



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA – AQI
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Utilização de diferentes dietas em reprodutores da vieira *Nodipecten nodosus* (L. 1758)
em laboratório e seu efeito na maturação, no rendimento larval e na produção de pré-sementes

Simone Sühnel

Florianópolis
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA – AQI
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Utilização de diferentes dietas em reprodutores da vieira *Nodipecten nodosus* (L. 1758)
em laboratório e seu efeito na maturação, no rendimento larval e na produção de pré-sementes

Simone Sühnel

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Aqüicultura do Centro de Ciências Agrárias da
Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito
parcial à obtenção do título de Doutor em Aqüicultura.

Orientador: Dr. Jaime Fernando Ferreira
Área: Malacocultura

Florianópolis, (SC), outubro de 2008.

Sühnel, Simone,

Utilização de diferentes dietas em reprodutores da vieira *Nodipecten nodosus* (L. 1758) em laboratório e seu efeito na maturação, no rendimento larval e na produção de pré-sementes / Simone Sühnel – 2008.

155 f : fgs. tabs.

Orientador: Jaime Fernando Ferreira.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura.

1. *Nodipecten nodosus*; 2. vieira; 3. maturação; 4. dietas; 5. larvas; 6. astaxantina; 7. ácido graxo.

Utilização de diferentes dietas em reprodutores da vieira *Nodipecten nodosus* (L. 1758) em laboratório e seu efeito na maturação, rendimento larval e produção de pré-sementes.

Por

SIMONE SÜHNEL

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOUTORA EM AQUICULTURA

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

Prof. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Jaime Fernando Ferreira - *Orientador*

Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães

Dra. Débora Machado Fracalossi

Dr. Guilherme Sabino Rupp

Dr. Hécio Luis de Almeida Marques

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho com muito amor e carinho à minha mãe Ione Albrecht Sühnel.

AGRADECIMENTOS

Quero fazer um agradecimento especial ao meu companheiro Pancho, que junto a mim trabalhou na realização deste doutorado.

Ao meu Pai, que sempre esteve ao meu lado, incentivando-me, pronto a ajudar em tudo que fosse necessário.

Ao meu Professor Orientador Jaime, que com todo o seu apoio, incentivou-me a fazer este Doutorado, estando sempre pronto para discutir, ensinar, tirar dúvidas, corrigir trabalhos e ser amigo. Estou muito contente com o professor e amigo que tenho desde 1996, que foi quando escolhi trabalhar na área de aquicultura do curso de Agronomia.

À minha Tia Elaine, que sempre esteve ao meu lado dando todo seu carinho e amor.

À minha filha Serena, por ser uma ótima filha e companheira em todos os momentos.

Ao meu irmão Charles, por ajudar a concretizar a inscrição no processo seletivo para entrada no doutorado, data na qual eu fui hospitalizada com apendicite.

À minha querida sogra Carmela, pelas comidinhas gostosas quando voltávamos para casa depois dos experimentos.

Às amigas Adriana e Mariza e aos amigos, Guilherme, Chico e Carlos Henrique, pelo apoio na execução dos experimentos, discutindo a metodologia de trabalho, estando sempre prontos a me ajudar nas dúvidas e, acima de tudo, pelo convívio dia a dia.

Ao pessoal do LMM, Sino, Bea, Eduardo, Alexandre, Cláudio, pelo espaço que ocupei durante o meu trabalho e pelo material (microalgas, água, compras, etc.) utilizado nos experimentos, bem como pela amizade que demonstraram durante este período e durante todo o tempo que estive lá.

Ao professor Marcelo, do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal/UFSC, por aceitar a coorientação deste trabalho, dando todo o suporte no tema de carotenóides e por sua amizade ao longo deste período.

Às professoras Aimê Rachel e Débora e ao Guilherme, que estão junto a este Doutorado contribuindo desde o seu início na sua construção, implementação e conclusão.

Ao Hércio por aceitar compor a banca de apresentação desta Tese, contribuindo na conclusão deste trabalho.

Ao professor Roberto, do Laboratório de Camarões Marinhos/UFSC, e à amiga Daniela, pela microalga seca *Haematococcus pluvialis* e pela cepa desta microalga viva.

Ao professor Hernani, do Laboratório de Biotecnologia Alimentar/UFSC, ao professor Beirão, do Laboratório de Tecnologia de Pescados e Derivados/UFSC e às colegas Renata e Regina, pelo apoio na centrifugação e liofilização das amostras.

À professora Edna, do Laboratório de Tecnologia de Frutas e Hortaliças/UFSC, pelo uso dos equipamentos.

À professora Débora, do Laboratório de Piscicultura de Água Doce/UFSC, e ao colega Renato, pelo apoio na liofilização das amostras.

Ao professor Cláudio, do Laboratório de Moluscos Marinhos/UFSC, pela discussão sobre as análises estatísticas.

À professora Marguerita, do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aqüicultura/UFSC, e colega Delano, pela elaboração e implementação das análises dos parâmetros hemato-imunológicos junto a este estudo, o que gerou a Dissertação de Mestrado do aluno Delano.

À amiga de muitos anos Mirella, ao Eduard e Philippe da Université de Bretagne Occidentale/França, por todo apoio na discussão e implementação do Capítulo VII e fornecimento dos ácidos graxos.

À professora e amiga Aimê e amiga Ana Lucia, pelo apoio na histologia.

Aos estagiários Felipe, Mani e Rafael por todo o seu apoio e dedicação durante os experimentos.

Ao Guilherme a equipe da EPAGRI, pelo apoio administrativo junto ao projeto FINEp/Vieira.

Ao colega Luciano, pelo apoio na realização das análises de carotenóides do Capítulo III.

Às minhas amigas Juliana, Ilca, Roberta, Carol e Dayna, pela amizade e comanherismo nestes três anos de doutorado.

À amiga Chris, que muito me apoiou na reta final.

À Cary Anne e Allan, que durante estes três anos me deram apoio e incentivo para conclusão deste doutorado.

Ao Dr. Sergio e à Dra. Ana Luiza, que cuidaram da minha saúde com muito carinho.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Aqüicultura por seu conhecimento transmitido.

Aos meus *colegas da turma de doutorado, que sempre foram muito amigos.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida, há qual muito me ajudou.

Ao Departamento de Aqüicultura, em especial ao Carlito, junto à Secretaria do Curso de Pós-graduação, pelo apoio administrativo.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I. Introdução Geral	22
1.1. Apresentação e Problemática	22
1.2. Características biológicas de <i>Nodipecten nodosus</i>	23
1.2.1. Taxonomia	23
1.2.2. Distribuição e habitat	24
1.2.3. Alimentação	24
1.2.4. Reprodução	25
1.2.5. Estágios de desenvolvimento larval	27
1.3. Aspectos sobre o sistema imunológico de pectinídeos	28
1.3.1. Fagositose	29
1.3.2. Espécies reativas de oxigênio (ERO)	29
1.3.3. Peptídeos antimicrobianos	30
1.3.4. Formação de cápsulas e nodulação	30
1.3.5. Lectinas	30
1.3.6. Sistema Pró-fenoloxidase	30
1.3.7. Contagem total de hemócitos	30
1.4. Os carotenóides	31
1.4.1. Histórico	31
1.4.2. Estrutura	31
1.4.3. Propriedades	33
1.4.3.1. Propriedades físico-químicas dos carotenóides	33
1.4.3.2. Cor dos carotenóides	34
1.4.3.3. Precursor da vitamina A (retinol)	34
1.4.3.4. Efeito antioxidante	35
1.4.3.5. Peroxidação de lipídeos	35
1.4.3.6. Efeito na reprodução	36
1.4.3.7. Imuno-estimulante	36
1.4.4. Degradação dos carotenóides	36
1.4.5. Funções	37
1.4.5.1. Nas plantas	37
1.4.5.2. Nos organismos aquáticos	37
1.4.6. Fontes	37
1.4.6.1. Fontes naturais	37
1.4.6.2. Carotenóides sintéticos	38
1.4.7. Usos	38
1.4.8. Bio-acumulação	39
1.4.8.1. Crustáceos	40

1.4.8.2. Peixes	40
1.4.8.3. Moluscos	40
CAPÍTULO II. Objetivos	42
2.1. Objetivo geral	42
2.2. Objetivos específicos	42
CAPÍTULO III. Extração de carotenóides da gônada da vieira <i>Nodipecten nodosus</i> (Bivalvia; Pectinidae)	43
Resumo	45
Introdução	46
Materiais e Métodos	48
Resultados	50
Discussão	52
Agradecimentos	54
Referências	55
CAPÍTULO IV. Relação entre o ciclo reprodutivo, níveis de astaxantina e maturação gonádica na vieira <i>Nodipecten nodosus</i>	60
Resumo	62
Introdução	63
Materiais e Métodos	64
Resultados	66
Discussão	67
Agradecimentos	70
Referências	71
CAPÍTULO V. Efeito de dietas com diferentes concentrações e fontes de astaxantina na maturação de reprodutores, rendimento larval e de pré-ementes da vieira <i>Nodipecten nodosus</i> (L. 1758)	77
Resumo	79
Introdução	80
Materiais e Métodos	81
Resultados	86
Discussão	89
Conclusões	92
Agradecimentos	92
Referências	93
CAPÍTULO VI. Avaliação dos parâmetros hemato-imunológicos durante o ciclo	108

reprodutivo da vieira <i>Nodipecten nodosus</i> (L.1758) em associação com uma dieta enriquecida com carotenóides. Parte II – Acúmulo de astaxantina, maturação e rendimento larval	
Resumo	110
Introdução	111
Materiais e Métodos	112
Resultados	115
Discussão	116
Conclusões	117
Agradecimentos	118
Referências	119
CAPÍTULO VII. Efeito de dietas enriquecidas com os ácidos graxos EPA e DHA durante a maturação de reprodutores, rendimento larval e de pré-sementes de <i>Nodipecten nodosus</i> (L. 1758)	125
Resumo	127
Introdução	128
Materiais e métodos	129
Resultados	132
Discussão	133
Conclusões	135
Agradecimentos	135
Referências	136
CAPÍTULO VIII. Conclusões	143
Conclusões Gerais	143
Considerações Finais	145
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL	147

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1. Reprodutor da vieira *Nodipecten nodosus*. A barra representa 2 cm. 24
- Figura 2. Estrutura química de alguns carotenóides. Fonte: Fontana (1997). 32
- Figura 3. Espectro de absorção de carotenóides quimiossintéticos e microbianos (Fonte: Fontana, 1997) 33
- Figura 4. Bio-transformação do β -caroteno em astaxantina em crustáceos (Fonte: Liñan-Cabello et al., 2002). 41

CAPÍTULO III

- Figura 1. Carotenóides totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$) extraídos da porção feminina da gônada da vieira *Nodipecten nodosus*, de acordo com a proporção de acetona(Ac=O):hexano(Hex) na solução extratora e nos tempos de extração. Ac=O: Hex: (a) 1:1, (b) 1:3, (c) 1:5, e (d) 2:3 58
- Figura 2. Extração exaustiva de carotenóides totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$) da porção feminina da gônada da vieira *Nodipecten nodosus* seguindo um protocolo de extrações seqüenciais (10x) com a solução extratora Ac=O:Hex (1:3) 59

CAPÍTULO IV

- Figura 1. Secções histológicas da gônada feminina de *Nodipecten nodosus* mostrando os diferentes ciclos gametogenicos: (1) gametogenese; (2A) pré-desova inicial; (2B) pré-desova avançada; (3A) desova inicial; (3B) desova avançada; (4) repouso. ct: tecido conjuntivo; oo: oogonia; wf: parede do folículo; oc: oocito; if: espaço intrafolicular; rg: gametas remanescentes. A barra representa 100 μ . 74
- Figura 2. Temperatura da água do mar durante a coleta de vieiras e estágio sexual dos animais (*N. nodosus*) mensalmente (n=4). Estágios: (1) gametogenese; (2A) pré-desova inicial; (2B) pré-desova avançada; (3A) desova inicial; (3B) desova avançada. 75
- Figura 3. Quantidade de astaxantina na porção feminina da gônada da vieira *N. nodosus*, nos estágios sexual. Estágios: (1) gametogenese; (2A) pré-desova inicial; (2B) pré-desova avançada; (3A) desova inicial; (3B) desova avançada; (4) repouso 76

CAPÍTULO V

Figura 1. Experimento I: média e desvio padrão da quantidade de astaxantina na porção feminina da gônada de *N. nodosus* após maturação de 15 e 30 dias, em laboratório, com diferentes dietas enriquecidas com Algamac AST e com dieta basal de microalgas (Algamac0% - controle). As letras no gráfico representam as diferenças estatísticas, sendo as minúsculas para o tempo T_{15} e as maiúsculas para o tempo T_{30} de maturação. 103

Figura 2. Experimento II: média e desvio padrão da quantidade de astaxantina na porção feminina da gônada de *N. nodosus* após maturação de 07 e 15 dias, em laboratório, com diferentes dietas enriquecidas com Algamac AST e com dieta basal de microalgas (Algamac0% - controle). As letras no gráfico representam as diferenças estatísticas, sendo as letras minúsculas para o tempo T_7 e as maiúsculas para o tempo T_{15} de maturação. 104

Figura 3. Experimento III: média, desvio padrão e erro padrão da quantidade de astaxantina na porção feminina da gônada de *N. nodosus* após maturação de 30 dias em laboratório com apresentando dados iniciais (T_0) e de 3 tratamentos: Cm100% (controle); Cm:Algamac50% e Cm:H.pluvialis50%. As letras minúsculas no gráfico representam as diferenças estatísticas. 105

Figura 4. Experimento I e II: estágios sexuais da porção feminina da gônada da vieira *N. nodosus* no início da maturação (T_0) e para as cinco dietas testadas no experimento I, após quinze (T_{15}) e trinta (T_{30}) dias de maturação e no experimento II, após sete (T_7) e quinze (T_{15}) dias de maturação. Onde: (1) estágio de gametogênese; (2A) estágio de pré-desova inicial; (2B) estágio de pré-desova avançada; (3A) estágio de desova inicial; (3B) estágio de desova avançada e (4) estágio de repouso. T_0 = tempo zero; 0% = Algamac0%; 25% = Algamac25%; 50% = Algamac50%; 75% = Algamac75%; 100% = Algamac100%. 106

Figura 5. Experimento III: estágios sexuais da porção feminina da gônada da vieira *N. nodosus* no início da maturação (T_0) e após trinta (T_{30}) dias de maturação para as três dietas testadas. Onde: (1) estágio de gametogênese e (2A) estágio de pré-desova inicial. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas. 107

CAPÍTULO VI

Figura 1. Estágios sexuais da porção feminina da gônada da vieira *N. nodosus* no início da maturação (T_0) ; após quinze dias de maturação, para os tratamentos NatuRose0% (M0%) e NatuRose50% (M50%); após desova, para os tratamentos NatuRose0% (D0%) e NatuRose50% (D50%). Onde: (2A) estágio de pré-desova inicial; (2B) estágio de pré-desova avançada e (3B) estágio de desova avançada. As letras minúsculas no gráfico representam as diferenças estatísticas. 123

Figura 2. Média, desvio padrão e erro padrão da quantidade de astaxantina na porção feminina da gônada de *N. nodosus* no início da maturação (T_0); após maturação de 15 dias em laboratório para os tratamentos NatuRose0% (M0%) e NatuRose50% (M50%) e, após desova para os tratamentos NatuRose0% (D0%) e NatuRose50% (D50%). As letras minúsculas no gráfico representam as diferenças estatísticas.

124

CAPÍTULO VII

Figura 1. Estágios sexuais da porção feminina da gônada da vieira *N. nodosus* no início da maturação (T_0) e para as cinco dizes testadas, após trinta dias (T_{30}) de maturação para os cinco tratamentos testados. Onde: (1) estágio de gametogênese; (2A) estágio de pré-desova inicial; (2B) estágio de pré-desova avançada. As letras minúsculas no gráfico representam as diferenças estatísticas.

141

Figura 2. Quantidade média e desvio padrão do rendimento de larva “D”, larvas pedivéliger e pré-sementes de *N. nodosus* em cada tratamento testado durante a maturação. As letras minúsculas **a**, **b**, **c** e **d** representam a análise estatística da recuperação de larvas “D”; As letras maiúsculas **A**, **B**, **C** e **D** representam a análise estatística da recuperação de larvas pedivéliger; e as letras minúsculas **v**, **w**, **x**, **y** e **z** representam a análise estatística da recuperação de pré-sementes.

142

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS DA INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1: Resumo com algumas das principais estruturas externas em cada estado larval e pós-larval para pectinídeos, com as dimensões médias e o tempo de desenvolvimento.	28
Tabela 2. Atividade pró-vitamina A de alguns carotenóides	35
Tabela 3. Fontes de carotenóides e o organismo que as produz e a respectiva referência bibliográfica.	39

CAPÍTULO III

Tabela 1. Carotenóides totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$) extraídos de gônada feminina liofilizada da vieira <i>Nodipecten nodosus</i> e tratamentos com soluções extratora e tempos de extração	57
--	----

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Descrição histológica dos estágios sexuais da porção feminina da gônada da vieira <i>Nodipecten nodosus</i>	73
---	----

CAPÍTULO V

Tabela 1. Descrição da composição das dietas utilizada em cada tratamento dos experimentos I e II, indicando as diferentes proporções de dieta basal (microalgas viva: <i>Isochrysis sp.</i> , <i>Chaetoceros muelleri</i> e <i>Skeletonema sp.</i> nas proporções 50:25:25, respectivamente) e de microalga seca <i>Haematococcus pluvialis</i> (Algamac AST). Quantidade de proteína total, carboidrato total e lipídeos totais em porcentagem e de astaxantina em $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ nas diferentes dietas utilizadas para a alimentação das vieiras <i>N. nodosus</i> durante os experimentos de maturação.	97
Tabela 2. Descrição da composição das dietas utilizadas no experimento III, indicando as diferentes proporções em <i>Chaetoceros muelleri</i> (microalga viva), em <i>Haematococcus pluvialis</i> (microalga seca - Algamac AST) e em <i>H. pluvialis</i> (microalga viva). Quantidade de proteína total, carboidrato total e lipídeos totais em porcentagem e de astaxantina em $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ nas diferentes dietas utilizadas para a alimentação das vieiras <i>N. nodosus</i> durante os experimentos de maturação.	98
Tabela 3. Porcentagem média e desvio padrão da quantidade total de proteína, carboidrato, lipídeos e astaxantina nas microalgas utilizadas nas diferentes dietas testadas.	99

Tabela 4. Experimentos I e II: quantidade de fêmeas que emitiram gametas e média e desvio padrão (de três contagens) da quantidade de: oócitos totais, larvas “D” obtidas e rendimentos de larvas pedivéliger (com 13 dias de larvicultura) para *N. nodosus*. 100

Tabela 5. Experimento III: quantidade de fêmeas que emitiram gametas, e média e desvio padrão (de três contagens) da quantidade de: oócitos totais, larvas “D” obtidas, rendimentos de larvas pedivéliger (com 13 dias de larvicultura) e obtenção de pré-sementes de *N. nodosus*. 101

Tabela 6. Significância estatística (p) para as comparações de quantidade de astaxantina na porção feminina da gônada nos diferentes tempos de maturação em cada tratamento, para os experimentos I e II. 102

CAPÍTULO VI

Tabela 1. Descrição da composição das dietas utilizada em cada tratamento testado indicando as diferentes composições em dieta basal (microalgas viva: *Isochrysis sp.*, *Chaetoceros muelleri* e *Skeletonema sp.* nas proporções 50:25:25, respectivamente) e em microalga seca *Haematococcus pluvialis* (NatuRose®). 121

Tabela 2. Quantidade de fêmeas que emitiram gametas e média e desvio padrão (em três contagens) da quantidade de: oócitos eliminados, larvas “D” (24h) obtidas e rendimento de larvas pedivéliger (com 13 dias de larvicultura) para *N. nodosus*. As letras minúsculas na tabela representam as diferenças estatísticas. 122

CAPÍTULO VII

Tabela 1. Descrição da composição das dietas utilizada em cada tratamento testado indicando as diferentes microalgas utilizadas, o enriquecimento com os ácidos graxos EPA e DHA e a dieta basal (microalgas viva: *Isochrysis sp.*, *Chaetoceros muelleri* e *Skeletonema sp.* nas proporções 50:25:25, respectivamente). 139

Tabela 2. Quantidade de fêmeas que emitiram gametas, porcentagem de fêmeas que desovaram e média e desvio padrão da quantidade de oócitos totais eliminados após desova de *N. nodosus* para cada tratamento. As letras minúsculas na tabela representam as diferenças estatísticas. 140

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac=O	= Acetona
Ac=O: Hex	= Acetona: Hexano
Anova	= Análise de variância
B	= Ingremento de Peso
Cc	= <i>Chaetoceros calcitrans</i>
Cél	= Células
Ci	= Concentração de carotenóides no tecido
CLAE	= Cromatografia Líquida de alta eficiência
Cm	= <i>Chaetoceros muelleri</i>
CP	= Concentração total de proteína
CR	= Quantidade carotenóides retida
DHA	= Docosahexaenóico 22:6n-3
DHC	= Differential Hemocytes Count
EPA	= Eicosapentaenóico 20:5n-3
ERO	= Espécies Reativas de Oxigênio
Hex	= <i>n</i> -Hexano
HPLC	= High Performance Liquid Cromatografi
Mix	= Dieta basal
Pav	= <i>Pavlova sp</i>
PDS	= Síndrome de Deficiência de Pigmento
proPO	= Pró-fenoloxidase
PUFAS	= Poli-unsaturated Fatty Acids
Sk	= <i>Skeletonema sp.</i>
T	= Tempo
THC	= Total Hemocytes Count
T-Iso	= <i>Isochrysis sp</i>
UV	= Ultravioleta
Wi	= Peso médio

RESUMO

Na obtenção de sementes da vieira *Nodipecten nodosus* em laboratório, a maturação dos reprodutores é uma etapa importante, já que o estado nutricional dos reprodutores está relacionado com a quantidade e qualidade das larvas geradas. Neste estudo foi avaliada a utilização de dietas ricas em carotenóide (astaxantina) ou enriquecidas com os ácidos graxos DHA e EPA na maturação de reprodutores de *N. nodosus* e seu efeito nos estágios sexuais, acúmulo de astaxantina e, no rendimento de larvas e de pré-sementes. Para isso, foi padronizada uma metodologia de extração de carotenóides da porção feminina da gônada da vieira *N. nodosus* sendo a melhor solução extratora a Ac=O: Hex 1:3. Foi possível descrever macroscopicamente e histologicamente 4 estágios sexuais bem definidos sendo que, os estágios sexuais de pré-desova avançada (estágio 2B, com $45,06 \pm 6,35 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de astaxantina) e de desova inicial (estágio 3A, com $38,01 \pm 7,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de astaxantina) foi onde se detectou as maiores quantidades desse carotenóide. Na maturação de reprodutores da vieira *N. nodosus* as dietas Algamac50%, Algamac75%, Algamac100% e Cm:H.pluvialis50%, ricas em carotenóides, proporcionaram um maior acúmulo de astaxantina na porção feminina da gônada, bem como um efeito positivo no desenvolvimento dos estágios sexuais dos reprodutores e no rendimento larval. Na maturação com dietas enriquecimento com o ácido graxo, a dieta T-Issso + EPA favoreceu a maturação dos reprodutores, bem como um efeito positivo no rendimento de larvas "D", pedivéliger e de pré-sementes, $97,62 \pm 2,18\%$, $99,05 \pm 2,86\%$ e $42,71 \pm 0,27\%$, respectivamente.

Palavras Chave: *Nodipecten nodosus*, vieira, maturação, dieta, larvas, astaxantina, ácidos graxos.

