Argopecten irradians* (Lamarck). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 121. p. 113-136. 1988.

FAO. Fishery and Aquaculture Statistics. 2008. Statistic and Information Service of the Fisheries and Aquaculture Department. **FAO yearbook**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 72p. 2010.

FÉLIX-PICO, E. F. et al. Growth & survival of *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1835) in suspended culture at the national marine park of Bahia de Loreto, B. C. S., México. 12th International Pectinid Workshop. Bergen, Norway. **Book of abstracts**. p. 39-40. 1999.

GÄDE, G.; WEEDA, E.; GABBOT; P. A. Changes in the level of octopine during the scape response of the scallop, *Pecten maximus* (L.). **Journal of Comparative Physiology**. v. 124. p. 121-127. 1978.

GÄDE, G.; GRIESHABER, M. K. Pyruvate reductases catalyze the formation of lactate and opines in anaerobic invertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 83B. p. 255-272. 1986.

GRIESHABER, M. K. et al. Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. **Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology**. v. 125. p.43-147. 1994.

GRIESHABER, M. K.; GÄDE, G. Energy supply and the formation of octopine in the adductor muscle of the scallop, *Pecten jacobaeus* (Lamarck). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 58B. p. 249-252. 1977.

GUDERLEY, H. Locomotor performance and muscle metabolic capacities: impact of temperature and energetic status. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 139B. p. 371-382. 2004.

HUSS, H. H. Quality and quality changes in fresh fish. FAO. **Fisheries Technical Paper**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. n. 348. 202p. 1995.

LAGREZE-SQUELLA, F. J. **Taxas fisiológicas alimentares e potencial de crescimento da vieira *Nodipecten nodosus* (L. 1758) cultivada em ambiente com alta concentração de séston**. 2008. 53 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. 3. Ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LOURENÇO, A. J. **Composição química nutricional da carne "in natura" de vieiras *Nodipecten nodosus* (Linnaeus 1758), cultivadas em Mangaratiba, RJ**. 2010. 136f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

MAGUIRE, J. A. et al. The effect of transportation on the juvenile scallop *Pecten maximus* (L.). **Aquaculture Research**. v. 30. p. 325-333. 1999.

MANZONI, G. C. **Cultivo de mexilhões *Perna perna*: evolução da atividade no Brasil e avaliação econômica da realidade de Santa Catarina.** 2005. 255f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

MARTINEZ, G. et al. Effect of diet and temperature upon muscle metabolic capacities and biochemical composition of gonad and muscle in *Argopecten purpuratus* Lamarck 1819. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.** v. 247. p. 29-49. 2000.

MINCHIN, D. et al. Effect of air exposure on scallop behaviour, and the implications for subsequent survival in culture. **Aquaculture International.** v. 8. p. 169-182. 2000.

OCAÑO-HIGUERA, V. et al. Bioquímica Posmortem em Pectínidos. In: MAEDA-MARTÍNEZ, A. N.; LODEIROS-SEIJO, C. (Eds). **Biología y Cultivo de los Moluscos Pectínidos Del Género *Nodipecten*.** Cap 13. p. 287-326. 2009.

RIOS, E. **Compedium of brazilian sea shells from Brazil.** Rio Grande: Evangraf LTDA. p. 676. 2009.

RUPP, G. S.; BEM, M. M. Cultivo de vieiras. In: Poli, C. R.; Poli, A. T.B.; Andreatta, B.; Beltrame, E. (orgs). **Aquicultura experiências brasileiras.** Multifatorial editora. Florianópolis, SC. p. 289-308.

RUPP, G. S.; PARSONS, G. J. Effects of salinity and temperature on the survival and byssal attachment of the lion's paw scallop *Nodipecte nodosus* at its southern distribution limit. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.** v. 309. p. 173-198. 2004.

RUPP, G. S.; PARSONS, G. J. Scallop aquaculture and fisheries in Brazil. In: SHUMWAY, S. E.; PARSONS, G. J., (Eds.). **Scallops: Biology Ecology and Aquaculture. Developments in Aquaculture and Fisheries Science.** 2. ed. Elsevier. Amsterdam. p. 1225-1250. 2006.

SMITH, J. T. Cenozoic giant pectinids from California and the Tertiary Caribbean Province: *Lyropecten*, "*Macrochlamis*", *Vertipecten*, and *Nodipecten* species. U.S. **Geological Survey Professional Paper.** 1991.

THOMPSON, R. J. et al. Physiological and biochemical aspects of the valve snap and valve closure responses in the giant scallop *Placopecten magellanicus*. **Journal of Comparative Physiology**. v. 137. p. 97-104. 1980.

ZWAAN, A. de. et al. Physiological and biochemical aspects of the valve snap and closure responses in the giant scallop *Placopecten magellanicus*. II Biochemistry. **Journal of Comparative Physiology**. v. 137. p. 105-114. 1980.