ABSTRACT

In seeds production of the scallop *Nodipecten nodosus* in hatchery, the broodstock maturation is an important stage since the broodstock nutritional condition is related with the amount and quality of larvae production. In this study it was evaluated the use of diets rich in carotenoids (asthaxantin) or enriched with fatty acids DHA and EPA in the maturation of *N. nodosus* broodstock animals and its effects in the sexual stage, asthaxantin accumulation and, in the larvae and spat yield. For this, an extraction methodology of carotenoids of the female portion of the *N. nodosus* scallop gonad was standardized being the best extracting solution, Ac=O: Hex 1:3 ration. It was possible to describe macroscopically and histologically 4 well defined sexual stages. In the advanced pre-spawning sexual stage (sexual stage 2B, with $45.06 \pm 6.35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of asthaxantin) and of initial spawning (sexual stage 3A, with $38.01 \pm 7.16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of asthaxantin) it where detected the bigger amounts of this carotenoid. In the broodstock maturation of the *N. nodosus* scallop the diets Algamac50%, Algamac75%, Algamac100% and Cm: H.pluvialis50%, rich in carotenoids, provided the biggest accumulation of asthaxantin in the feminine portion of the gonad, as well as a positive effect in the sexual stages development of the broodstock animals and in the larval yield. In the maturation with diets enriched with fatty acid, the T-Iso+EPA diet favored the maturation of the broodstock animals, as well as a positive effect in the larvae "D" production, pediveliger and spat yield, $97.62 \pm 2.18\%$, $99.05 \pm 2.86\%$ and $42.71 \pm 0.27\%$, respectively.

Key words: *Nodipecten nodosus*, scallop, maturation, diets, larvae, astaxanthin, fatty acids.

PROPOSTA DA TESE

Esta Tese nasce a partir de uma demanda do próprio Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), de aprimorar as técnicas de reprodução em laboratório da vieira *Nodipecten nodosus*, visando uma maior produção de sementes. Em uma revisão bibliográfica realizada para camarões, percebeu-se que os carotenóides apresentavam efeito positivo na reprodução e na sobrevivência de larvas de camarão, então, pensou-se: “porque não testar o enriquecimento de dieta dos reprodutores da vieira com fontes de carotenóides também?”. Realizou-se, então, uma revisão bibliográfica, visando procurar trabalhos semelhantes em moluscos, observando-se que, até o presente momento, não havia publicações acerca desse tema. A partir desta constatação nasceu a proposta e estudar os efeitos dos carotenóides na maturação e sobrevivência larval da vieira, uma vez que o órgão reprodutivo feminino da vieira apresenta uma coloração alaranjada, o que pode estar relacionada com a quantidade de carotenóides presentes no tecido.

Na revisão bibliográfica realizada observou-se que os carotenóides, além de apresentarem efeito positivo na maturação e sobrevivência larval de camarões, também apresentavam efeito no sistema imunológico dos animais, por seu alto potencial antioxidante. Assim, decidiu-se que, além do efeito na reprodução mostrava-se interessante saber o efeito dos carotenóides no sistema imunológico das vieiras.

É importante destacar que o carotenóide avaliado neste estudo foi a astaxantina, por ser o carotenóide em maior quantidade presente na gônada da vieira *N. nodosus*, segundo resultados obtidos em bioensaio preliminares.

Outro aspecto observado nesta revisão bibliográfica foi a grande quantidade de trabalhos avaliando o efeito dos lipídeos na reprodução de moluscos em geral e por isto decidiu-se também avaliar os efeitos dos lipídeos em *N. nodosus*.

Para alcançar todos esses objetivos, optou-se em dividir o presente estudo em cinco capítulos, onde:

- **Capítulo III:** para a realização deste estudo foi necessária a definição de um protocolo de extração de carotenóides da gônada da vieira, visto que até então, não havia um trabalho definindo o melhor método para extração de carotenóides. Foram encontrados apenas dois trabalhos com extração de carotenóides de pectínídeos, os quais utilizaram método de extração para camarões e peixes, com produtos altamente tóxicos. Por isto foi necessário definir um protocolo de extração de carotenóides da vieira;
- **Capítulo IV:** Além do protocolo de extração de carotenóides foi necessária a descrição dos estágios reprodutivos da vieira *N. nodosus* de cultivo e a quantidade de astaxantina em cada estágio sexual.
- **Capítulo V:** Neste capítulo foram realizados 3 experimentos de maturação com duas fontes de astaxantina, a microalga *Haematococcus pluvialis* seca, vendida comercialmente como Algamac AST e viva, produzida no LMM, avaliando o acúmulo de carotenóides na porção feminina da

gônada e o estágio sexual após a maturação. Para isto foi necessária a realização de bioensaios: (1) definição da melhor concentração de microalgas na alimentação de reprodutores da vieira *N. nodosus*; (2) produção da microalga *H. pluvialis* viva no LMM, a qual demandou a realização de bioensaios para definição no melhor método de estresse desta microalga para a produção de carotenóides. (3) criação de um sistema no LMM eficiente para a alimentação dos reprodutores com a microalga seca; (4) realização de um curso de bioquímica no LMM para a capacitação dos técnicos e alunos envolvidos no presente estudo na quantificação de proteína, lipídeos e carboidratos em microalgas. Neste capítulo, também foram descritos os resultados da eliminação de gametas, larviculturas (para os 3 experimentos) e assentamento (só para o experimento 3) para cada tratamento testado na maturação, a fim de avaliar o efeito da maturação dos reprodutores alimentados com dietas ricas em astaxantina na eliminação de gametas e rendimento de larvas e pré-sementes.

- **Capítulo VI:** Neste capítulo foi avaliado o efeito dos carotenóides nos parâmetros hemato-imunológicos dos reprodutores da vieira maturados com fontes de carotenóides. Os parâmetros hemato-imunológicos foram avaliados em parceria com um aluno de mestrado, Delano Schleder, o qual desenvolveu sua dissertação de mestrado, gerando uma publicação já aceita. Os dados de maturação, acúmulo de astaxantina, eliminação de gametas e rendimento de larvas avaliados neste experimento foram descritos neste capítulo. Neste capítulo utilizou-se o NatuRose como fonte de astaxantina, que é a microalga *Haematococcus pluvialis* seca e tem a mesma composição que o Algamac AST.
- **Capítulo VII:** Neste capítulo foi avaliada a maturação de reprodutores da vieira com a implementação dos ácidos graxos DHA e EPA e seu efeito no estágio sexual, eliminação de gametas e o rendimento de larvas e de pré-sementes.

Produção bibliográfica durante o estudo relacionado ao Doutorado:

Artigos aceitos para publicação

1. Sühnel, S., Lagreze, F., Ferreira, J.F., Campestrini, L. H., Maraschin, M., *in press*. Carotenoid extraction from the gonad of the scallop *Nodipecten nodosus* (Bivalvia; Pectinidae). Brazilian Journal of Biology. Accepted in 2008.
2. Schleder, D.D., Kayser, M., Sühnel, S., Ferreira, J.F., Rupp, G.S., Barraco, M.A., 2008. Evaluation of hemato-immunological parameters during the reproductive cycle of the scallop *Nodipecten nodosus* in association with a carotenoid-enriched diet. Aquaculture, in press. Accepted in May, 1th 2008.

Artigo enviado para publicação

1. Sühnel, S., Lagreze, F., Bercht, M. Ferreira, J.F., Schaefer, A.L.C., Magalhães, A.R.M., Maraschin, M. The relations between the reproductive cycle, astaxanthin levels and gonadic maturation in

the scallop *Nodipecten nodosus* (Bivalvia; Pectinidae). Brazilian Journal of Biology. Enviado em julho de 2008.

Resumos Publicados em Anais de Congressos

1. SÜHNEL, S., LAGREZE, F., MARASCHIN, M., FERREIRA, J.F.. The effect of an enriched diet with Algamac AST on carotenoids accumulation during hatchery maturation of the scallop *Nodipecten nodosus* (BIVALVIA:PECTINIDAE) In: XIII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, 2008, Florianópolis.
2. FERREIRA, J.F., SÜHNEL, S., LAGREZE, F., PEREIRA, A., SILVA, F. C., GOMES, A.M.C.H., BERCHT, M. Obtenção de larvas de *Nodipecten nodosus* produzidas a partir de reprodutores maturados com dietas enriquecidas com ALGAMAC AST In: XX Encontro Brasileiro de Malacologia, 2007, Rio de Janeiro.
3. SCHLEDER, D.D., KAYSER, M.R., SÜHNEL, S., FERREIRA, J.F., RUPP, G.S., BARRACCO, M.A. Análise comparativa de alguns parâmetros hemato-imunológicos em reprodutores de vieira *Nodipecten nodosus* antes e após a desova In: ENBRAPOA, 2006
4. SCHLEDER, D.D., KAYSER, M.R., SÜHNEL, S., FERREIRA, J.F., GARGIONI, R., RUPP, G.S., BARRACCO, M.A. Estudo básico do sistema imune da vieira *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) do litoral de Santa Catarina In: ENBRAPOA, 2006
5. LAGREZE, F., SÜHNEL, S., ZANETTE, G., PEREIRA, A., SILVA, F. C., GOMES, A.M.C.H., FERREIRA, J.F. Estudo preliminar do consumo de microalgas pela vieira *Nodipecten nodosus* In: AquaCiencia, 2006, Bento Gonçalves.

CAPÍTULO I – Introdução Geral

1.1. Apresentação e Problemática

Os pectinídeos são moluscos bivalves, da família Pectinidae, que apresentam importância econômica. Devido ao seu elevado valor comercial e a sua intensa pesca, esta espécie tem sido foco de diversas pesquisas a nível mundial.

No litoral brasileiro, a família Pectinidae está representada por 6 gêneros e 16 espécies (RIOS, 1994). Destas 16 espécies, destacam-se as espécies *Nodipecten nodosus* e *Euvola ziczac* por serem de interesse econômico no País.

Segundo estudos desenvolvidos por Rupp et al. (1992) e Manzoni e Rupp (1993), a espécie *N. nodosus* apresenta um bom potencial para cultivo em ambiente natural.

Entretanto, para o êxito da atividade de cultivo e manejo pesqueiro, é fundamental que exista um bom conhecimento sobre a biologia das espécies envolvidas (SHUMWAY, 1991).

O principal ponto crítico no cultivo de pectinídeos, assim como o de outros moluscos marinhos, é a obtenção de larvas e sementes (moluscos jovens) (HARDY, 1991). As sementes podem ser obtidas através da captação no ambiente natural ou podem ser produzidas em laboratórios ("hatcheries").

Pesquisas para obtenção de sementes de *N. nodosus* através de coletores artificiais colocados em ambiente natural, demonstraram que esta espécie possui uma baixa taxa de captação, devido a sua baixa densidade e à dispersão das populações (OSTINI; POLI, 1990; MANZONI; RUPP, 1993; MANZONI et al., 1996; URIARTE et al., 2001).

Os autores Loosanoff e Davis (1963) desenvolveram técnicas que beneficiaram a produção de larvas de moluscos bivalves em laboratório. Atualmente, para pectinídeos são utilizadas técnicas específicas como as de Chew et al. (1987), Bourne et al. (1989) e Illanes (1990). Essas técnicas compreendem as seguintes etapas: obtenção e transporte de reprodutores, condicionamento de reprodutores, indução à desova, larvicultura, assentamento e metamorfose, produção de pré-sementes (berçário) e, finalmente, transferência para o mar.

Para a espécie *N. nodosus*, os autores Rupp (1994), Rupp (1997), Rupp et al. (2000a), Rupp et al. (2000b), De Bem et al. (2001a), De Bem et al. (2001b), De La Roche et al. (2002), Rupp e Parsons (2004), Rupp et al. (2004a) e Rupp et al. (2004b) estudaram as técnicas de produção de sementes e características biológicas da espécie.

Na reprodução de vieiras a alta mortalidade é um ponto crítico. Segundo Nicolas et al. (1996), a mortalidade de larvas está associada à presença de bactérias. Lodeiros (1988) cita que as instalações de um laboratório são adequadas para a proliferação bacteriana, devido à presença de cultivos de microalgas, a presença de matéria orgânica e a temperatura constante, as quais induzem o crescimento bacteriano. A presença das bactérias é demonstrada pelo uso profilático de agentes anti-bacterianos que aumenta a sobrevivência nos cultivo (ROBERT et al., 1996).

Um dos métodos para controlar a proliferação de patógenos em "hatcheries" é a utilização de antibióticos (AVENDAÑO; RIQUELME, 1999; DE BEM, 1999). Cabe destacar que a utilização destes antibióticos aumenta a porcentagem de sobrevivência, entretanto, esta técnica normalmente gera

cepas bacterianas resistentes aos antibióticos (FITT et al., 1992; MADIGAN et al. 1997). A utilização de diversos tipos de antibióticos em animais para o consumo humano está proibida em diversos países com, por exemplo, nos países da União Européia.

Métodos profiláticos alternativos têm sido propostos para o controle de enfermidades na larvicultura, como por exemplo, a utilização de bactérias probióticas, limpeza dos equipamentos com produtos naturais, entre outros.

Outra alternativa para melhorar a qualidade larval em forma direta é através da nutrição. Cabe destacar que, até o presente momento não foi testado o enriquecimento de dietas para reprodutores de *Nodipecten nodosus* durante a maturação de reprodutores com carotenóides e ácido graxos.

1.2. Características biológicas de *Nodipecten nodosus*

1.2.1. Taxonomia

Classificação da espécie *Nodipecten nodosus* (Figura1) segundo Smith (1991):

Phylum:	Mollusca
Classe:	Bivalvia
Subclasse:	Pteriomorphia
Superordem:	Eupteriomorphia
Ordem:	Ostreoida
Subordem:	Pectinina
Superfamília:	Pectinacea
Família:	Pectinidae
Gênero:	<i>Nodipecten</i>
Espécie	<i>Nodipecten nodosus</i> (LINNAEUS, 1758)

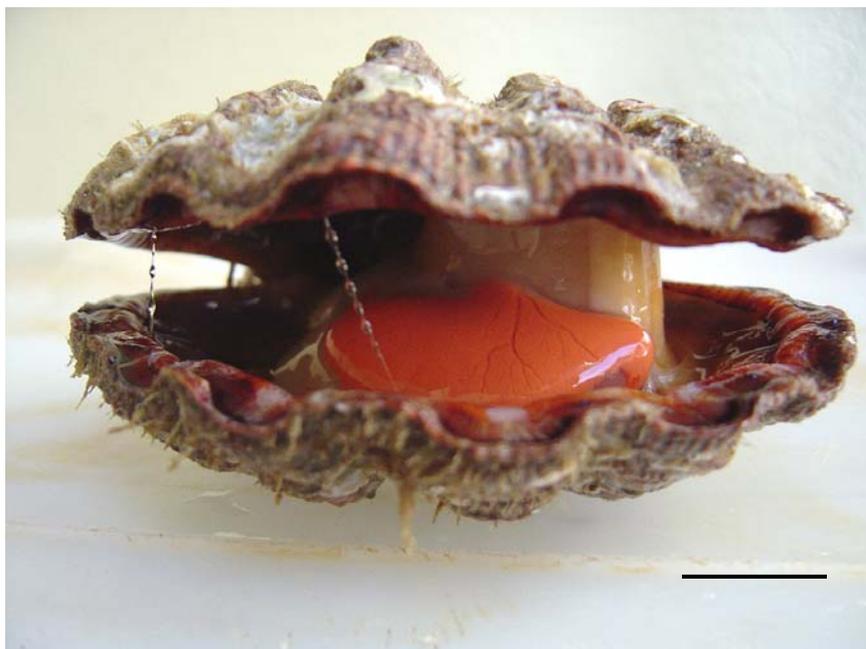


Figura 1. Reprodutor da vieira *Nodipecten nodosus*. A barra representa 2 cm.

1.2.2. Distribuição e habitat

A espécie *Nodipecten nodosus*, conhecida também com o nome popular de “vieira”, é o maior dos pectinídeos registrados para o litoral brasileiro (RIOS, 1994). Segundo Rupp e Parsons (2006) a sua distribuição geográfica se estende desde o sul do mar do Caribe, Ilhas Virgens, América Central Sul da Península de Yucatam, passando por Panamá, Colômbia e Venezuela e de forma descontínua no Brasil, sendo encontrada em Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro e Santa Catarina.

Os dados batimétricos desta espécie são escassos. Segundo Smith (1991) descreve a ocorrência de exemplares entre 10 e 15 metros e Rupp (1994, 1997), na Ilha do Arvoredo, Santa Catarina, a ocorrência entre 6 e 30 metros de profundidade. Segundo Rios (1994), os pectinídeos encontram-se sob o substrato arenoso e de algas calcárias.

1.2.3. Alimentação

O processo de alimentação dos moluscos bivalves é através da filtração, sendo um mecanismo que permite a remoção de materiais particulados microscópicos suspensos na coluna d'água.

Os filtradores se alimentam removendo o material particulado suspenso na coluna d'água, sua composição inclui além de fitoplâncton partículas inertes que compõe o detrito, podendo ser de origem orgânica ou inorgânica.

Os bivalves formam uma corrente de água por suas brânquias onde o alimento é coletado e levado ao sistema digestivo através do transporte ciliar. Esta remoção das partículas em suspensão

na água por bivalves, recebe o nome de Taxa de Clareamento, calculada através do volume de água liberado de suas partículas por unidade de tempo (litros/hora) (NAVARRO, 2001).

Segundo Vernet (1977), adultos de pectinídeos retêm com maior eficiência partículas pequenas menores que 40 micrômetros e as larvas entre 5 e 8 micrômetros.

Os bivalves possuem capacidade de manter as taxas de nutrientes relativamente constantes, balanceando e controlando as taxas de ingestão, absorção de nutrientes, eliminação de pseudofeces (compostas por “pellets” formados pelas partículas rejeitadas, associadas a um muco protéico) e fezes.

Essa resposta funcional às variações de concentração de alimento foi estudada em *Mytilus edulis*:

- ✓ Com alta concentração de alimento a taxa de filtração e o bombeamento de água diminuem, a produção de pseudofeces aumenta, mantendo uma taxa de ingestão próxima do nível máximo;
- ✓ Com baixa concentração de alimento a taxa de ingestão aumenta e se estabiliza quando as pseudofeces são produzidas e ocorre um enchimento do trato digestivo.

1.2.4. Reprodução

Nodipecten nodosus é um bivalve hermafrodita funcional (simultâneo) (RUPP, 1994; LODEIROS et al, 1997), com desovas ao longo do ano, sendo as épocas de maior intensidade na primavera e no verão (VÉLEZ, 1987; MANZONI, 1994; MANZONI et al., 1996). Estudos desenvolvidos por Manzoni (1994), na região da Ilha do Arvoredo mostraram que há uma baixa captação de sementes desta espécie. Estes dados, somados as desovas assíncronas, sugerem que o fornecimento de sementes, desta espécie para a produção comercial, seja através da produção em laboratório.

A gônada é uma glândula definida envolvida por um tegumento. O tegumento é composto por: um epitélio externo, uma lâmina basal e um tecido conjuntivo (tecido sub-epitelial perigonádico). A gônada contém gonoductos, vasos sanguíneos, fibras musculares e parte do intestino. A parte masculina da gônada, de cor branca, está na zona proximal e a feminina, de cor alaranjada, na porção distal. Os folículos apresentam forma de bulbo, delimitados por um tecido conjuntivo intersticial, o qual quando o folículo está cheio é mais fino e quando está vazio é mais espesso (ROMÁN et al., 2001).

O ciclo gametogênico envolve um período de repouso da atividade reprodutiva (período vegetativo), período de diferenciação celular, de crescimento citoplasmático, de vitelogênese (maturação), de desova (liberação de gametas) e de reabsorção dos gametas que não foram liberados na desova (BARBER; BLAKE, 1991).

A identificação do estágio de desenvolvimento gonádico pode ser realizada por uma inspeção visual da gônada observando seu tamanho, coloração e espessura. Contudo, este método pode conduzir a estimativas subjetivas. Outro método direto de identificação é o índice gonádico, obtido através do peso da gônada dividido pelo peso total dos tecidos moles. Este método é simples e de aplicação direta, contudo o seu inconveniente é que o animal é sacrificado (ROMÁN et al., 2001).

Segundo Utting e Millican (1997), as reservas de alimento antes de entrar no processo de vitelogenese são fundamentais. Estes autores também relatam que um melhor estado nutricional aumenta a fecundidade e a qualidade dos ovos produzidos. Segundo Uriarte et al., (2001) recentemente tem sido demonstrado que existe um efeito do estado nutricional dos reprodutores e a qualidade das larvas resultantes.

Hernandez et al., (2000) descrevem que as larvas resultantes de progenitores alimentados com alta proteína mostraram um crescimento superior a larvas procedentes de reprodutores condicionados com dieta protéica normal.

Em *Pecten maximus* as reservas de proteínas, carboidratos e lipídeos no músculo adutor e lipídeos na glândula digestiva, são transferidos para o desenvolvimento gonádico durante o condicionamento de reprodutores (SOUDANT et al., 1996) em resposta ao aumento da temperatura. De mesmo modo, a temperatura inicia o processo de gametogênese, fecundidade e qualidade dos ovos produzidos aumentam quando são dados suprimentos algais (DEVAUCHELLE; MINGANT, 1991).

Segundo Wilson et al. (1996), o condicionamento de reprodutores é uma etapa importante no processo de cultivo de bivalves em laboratório, embora não sempre com total sucesso. Este condicionamento é usualmente atingido pela manipulação de regimes alimentares e da temperatura da água no laboratório.

Os moluscos bivalves apresentam ciclos estacionais de armazenamento de energia, o qual é regulado por fatores exógenos e endógenos. A energia é armazenada pelos animais durante períodos não reprodutivos sendo usada subseqüentemente para:

- ✓ O suporte e a manutenção quando o alimento é escasso;
- ✓ Produzir um incremento líquido em massa em outros períodos do ano;
- ✓ Substituir perda de massa em outros períodos do ano;
- ✓ Produzir gametas (BARBER; BLAKE 1985; BAYNE, 1985).

A qualidade das dietas fornecida aos reprodutores explica uma grande parte das variabilidades experimentadas durante o cultivo de bivalves e como afeta a composição dos gametas e a qualidade das larvas (NEVEJAN et al., 2003).

Durante a ovogênese, os oócitos adquirem suas reservas de lipídeos de três fontes principais:

- ✓ Do músculo adutor, no qual o glicogênio é convertido em lipídeo. (GABBOTT 1975; BAYNE et al., 1982; BARBER; BLAKE 1985a);
- ✓ Da transferência de lipídeos das reservas na glândula digestiva para a gônada feminina (VASSALO, 1973; BARBER; BLAKE 1981; BARBER; BLAKE 1985a);
- ✓ Diretamente do alimento quando os adultos são colocados sob estresse nutricional (GALLAGER; MANN 1986; SOUDANT et al., 1996b).

As reservas de energia, armazenadas nos oócitos, são catabolisadas no desenvolvimento embrionário (oócitos fertilizados) até a larva "D". Contudo, o catabolismo de energia ocorre para manter a larva durante o estagio transitório de consumidor endógeno para exógeno (WHYTE et al., 1990). A sobrevivência de larvas de *Mercenaria mercenaria* e *Crassostrea virginica* esta altamente

correlacionada com as reservas totais de lipídeos depositados nos oócitos durante a vitelogênese (GALLAGER; MANN, 1986).

Segundo Bayne et al. (1975), o desenvolvimento das larvas de *Mytilus edulis* está correlacionado com o nível de lipídeos nos oócitos antes de serem fertilizados. A viabilidade das larvas de *Ostrea edulis* está relacionada com o conteúdo lipídico, particularmente a fração lipídica neutral, no momento da liberação das larvas (HELM et al., 1973).

Diferentes qualidades de conteúdo lipídico, utilizadas em dietas no condicionamento de reprodutores, mostraram os efeitos das deficiências de ácidos graxos específicos em oócitos e larvas de bivalves (UTTING; DOYOU 1992; MILLICAN; HELM 1994; SOUDANT et al., 1996a).

1.2.5. Estágios de desenvolvimento larval

O desenvolvimento das larvas de pectinídeos compreende diferentes estágios. Em cada estágio a larva de pectinídeos apresenta diferentes características. O tempo de desenvolvimento larval pode variar em função de diversos fatores, como por exemplo: temperatura, uso de antibióticos e alimentação.

Para *Nodipecten nodosus* o ciclo varia, segundo Rupp (1994), de 15 a 19 dias.

Os estados de desenvolvimento larval para pectinídeos que podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo com algumas das principais estruturas externas em cada estado larval e pós-larval para pectinídeos, com as dimensões médias e o tempo de desenvolvimento.

Estágio	Dimensão média (µm)	Tempo	Principais estruturas
Óvulo	60	0	Membrana vitelínea, coloração vermelho-alaranjado
Trócofora	70 - 80	10-12 horas	Flagelo sensitivo, ativamente nadantes
Véliger ("larva D")	100	22 horas	Velum ciliado, flagelos sensitivos
veliconcha	160-200	11 dias	Umbo, velum, flagelos sensitivos, prodissoconcha I
Pediveliger	186-250	14 dias	Pé, mancha ocular, prodissoconcha I e II, calo do pé por onde sai o bisso
Pós-larva	270-295	19-21 dias	Dissoconcha, branquias, pós-larvas fixadas ao substrato ou rastejando a busca de um substrato com o pé ativo

(Fonte: RUPP, 1994; RUPP; PARSONS, 2006)

1.3. Aspectos sobre o sistema imunológico de Pectinídeos

Os moluscos, como todos os invertebrados, dispõem de um sistema imunológico que os protege contra patógenos. Seu sistema imune está restrito a uma imunidade inata ou natural, não possuindo o sistema adaptativo altamente específico dos vertebrados.

De forma semelhante a todos os animais, o sistema imune dos moluscos está relacionado principalmente ao seu sangue ou hemolinfa. Este sistema engloba reações celulares, desempenhadas pelas células circulantes ou hemócitos, reações humorais, onde atuam proteínas e outras moléculas plasmáticas e reações integradas em sistemas multiméricos que envolvem respostas celulares e humorais (VARGAS-ALBORES; BARRACCO, 2001).

Os hemócitos são classificados em dois grupos celulares; aqueles que contêm muitos grânulos, denominados hemócitos granulares ou granulócitos, e aqueles com pouco ou nenhum grânulo, conhecidos como hemócitos agranulares, hialinos ou agranulócitos (HINE, 1999).

Há, entre os moluscos pectínídeos, uma controvérsia quanto à presença dos hemócitos granulares. Foi referido que, em *Chlamys varia* e *Pecten maximus*, não são encontrados hemócitos granulares na hemolinfa (AUFFRET, 1988; HENRY et al., 1990; MORTENSEN; GLETTE, 1996). No entanto, há relatos da presença de granulócitos em *Chlamys farreri* (Liu et al., 2004), *Argopecten irradians irradians* (LIU et al., 2004; ZHANG et al., 2005; HEGARET; WIKFORS, 2005), e *Argopecten purpuratus* (GONZALEZ; ARENAS, 2002; LUNA-GONZALEZ et al., 2003).

Os granulócitos, de modo geral, parecem ser as células mais ativas na função imunológica. Embora sua composição e função possam variar grandemente entre os bivalves por diversos fatores, são capazes de fagocitar ativamente, produzir enzimas digestivas, gerar espécies reativas de oxigênio, ativar o mecanismo da enzima fenoloxidase e produzir lectinas com diferentes padrões de ligação ao patógeno (HINE, 1999). Recentemente foi identificada a presença de hemócitos granulares em *Nodipecten nodosus* por Schleder et al. (*in press*).

1.3.1. Fagocitose

A principal resposta imune celular é a fagocitose, que representa a primeira linha de defesa contra a invasão de microorganismos. Neste processo, os agentes estranhos são englobados, internalizados e destruídos imediatamente após o contato com hemócitos (MORTENSEN; GLETTE, 1996).

A degradação do agente estranho no fagossoma é procedida por uma gama de mecanismos microbicidas, os quais podem incluir a liberação de enzimas degradativas e oxidativas (PIPE, 1990; RENWRANTZ et al., 1996), a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e os peptídeos antimicrobianos (PIPE, 1992; ARUMUGAM et al., 2000).

Os hemócitos podem também liberar outros compostos como parte de sua estratégia de defesa, destacando-se entre estes as aglutininas ou lectinas e as moléculas do sistema pró-fenoloxidase (proPO) (LUNA-GONZALEZ et al., 2003).

1.3.2. Espécies reativas de oxigênio (ERO)

As ERO são moléculas produzidas que possuem um papel importante na degradação de microorganismos invasores, no entanto, também podem danificar o tecido do hospedeiro. Para neutralizar os efeitos não desejados, existem enzimas antioxidantes como: a glutaion-redutase, a catalase e SOD. Ademais, tem sido reportado vários compostos de baixo peso molecular tais como: a glutatona, carotenóides e as vitaminas C e E (ROCH, 1999; VARGAS-ALBORE; BARRACCO, 2001).

Os autores Camus et al. (2002) evidenciaram o aumento na produção de ERO e depleção na defesa antioxidante (glutaciona) em *Chlamys islandicus* expostos ao benzopireno. Hégaret e Wikfors (2005) também observaram o incremento das ERO em *Argopecten irradians irradians* infectados pelo protozoário *Prorocentrum minimum*.

1.3.3. Peptídeos Antimicrobianos

Em moluscos bivalves, os peptídeos antimicrobianos (PAM) foram identificados, apenas muito recentemente, na hemolinfa dos mexilhões *Mytilus edulis* (CHARLET et al., 1996) e *M. galloprovincialis* (MITTA et al., 2000a; MITTA et al., 2000b). Em *M. galloprovincialis*, por exemplo, foram identificadas quatro classes de PAM, com diferentes isoformas: defensinas, mitilinas, miticinas e mitimicinas (MITTA et al., 2000a).

1.3.4. Formação de cápsulas e nodulação

Em bivalves, também se tem relatado a formação de cápsulas e nódulos, onde a invasão por parasitas desencadeia, usualmente, uma resposta inflamatória caracterizada pela infiltração de hemócitos no tecido infectado e o encapsulamento do agente estranho. Nestes processos são utilizados, pelos hemócitos, os mesmos mecanismos microbicidas da fagocitose (VARGAS-ALBORES; BARRACCO, 2001).

1.3.5. Lectinas

As reações humorais são mediadas por proteínas e outras moléculas plasmáticas presentes no plasma dos moluscos bivalves, que atuam sinergisticamente com as reações celulares, otimizando assim a resposta imune, na qual se destacam as lectinas.

Uma das funções das lectinas parece ser a de participar nos mecanismos de reconhecimento de elementos exógenos em invertebrados, resultando na opsonização e/ou aglutinação dos microorganismos oportunistas e/ou patogênicos (MARQUES; BARRACCO, 2000). No que se refere às lectinas, a ocorrência destas moléculas na hemolinfa de bivalves foi descrita por diferentes autores dentre eles Tunkijanukij et al., (1997) e Yakovleva et al., (2001). Contudo, não se tem registro da presença e/ou da atividade de lectinas em pectinídeos, até a presente data.

1.3.6. Sistema Pró-fenoloxidase

O conhecimento detalhado sobre o sistema pró-fenoloxidase (proPO) e seu papel na imunidade de invertebrados foi extensivamente estudado em artrópodes, notavelmente, em insetos e crustáceos (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004). Entretanto, para moluscos existem apenas alguns poucos relatos sobre a ocorrência deste sistema, sua ativação e envolvimento no sistema imune (ASOKAN et al., 1998; MERCADO et al., 2002). Em *Placopecten magellanicus* e *Argopecten irradians* não houve ativação consistente da proPO por componentes de superfície de microorganismos. Por outro lado, Luna-González et al. (2003) reportaram a ativação do sistema proPO de *Argopecten ventricosus* e *Nodipecten subnodosus* por componentes da parede de fungos.

1.3.7. Contagem total de hemócitos

A concentração total de proteína (CP) na hemolinfa pode também funcionar como indicador hemato-imunológico de condição de saúde em bivalves. Em pectinídios, foi evidenciado o aumento das CP com o incremento da temperatura até 25 °C. No entanto, quando a temperatura foi elevada até 30 °C, observou-se uma queda brusca deste parâmetro (LIU et al., 2004).

Os hemogramas, representados pela a contagem total (THC – “total haemocytes count”) e diferencial de hemócitos (DHC – “differential haemocytes count”) funcionam como um dos imunoparâmetros mais amplamente utilizado para expressar as condições de saúde de bivalves (VARGAS-ALBORES; BARRACCO, 2001), apesar das amplas variações tanto entre indivíduos quanto entre espécies de bivalves.

O estudo feito por Bower et al. (1998) trabalhando com grupos de *Patinopecten yessoensis* de diferentes localidades, e infectados pelo protozoário *Perkinsus qugwadi*, mostraram que alguns grupos apresentaram um maior número de hemócitos, enquanto outros, mesmo infectados, não demonstraram alteração na quantidade destas células.

Já na ostra *Crassostrea virginica* e o pecten *Argopecten irradians irradians* infectados pelo dinoflagelado *Prorocentrum minimum*, os autores descrevem que houve um aumento significativo da THC (HEGARET; WIKFORS, 2005).

1.4. Os carotenóides

1.4.1. Histórico

Os primeiros pigmentos foram isolados no ano de 1831, da cenoura (HUGHES, 1994). Em 1988, já tinham sido isoladas 400 variantes estruturais de carotenóides (MORETTO; FETT, 1988) e no ano 2000 mais de 700 variantes estruturais (LORENZ, 2000).

Os carotenóides são pigmentos naturais mais difundidos nas plantas e nos animais. Os carotenóides compreendem uma família de compostos naturais. As variantes estruturais estão descritas e caracterizadas, a partir de bactérias, algas, fungos e plantas superiores, sendo estes organismos fotossintéticos os responsáveis pela biossíntese dos carotenóides.

Os mamíferos, crustáceos, peixes e moluscos não estão bioquimicamente capacitados para a biossíntese de carotenóides, mas podem acumular e/ou converter precursores que obtêm da dieta como, por exemplo, a conversão de β -caroteno em vitamina A (JOHNSON; SCHROEDER, 1995).

Os carotenóides são os principais pigmentos em muitos animais aquáticos (MEYERS, 1994). Segundo GU et al. (1997), o carotenóide astaxantina (3,3'-dihydroxy-carotene-4,4'-dione) é um dos pigmentos responsável pela cor da carne e gônada de muitos animais marinhos assim como, é um agente antioxidante.

1.4.2. Estrutura

Os carotenóides podem ser classificados em dois grupos:

- a) carotenos, os quais são hidrocarbonetos carotenóides;
- b) oxicarotenóides, que contém oxigênio além de carbono e hidrogênio.

Os oxicarotenóides podem ser: xantofilas (monois, diois, poliois), epóxidos, furanóides, metoxilas, cetonas, aldeídos, esters, entre outros (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 1984).

Os principais tipos de carotenóides são (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 1984; MEYERS, 1994): β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, ζ -caroteno, licopeno, zeaxantina, cantaxantina, astaxantina, Zeinoxantina, esters de capsantina, bixina, crocin, criptoxantina, luteína, ácido apocarotenóico etil ester, entre outros (Figura 2).

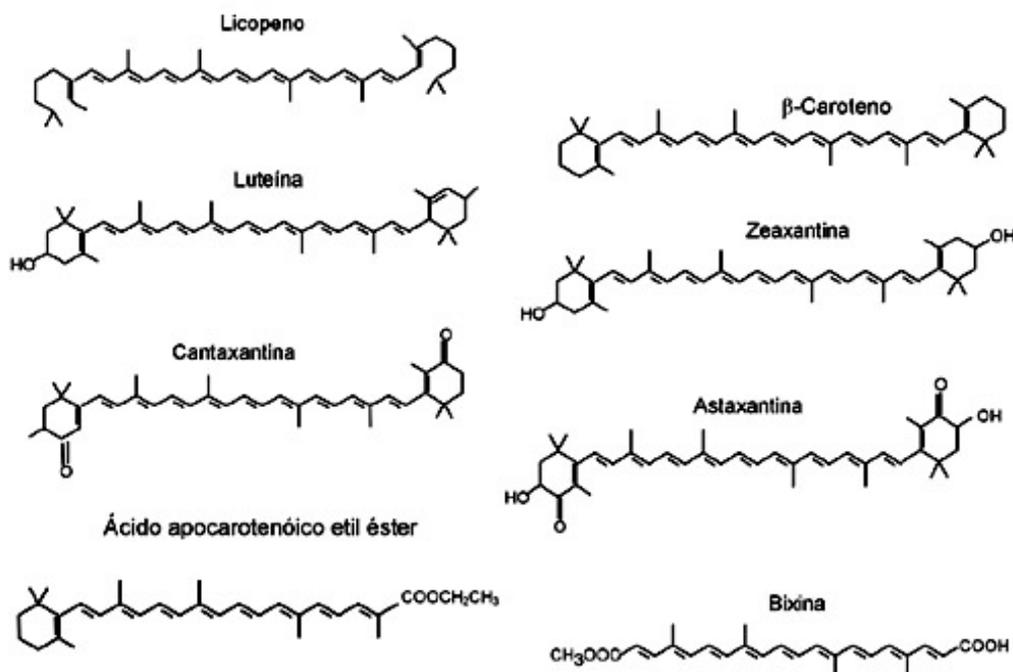


Figura 2. Estrutura química de alguns carotenóides. Fonte: FONTANA (1997).

Cabe destacar que a astaxantina é o carotenóide predominante em muitas espécies de peixes marinho e invertebrados em geral (BJERKENG et al., 1992; STOREBAKKEN; NO, 1992).

As funções, propriedades, ações dos carotenóides estão ligadas às suas estruturas, a qual possui na maioria dos casos 40 carbonos (tetraterpenos) acíclicos ou alicíclicos. Estes carbonos formam oito unidades isoprenóides (com cinco carbonos – C_5H_8) unidos pela ligação do tipo “cabeça-cauda”, com exceção da posição central, na qual a ligação é do tipo “cauda-cauda”, produzindo uma estrutura simétrica com reversão do plano de simetria no centro da molécula (RODRIGUEZ-AMAYA, 1984; RODRIGUES-AMAYA, 1997; PADULA, 1999). Segundo Vieira et al. (1991), os carotenóides são terpenos, os quais são estruturas, onde o esqueleto é composto de unidades de cinco carbonos, semelhante ao isopreno.

A estrutura do esqueleto dos carotenóides pode sofrer diferentes modificações, as quais podem ser: hidrogenação, dehidrogenação, ciclização, migração de dupla ligação, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de substituintes ou contaminação destes processos resultando em diferentes estruturas (RODRIGUEZ-AMAYA, 1984; RODRIGUES-AMAYA, 1997; PADULA, 1999).

Os substituintes oxigenados mais comuns são os grupos hidroxílicos e epóxidos. São também encontrados grupos aldeídicos (CHO), cetônico (C=O), carboxi (CO_2H), carboximetoxi (CO_2Me) e metoxi (OME). Os epoxicarotenóides e os apocarotenóides (os com cadeias mais curtas) são produtos iniciais da degradação dos carotenóides (BRITTON, 1992; RODRIGUEZ-AMAYA, 1997).

Experimentos realizados com carotenóides exigem certos cuidados com a preparação e manipulação das amostras. Em particular, os carotenóides são instáveis expostos à luz, oxigênio e temperatura, assim como a condições ácidas e alcalinas (OLIVER; PALOU, 2000).

Os métodos analíticos compreendem basicamente: 1) extração dos carotenóides com solvente orgânico; 2) saponificação alcalina; e 3) quantificação em espectrofotometria ou HPLC (STANCHER et al., 1988; OLIVER; PALOU, 2000).

A identificação dos carotenóides pode ser feita com os seguintes parâmetros (RODRIGUEZ-AMAYA, 1984):

- ordem de diluição das frações na coluna;
- espectros de absorção visível (Figura 3);
- valores de R_F na camada de sílica gel;
- reações químicas específicas.

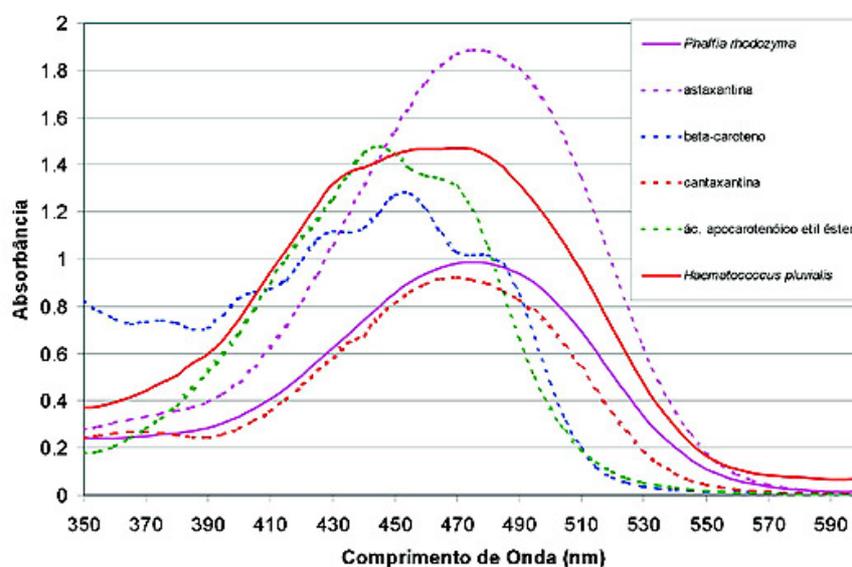


Figura 3. Espectro de absorção de carotenóides quimiossintéticos e microbianos (Fonte: Fontana, 1997)

1.4.3. Propriedades

1.4.3.1. Propriedades físico-químicas dos carotenóides

As principais propriedades físico-químicas dos carotenóides são:

- ✓ Seqüestro de oxigênio singleto;
- ✓ Absorção de luz;
- ✓ Facilidade isomerizado e oxidado;
- ✓ Bloqueia reações por radicais livres;
- ✓ Lipofílico, insolúvel em água;
- ✓ Liga as superfícies hidrofóbicas;
- ✓ Inibidor da peroxidação dos lipídios.

Além destas propriedades citadas, os carotenóides cristalizam em uma variedade de formas, onde a cor varia de laranja vermelho para violeta e quase preto, dependendo de sua forma e tamanho. O ponto de fusão de carotenóides é alto, geralmente varia entre 130 a 220 °C (HOSANG, 2001).

1.4.3.2. Cor dos carotenóides

A cor está relacionada com a presença de um cromóforo constituído de uma cadeia de duplas ligações conjugadas, o qual está ligado à habilidade do carotenóide de absorver a luz na região visível e o seu poder corante. Para o aparecimento de coloração são necessárias no mínimo sete duplas ligações conjugadas.

A intensidade da coloração aumenta do amarelo ao vermelho, conforme o número de duplas ligações. A ciclização diminui o efeito das duplas ligações situadas no anel. Um exemplo é o licopeno que com 11 ligações apresenta coloração vermelha, já o β -caroteno, que apresenta ciclização, apresenta coloração amarelada tendendo para o laranja, conforme a sua concentração (RODRIGUEZ-AMAYA, 1984; BRITTON, 1992).

Para a coloração de crustáceos o carotenóide astaxantina, mostrou ser mais eficiente quando comparado com canthaxantina e β -caroteno

1.4.3.3. Precursor da vitamina A (retinol)

Os carotenóides podem ser convertidos enzimaticamente em vitamina A pela maioria dos animais. A vitamina A, por si mesma, não ocorre nos vegetais, elas podem ser formadas pela clivagem do β -caroteno (LEHNINGER et al., 1995).

Um pré-requisito para que um carotenóide possa ter atividade pró-vitamina A é a presença de um anel β não substituído com uma cadeia poliênica de 11 carbonos. Dos mais de 600 carotenóides conhecidos, apenas 50 tem a atividade pró-vitamina A com base em suas estruturas, sendo o β -caroteno a pró-vitamina A mais importante tanto em termos de biopotência como pela sua larga ocorrência (Tabela 2). Estruturalmente a vitamina A é a metade do β -caroteno com uma molécula adicional de água no fim da cadeia lateral (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997).

Os carotenóides acíclicos, como o licopeno, não são pró-vitamina A, assim como os carotenóides nos quais os anéis β contêm grupos hidroxílicos e epóxidos são inativos, já os carotenóides com apenas um anel β não substituído, possuem aproximadamente 50% da atividade do β -caroteno (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997).

Tabela 2. Atividade pró-vitamina A de alguns carotenóides

Carotenóide	Atividade pró-vitamina A (%)
β -caroteno	100
α -caroteno	50-54
γ -caroteno	42-50
β -zeacaroteno	20-40
Criptoxantina	50-60
β -apo-8'-carotenal	72

Fonte: BAUERNFFEIND (1972)

1.4.3.4. Efeito antioxidante

A propriedade antioxidante dos carotenóides é devido às duplas ligações conjugadas, onde ocorre a desativação dos radicais livres e o seqüestro do oxigênio singleto (EROS espécies reativas de oxigênio) (MIKI, 1991). A maior proteção é dada por aqueles carotenóides que têm nove ou mais ligações duplas conjugadas. O licopeno é mais efetivo antioxidante que o β -caroteno no seqüestro de oxigênio singleto, bem como a astaxantina e a cantaxantina são melhores antioxidantes que o β -caroteno (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997; EDGE et al., 1997; PADULA, 1999).

Em estudos feitos por Chien e Jeng (1992), verificaram uma correlação positiva entre os níveis de concentração de pigmento nos tecidos e a sobrevivência de camarões alimentados com dietas com 100 mg.kg⁻¹ de astaxantina, sugerindo que os carotenóides funcionam como uma reserva de oxigênio intracelular.

Segundo Kobayashi e Sakamoto (1999), demonstraram que a astaxantina purificada da microalga de *Haematococcus pluvialis*, é um potente agente antioxidante *in vitro* sob condições hidrofóbicas e hidrofílicas.

Bem como, Naguib (2000) e Rengel et al. (2000), relatam que a astaxantina, que é um ketocarotenoide oxidado a partir de β -caroteno, tem uma maior atividade antioxidante comparado com α -caroteno, β -caroteno, luteína, licopeno, canthaxantina e vitamina E.

1.4.3.5. Peroxidação dos lipídios

Os carotenóides em invertebrados, segundo Kurashige et al. (1990), inibem da peroxidação lipídica mitocondrial. Como exemplo, os autores Katsuyama e Matsuno (1988), descreveram que os carotenóides, em específico a astaxantina, protegem as membranas de tilápia (*Tilapia nilotica*) do dano oxidativo com a inibição da peroxidação lipídica mitocondrial.

1.4.3.6. Efeito na Reprodução

Segundo Meyers (1994), larvas e alevinos de salmão, de reprodutores alimentados com dieta sem fontes de carotenóides, apresentaram menor taxa de sobrevivência (<15%), quando comparados com reprodutores alimentados com dieta devidamente suplementada com carotenóides.

Os autores Lorenz (1998) e Howell e Matthews (1991), indicam que em estudos com reprodutores de camarão mostraram que animais alimentados com dietas deficientes em carotenóide apresentaram deformidade nas larvais, bem como uma baixa sobrevivência destas. Estas observações estão associadas a uma perda da pigmentação e branqueamento dos ovários de fêmeas maduras e dos sacos vitelinos larvais. Este sinal clínico é denominado de Síndrome de Deficiência de Pigmento (PDS) (D'ABRAMO, 1983; WYBAN, 1997).

Segundo Cuzon et al. (2004), a utilização de astaxantina na alimentação do camarão *Litopennaeus vannamei* proporcionou uma maior sobrevivência de larva náuplios.

Em estudos feitos por Chien e Jeng (1992) observaram uma maior taxa de sobrevivência de *P. japonicus* quando alimentados com dieta suplementada com astaxantida do que com β -caroteno ou farinha de alga.

1.4.3.7. Imuno-estimulante

Segundo Bendich (1989) e Bendich (1990), os carotenóides em geral aumentam ambos os sistemas imuno específico e não específico.

O efeito imune-estimulante dos carotenóides foi evidenciado em mamíferos (DEMING; ERDMAN, 1999; CHEW; PARK, 2004). Em peixes, Amar et al. (2004) demonstraram que uma dieta suplementada com carotenóides, ou seja, com algas *Dunaliella salina* e *Phaffia rhodozyma* ricas em astaxantina, levou a modulação de alguns parâmetros do sistema imune inato da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

Em invertebrados, também foi descrito o efeito imuno-estimulante de diferentes carotenóides, como é o caso do ouriço-do-mar, *Pseudocentrotus depressus*, em estágio reprodutivo (KAWAKAMI et al., 1998).

1.4.4. Degradação dos carotenóides

Os carotenóides são moléculas altamente insaturadas e, portanto, susceptíveis à oxidação. A cadeia poliênica, responsável pelas propriedades especiais e desejáveis dos carotenóides, é também responsável por sua instabilidade (HOSANG, 2001).

A forma mais estável dos carotenóides é a configuração *trans*. Sob condições de pH baixo e temperatura alta, sofrem isomerização para a forma *cis*, o que resulta em uma diminuição da cor e da atividade de pró-vitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 1984).

Os cristais são sensíveis à decomposição oxidativa quando expostos ao ar, assim como insolúveis em água, pouco solúvel em óleos vegetais e muito solúveis em solventes clorados como clorofórmio e diclorometano. Os cristais se dissolvem muito lentamente e sua solubilidade aumenta com a temperatura (BRITTON, 1992). Ou seja, a sua estabilidade depende de vários fatores como segue: disponibilidade de oxigênio, temperatura, exposição à luz, atividade de água, presença de

metais, acidez/alcanilidade e a própria estrutura (SKREDE et al., 1990; NO; STOREBAKKEN, 1991; BRITTON, 1992; RODRIGUEZ-AMAYA, 1997; PADULA, 1999).

No processo de liofilização dos carotenóides a quantidade de água é crítica na estabilidade dos carotenóides (GOLDBLISTL et al., 1963). O decréscimo de umidade tende a estabilizar os carotenóides até atingir um valor limite, e a partir deste valor a estabilidade decresce rapidamente (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 1984).

1.4.5. Funções

1.4.5.1. Nas plantas

Além da cor, os carotenóides têm como principais funções nas plantas a absorção de luz nos comprimentos de onda que a clorofila não absorve no processo de fotossíntese (VIEIRA et al., 1991) e a de proteger a clorofila e o aparelho fotossintético contra fotodegradação estando presente em tecidos fotossintéticos, sendo em muitos casos a sua cor mascarada pela clorofila (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997).

1.4.5.2. Nos organismos aquáticos

Os carotenóides são os principais pigmentos em muitos animais aquáticos (MEYERS, 1994), são lipossolúveis e além de terem sua atividade a provitamina A, são requeridos para o desenvolvimento gonádico e a maturação (aumenta a taxa de fecundação), a fertilização (hormônio de fertilização), no desenvolvimento embrionário, na eclosão, a viabilidade larvária, a percepção olfatória e quimio-recepção, foto-proteção (contra a luz UV), atividade anti-oxidante, aumenta a tolerância ao estresses e variações ambientais, aumenta a tolerância a níveis elevados de amônia e baixos níveis de oxigênio na água, estimulante do crescimento, além da transferência de Ca^{2+} através da membrana (TACON 1981; TORRISSSEN 1984; PETIT et al., 1991; OLSON 1993; MENASVETA et al., 1994; MEYERS, 1994; MANTIRI et al., 1995; MENASVETA et al., 1995; OLSON AND OWENS 1998; FARÍAS-MOLINA, 2001). Segundo Liñan-Cabello (2002) e Cuzon et al. (2004), atualmente, os carotenóides são considerados imuno-estimulantes.

1.4.6. Fontes

Para uma variedade de carotenóides, tanto natural quanto sintético, tem sido desenvolvidas técnicas para seu uso na aqüicultura (MEYERS, 1994).

1.4.6.1. Fontes naturais

Os carotenóides mais comumente encontrados nos alimentos vegetais são o β -caroteno (cenoura; *Daucus carota*), licopeno (tomate; *Lycopersicum esculentum*), várias xantofilas (zeaxantina, luteína e outras estruturas oxigenadas do milho, *Zea mays*; da manga, *Mango indica*; do mamão, *Carica papaya* e da gema de ovo) e a bixina (utilizado com aditivo culinário e corante dérmico por indígenas amazônicos, obtido do urucum *Bixa orellana*). Outras ocorrências naturais de uso culinário são a capsaxantina e capsorubina (páprica, *Capsicum annum*) e a crocina (açafraão, *Crocus sativus*),

excepcionalmente solúvel em água e um dos raros glicosídeos diterpênicos (C₂₀) encontrados em plantas.

Principais fontes de astaxantina e canthaxantina para dietas de salmões (MEYERS, 1994):

- ✓ Krill do Antártico;
- ✓ *Spirulina*;
- ✓ Farinha de crustáceos;
- ✓ Marigold;
- ✓ Pimenta vermelha (*Capsicum sp.*);
- ✓ *Alguns vegetais*;
- ✓ *Phaffia rhodozyma*;
- ✓ *Haematococcus pluvialis*.

Principais fontes de zeaxantina, canthaxantina e luteína para dieta de peixes ornamentais (MEYERS, 1994):

- ✓ Milho;
- ✓ Farinha de glúten de milho;
- ✓ Alfafa;
- ✓ Farinha de Marigold;
- ✓ Pimenta vermelha;
- ✓ Farinha de krill e de crustáceos;

A Tabela 3 descreve uma relação das fontes de carotenóides mais utilizadas na aqüicultura.

1.4.6.2. Carotenóides sintéticos

Os primeiros carotenóides produzidos sinteticamente foram: a) ano de 1954: β -caroteno; b) ano de 1962: β -apo-8-carotenal; e c) ano de 1964: cantaxantina (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 1984).

1.4.7. Usos

Os principais usos dos carotenóides na aqüicultura são:

- ✓ Pigmentação de peixes para o consumo humano (MEYERS, 1994);
- ✓ Pigmentação de peixes ornamentais (MEYERS, 1994);
- ✓ Aditivo nutricional da dieta de reprodutores de crustáceos, em específico de camarões (D'ABRAMO, 1997);
- ✓ Aditivo nutricional da dieta de reprodutores de peixes, em específico de salmões (MEYERS, 1994);

Segundo Simão (1989), os corantes naturais não apresentam limite de uso para o consumo humano, as restrições para o uso de corantes estão nos artificiais.

Segundo Ono et al. (1999), não houve toxicidade em diferentes concentrações de carotenóides para os animais testados. Bem como não se te registros de contra-indicações em estudos feitos em humanos com dieta rica em astaxantina (MERA PHARMACEUTICALS, 1999; LIGNELL, 1999; ØSTERLIE et al., 1999a; ØSTERLIE et al., 1999b).

Tabela 3. Fontes de carotenóides e o organismo que as produz e a respectiva referência bibliográfica.

Organismo	Espécie	Referência bibliográfica
Microalgas	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Yuan e Chen (2000)
	<i>Chlorella sp.</i>	Gouveia et al. (1996)
	<i>Dunaliella sp</i>	Boonyaratpalin et al. (2001)
	<i>Spirulina sp.</i>	Choubert (1989)
	<i>Chlorococcum sp.</i>	Zhang et al. (1997)
Levedura	<i>Phaffia rhodozyma</i>	Whyte e Sherry (2001)
Bactéria	<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	Yokoyama e Miki (1995)
Flor	<i>Tagetes erecta</i>	Lee et al. (1978)

1.4.8. Bio-acumulação

Os moluscos bivalves assim como outras espécies de animais aquáticos não podem sintetizar astaxantina, sua obtenção é através da ingestão de organismos que sintetizam este pigmento (JOHNSON; SCHROEDER, 1995).

As funções e a bio-acumulação dos carotenóides nos peixes são afetadas por diferentes fatores, como segue (TORRISSSEN et al., 1989; TORRISSSEN, 1989; MEYERS, 1994):

- ✓ Fonte de pigmentos;
- ✓ Forma (livre ou diester) e concentração dos carotenóides na dieta;
- ✓ Composição da dieta;
- ✓ Presença de ácidos graxos essenciais na dieta;
- ✓ Tamanho dos peixes;
- ✓ Estágio fisiológico e de maturação sexual;
- ✓ Formação genética;
- ✓ Digestibilidade;
- ✓ Absorção intestinal;
- ✓ Metabolismo;
- ✓ Excreção;
- ✓ Temperatura e salinidade.

1.4.8.1. Crustáceos

Nos crustáceos a astaxantina da dieta é depositada no tegumento, na carapaça, na epiderme e no hepatopâncreas (MEYERS, 1994). No processo de maturação os carotenóides depositados no hepatopâncreas são transferidos para o ovário (D'ABRANO et al., 1997).

Na bio-acumulação o carotenóide β -caroteno pode ser bio-transformado e outras moléculas de carotenóides, como em astaxantina (Figura 4)

1.4.8.2. Peixes

A absorção dos carotenóides ocorre no intestino com a conversão à vitamina A, principalmente na parede intestinal. Os carotenóides são transportados pelo sangue em ligações não covalentes por lipo-proteínas sendo o fígado o órgão responsável pelo metabolismo dos carotenóides. Com a maturidade sexual os carotenóides são transferidos, da carne para a pele e gônadas (TORRISSEN et al., 1989; MEYERS, 1994).

A deposição de carotenóides na carne de trutas varia conforme inicia a alimentação e a maturação sexual (BJERKENG et al., 1992). Durante o crescimento ativo, altas concentrações de carotenóides são depositadas na pele (MEYERS, 1994).

A bio-acumulação dos carotenóides pode variar de 6 a 25 mg.kg⁻¹ em diferentes espécies (MEYERS, 1994). Para trutas, uma concentração de 6 mg.kg⁻¹, de carne, de carotenóides mostrou ser suficiente para atingir uma coloração rosa satisfatória para o mercado de carne de truta (TORRISSEN et al., 1989).

A digestibilidade aparente dos carotenóides pode variar de 13 % para astaxantina dipalmitato em truta a 97 % para astaxantina livre em salmão do atlântico (MEYERS, 1994).

1.4.8.3. Moluscos

No estudo de Miki et al. (1982) identificou 5 tipos de carotenóides em quatro espécies de pectinídeos: Astaxantina, Pectenolone, Pectenoxantina, Pectenol e Tetrol, em uma concentração total de carotenóide de 1.56 a 7.15 mg por 100 gramas de gônada. De mesmo modo, Escarria et al. (1989) observou em gônadas de *Argopecten ventricosus*, a presença de Astaxantina e Luteína em ordens de 2×10^{-5} miligrama de carotenóides por grama de gônada (2×10^{-5} mg.g de gônada⁻¹).

Os carotenóides requeridos na dieta de animais aquáticos têm a sua origem no fitoplâncton, por isto se espera que os moluscos filtradores não tenham limitações destes pigmentos quando alimentados com dietas microalgais (FARÍAS-MOLINA, 2001).

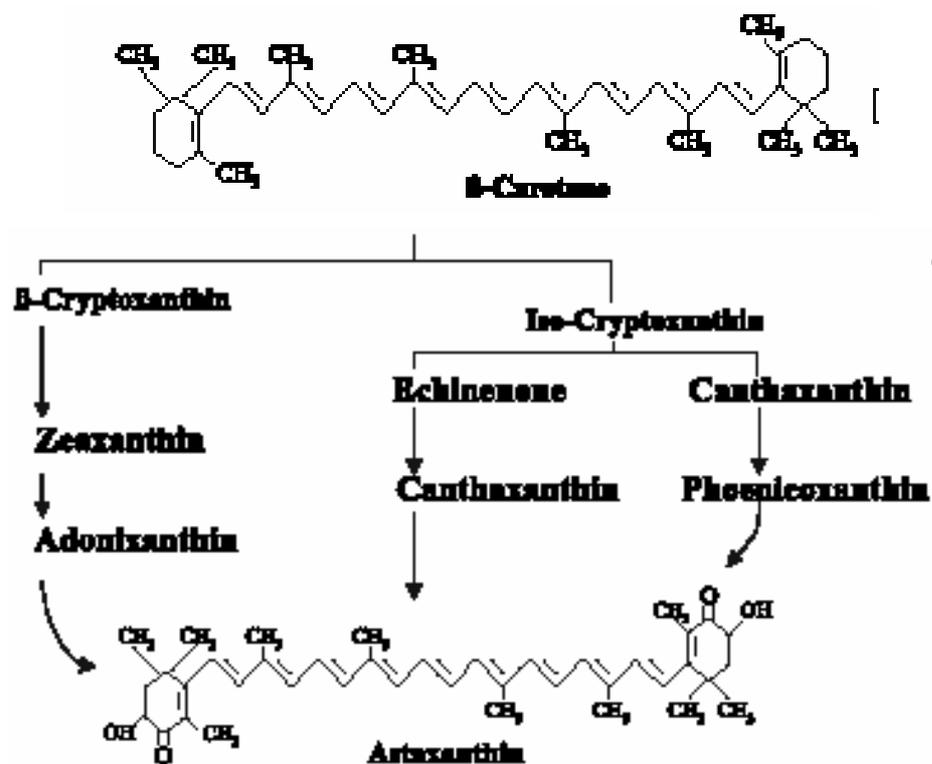


Figura 4. Bio-transformação do β-caroteno em astaxantina em crustáceos (Fonte: LIÑAN-CABELLO et al., 2002).

Para quantificar a quantidade de carotenóides retidos pelo animal, No e Storebakken (1991), utilizaram a seguinte fórmula:

$$CR = \frac{(W2 \times C2 - W1 \times C1)}{B}$$

Onde:

CR = quantidade de carotenóides retida.

W1 e W2 = Peso médio inicial e final, respectivamente.

C1 y C2 = Concentração inicial e final de carotenóides no tecido, respectivamente.

B = Incremento em peso.

CAPÍTULO II. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da utilização de dietas com diferentes concentrações de astaxantina e os ácidos graxos EPA e DHA, em reprodutores da vieira *Nodipecten nodosus* mantidos em laboratório e seu efeito na maturação, rendimento larval e produção de pré-sementes.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Padronizar um protocolo de extração de carotenóides da porção feminina da gônada de *N. nodosus*;
- ✓ Padronizar e descrever os estágios sexuais da porção feminina da gônada de *N. nodosus* em relação às características histológicas e à quantidade de astaxantina;
- ✓ Avaliar o efeito da utilização de dietas com diferentes concentrações de astaxantina no acúmulo desse carotenóide na gônada e na maturação de reprodutores;
- ✓ Analisar a sobrevivência de larvas e pré-sementes de *N. nodosus* produzidas a partir de reprodutores alimentados com dietas com diferentes concentrações de astaxantina;
- ✓ Verificar o efeito da utilização de dietas enriquecidas com os ácidos graxos EPA e DHA na maturação de reprodutores e no rendimento larval e de pré-sementes de *N. nodosus*.

CAPÍTULO III - Extração de carotenóides da gônada da viera Nodipecten nodosus (Bivalvia; Pectinidae)

Revista: Brazilian Journal of Biology (BJB)

Aceito para publicação em: 12 de março de 2008

Data prevista para publicação: maio de 2009 (volume 69.2)

Número da aceitação: BJB-124/07

Extração de carotenóides da gônada da viera Nodipecten nodosus (Bivalvia; Pectinidae)

Simone Sühnel¹, Francisco Lagreze, Jaime Fernando Ferreira

LABORATÓRIO DE MOLUSCOS MARINHOS/UFSC

Servidão dos Coroas s/n, Barra da Lagoa, Florianópolis/SC-Brasil CEP 88061-600

Luciano Henrique Campestrini, Marcelo Maraschin

LABORATÓRIO DE MORFOGÊNESE E BIOQUÍMICA VEGETAL/UFSC

Rodovia Edmar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis/SC-Brasil, CEP 88040-900,

Número de figuras: 2

Número de tabelas: 1

Palavras Chave: Carotenóides, Nodipecten nodosus, extração, solventes orgânicos, vieiras

Abreviação do título: Extração de Carotenóides de Nodipecten nodosus

Autor para correspondências: Simone Sühnel

Laboratório de Moluscos Marinhos - UFSC

Servidão dos Coroas s/n, Barra da Lagoa, Florianópolis/SC-Brasil CEP88061-600

ssuhnel@gmail.com

Extração de carotenóides da gônada da vieira Nodipecten nodosus (Bivalvia: Pectinidae)**RESUMO**

Em moluscos bivalves marinhos, carotenóides insaturados estão presentes na dieta natural, com um importante papel em diversos processos biológicos, em especial na reprodução. A elucidação dos efeitos destes compostos em Nodipecten nodosus requer o desenvolvimento de um protocolo adequado para a extração de carotenóides das gônadas desses animais. Para isso, gônadas de vieiras cultivadas (75 mm de comprimento) foram liofilizadas e maceradas em N₂ líquido. Amostras em triplicata com 50 mg foram coletadas para a utilização em cada tratamento. Os conteúdos de carotenóides totais e astaxantina foram determinados via espectrofotometria de luz UV-visível e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), respectivamente. O efeito da composição em organosolventes das soluções de extração foi testado utilizando-se acetona (Ac=O) e hexano (Hex) em quatro proporções (Ac=O:Hex): 1:1, 1:3, 1:5, e 2:3, em quatro tempos de extração: 0, 5, 10, e 15 minutos. Os resultados mostraram que o melhor rendimento de extração ($0,312 \pm 0,016 \mu\text{g}$ carotenóides/mg) foi obtido com Ac=O:Hex, 1:3, por 15 minutos. Com a utilização de protocolo de extração exaustiva (10x), uma quantidade superior ($0,41 \pm 0,001 \mu\text{g}$ de carotenóides/mg) foi obtida de amostras de gônada, comparativamente aos valores obtidos em extrações únicas. O conteúdo de astaxantina foi reduzido em 8,6% em testes de preservação deste metabólito em extratos crus (-18 °C, 26 dias de incubação em atmosfera de N₂).

1. Introdução

As vieiras são moluscos bivalves da família Pectinidae que apresentam importância econômica na aquicultura. Segundo a FAO (2005), a produção mundial de pectinídeos alcançou valores em torno de 1,27 milhões de toneladas métricas em 2005, destacando-se a China como maior produtor (81% da produção mundial).

Nos organismos aquáticos, os carotenóides são responsáveis pela pigmentação dos tecidos (Meyers 1994). Além da pigmentação, os carotenóides são precursores da vitamina A (Miki et al. 1982; Farías-Molina 2001) e fundamentais para o desenvolvimento e maturação da gônada e pelo aumento da fertilização. Proporcionam um aumento na taxa de fecundação, além de desempenharem uma função importante no desenvolvimento embrionário e na eclosão (Petit et al. 1991; Olson 1993; Menasveta et al. 1994; Mantiri et al. 1995; Farías-Molina 2001) otimizando a viabilidade larvária e a percepção olfatória e quimio-recepção (Farías-Molina 2001). São agentes fotoprotetores efetivos contra a radiação UV e, em função de sua atividade antioxidante (Miki 1991; Miki et al. 1994; Farías-Molina 2001), aumentam a tolerância ao estresse ambiental, como elevado teor de amônia e baixos níveis de oxigênio dissolvidos na água (Tacon 1981; Torrissen 1984; Menasveta et al. 1995; Olson and Owens 1998). Além disso, apresenta ação estimulatória do crescimento celular e do transporte de Ca^{2+} através da membrana plasmática (Farías-Molina 2001), sendo mais recentemente reconhecida sua ação imuno-estimulante (Liñan-Cabello 2002; Cuzon et al. 2004).

Estudos para avaliar a influencia dos carotenóides na reprodução são importantes, em especial em vieiras, no sistema imunológico (Schelder 2007), na maturação e na obtenção de gametas viáveis para o desenvolvimento larval. Devido à baixa captação de sementes em ambiente natural e aos períodos de produção de larvas e sementes em laboratório, para *Nodipecten nodosus*, a maturação em laboratório é um fator importante para o sucesso da produção comercial e os carotenóides podem ter uma importante função neste processo.

Os carotenóides compreendem uma família de compostos naturais, onde as variantes estruturais (quimiodiversidade) estão descritas e caracterizadas, a partir de bactérias, algas, fungos e plantas superiores, sendo os organismos fotossintetizantes os responsáveis pela biossíntese destes pigmentos (Rodríguez-Amaya 2001).

Os carotenóides são tetraterpenos acíclicos ou cíclicos, cujas propriedades e atividades em sistemas biológicos estão ligadas à sua estrutura. Sua via biossintética utiliza como precursor o acetil-CoA, a partir do qual são gerados dois intermediários, o ácido mevalônico e sua forma pirofosfato, os quais originam a unidade estrutural básica destes metabólitos, constituída por cinco átomos de carbono (C_5H_8) e denominada isopreno (Rodríguez-Amaya 2001). Unidades de isopreno são unidas por ligação do tipo “cabeça-cauda”, com exceção da posição central do composto derivado, onde a ligação é do tipo “cauda-cauda”, produzindo uma estrutura simétrica, com reversão do plano de simetria no centro da molécula (Rodríguez-Amaya 1984; Rodrigues-Amaya 1997; Padula 1999; Rodríguez-Amaya 2001). São moléculas altamente insaturadas e, portanto, susceptíveis à oxidação, a cadeia poliênica responsável pelas propriedades especiais e desejáveis dos carotenóides é também responsável por sua instabilidade (Hosang 2001).

Os métodos analíticos para o estudo de carotenóides compreendem basicamente o preparo da amostra, a extração com organosolventes, a identificação e a quantificação destes metabólitos. Recomenda-se especial atenção ao protocolo de extração, uma vez que estes compostos são passíveis de oxidação, sugerindo a necessidade de proteção do extrato carotenóidico quanto à ação de agentes oxidantes, ex., O₂ e suas espécies reativas (ERO) e radiação luminosa. Os extratos carotenóidicos podem ser armazenados em atmosfera de N₂ e em ausência de luz (Oliver e Palou 2000).

Os métodos mais utilizados para a identificação de carotenóides são a espectrofotometria UV-visível, a espectrometria de massa e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (¹H-RMN, ¹³C-RMN), acopladas ou não a técnicas cromatográficas (Rodriguez-Amaya 2001; Schoefs 2002). Independente da técnica utilizada, a extração de carotenóides é altamente influenciada por variáveis processuais, assim como pelo tipo de amostra, tipo e proporção de solventes, tempo de extração, condições de estocagem, entre outros. Deste modo, deve ser considerada a utilização de várias técnicas analíticas, a comparação dos resultados deve ser realizada com precaução, pois esta pode não ser precisa.

Miki et al. (1982) extraíram carotenóides de gônadas de quatro espécies de pectinídeos Chlamys nipponensis akazara, Pecten albicans, Chlamys nobilis, e Patinopecten yessoensis. O protocolo utilizado incluiu a extração com acetona seguido da secagem com sulfato de sódio anidro. O extrato organosolvente foi concentrado sobre pressão reduzida (rota-evaporador), cromatografado em sistema líquido-líquido (benzeno: água, 1:1) e recuperado na fração orgânica. A quantificação dos carotenóides foi realizada por cromatografia em camada delgada, utilizando acetona/benzeno (1:9) e diclorometano/acetato de etila (4:1) como fases móveis, sequencialmente. Os carotenóides pectenolona, pectenoxantina, pectenol, astaxantina e tetrol foram identificados na fração carotenóidica. Em termos quantitativos, a espécie Chlamys nipponensis akazara apresentou o maior teor de metabólitos secundários.

Escarria et al. (1989) extraíram carotenóides de amostras de gônadas frescas de Argopecten circularis utilizando uma solução de éter de petróleo, acetona e água (6: 3: 1), seguido de saponificação dos extratos organosolvente. A identificação dos carotenóides foi realizada via cromatografia em coluna (CC) e em camada delgada (CDD), em suporte de sílica gel, com clorofórmio: acetato de etila (4:1) como fase móvel. Os resultados revelaram a existência de luteína e astaxantina como os carotenóides majoritários nas gônadas desta espécie.

De forma similar, Viarengo et al. (1995) extraíram exaustivamente (5x) os carotenóides de tecido fresco de brânquias e glândulas digestivas de Adamussium colbecki e de Pecten jacobaeus, com acetona e éter de petróleo. O teor de carotenóides totais foi determinado a partir da leitura da absorbância das amostras no comprimento de onda de 451nm. Os carotenóides totais nas brânquias (0,005 µg carotenóides/mg) e na glândula digestiva (0,813 µg/mg) foi maior em Adamussium colbecki que em Pecten jacobaeus (brânquias: 0,262 µg carotenóides/mg, glândulas digestivas: 0,454 µg carotenóides/mg).

Sachindra et al. (2006) analisando o conteúdo de carotenóides de biomassa residual do processamento de camarões, utilizaram hexano, éter de petróleo, acetona, etil-metil-cetona, acetato

de etila, álcool isopropílico (IPA), etanol e metanol. Também foram utilizadas soluções de acetona: hexano (50:50) e IPA: hexano (50:50). O extrato carotenóidico em éter de petróleo, hexano, acetona: hexano (50:50) e IPA: hexano (50:50) foram diretamente tratados com solução salina sulfato de sódio anidro e concentrado (rota-evaporador 40°C). A absorbância dos extratos carotenóidicos foi medida no comprimento de onda de 468nm. A maior quantidade de carotenóides totais foi obtida com a solução de IPA: hexano (50:50, 0,043µg carotenóides/mg). Os organosolventes IPA, hexano e acetona geraram valores de rendimento de carotenóides totais de 0,040µg carotenóides/mg, 0,013µg carotenóides/mg e 0,040µg carotenóides/mg, respectivamente.

Em função do exposto, tendo em consideração o efeito de diversas variáveis, como por exemplo: metodologia de extração, técnica analítica, conteúdo de carotenóides em uma amostra biológica em conexão com estudos na biologia reprodutiva de Nodipecten nodosus, o objetivo do presente estudo é a determinação do conteúdo de carotenóides e o efeito da composição de organosolventes nas proporções de extração de carotenóides da gônada da vieira N. nodosus. Além disso, foi estabelecido o protocolo de extração para estes pigmentos e a análise de estabilidade da astaxantina no extrato carotenóidico, avaliado em experimento com duração de 26 dias sob condições controladas de armazenamento.

2. Materiais e Métodos

2.1. Preparo das amostras

Quinze animais (70-75 mm de altura, 18 meses de vida) cultivados em espinhel, a 2m de profundidade, foram coletados no município de Porto Belo–SC (latitude 27°11'52,96"S e longitude 48°30'39,58"W). Os animais foram imediatamente transportados em caixas de isopor, com suas valvas oclusas, para o laboratório. Com o auxílio de uma tesoura e bisturi foi retirada a porção feminina das gônadas, seguido da dessalinização deste material com solução de formiato de amônio (0,5M). O excesso de líquido sobre a biomassa amostral foi removido utilizando-se papel de filtro, seguido da determinação do peso fresco de cada gônada (balança Kern 430-21). As porções femininas das gônadas foram armazenadas (-18°C, 24h) e liofilizadas (Terroni Favel LT 1000/8), seguida da determinação do peso seco.

As amostras liofilizadas das 15 gônadas (total de 6,44 g de peso seco liofilizado) foram reunidas, maceradas com auxílio de gral e pistilo, e armazenadas em vidro âmbar com atmosfera interna de N₂, a -18°C, para posterior extração dos carotenóides.

2.2. Extração dos carotenóides – efeito da composição em organosolventes da solução extratora

Quatro soluções extratoras foram testadas, considerando-se as seguintes proporções de acetona (Ac=Q, Nuclear, p.a.) e *n*-hexano (Hex, TediaBrazil, p.a.) 1:5, 1:1, 1:3 e 2:3. Adicionalmente, foi testado quatro tempos (minutos) de incubação das amostras nas soluções extratoras: t₀, t₅, t₁₀ e t₁₅. O tratamento t₀ consistiu da imersão da biomassa amostral na solução extratora e sua imediata retirada, seguida de filtração em papel filtro. Então foi determinado o conteúdo de carotenóides totais.

Amostras (50 mg de biomassa seca) de gônada foram transferidas para copos de Becker (40mL) envolvidos com papel alumínio e acrescidas de 5 mL da solução extratora. Consoante ao

tempo de extração, as amostras permaneceram em agitação (agitador magnético Fisatom), protegidas da luz, em temperatura ambiente (23°C). Após a extração, as amostras foram filtradas em papel filtro, tendo seu volume final ajustado para 3mL, com posterior acondicionamento em frascos âmbar (~ 10mL) contendo atmosfera de N₂. As amostras permaneceram armazenadas em freezer (-18°C) para posterior determinação do teor de carotenóides totais por espectrofotometria UV-visível (Hitachi, modelo U-1800).

2.3. Extração dos carotenóides – determinação de protocolo de extração exaustiva

Posteriormente à otimização da composição em organosolventes da solução extratora dos carotenóides da gônada de Nodipecten nodosus, procedeu-se à extração exaustiva daqueles pigmentos com o uso da solução extratora de maior eficiência, ex. Ac=O: Hex, (1:3), conforme descrito posteriormente. De maneira seqüencial, foram realizadas 10 extrações de uma mesma amostra e, para isto, uma alíquota (50mg, peso seco) foi transferida para copo de Becker (40mL), acrescida de 5mL de solução Ac=O: Hex (1:3), seguido de agitação (5 min, agitador magnético Sisatom). O extrato organosolvente foi recuperado por filtração, em suporte de celulose sob vácuo, e o resíduo sólido foi acrescido de 5mL da solução extratora de forma a repetir o procedimento. O extrato líquido contendo os carotenóides foi aferido para 3mL, transferido para frasco âmbar com atmosfera de N₂ e armazenado em freezer (-18°C), para posterior análise do teor dos pigmentos em estudo.

2.4. Quantificação dos carotenóides totais

Para determinar a quantidade de carotenóides totais extraídos, foi utilizada a janela espectral de 380 a 750 nm, em triplicata com espectrofotômetro UV-visível (Hitachi, U-1800). A concentração de carotenóides totais foi obtida utilizando-se a Lei de Lambert-Beer e para efeito de cálculos, a seguinte equação foi aplicada aos valores de absorbância:

$$\text{Carotenóides totais } (\mu\text{g/mg}) = \frac{\text{absorbância} / \epsilon \times \text{massa molecular} \times 1000 \times \text{volume da amostra (mL)}}{\text{peso seco da amostra (mg)}}$$

Utilizou-se o valor do coeficiente de extinção molar (ϵ) de $s_{1\text{cm}}^{1\%} = 124000_{(\text{astaxanthin})}$ a 460 nm (Buchwaldt & Jencks 1968) e massa molecular 596,84 (astaxantina). A absorbância foi dividida pelo coeficiente de extinção molar, multiplicado pela massa molecular, multiplicada por 1000 para transformar de mg/mL para $\mu\text{g/mL}$, multiplicada pelo volume total e dividida pelo peso seco da amostra. Para a quantificação de carotenóides totais realizou-se a soma dos valores de leitura das absorbâncias para os comprimentos de onda de interesse e o valor total foi aplicado à fórmula acima descrita (Mínguez-Mosquera et al. 2002).

2.5. Estabilidade da amostra com os carotenóides extraídos

Para avaliar a estabilidade dos carotenóides em amostras dos extratos organosolventes acondicionados e armazenados conforme acima descrito, foi realizada a extração de um pool de

amostras (n=3). O protocolo de extração considerou a incubação de amostras de biomassa (50mg peso seco) em solução de Ac=O: Hex (1:3), por 15 minutos. A fração carotenóidica foi recuperada por filtração em suporte de celulose, sob vácuo, armazenada a -18°C, em vidro âmbar com atmosfera de N₂. A quantificação de astaxantina nos extratos carotenóidicos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), procedendo-se à injeção de alíquotas (10µL) imediatamente após a extração (t₀ dia) e no 26° dia de armazenamento dos extratos (t₂₆ dia).

2.6. Determinação do conteúdo de astaxantina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foram filtradas (filtros de 0,22µm) alíquotas (300µL) das amostras, seguido da injeção de 10µL de cada amostra em um cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna (40°C) C₁₈ de fase reversa (Vydac-BioRad, 25cm x 4,6mm Ø) e detector UV-visível, operando em leitura de 470nm. Como fase móvel, utilizou-se acetonitrila: metanol (90: 10, TediaBrazil, grau HPLC), em um fluxo de 0,8 mL/min.

A identificação da astaxantina foi realizada com base no tempo de retenção obtido a partir da análise de amostra padrão (0,461mg/10mL Hex, Sigma – MO, USA), sob as mesmas condições experimentais. A quantificação de astaxantina foi realizada calculando-se a integral da área dos picos correspondentes e através de curva padrão externa ($y = 7.044,96x$, $r^2 = 0,994$).

2.7. Análise estatística

Os valores de concentração total de carotenóides foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de LSD, assumindo-se um nível de significância de 5%. Adicionalmente, os dados dos experimentos de determinação do efeito do tempo de incubação e de extração exaustiva foram submetidos à análise de regressão. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa SPSS (versão 13.0).

3. Resultados

Para a realização das extrações, as gônadas de Nodipecten nodosus foram previamente liofilizadas e a média do conteúdo de água nas amostras foi de $80 \pm 1,6$ %.

3.1. Extração dos carotenóides – efeito da composição em organosolventes da solução extratora

Os valores de concentração de carotenóides totais da porção feminina da gônada de vieira obtidos com a utilização das soluções extratoras em estudo podem ser visualizados na Tabela 1.

A solução Ac=O: Hex, na proporção de 1:3 volumes, apresentou o melhor rendimento ($p < 0,05$) de extração de carotenóides para todos os tempos de incubação testados. Quando comparado com t₀ (0,184 µg carotenóides/mg), houve um aumento da quantidade de carotenóides totais de 19,0% (t₅), 41,3% (t₁₀) e 69,9% (t₁₅) para esta proporção (1:3) (Tabela 1). A capacidade de solvatação e de extração dos metabólitos secundários de interesse desta solução se mostrou bastante eficiente, mesmo sob condições virtualmente não adequadas de extração, qual seja um pequeno tempo de contato entre a biomassa e o componente extrator, ex., t₀. Tal abordagem é de interesse, quando se busca a definição de protocolos que viabilizem uma avaliação rápida (screening)

e robusta do potencial de biomassas como fontes de carotenóides. Além disso, os resultados obtidos sob condições de incubação prolongada (t_{15}) sugerem que as gônadas de N. nodosus são ricas em carotenóides ($0,312 \pm 0,016 \mu\text{g}$ carotenóides/mg), um aspecto relevante nos contextos bioquímico e nutricional, bem como para o manejo reprodutivo deste bivalve.

A análise da dinâmica de extração de carotenóides totais ao longo do tempo (Figura 1a, b, c e d) revelou uma extração contínua destes metabólitos para todas as soluções extratoras testadas. Ao término do período experimental (t_{15}), não foi observada uma tendência de queda da concentração de carotenóides, independente da composição em organosolventes utilizada, indicando o não esgotamento da biomassa como fonte destes compostos e a não saturação do meio extrator. As proporções Ac=O:Hex 1:5, 1:1 e 2:3 apresentam diferença significativa em t_{10} t_{15} .

Tabela 1

Para todas as composições houve um aumento na quantidade de carotenóides ao longo do tempo de incubação, sendo para as soluções extratoras Ac=O: Hex nas proporções 1:3 e 2:3 o tempo de incubação t_{15} diferente significativamente ($p < 0,05$) dos tratamentos t_0 , t_5 e t_{10} . Contudo, os carotenóides totais em t_{15} foram similares aos encontrados em t_{10} para as proporções Ac=O: Hex 1:1 e 1:5 com valores diferentes ($p < 0,05$) em comparação aos encontrados em t_0 (Tabela 1). As proporções Ac=O: Hex 1:5, 1:1 e 2:3 não apresentaram diferença significativa entre si.

A análise de regressão do conteúdo de carotenóides na gônada de N. nodosus dos dados de cinética de extração para as soluções Ac=O: Hex nas proporções 1:3 e 2:3 revelou uma relação linear (r^2 0,998), para as variáveis estudadas (Figura 1b, d). Um modelo quadrático mostrou-se mais adequado à explicação da relação entre as variáveis usando as soluções de Ac=O: Hex nas proporções de 1:5 e 1:1, com r^2 0,997 e r^2 0,986, respectivamente (Figura 1a, c).

Figura 1

3.2. Extração dos carotenóides – determinação de um protocolo de extração exaustiva

Considerando-se que a extração única de um composto, ou de uma classe de compostos, pode levar, em um número não desprezível de casos, à obtenção de valores subestimados de concentração, a utilização de extrações seqüenciais da mesma biomassa (extração exaustiva) foi avaliada para as gônadas de Nodipecten nodosus. Para tal, o protocolo de extração exaustiva adotou a composição em organosolventes da solução extratora Ac=O: Hex 1:3, em função dos maiores valores de rendimento em carotenóides totais obtidos, conforme acima descrito (Tabela 1).

Com a metodologia de extração exaustiva utilizada foram extraídos $0,410 \pm 0,001 \mu\text{g}$ carotenóides/mg da gônada da vieira, após 10 extrações. Este resultado mostrou ser maior quantitativamente que na extração simples em t_{15} com $0,312 \pm 0,016 \mu\text{g}$ carotenóides/mg.

A análise do conteúdo de carotenóides totais ao longo do protocolo de extração exaustiva adotado revelou que os maiores valores de rendimento foram obtidos na primeira etapa da extração ($0,223 \pm 0,001 \mu\text{g}$ carotenóides/mg; 5 minutos de incubação). As extrações subseqüentes

apresentaram teores inferiores daqueles pigmentos, conforme descrito na figura 2. Além disto, a partir da quinta extração, os valores de concentração observados mostraram uma tendência de estabilização, situando-se abaixo de 0,014 μg carotenóides/mg. Vale a pena mencionar, a similaridade encontrada entre os valores do total de pigmentos em estudo para as três primeiras extrações (0,308 μg carotenóides/mg) quando comparada a uma extração simples de 15 minutos de duração (0,312 μg carotenóides/mg). Por outro lado, através da metodologia extração exaustiva (10x), foi obtido um rendimento superior ($0,410 \pm 0,001$ μg carotenóides/mg) das amostras de gônadas em comparação com os maiores valores encontrados para uma extração simples, ex., $0,312 \pm 0,016$ μg carotenóides/mg a t_{15} . Os protocolos de extração são onerosos, consomem muito tempo e obviamente não são ajustáveis para avaliar em forma rápida o potencial de uma amostra de biomassa como uma fonte de compostos de interesse. Por outro lado, tal abordagem parece ser útil para análises mais detalhadas dos efeitos de metabólicos secundários (ex., carotenóides) na biologia reprodutiva e a interação ecológica das espécies.

Figura 2

3.3. Estabilidade da amostra com os carotenóides extraídos

Os carotenóides, por serem compostos susceptíveis de degradação pela ação de fatores ambientais como a temperatura e a radiação luminosa requerem condições adequadas de armazenamento. Após 26 dias de armazenamento, o conteúdo de astaxantina reduziu 8.6%, de $32,55 \pm 0,60$ μg carotenóides/mL em t_0 , a $29,74 \pm 1,69$ μg carotenóides/mL em t_{26} .

4. Discussão

A definição de um método prático e não oneroso de extração de carotenóides da gônada de vieira é importante para estudos futuros sobre a influencia destes compostos na reprodução de moluscos, em especial para Nodipecten nodosus, onde a maturação em laboratório é utilizada para a produção comercial de sementes.

Neste trabalho a quantidade de carotenóides totais (0,312 μg carotenóides/mg) extraídos da gônada liofilizada de N. nodosus foram superiores aos obtidos por Miki et al. (1982), em gônada fresca de Patinopecten yessoensis (0,0156 μg carotenóides/mg), de Chlamys nipponensis akazara (0,0715 μg carotenóides/mg), de Chlamys nobilis (0,0360 μg carotenóides/mg) e de Pecten albicans (0,0578 μg carotenóides/mg) extraídos de gônada fresca, bem como, os obtidos por Escarria et al. (1989) para Argopecten circularis (0,00002 μg carotenóides/mg), também extraídos de gônada fresca. Nos referidos trabalhos, além de serem outras espécies de pectinídeos as amostras de tecido utilizadas para extração dos carotenóides eram frescas e não liofilizado o que pode explicar a tamanha diferença na quantidade de carotenóides totais extraídos.

O processo de liofilização auxilia na conservação da amostra através da redução do teor de água desta. Além disto, em protocolos de extração de compostos de natureza apolar, ex., carotenóides, o uso de material liofilizado corrobora para a obtenção de rendimentos superiores, por minimizar o efeito de repulsão da água em relação ao organosolvente extrator.

Diversos trabalhos descrevem a utilização de organosolventes para a extração de carotenóides de gônadas de crustáceos e moluscos, como observado para as espécies de pectinídeos Patinopecten yessoensis, Chlamys nipponensis akazara, Chlamys nobilis e Pecten albicans. Miki et al. (1982) utilizaram acetona para a extração a partir de amostras frescas daquele órgão, enquanto uma solução de acetona, éter de petróleo e água (6: 3: 1) foi usada em amostras de Argopecten circularis (Escarria et al. 1989). Em ambos os trabalhos, valores inferiores de concentração daqueles pigmentos foram observados, comparativamente a este estudo, indicando um melhor desempenho para a proporção Ac=O: Hex utilizada.

De forma similar, o uso de acetona é relatado em protocolos de extração de carotenóides em crustáceos (Sachindra et al. 2005; Sachindra et al. 2006). Sachindra et al. (2006) obtiveram maiores valores de rendimento de extração (0,040 µg carotenóides/mg exos esqueleto de camarão) com a utilização de acetona em relação ao detectado com hexano (0,013 µg carotenóides/mg exos esqueleto de camarão). A combinação destes dois solventes na proporção de 1:1 determinou rendimentos similares ao observado com a utilização de acetona isoladamente, ex., 0,038 µg carotenóides/mg exos esqueleto de camarão.

A composição química do material amostral a ser utilizado para a extração de carotenóides pode ser um fator a influenciar na determinação do tipo de organosolvente a ser utilizado e, obviamente, nos valores de rendimento obtidos.

Uma questão significativa para a otimização dos protocolos de extração tem a ver com a composição química da amostra a ser extraída, considerando que o rendimento está relacionado diretamente com a escolha do solvente orgânico. Para a espécie Nodipecten nodosus, Lodeiros et al. (2001), quantificaram lipídeos totais, proteínas totais e carboidratos na gônada da vieira de ambiente de cultivo coletadas em diferentes épocas do ano. Eles obtiveram valores em torno de 160 mg/g (peso seco) de lipídeos totais na gônada, 400 mg/g (peso seco) de proteínas totais na gônada e 80 mg/g (peso seco) de carboidratos na gônada. Avaliando os resultados obtidos por Lodeiros et al. (2001) destaca-se a presença de lipídeo na gônada onde o organosolvente apolar hexano estaria abrindo caminho para, em conjunto com a acetona, atuarem no processo de extração dos carotenóides. Avaliando a quantidade de carotenóides totais extraídos com as diferentes proporções em organosolventes em estudo, observa-se que a solução extratora Ac=O: Hex (1:3) gerou rendimentos superiores de extração, comparativamente às soluções extratora Ac=O: Hex (1:1, 1:5 e 2:3). Revelando uma melhor interação, para a extração dos carotenóides da vieira N. nodosus, entre o complexo químico da matriz e a solução extratora. Deste modo, considerando a diversidade da composição química de uma série de amostras biológicas em estudo e o grande número de combinações de organosolventes para a extração de carotenóides, deve-se cuidar com a necessidade de estabelecer protocolos para otimização da extração de metabólitos secundários aqui descritos.

No segundo experimento, o protocolo de extração exaustiva foi utilizado para extrair os carotenóides totais da gônada de vieira. Os maiores valores foram obtidos no primeiro momento de extração, desde que o conteúdo de pigmentos tende a estabilizar-se, 0,014 µg carotenóides/mg a partir da 5ª extração. Apesar de ser uma extração demorada, a extração exaustiva parece apresentar

resultados realistas do conteúdo de carotenóides totais ($0,410 \pm 0,001 \mu\text{g}$ carotenóides/mg) das amostras em estudo em comparação aos maiores valores para uma extração simples ($0,312 \pm 0,016 \mu\text{g}$ carotenóides/mg em t_{15}). Por outro lado, para uma rápida quantificação destes pigmentos na porção feminina da gônada de N. nodosus, a extração com 15 minutos de incubação utilizando a solução extratora Ac=O: Hex (1:3) mostrou ser um método eficiente.

Finalmente, na análise de estabilidade da amostra, a pequena redução do conteúdo de astaxantina (0,3% por dia) após 26 dias de armazenamento sugere que a metodologia proposta é efetiva e útil quando a capacidade analítica está abaixo da demanda.

Os resultados obtidos neste estudo proporcionam uma metodologia prática para extrair e analisar os carotenóides da vieira Nodipecten nodosus. Estes resultados são de interesse, por exemplo, para experimentos que busquem estudar as influências destes metabólitos secundários no sistema reprodutivo desta espécie e para melhorar a sua maturação em laboratório para a produção comercial de larvas e sementes.

5. Agradecimentos

Agradecemos ao FINEP pelo apoio financeiro e a CAPES/UFSC pela bolsa de Doutorado.

6. Referências

- AMAR, EC., KIRON, V., SATOH, S. and WATANABE, T., 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss walbaum*) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. *Fish Shellf. Immunol.*, vol.16, p.527-537.
- BUCHWALDT, M. and JENCKS, WP., 1968. Optical Properties of Astaxanthin Solutions and Aggregates. *Biochemistry*, vol.7, p.834-843.
- CUZON, G., LAWRENCE, A., GAXIOLA, G., Rosas, C. and Guillaume, J., 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*, vol.235, p.513-551.
- ESCARRIA, S., REYES, C. and ROHAN, D., 1989. Estudio bioquímico de la escalopa *Argopecten circularis*. *Ciencias Marinas*, vol.15, p.63-72.
- FAO, 2005. Global Aquaculture Production 1950-2005. www.fao.org access on: 29 May, 2007.
- FARÍAS-MOLINA, A., 2001. Nutrición en moluscos Pectínidos. in: MAEDA-MARTINZ, A. N.. *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica*. 1st ed. Ciencia y Acuicultura. 2001, p. 89-104.
- HOSANG, K., 2001. Extração de pigmentos carotenóides a partir de resíduos do processamento de camarões (*Farfantepenaeus paulensis*). Master Theses, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.
- LIÑAN-CABELLO, MA., PANIAGUA-MICHEL, JJ. and HOPKINS, PM., 2002. Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. *Aquaculture Nutrition*, vol.8, p.299-309.
- LODEIROS, CJ., RENGEL, JJ., GUDERLEY, HE., NUSETTI, O. and HILMMELMAN, JH., 2001. Biochemical composition and energy allocation in the tropical scallop *Lyropecten (Nodipecten) nodosus* during the months leading up to and following the development of gonads. *Aquaculture*, vol.199, p.63-72.
- MANTIRI, DM., NE`GRE-SADARGUES, G., CASTILLO, R. and TRILLES, JP., 1995. Evolution of carotenoid metabolic capabilities during the early development of the European lobster *Homarus gammarus* (Linnaeus 1758). *Comp. Biochem. Physiol.*, vol.B 111, p.553-558.
- MEYERS, PS., 1994. Developments in World aquaculture, feed formulation and role of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, vol. 66, p.1069-1076.
- MENASVETA, P., CHOOSUWAP, J., PIYATIRATITIVORAKUL, S., FAST, A. and LATSCHA, T., 1994. Effect of dietary astaxanthin on gonadal maturation and spawning of giant tiger prawn (*Penaeus monodon fabricius*). In: CHOU, LM., MUNRO, AD., LAM, TJ., CHEN, TW., CHEONG, LK., HOOI, KW., PHANG, VP.E. and TAN, CH. (Eds), *The Third Asian Fisheries Forum*, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. 1994, p.713-716.
- MENASVETA, P., CHAIYANETR, N., PIYATIRETITIVORAKUL, S. and KITTAKOOP, P., 1995. Dietary prophylaxis against yellow-head disease in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Flegel, T.W., Menasveta, P. and Paisarnrat, S. (Eds), *Shrimp Biotechnology in Thailand*, NSTDA, Bangkok, Thailand:61-70.
- MIKI, WN., YAMAGUCHI K. and KONOSU S., 1982. Comparison of carotenoids in the ovaries of marine fish and shellfish. *Comp. Biochem. Physiol.*, vol.B 71, p.1:7-11.
- MIKI, W., 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.*, vol.63, p.141-146.
- MIKI, W., OTAKI, N., SHIMIDZU, N. and YOKOYAMA, A., 1994. Carotenoids as free radical scavengers in marine animals. *J. Mar. Biotechnol.*, vol. 2, p.35-37.

- OLIVER, J. and PALOU, A., 2000. Chromatographic determination of carotenoids in food. Journal of Chromatography, vol. A 881, p.543-555.
- OLSON, JA., 1993. Vitamin A and carotenoids as antioxidants in a physiological context. J. Nutr. Sci. Vitam., vol. 39, p.57-65.
- OLSON, VA. and OWENS, IP., 1998. Costly sexual signals: are carotenoids rare, risky or required? Trends Ecol. Evol., vol.13, p.510-514.
- PADULA, M., 1999. Degradação de β -caroteno e cantaxantina em sistema-modelo de baixa umidade à temperatura ambiente. Formação de produtos não voláteis e voláteis. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil.
- PETIT, H., SANCE, S., NEGRE-SADARGUES, G., CASTILLO, R. and TRILLES, JP., 1991. Ontogeny of carotenoid metabolism in the prawn Penaeus japonicus Bate (1888) (Crustacea Penaeidae). A qualitative Approach. Comp. Biochem. Physiol., vol. B 99, p.667-71.
- RODRIGUEZ-AMAYA, DB., BOBBIO, FO. and BOBBIO, PA., 1984. Curso sobre pigmentos naturais. Campinas. SBCTA-FEAA, UNICAMP, São Paulo, Brazil.
- RODRIGUEZ-AMAYA, DB., 1997. Carotenóides: estruturas, propriedades e funções. Ciência de Alimentos – Avanços e perspectivas na América Latina. Fundação Cargill, Campinas, São Paulo, Brazil. 1997, Cap. 3, p.20-31,.
- RODRIGUEZ-AMAYA, DB., 2001. A guide to carotenoid analysis in foods. Ed. ILSI - International Life Sciences Institute, Washington DC. 2001.
- SACHINDRA, NM., BHASKAR, N. and MAHENDRAKAR, NS., 2005. Carotenoids in crabs from marine and fresh waters of India. Lebens Wiss und-Technol., vol. 38, p.221-225.
- SACHINDRA, N.M., BHASKAR, N. and MAHENDRAKAR, N.S., 2006. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. Waste Management, vol.26, p.1092-1098.
- SCHLEDER, D.D., 2007. Estudo de alguns parâmetros hemato-imunológicos no pectinídeo Nodipecten nodosus e da influência de uma suplementação de carotenóides na dieta, durante o período de reprodução induzida. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.
- SCHOEFS, B., 2002. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. Trends in Food Science & Technology, vol.13, p.361-371.
- TACON, A.G., 1981. Speculative review of possible carotenoid function in fish. Progr. Fish-Culturist, vol.43, p.205-208.
- TORRISSEN, O., 1984. Pigmentation of salmonids of carotenoids in eggs and start-feeding diet on survival and growth rate. Aquaculture, vol.43, p.185-193.
- VIARENGO, A., CANESI, L., MARTINEZ, PG., PETERS, LD. and LIVINGSTONE, DR. 1995. Pro-oxidant processes and antioxidant defence systems in the tissues of the Antarctic scallop (Adamussium colbecki) compared with the Mediterranean scallop (Pecten jacobaeus). Comp. Biochem. Physiol., vol. B 111, 1,p.119-126.
- ZHANG, DH., NG, YK. and PHANG, SM., 1997. Composition and accumulation of secondary carotenoids in Chlorococccum sp. Journal of Applied Phicology, vol. 9(2), p.147-155.

Tabela 1. Carotenóides totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$) extraídos de gônada feminina liofilizada da vieira Nodipecten nodosus e tratamentos com soluções extratora e tempos de extração.

Solução extratora (a: h)	Tempo de incubação		Tempo de incubação	
	Carotenóides totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Solução extratora (a: h)	Carotenóides totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Solução extratora (a: h)
	0 minuto (t_0)		5 minutos (t_5)	
1:1	0.125 ^{(a)γ (A)▼} \pm 0.006	1:1	0.200 ^{(a) (B)} \pm 0.015	
1:3	0.184 ^{(b) (A)} \pm 0.004	1:3	0.219 ^{(a) (B)} \pm 0.021	
1:5	0.105 ^{(c) (A)} \pm 0.010	1:5	0.185 ^{(ac) (B)} \pm 0.025	
2:3	0.125 ^{(ac) (A)} \pm 0.012	2:3	0.170 ^{(bc) (B)} \pm 0.003	
	10 minutos (t_{10})		15 minutos (t_{15})	
1:1	0.213 ^{(a) (BC)} \pm 0.016	1:1	0.236 ^{(a) (C)} \pm 0.014	
1:3	0.260 ^{(b) (B)} \pm 0.020	1:3	0.312 ^{(b) (C)} \pm 0.016	
1:5	0.218 ^{(a) (BC)} \pm 0.015	1:5	0.244 ^{(a) (C)} \pm 0.015	
2:3	0.222 ^{(a) (C)} \pm 0.013	2:3	0.265 ^{(a) (D)} \pm 0.015	

*a: h = acetona: hexano

γ (a), (b), (c) P < 0.05, LSD (para tratamento com soluções extratoras);

▼ (A), (B), (C), (D) P < 0.05, LSD (para tratamentos com tempos de incubação).

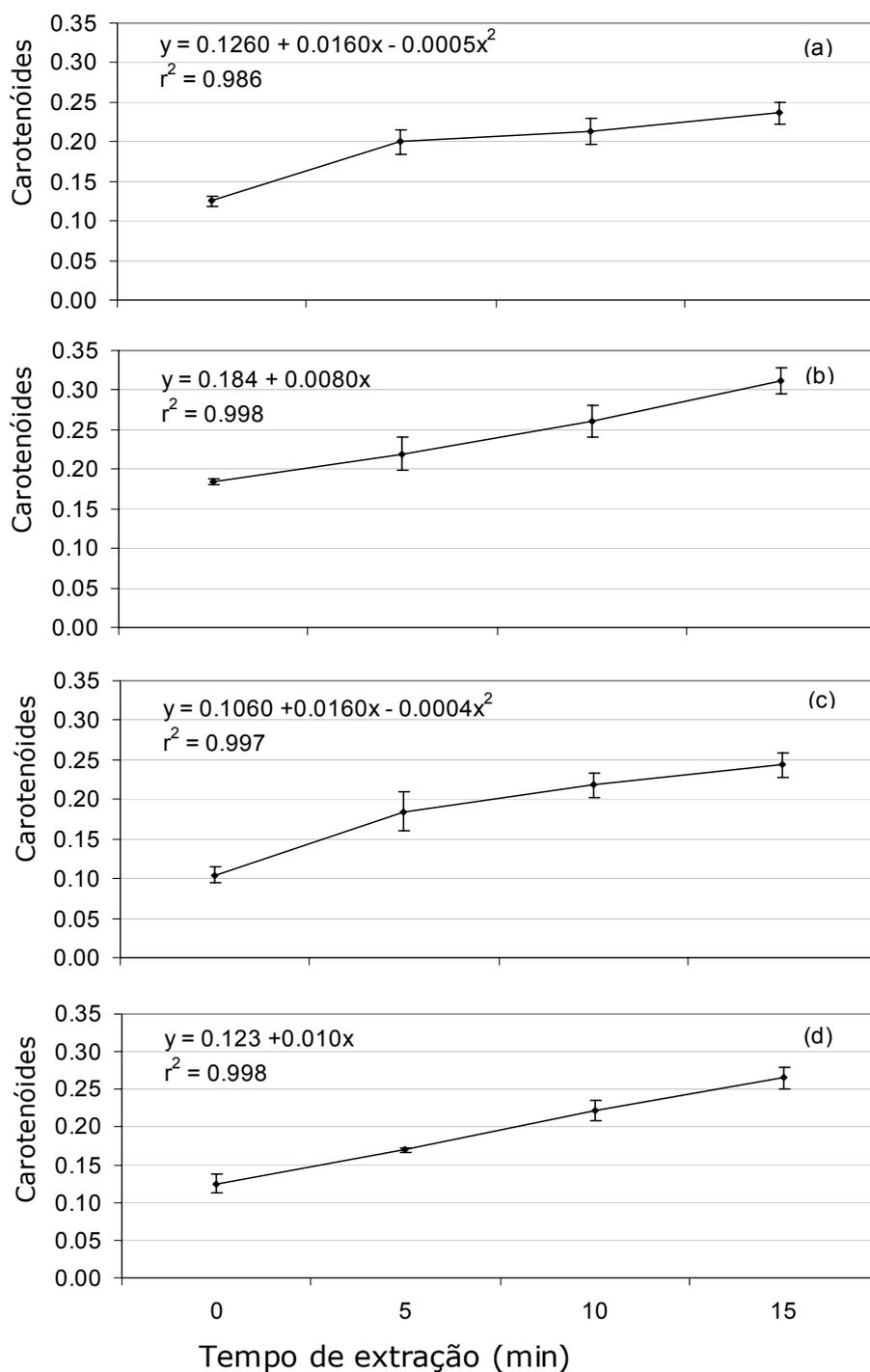


Figura 1. Carotenóides totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$) extraídos da porção feminina da gônada da vieira *Nodipecten nodosus*, de acordo com a proporção de acetona(Ac=O):hexano(Hex) na solução extratora e nos tempos de extração. Ac=O:Hex: (a) 1:1, (b) 1:3, (c) 1:5, e (d) 2:3.

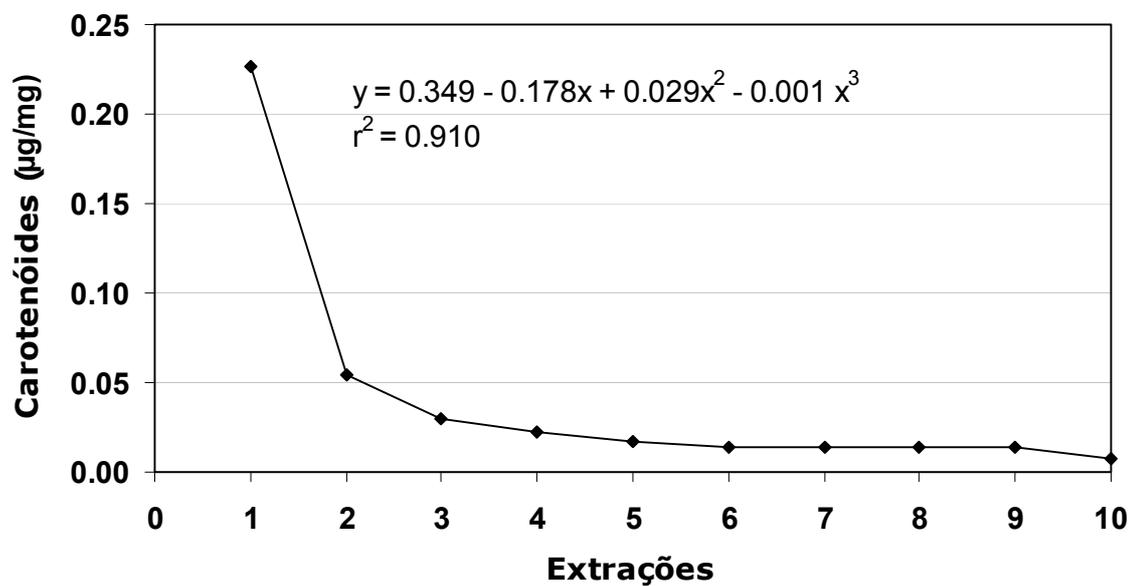


Figura 2. Extração exaustiva de carotenóides totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$) da porção feminina da gônada da vieira *Nodipecten nodosus* seguindo um protocolo de extrações seqüenciais (10x) com a solução extratora Ac=O:Hex (1:3).

CAPÍTULO IV - Relação entre o ciclo reprodutivo, quantidade de astaxantina e estágio de maturação gonádico da vieira Nodipecten nodosus (Bivalvia: Pectinidae)

Revista: Brazilian Journal of Biology (BJB)

Enviado para publicação em: 25 de julho de 2008

Número da referência de recebimento na BJB: BJB-081/08

Relação entre o ciclo reprodutivo, quantidade de astaxantina e estágio de maturação gonádico da vieira Nodipecten nodosus (Bivalvia: Pectinidae)

Simone Sühnel¹, Francisco Lagreze, Marisa Bercht, Jaime Fernando Ferreira
LABORATÓRIO DE MOLUSCOS MARINHOS/UFSC
Servidão dos Coroas s/n, Barra da Lagoa, Florianópolis/SC-Brasil Cep. 88061-600

Ana Lucia Carneiro-Schaefer, Aimê Rachel Magenta Magalhães
NÚCLEO DE ESTUDOS EM PATOLOGIA EM AQUICULTURA/UFSC
Rodovia Edmar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis/SC-Brasil Cep. 88040-900

Marcelo Maraschin
LABORATÓRIO DE MORFOGÊNESE E BIOQUÍMICA VEGETAL/UFSC
Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis/SC-Brasil, Cep. 88040-900

Número de figuras: 3

Número de tabelas: 1

Palavras Chave: Ciclo reprodutivo, astaxantina, Nodipecten nodosus, maturação gonádica de vieira.

Título abreviado: Ciclo reprodutivo, quantidade de astaxantina em Nodipecten nodosus

¹Autor para correspondência: Simone Sühnel
Laboratório de Moluscos Marinhos - UFSC
Servidão dos Coroas s/n, Barra da Lagoa, Florianópolis/SC-Brazil CEP88061-600
ssuhnel@gmail.com

Relação entre o ciclo reprodutivo, quantidade de astaxantina e estágio de maturação gonádico da vieira Nodipecten nodosus (Bivalvia; Pectinidae)

RESUMO

Este trabalho descreve o ciclo gametogênico da vieira Nodipecten nodosus mantida em ambiente de cultivo. Para isto, durante um ano, amostras de indivíduos reprodutores foram coletadas a cada 30 dias e submetidas à avaliação macroscópica e microscópica bem como, avaliada a quantidade de astaxantina. Para a avaliação microscópica secções de 5 μ da porção mediana feminina da gônada foram submetidas a metodologia de análise histológica padrão em parafina e coloração HE. O restante da porção feminina foi liofilizado para extração e quantificação de astaxantina em HPLC. Na avaliação microscópica foram descritos quatro estágios bem definidos para o ciclo reprodutivo. Na análise ao longo do ano foram observados períodos preferenciais de desova em dezembro e janeiro e em julho, agosto e setembro. Quando analisada a quantidade de astaxantina, observou-se que os estádios de pré-desova avançada e de desova inicial apresentaram maior quantidade desse carotenóide que os estádios de gametogênese, pré-desova inicial, desova avançada e repouso. Em função dos resultados, foi possível estabelecer um quadro descritivo dos estágios e uma relação destes com o acúmulo e consumo de astaxantina como importante componente na reprodução da vieira Nodipecten nodosus.

1. Introdução

O molusco bivalve Nodipecten nodosus, da família Pectinidae, popularmente conhecido como vieira, é hermafrodita funcional (simultâneo) (Rupp 1994; Lodeiros et al. 1997, Freitas 2001). Animais adultos de ambiente natural apresentam desovas ao longo do ano, sendo as épocas de maior intensidade primavera e verão na região sul do Brasil na Ilha do Arvoredo (Manzoni 1994; Manzoni et al. 1996).

Esta espécie caracteriza-se por apresentar uma gônada definida envolvida por um tegumento. O tegumento é composto por um epitélio externo, uma lâmina basal e um tecido conjuntivo (tecido sub-epitelial perigonádico). A gônada contém gonodutos, vasos sangüíneos, fibras musculares e parte do intestino. A parte masculina da gônada, de cor branca, está na zona proximal e, a feminina, de cor alaranjada, na porção distal. Os folículos apresentam forma de bulbo, delimitados por um tecido conjuntivo intersticial, o qual, quando o folículo está cheio de gametas, é mais fino e quando está vazio é mais evidente e espesso. Os gonodutos são os canais que ligam o folículo ao exterior, sendo formados por um epitélio prismático simples. Os gametas saem na cavidade paleal através do poro urogenital (Román et al. 2001).

Nos moluscos bivalves, durante o ciclo reprodutivo, ocorrem na gônada diferentes modificações, divididas em estágios de maturação. Estes diferentes estágios sexuais podem ser visualizados por secções histológicas da gônada (Lubet 1959).

Segundo Freitas (2001), o ciclo reprodutivo da vieira N. nodosus apresenta três estágios com as seguintes características: (1) repouso sexual, em que macroscopicamente observa-se massa visceral translúcida, com fácil visualização da alça do intestino, mas não é possível distinguir, na gônada, a porção masculina da feminina; (2) organização do folículo e multiplicação das células sexuais: observa-se a multiplicação das células das paredes foliculares em ambos os setores, feminino e masculino, sendo a fase de evolução da gônada, com muitos oogônias e espermatogônias; (3) período de reprodução, em que se observa a maturação gonádica, eliminação dos gametas e restauração da gônada.

Indivíduos de N. nodosus com 50 mm de altura (aproximadamente 6 a 7 meses após fecundação) já se encontram maduros sexualmente e aptos para reprodução (Freitas 2001).

Para moluscos bivalves, vários fatores endógenos e exógenos determinam o tempo e a duração da maturação (Barber and Blaker 2006). Estes fatores regulam também o balanço de energia, a qual é armazenada pelos animais durante períodos não reprodutivos, sendo usada subsequente para suporte e manutenção quando o alimento é escasso, assim como para produzir um incremento em massa e substituir perdas em outros períodos do ano e para produzir gametas (Barber & Blake 1985; Bayne 1985).

A identificação do estágio de desenvolvimento gonádico pode ser realizada por uma inspeção visual da gônada (avaliação macroscópica) observando seu tamanho, coloração e espessura. Contudo, este método pode conduzir a estimativas subjetivas. Outro método direto de identificação é o índice gonádico, obtido através do peso seco da gônada dividido pelo peso seco total dos tecidos moles. Este método é simples e de aplicação direta. Contudo o seu inconveniente é que o animal é sacrificado (Román et al. 2001). Além destes dois métodos já citados, o método histológico (avaliação

microscópica) é o mais preciso, sendo um método que não deixa dúvidas do estágio sexual do animal (Barbert and Blake, 2006).

Este estudo tem por objetivo descrever os diferentes estágios sexuais da porção feminina da gônada da vieira N. nodosus, avaliar estes estágio ao longo de um ano em ambiente de cultivo e avaliar a relação da quantidade de astaxantina na porção feminina da gônada com os estágios sexuais.

2. Materiais e Métodos

Reprodutores da vieira Nodipecten nodosus (Linnaeus, 1758) foram coletados na área de cultivo experimental da EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural), localizada em Santa Catarina (SC), região sul do Brasil, na praia do Canto Grande, Bombinhas (27°12'5,39"S e 48°30'47,7"N). As análises de carotenóides, com HPLC, foram realizadas no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina (LMBV/UFSC) e, as análises histológicas, no Núcleo de Estudos em Patologia em Aqüicultura (NEPA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

2.1. Delineamento experimental

Para descrever o ciclo gametogênico da porção feminina da gônada foram coletados em diferentes períodos, 45 animais de 70 ± 5 mm de altura, 17 meses de vida, da área de cultivo experimental da EPAGRI e realizadas secções histológicas e análise da quantidade de astaxantina presente na porção feminina da gônada.

Para o estudo dos estágios sexuais ao longo de um ano, foram coletados mensalmente 4 animais de 70 ± 5 mm de altura de uma mesma família, mantidos na área de cultivo experimental da EPAGRI.

Os animais, ao serem coletados, foram imediatamente transportados em caixas de isopor para o laboratório, com as valvas oclusas. Foi realizada a avaliação sexual macroscópica e então, com o auxílio de uma tesoura e bisturi, foi retirada a porção feminina das gônadas. Em seguida ocorreu a dessalinização deste material com solução de formiato de amônio (0,5 M). O excesso de líquido sobre a biomassa amostral foi removido utilizando-se papel de filtro. Para a histologia foi realizada a secção mediana longitudinal da parte feminina partindo a gônada em duas partes e colocado 1 parte para análise histológica e outra para análise de astaxantina. As porções femininas das gônadas que foram utilizadas para análise de astaxantina foram armazenadas a -18 °C por 24 h e liofilizadas (marca Terroni Favel LT 1000/8).

2.2. Histologia

Os cortes foram fixados em solução de Davidson e armazenados em álcool 70 %. Após diferentes banhos em álcool etílico (de 70 a 100 %), xilol e parafina, foram então montados em blocos de parafina.

Os blocos contendo as amostras de gônada foram cortados a 5 μ . As lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris e Eosina.

Para a identificação dos estágios sexuais foram realizadas duas avaliações por dois identificadores, aleatoriamente e sem identificação da lâmina. A descrição dos estágios foi realizada individualmente, pela análise microscópica com aumento de 200 e 400 vezes.

Foi padronizada uma pontuação para cada estágio sexual de 1 a 6, como pode ser visualizada no Quadro 1, para as análises.

No local de cultivo onde os animais foram mantidos, a temperatura da água do mar foi registrada de outubro de 2006 a novembro de 2007, através de um TidBit, modelo Optic StowAway-TEMP, instalado no local.

2.3. Análise de astaxantina

A extração de carotenóides foi realizada conforme metodologia descrita por Sühnel et al. (*in press*), colocando a amostra liofilizada em um recipiente de cerâmica, adicionando nitrogênio líquido, macerando-as e retirando uma alíquota de 50 mg. A esta alíquota de 50 mg foram adicionados 5 mL da solução extratora de acetona (Ac=O, Nuclear, P.A.) e *n*-hexano (Hex, TediaBrazil, P.A.) na proporção 1:3 respectivamente, permanecendo em agitação (agitador magnético Fisatom), protegidas da luz, em temperatura ambiente (23 °C). Após a extração, as amostras foram filtradas em papel filtro, tendo seu volume final ajustado para 3 mL, com posterior acondicionamento em frascos âmbar, contendo atmosfera de N₂. As amostras permaneceram armazenadas em freezer (-18 °C) para posterior determinação do teor de astaxantina.

A astaxantina foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A metodologia utilizada para análise foi conforme descrito por Sühnel *et al.* (*in press*), onde alíquotas dos extratos carotenóidicos das amostras (300 µL) foram filtradas (filtros de 0,22 µ), seguido da injeção de 10 µL de cada amostra em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna C₁₈ de fase reversa Vydac (BioRad, 25 cm x 4,6 mm Ø) e detector UV-visível, operando em leitura de 470 nm. Como fase móvel, utilizou-se acetoneitrila: metanol (90: 10, TediaBrazil, grau HPLC), em fluxo de 0,8 mL/min.

A identificação da astaxantina foi realizada com base no tempo de retenção obtido a partir da análise de amostra padrão (0,461 mg/10 mL Hex, Sigma – MO, USA), sob as mesmas condições experimentais e calculando-se a integral da área dos picos correspondentes, através de curva padrão externa ($y = 7044,96x$, $r^2 = 0,994$).

2.4. Análise estatística

Para análise da relação entre quantidade de astaxantina na porção feminina da gônada e o estágio sexual, foi feita análise descritiva, a avaliação de normalidade dos erros e de homogeneidade de variância (Bartlett). Como as amostras não mostraram homogeneidade, foi realizada uma análise não paramétrica Kruskal Wallis e, em seguida, o teste de separação de médias dois a dois, o Mann-Whitney U-test. A bibliografia de referência para as análises estatísticas foi a de Zar (1974).

3. Resultados

3.1. Descrição dos estágios sexuais

Os animais coletados encontravam-se em diferentes estágios sexuais, os quais foram organizados em quatro estágios e realizada a descrição macroscópica e microscópica dos aspectos da porção feminina da gônada (Tabela 1), observando: a) primeiro os aspectos macroscópicos, como coloração da gônada, granulação, e aparência; e b) em seguida os aspectos microscópicos, como a presença de oócitos, paredes dos folículos, espaços inter e intrafoliculares, canais (gonodutos), presença de tecido conjuntivo e lise dos gametas. Os quatro estágios descritos são: (estágio 1) gametogênese; (estágio 2A) pré-desova inicial; (estágio 2B) pré-desova avançada; (estágio 3A) desova inicial; (estágio 3B) desova avançada; e (estágio 4) repouso (Tabela 1). Estes quatro estágios podem ser observados na Figura 1.

Nos estágios pré-desova (estágio 2) e desova (estágio 3) foram realizadas subdivisões em A e B, sendo A em ambos uma fase inicial e B uma fase avançada em cada estágio.

As análises microscópicas realizadas pelos 2 analisadores foram idênticas, não deixando dúvidas do real estágio em que se encontrava cada gônada analisada.

O estágio de gametogênese (estágio 1) caracteriza-se pela presença de folículos aparentes com paredes espessas e não justapostas, poucos oócitos nos folículos, sendo o aspecto dos folículos heterogêneo, em diferentes tamanhos. Podem ser observadas oogônias no lado interno do folículo. Também se observa a presença de tecido conjuntivo interfolicular e espaços vazios intrafoliculares.

O estágio de pré-desova inicial (estágio 2A) caracteriza-se por apresentar muitos folículos, repletos de gametas, sendo que os oócitos são alongados. A parede dos folículos é aparente, reconhecível. O gonoduto apresenta-se vazio, sem a presença de oócitos e não se observam espaços intrafoliculares.

O estágio de pré-desova avançado (estágio 2B) caracteriza-se por apresentar mais oócitos por folículo que no estágio 2A, sendo que os oócitos são alongados e extremamente comprimidos; a parede do folículo está muito justaposta e é de difícil visualização. Há muitos folículos, o gonoduto está sem oócitos e não se observam espaços intrafoliculares e ou interfoliculares. Como a gônada está repleta de gametas, o próprio corte, secção histológica, já estimula a liberação de gametas.

O estágio de desova inicial (estágio 3A) caracteriza-se por ser a fase inicial de eliminação de gametas; as paredes dos folículos não estão totalmente justapostas, são reconhecíveis, podendo haver presença de gametas nos gonodutos e há presença de alguns espaços intrafoliculares e interfoliculares.

O estágio de desova avançada (estágio 3B) caracteriza-se por apresentar folículos vazios e com formato irregular, devido à recente eliminação de gametas. Neste estágio o folículo pode estar total ou parcialmente vazio, com oócitos remanescentes, podendo-se observar lise nesses oócitos remanescentes.

O estágio de repouso (estágio 4) caracteriza-se pela gônada apresentar muito tecido conjuntivo e poucos folículos. Os folículos remanescentes têm pequeno diâmetro e a dominância é de conjuntivo interfolicular.

Tabela 1

3.2 Variação do estágio sexual em ambiente de cultivo

Na análise histológica da porção feminina da gônada das vieiras coletadas no período de novembro de 2006 a novembro de 2007, foram observadas eliminação de gametas no período de dezembro de 2006 e janeiro de 2007 e no período de julho, agosto e setembro de 2007 na praia de Canto grande (Sul do Brasil). No restante dos meses os animais analisados estavam predominantemente em estágio de pré-desova (Figura 2).

A temperatura da água do mar no período de dezembro de 2006 a janeiro de 2007 variou de $22,64 \pm 0,77$ °C a $24,75 \pm 0,97$ °C, respectivamente e de julho, agosto e setembro de 2007 de $15,84 \pm 1,40$ °C, $16,47 \pm 1,09$ °C e $19,65 \pm 1,37$ °C, respectivamente (Figura 2).

3.3 Quantidade de astaxantina em cada estágio sexual

Para avaliar a relação da quantidade de carotenóides e o estágio sexual, foi primeiramente realizada a avaliação da homogeneidade das amostras. Como não são homogêneas ($p < 0,05$), então foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis, o qual mostrou que as amostras apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). Para identificar quais estágios são diferentes foi aplicado Mann-Whitney U-Test comparando as amostras duas a duas. Este teste mostrou que a quantidade de astaxantina nos estágios de pré-desova avançada estágio 2B ($45,06 \pm 6,35$ µg/mL) e de desova inicial estágio 3A ($38,01 \pm 7,16$ µg/mL) não apresenta diferença significativa, mas sim em relação aos estágios de gametogênese estágio 1 ($8,31 \pm 0,41$ µg/mL), pré-desova inicial estágio 2A ($17,71 \pm 4,87$ µg/mL), desova avançada 3B ($17,12 \pm 0,85$ µg/mL) e de repouso estágio 4 ($6,76 \pm 0,91$ µg/mL). O estágio de gametogênese (estágio 1) e o de repouso (estágio 4) apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si e dos demais estágios. Assim como, o estágio de repouso (estágio 4) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) dos demais estágios, apresentando a menor quantidade de astaxantina. Os estágios pré-desova inicial (estágio 2A) e desova avançada (estágio 3B) não apresentaram diferença significativa.

Figura 1

Figura 2

Figura 3

4. Discussão

Segundo Sastry (1975), os estágios no ciclo reprodutivo envolvem as interações entre fatores endógenos e exógenos. Os fatores exógenos são principalmente: temperatura, salinidade e abundância nutricional. Para os fatores endógenos o autor descreve a idade, o metabolismo e os hormônios. Contudo, o estado nutricional do animal também é fundamental para este ciclo.

Os quatro estágios reprodutivos aqui descritos e utilizados foram adotados por terem se mostrado possíveis de reconhecimento, levando em conta o aspecto dinâmico do ciclo sexual da vieira Nodipecten nodosus.

A diferenciação dos quatro estágios descritos neste estudo foi realizada com base na avaliação microscópica de cada estágio sexual. Esta divisão em estágio é importante no processo de reprodução em laboratório, a qual facilita a identificação do estágio sexual dos reprodutores a serem utilizados para produção de sementes. Nesse processo, para N. nodosus, os animais ao chegarem do mar passam por um período de maturação, os quais são acondicionados em tanques e com alimentação diária. A qualidade deste alimento fornecida deve ser considerada para o sucesso desta maturação e posterior produção de larvas viáveis.

Os autores Barber e Blake (1991) descrevem para os moluscos, incluindo os pectinídeos, 6 estágios sexuais, sendo eles: (1) repouso (período vegetativo na reprodução); (2) diferenciação celular; (3) crescimento citoplasmático; (4) vitelogênese (maturação); (5) desova; (6) reabsorção dos gametas remanescentes.

O autor Sastry (1963) descreve para Argopecten ventricosus 5 estágios sexuais, sendo eles: (1) imaturo; (2) parcialmente maturo; (3) maturo; (4) repouso. Já os autores Villalejo-Fuerte e Ochoa (1993) e Beninger e LePennec (1991) descrevem para esta mesma espécie os seguintes estágios: (1) gametogênese inicial; (2) gametogênese avançada; (3) maturo; (4) desova; (5) repouso.

Já Barber e Blake (2006) citam que o pectinídeo Pecten maximus, apresenta 7 estágios sexuais, sendo eles: (0) imaturo; (I) desenvolvimento; (II) diferenciação; (III) recuperação; (IV) preenchimento; (V) maturação inicial; (VI) maturação avançada; (VII) desova parcial ou desova total.

Segundo Penchaszadeh et al. (2000), o pectinídeo Amusium laurenti, apresenta 4 estágios sexuais, sendo eles: desenvolvimento dos folículos, folículo cheio, desova parcial e desova total. Este autor não descreve a ocorrência do estágio de repouso para esta espécie.

Na avaliação e descrição macroscópica, o estágio de gametogênese caracteriza-se por apresentar gônada não tão inchada, coloração laranja claro e visualização de grânulos. Para os estágios de pré-desova inicial (2A) e avançada (2B) não foi observada diferenciação macroscópica, apresentando ambos os estágios aparência inchada da gônada, coloração laranja forte e sem presença de grânulos. Para os estágios de desova inicial (3A) e desova avançada (3B) também não foi observada para a gônada uma diferenciação macroscópica, apresentando nos dois casos gônada aparência inchada, coloração laranja forte e a presença de grânulos. Para o estágio de repouso (4) a gônada apresentou aparência não inchada, com coloração laranja bem clara e opaca sem a presença de grânulos.

O estágio de repouso (4) descrito neste estudo foi observado por Manzoni et al. (1996), para N. nodosus, no período do inverno, contudo não foi observado por Freitas (2001) para esta mesma espécie. Luna-González (1997) e Luna-González et al. (2001) observaram para Argopecten ventricosus no México o estágio de repouso no mês de julho.

Em alguns bivalves, no estágio de repouso, o tecido conjuntivo rodeia os folículos, o qual se ramifica e expande de acordo com a quantidade e grau da maturação dos gametas (Calvo et al.

1998) e por isto no estágio de repouso, quando apenas existem gametas remanescentes, o tecido conjuntivo preenche os espaços vazios interfoliculares.

O período de desova observado para N. nodosus neste trabalho com maiores temperaturas da água do mar no período do verão também são observados para outras espécies de pectinídeos, como para Amusium laurenti (Penchaszadeh et al. 2000). Para Pecten maximus na Galícia (Pazos et al. 1996), o período de desova é observado no inverno (12,0 - 12,7 °C) e na primavera, quando a temperatura alcança os 16 °C.

De acordo com Manzoni et al. (1996), N. nodosus, em estudos realizados na Ilha do Arvoredo/SC, apresentam desovas parciais e assíncronas ao longo do ano, mas estas desovas não significam que os animais estejam desovando gametas viáveis. Eles simplesmente podem estar eliminando gametas por fatores de estresses ambientais como temperatura. O período de novembro a dezembro, para este autor (Manzoni et al., 1996) foi o de maiores valores de índice gonadosomático, o qual está associado a altas temperaturas da água. No presente estudo, na avaliação histológica do estágio sexual ao longo do ano em ambiente de cultivo, pode-se observar dois picos definidos de desova: um no verão (dezembro e janeiro) e outro no final do inverno e começo da primavera (julho, agosto e setembro). Os picos de desova no período de inverno e primavera, com temperaturas da água do mar menores, também foram identificados por Manzoni and Banwart (2000).

Para avaliar a relação entre os carotenóides e os estágios sexuais, foram medidos os níveis de carotenóides na gônada. Isto mostrou que em estágios avançados de pré-desova e início de desova apresentam altos níveis de astaxantina na parte feminina da gônada do que em estágios iniciais de gametogênese em pré-desova, desova avançada e repouso. A maior quantidade de astaxantina na porção feminina da gônada no estágio de pré-desova avançado e no início da desova indica que o acúmulo de carotenóides está relacionado com a maturação dos oócitos.

De acordo com Farias-Molina (2001), os carotenóides são necessários para a maturação gonádica em invertebrados. O que justificaria os maiores níveis de carotenóides presentes na gônada quando os animais estão em estágios reprodutivos mais avançados e têm mais gametas presentes na gônada (pré-desova avançada e desova inicial), indicando a importância dos carotenóides nestas fases.

Nossos resultados mostram que os carotenóides são necessários para o ciclo reprodutivo da vieira N. nodosus. Como os moluscos bivalves são incapazes de sintetizar os carotenóides (Farias-Molina 2001) é essencial que eles venham de uma dieta de fitoplancton rica em carotenóides.

Ficou claro com a realização deste trabalho que a vieira N. nodosus, adulta e madura, apresenta quatro estágios sexuais bem definidos e que os estágios de pré-desova e desova podem ser subdivididos em inicial e avançado, sendo eles: (1) gametogênese; (2A) pré-desova inicial; (2B) pré-desova avançada; (3A) desova inicial; (3B) desova avançada; (4) repouso. Que os estágios de pré-desova inicial e de desova avançada apresentam maior quantidade de astaxantina. N. nodosus apresenta dois picos de desova ao longo do ano, sendo eles em dezembro e janeiro e o outro em julho, agosto e setembro.

Em mexilhão, de acordo com Lunetta (1969), a coloração salmão alaranjada nos oócitos está relacionada a inclusão lipídica. Por outro lado, em N. nodosus esta coloração pode estar relacionada com ambos, influência lipídica e da presença de carotenóides nos oócitos.

Como pode ser visto nos resultados de nosso trabalho, de acordo com os estágios do ciclo reprodutivo e o conteúdo de astaxantina, é possível estabelecer uma relação muito próxima entre estes eventos durante processos de maturação e desova em N. nodosus.

5. Agradecimentos

Agradecemos ao FINEP, FAPESC e CNPq pelo suporte financeiro e a CAPES/UFSC pela bolsa de doutorado.

6. Referências

- BARBER BJ. and BLAKE NJ., 1985. Substrate catabolism related to reproduction in the bay scallop Argopecten irradians concentricus, as determined by O/N and R/Q physiological indexes. *Mar Biol* vol. 87, p. 13–18.
- BARBER, BJ. and BLAKE, NJ. Reproductive physiology. In: Shumway SE., Parsons GJ. (eds) *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, 2nd ed. Elsevier, 2006, vol. 35, p 357-416.
- BAYNE, BL. Ecological consequences of stress. In: Bayne BL., Brown DA., Burns K., Dixon DR., Ivanovici A., Livingstone DR., Lowe DM., Moore MN., Stebbing ARD., Widdows J. *The effects of stress and pollution on marine animals*. Praeger, New York, 1985, p. 141–157.
- CALVO, J., MORRICONI, E. and ORLER, PM., 1998. Estratégias reprodutivas de moluscos bivalves y equinoideos. *El Mar Argentino y sus Recursos Pesqueros* vol.2, p. 195-231.
- FARIAS-MOLINA, A. Nutrición en moluscos Pectínidos. In: Maeda-Martínez AN. *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. 2001, Cap. 5, p. 89-104.
- FREITAS, CA., 2001. Formação da gônada e Índice Gonádico em juvenis da vieira Nodipecten nodosus (Linnaeus, 1758)(Bivalvia: Pectinidae) cultivados em diferentes profundidades. Florianópolis, UFSC, Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, 33 p.
- GU, WL., AN, GH. and JOHNSON, EA., 1997. Ethanol increases carotenoid production in Phaffia rhodozyma. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 19, p. 114–117.
- HERNÁNDEZ, J., URIARTE, I., FARIAS, A., 2000. Estudio comparativo de las progenies del ostión del norte (Argopecten purpuratus) y la ostra del Pacífico (Crassostrea gigas), en reproductores acondicionados con distintas calidades de dieta. In: *Libro de Resúmenes, XX Congreso Ciencias del Mar*, Concepción, Chile, p. 136.
- LODEIROS, CJ., RENGEL, JJ., FREITES, L., MORALES, F. and HIMMELMAN, JH., 1997. Growth and survival of the tropical scallop Lyropecten (Nodipecten) nodosus maintained in suspended culture at three depths. *Aquaculture*, vol. 165, p. 41-50.
- LUBET, P., 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilides et les pectinides (Mollusques Bivalves). *Rev. Trav. Ins. Pêches Marit.*, vol.23, no. 4, p. 387-548.
- LUNETTA, JE., 1969. Fisiologia da reprodução de mexilhões (Mytilus perna L. Mollusca Lamellibranchia). *Bol. Zool. Biol. Mar.*, São Paulo, vol. 26, p. 33-111.
- MAGNESEN, T., BERGH, O. and CHRISTOPHERSEN, G., 2006. Yields of great scallop, Pecten maximus, larvae in a commercial flow-through rearing system in Norway. *Aquaculture International*, vol.14, p. 377-394.
- MANTIRI, DM., NEGRE-SADARGUES, G., CASTILLO, R., TRILLES, JP., 1995. Evolution of carotenoid metabolic capabilities during the early development of the European lobster Homarus gammarus (L. 1758). *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 111B, p. 553–558.
- MANZONI, GC., 1994. Aspectos da Biologia de Nodipecten nodosus, (Linnaeus, 1758) (MOLLUSCA: BIVALVIA), nos arredores da ilha do Arvoredo (Santa Catarina - Brasil), com vistas a sua utilização na aquicultura. Florianópolis, UFSC, Dissertação (Mestrado em Aquicultura) Universidade Federal de Santa Catarina, 98p.
- MANZONI, GC. , POLI, CR., RUPP, GS. Período Reprodutivo del pectínido Nodipecten nodosus (Mollusca:Bivalvia) en los alrededores de la Isla Arvoredo (27° 17'S - 48° 22'W) - Santa Catarina - Brasil. In: Silva, A. and Merino, G. *Acuicultura en Latinoamérica*. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura, II Simposio Avances y Perspectivas de la Acuicultura en Chile., 1996, p. 197-201.

- MEYERS, PS., 1994. Developments in World aquaculture, feed formulation and role of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, vol. 66, p. 1069-1076.
- MENASVETA, P., CHOOSUWAP, J., PIYATIRATITIVORAKUL, S., FAST, A. and LATSCHA, T. Effect of dietary astaxanthin on gonadal maturation and spawning of giant tiger prawn (*Penaeus monodon*). In: CHOU, LM., MUNRO, AD., LAM, TJ., CHEN, TW., CHEONG, LK., HOOI, KW., PHANG, VPE., TAN, CH. *The Third Asian Fisheries Forum*. Asian Sheries Society, Manila, Philippines, 1994, p. 713-716.
- MIKI, WN., YAMAGUCHI K. and KONOSU S., 1982. Comparison of carotenoids in the ovaries of marine fish and shellfish. *Comp Biochem Physiol*, vol. 71 B, no. 1, p. 7-11.
- OLSON, JA., 1993. Vitamin A and carotenoids as antioxidants in a physiological context. *J. Nutr. Sci. Vitam.*, vol. 39, p. S57-S65.
- PAZOS, AJ., RÓMAN, G., ACOSTA, CP., ABAD, M. and SÁNCHEZ, JL., 1996. Stereological studies on the gametogenic cycle of the scallop, *Pecten maximus*, in suspended culture in Ria de Arousa (Galicia, NW Spain). *Aquaculture*, vol. 142, p. 119-135.
- PETIT, H., SANCE, S., NEGRE-SADARGUES, G., CASTILLO, R. and TRILLES, JP., 1991. Ontogeny of carotenoid metabolism in the prawn *Penaeus japonicus* Bate (1888) (Crustacea Penaeidae). A qualitative approach. *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 99B, p. 667-671.
- ROMÁN, G., MARTÍNEZ, G., GARCÍA, O. and FREITES, L. Reproducción. In: *Los Moluscos Pectinídeos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*, 2001, Cap. 2, p. 27-59.
- RUPP, GS., 1994. Obtenção de reprodutores, indução à desova e cultivo larval e pós-larval de *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Pectinidae). Florianópolis, UFSC, Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, 125 p.
- SOUDANT, P., MARTY, Y., MOAL, J. and SAMAIN, JF., 1996. Fatty acids and egg quality in great scallop. *Aquacult Int*, vol. 4, p. 191-200.
- SÜHNEL, S., LAGREZE, F., FERRERIRA, JF., CAMPESTRINI, LH., MARASCHIN, M., in press. Carotenoid extraction from the gonad of the scallop *Nodipecten nodosus* (Bivalvia: Pectinidae). *Bras J. Biol.*
- URIARTE, I., RUPP, G. and ABARCA, A. Producción de juveniles de pectínidos Iberoamericanos bajo condiciones controladas. In: Maeda-Martínez, AN. *Los Moluscos Pectinídeos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. 2001, Cap. 8: p.147-171.
- UTTING, SD. and MILLICAN, PF., 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*, vol. 155, p. 45-54.
- VÉLEZ, A., 1987. Variación estacional de la composición química de los pectinidos *Pecten ziczac* y *Lyropecten nodosus*. *Boln. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente.*, vol. 26, no. 1-2, p. 56-61.
- ZAR, JH., 1974. *Biostatistical analyses*. SA.: Prentice-Hall, 357 p.

Tabela 1. Descrição histológica dos estágios sexuais da porção feminina da gônada da vieira *Nodipecten nodosus*.

Nome	Estágio	Pontos	Descrição microscópica	Descrição macroscópica
Gametogenese	1	1	Poucos oócitos; Oócitos em diferentes tamanhos; Aspecto heterogêneo; Presença de tecido conjuntivo interfolicular; Paredes dos folículos não justapostas; Parede do folículo mais espessa e presença de oogônias no lado interno; Com espaços intrafoliculares.	Gônada não inchada; Coloração laranja claro; Visualização de grânulos.
Pré-desova inicial	2A	2	Muitos folículos Folículos repletos de gametas; Oócitos alongados; Paredes dos folículos justapostas, mas reconhecíveis; Canal vazio.	Gônada inchada; Coloração: laranja forte; Sem presença de grânulos.
Pré-desova avançada	2B	3	Com mais oócitos por folículos que em 2A; Oócitos alongados e extremamente comprimidos; Parede do folículo muito justaposta, de difícil visualização; Muitos folículos; Canal vazio; Qualquer estímulo ou corte já há liberação de gametas; Sem espaços intrafoliculares e interfoliculares.	
Desova inicial	3A	4	Fase inicial de eliminação de gametas; Paredes dos folículos não totalmente justapostas, reconhecíveis; Pode haver presença de gametas nos canais genitais; Com espaços intrafoliculares e interfoliculares.	Gônada inchada; Coloração: laranja forte; Presença de grânulos.
Desova avançada	3B	5	Presença de folículos vazios; Folículo com formato irregular, devido à recente desova; Folículo total ou parcialmente vazio, gametas remanescentes.	
Repouso	4	6	Poucos folículos; Folículos remanescentes em pequeno diâmetro; Muito tecido conjuntivo interfolicular; Raros oócitos residuais.	Gônada não inchada; Coloração: Laranja claro, opaca; Sem presença de grânulos;

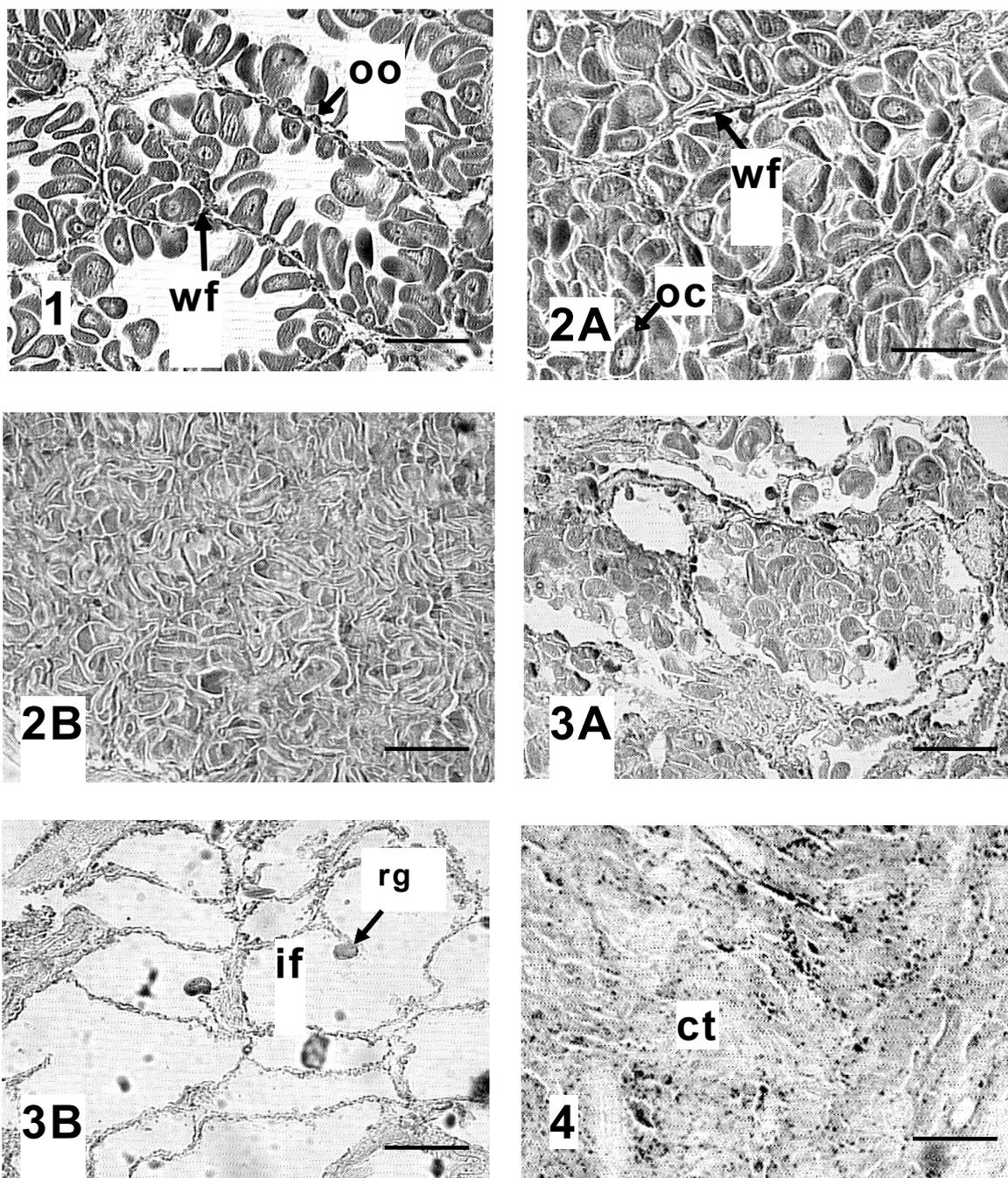


Figura 1. Secções histológicas da gônada feminina de *Nodipecten nodosus* mostrando o desenvolvimento do ciclo gametogênico: (1) gametogênese; (2A) pré-desova inicial; (2B) pré-desova avançada; (3A) desova inicial; (3B) desova avançada; (4) repouso. ct: tecido conjuntivo; oo: oogônia; wf: parede do folículo; oc: óocito; if: espaço intrafolicular; rg: gametas remanescentes. A barra representa 100 μ .

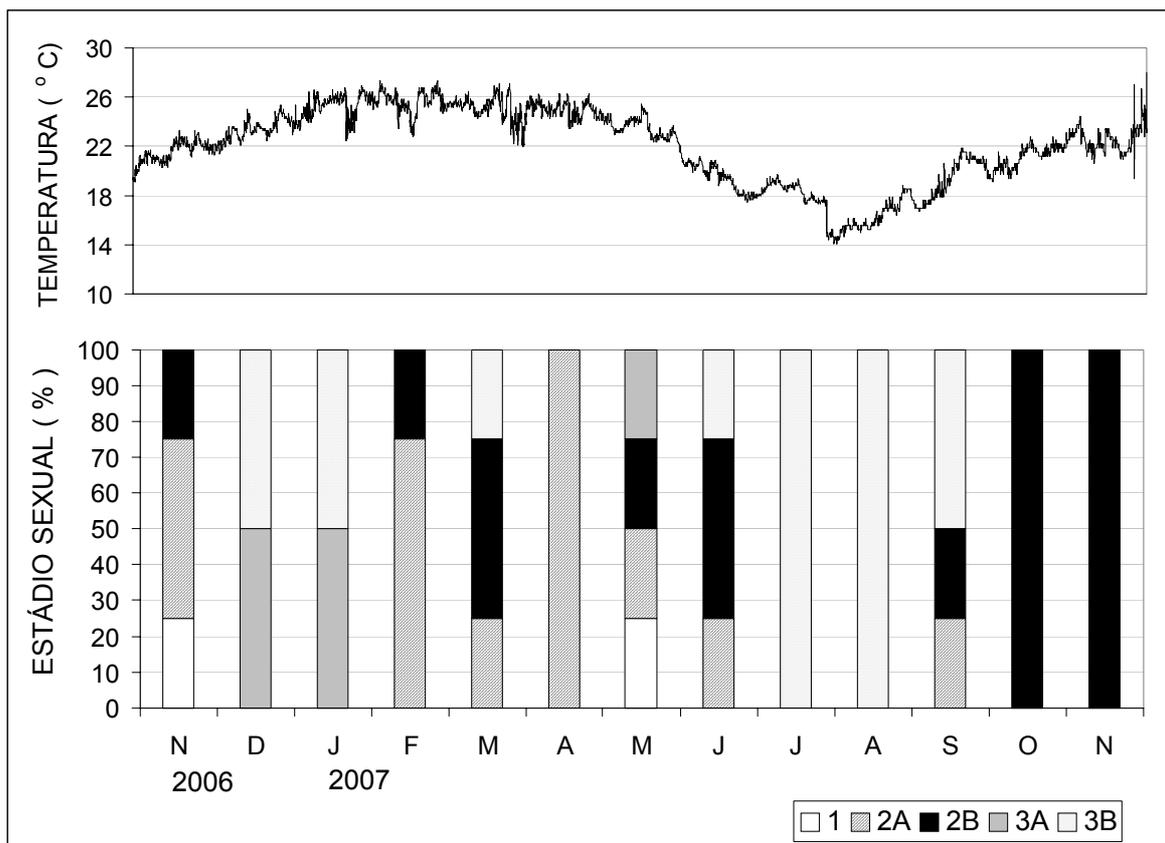


Figura 2. Temperatura da água do mar durante a coleta de vieiras e estágio sexual dos animais (*N. nodosus*) mensalmente (n=4). Estágios: (1) gametogenese; (2A) pré-desova inicial; (2B) pré-desova avançada; (3A) desova inicial; (3B) desova avançada.

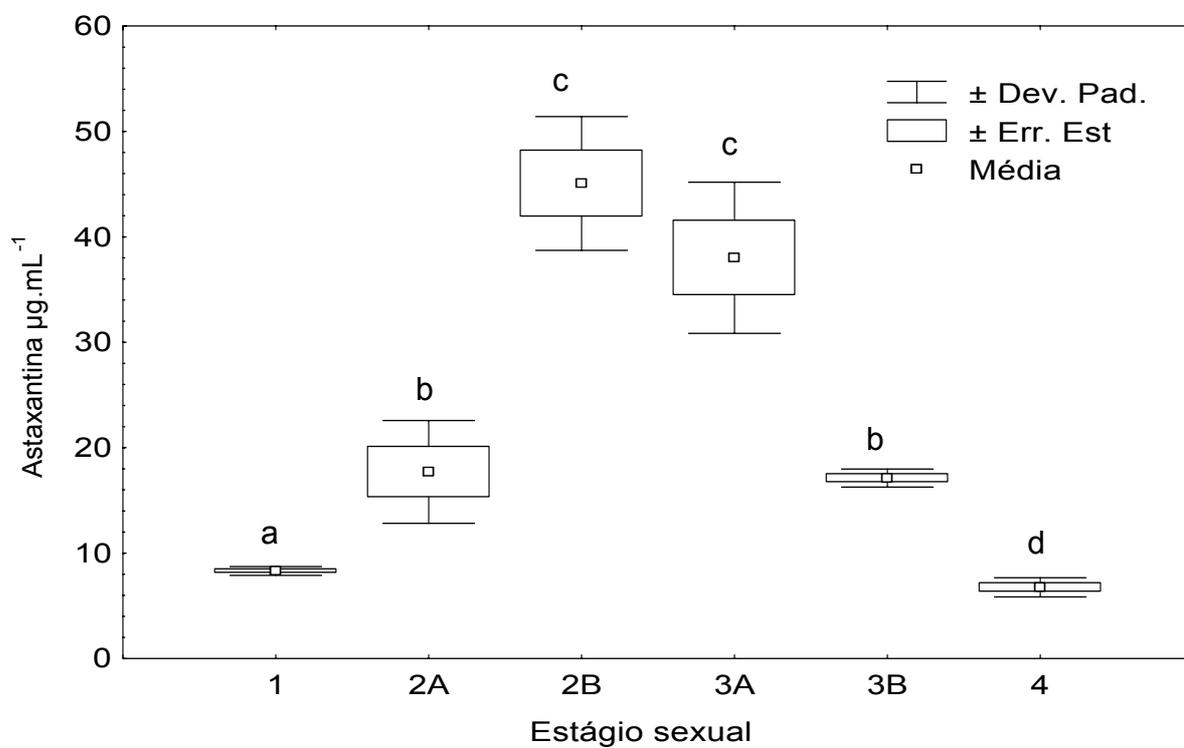


Figura 3. Quantidade de astaxantina na porção feminina da gônada da vieira *N. nodosus*, nos estágios sexuais. Estágios: (1) gametogenese; (2A) pré-desova inicial; (2B) pré-desova avançada; (3A) desova inicial; (3B) desova avançada; (4) repouso.

CAPÍTULO V – Efeito de dietas com diferentes concentrações e fontes de astaxantina na maturação de reprodutores, rendimento larval e de pré-sementes da vieira, *Nodipecten nodosus* (L. 1758)

Revista à qual será enviado para publicação: Aquaculture

Efeito de dietas com diferentes concentrações e fontes de astaxantina na maturação de reprodutores, rendimento larval e de pré-sementes da vieira *Nodipecten nodosus* (L. 1758).

Simone Sühnel^{1*}, Francisco Lagreze¹, Adriana Pereira², Francisco C. da Silva¹, Marcelo Maraschin³, Aimê Rachel Magenta Magalhães⁴, Jaime Fernando Ferreira¹

¹Laboratório de Moluscos Marinhos/UFSC, Servidão dos Coroas s/n, Barra da Lagoa, Florianópolis/SC-Brasil Cep.88061-600

²Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga nº 1188, Itacorubi, Florianópolis/SC-Brasil Cep.88034-901

³Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal/UFSC, Rodovia Edmar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis/SC-Brasil Cep.88040-900

⁴Núcleo de Estudos em Patologia em Aquicultura/UFSC, Rodovia Edmar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis/SC-Brasil Cep.88040-900

(*)Autor para correspondência: Simone Sühnel

Laboratório de Moluscos Marinhos - UFSC

Servidão dos Coroas s/n, Barra da Lagoa, Florianópolis/SC-Brasil Cep. 88061-600

e-mail: ssuhnel@gmail.com

Telefone: (55) (48) 3232 3279

Resumo

Neste estudo, foi realizada a maturação de reprodutores da vieira *Nodipecten nodosus* com duas fontes de astaxantina, a microalga *Haematococcus pluvialis* seca (Algamac AST) e viva, e avaliado o seu efeito no estágio sexual, acúmulo de astaxantina e eliminação e gametas dos reprodutores, assim como na recuperação de larvas e de pré-sementes. Foram realizados dois experimentos testando diferentes concentrações de Algamac AST em uma dieta compostas por uma mistura de microalgas (*Isochrysis sp.*, *Chaetoceros muelleri* e *Skeletonema sp.*). Um terceiro experimento foi realizado testando o Algamac AST e a microalga *H. pluvialis* viva em uma concentração de 50 % sobre uma dieta composta pela microalga *C. muelleri*. Todas as dietas foram calculadas para uma concentração final de microalgas de $7,5 \times 10^4$ células.mL⁻¹. Observou-se para os experimentos I e II, que a substituição da dieta com 50% de Algamac AST, em ambos tempos avaliados, proporcionou um maior acúmulo de astaxantina na porção feminina da gônada e que todas as dietas testadas favoreceram a maturação gonádica. Assim como, observou-se que o Algamac AST na dieta favoreceu a sobrevivência de larvas “D” e pedivéliger. Para o experimento III, o tratamento com a microalga *H. pluvialis* viva proporcionou um maior acúmulo de astaxantina na porção feminina da gônada da vieira e uma maior porcentagem de recuperação de larvas “D” e pedivéliger. Estes resultados mostraram que os carotenóides apresentam um efeito positivo na recuperação de larvas para esta espécie.

Palavras Chave: *Nodipecten nodosus*, maturação, astaxantina, rendimento larval, recuperação de pré-sementes, vieira.

1. Introdução

A maturação de reprodutores em laboratório é uma etapa importante no processo de cultivo de bivalves (Wilson et al., 1996). Para *Nodipecten nodosus*, esta etapa é fundamental para garantir o fornecimento de sementes para a produção comercial. Pesquisas para obtenção de sementes de *N. nodosus* através de coletores artificiais colocados em ambiente natural, demonstraram que esta espécie possui uma baixa taxa de captação, devido à sua baixa densidade e dispersão das populações (Ostini; Poli, 1990; Manzoni; Rupp, 1993; Manzoni et al., 1996; Uriarte et al., 2001).

Os primeiros ensaios sobre a maturação da vieira *Nodipecten nodosus* em laboratório foram realizados por Rupp (1994), obtendo 100% de sobrevivência dos reprodutores acondicionados em laboratório. De mesma forma, Velascos e Barros (2007) citam que é possível obter uma maturação de *Nodipecten nodosus* em laboratório.

Na maturação em laboratório, além da temperatura, um dos fatores fundamentais é a alimentação destes reprodutores durante este período (Roman et al., 2001). A dieta de reprodutores em laboratório pode ser enriquecida com diferentes nutrientes, como lipídeos (Soudant et al., 1996a, 1996b), proteínas (Hernández et al., 2000) e vitaminas.

Os carotenóides, precursores da vitamina A (Miki et al., 1982), são pigmentos encontrados nos tecidos de organismos marinhos (Meyers, 1994). Segundo Gu et al. (1997), o carotenóide astaxantina (3,3'-dihydroxy-carotene-4,4'-dione) é um dos principais pigmentos responsáveis pela cor da carne e gônada de muitos animais marinhos. Nos organismos marinhos, os carotenóides são exigidos para o desenvolvimento e maturação gonádica e para a fertilização, conferindo aumento na taxa de fecundação, além de desempenharem importante função no desenvolvimento embrionário e na eclosão (Petit et al., 1991; Olson, 1993; Menasveta et al., 1994; Mantiri et al., 1995; Farias-Molina, 2001).

Os mamíferos, crustáceos, peixes e moluscos não estão bioquimicamente capacitados para a biossíntese de carotenóides, mas podem acumular e/ou converter precursores que obtêm da dieta, como por exemplo, a conversão de β -caroteno em vitamina A (Johnson e Schroeder, 1995). Para os moluscos bivalves, o fitoplâncton é a principal fonte de carotenóides ingeridos na dieta (Farias-Molina, 2001). Portanto, a qualidade e quantidade de alimentos fornecidos aos reprodutores durante sua maturação em laboratório, são fundamentais para o sucesso da reprodução.

Em pectinídeos, foi demonstrada a presença e a importância dos carotenóides para as etapas de maturação gonádica. Miki et al. (1982) identificou 5 tipos de carotenóides em quatro espécies de pectinídeos: Astaxantina, Pectenolone, Pectenoxantina, Pectenol e Tetrol, em concentrações totais de carotenóide de 1,56 a 7,15 mg por 100 gramas de gônada. Escarria et al. (1989) observaram em gônadas de *Argopecten ventricosus*, a presença de Astaxantina e Luteína em concentração de 2×10^{-5} mg por grama de gônada.

A microalga *Haematococcus pluvialis* é uma alga verde da ordem Volvocales, família Haematococcaceae, de ocorrência mundial em condições favoráveis para o seu crescimento (Passos, 2006). Esta microalga tem a capacidade de sintetizar e acumular mais de 1% do seu peso seco em astaxantina no citoplasma, quando na forma encistada (Cordero et al., 1996). Sua produção comercial compreende duas etapas: a primeira de obtenção massiva de biomassa (forma vegetativa)

e a segunda de carotenogênese (forma encistada). O processo de carotenogênese é iniciado quando a microalga, em sua forma vegetativa, é exposta a condições de estresse como a variação de nitrogênio e fósforo (Boussiba and Vonshak 1991; Boussiba et al., 1999) e de salinidade (Tjahjono et al., 1994).

Portanto, uma vez que a qualidade e quantidade de alimentos fornecidos aos reprodutores durante sua maturação em laboratório são fundamentais para o sucesso da reprodução, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da utilização de dietas enriquecidas com carotenóides, na maturação de reprodutores de *N. nodosus*, em laboratório, para produção de larvas de sementes.

2. Materiais e Métodos

Os experimentos de maturação de reprodutores e respectivas larviculturas e assentamento foram realizados no Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LMM/UFSC), localizado na Barra da Lagoa/Florianópolis. As análises de astaxantina, com HPLC, foram realizadas no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina (LMBV/UFSC) e as análises histológicas no Núcleo de Estudos em Patologia em Aqüicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (NEPA/UFSC).

2.1. Delineamento experimental

Durante o estudo foi avaliado o efeito da maturação de reprodutores com dietas com diferentes concentrações de astaxantina sobre a produção de gametas, larvas e sementes. Para isto foram realizados 3 experimentos (I, II e III). As fontes de astaxantina foram: (i) a microalga *Haematococcus pluvialis* seca, produzida comercialmente por Aquafauna/BIO-MARINE_{INC} com o nome de Algamac AST; (ii) e a microalga *H. pluvialis* viva, produzida pelo LMM.

Nos experimentos I e II (Tabela 1) foram testados 5 tratamentos em triplicata distribuídos ao acaso, totalizando 15 unidades experimentais. No experimento III (Tabela 2) foram testados 3 tratamentos em triplicata distribuídos ao acaso, totalizando 9 unidades experimentais.

2.2. Dietas

Nos tratamentos testados no experimento I e II, foi padronizada uma dieta composta pela mistura de microalgas das espécies *Isochrysis sp.* variedade *Tahit* (CCMP 1324, T-Iso), *Chaetoceros muelleri* (CCMP 1316, Cm) e *Skeletonema sp.* (CCMP 795, Sk), nas proporções 50:25:25 (dieta utilizada pelo Laboratório de Moluscos Marinhos, basal), respectivamente. Esta dieta padrão foi utilizada também como tratamento controle (Algamac0%). No experimento III, o controle foi alimentado somente com *Chaetoceros muelleri* (Cm). Estas microalgas foram cultivadas no meio Guillard F/2 modificado no LMM, em água filtrada e esterilizada, aeração contínua filtrada, temperatura de 22 °C e um regime de luz de 24 h. As microalgas foram utilizadas na fase exponencial de crescimento.

A cepa de *Haematococcus pluvialis* foi obtida da Coleção de Microalgas Elizabeth Aidar da Universidade Federal Fluminense (CMEA/UFF). O cultivo de *Haematococcus pluvialis* foi realizado em duas fases. Na primeira, sob condições adequadas foi estimulada a produção de elevadas

densidades de células flageladas verdes. Os cultivos foram realizados em volumes de 2 L com meio de cultura WC (Guillard and Lorenzen, 1972) e intensidade de luz média de $120 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. No quarto dia de cultivo iniciou a fase dois (2), caracterizada pelo acúmulo de astaxantina, onde as culturas foram submetidas a estresse químico (ausência do nitrato de sódio no meio de cultura utilizado na fase um). Os cultivos da fase um (1) foram inoculados em 10 L de meio de cultura e cultivados por 10 dias antes de serem utilizados na dieta testada.

A concentração diária de alimento fornecida foi de $7,5 \times 10^4 \text{ célula.mL}^{-1}$ ($5,50 \text{ mg.L}^{-1}$) para todos os tratamentos. Nos experimentos I e II, os tratamentos foram compostos por diferentes porcentagens da mistura de microalgas e Algamac AST (Tabela 1). No experimento III, os tratamentos testados foram realizados com diferentes porcentagens da microalga *Chaetoceros muelleri*, Algamac AST e *Haematococcus pluvialis* viva (Tabela 2).

A composição total de proteínas, carboidratos e lipídeos e a quantidade de astaxantina nas das microalgas utilizadas está apresentada na Tabela 3. A composição nutricional e a quantidade de astaxantina das dietas testadas nos experimentos I e II podem ser visualizadas na Tabela 1 e no experimento III na Tabela 2.

A determinação de proteína total foi realizada através do método colorimétrico, onde, 5 mg de amostra liofilizada foram submetidas à hidrólise com 2 mL de NaOH 1N, exposição a ultrassom e centrifugação para obtenção do extrato alcalino. A este extrato foram adicionados os reagentes para reação de cor conforme descrito por Lowry et al. (1951). A determinação de carboidrato foi realizada por método colorimétrico onde, a 5 mg de amostra liofilizada foram submetidas à hidrólise com 1 mL de H_2SO_4 a 80% por 20 h, centrifugadas, diluídas e adicionado os reagentes para reação de cor conforme descrito por Dubois et al. (1956). O lipídeo total foi determinado por método gravimétrico descrito por Folch et al. (1957).

2.3. Maturação de reprodutores

Os reprodutores (70-75 mm de altura e 18 meses de idade) cultivados em espinhel, a 2 m de profundidade, foram coletados na área de cultivo experimental da EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural), localizada em Santa Catarina (SC), região sul do Brasil, na praia do Canto Grande, Bombinhas ($27^\circ 12' 5,39''\text{S}$ e $48^\circ 30' 47,7''\text{N}$). Os animais foram imediatamente transportados em caixas de isopor, com água do mar a 23°C , para o laboratório. No laboratório, os animais permaneceram em jejum por 12 horas (*over night*), sendo aclimatados a temperatura de 17°C para experimento I e a 20°C para os experimentos II e III.

Para os três experimentos de maturação, foram utilizados tanques de 15 L em triplicata para cada tratamento, com aeração constante. Foi utilizado fluxo contínuo aberto de entrada de água do mar a uma vazão de 333 mL.min^{-1} por animal e para alimento (microalgas diluídas na água) de 33 mL.min^{-1} por animal. Os tanques de maturação não foram limpos durante o experimento.

Os tanques de alimentação foram limpos diariamente e renovado o alimento para cada tratamento. Após este manejo o fluxo de água e de alimento em cada tanque de maturação era regulado conforme os valores descritos acima e mantidos com aeração constante.

O Alagamac AST foi hidratado em um volume fixo de água salgada circulante por 12 horas e protegido da luz a uma temperatura de 19 °C, antes de ser utilizado nos tratamentos testados.

Experimento I

Após a aclimação, foram retirados os organismos incrustantes e os animais foram induzidos à desova por diferença de temperatura, com água do mar tratada com UV, aclimatados novamente, para então serem acondicionados nos tanques de maturação, em triplicata, para início do experimento.

Este experimento teve duração de 30 dias com duas induções à desova, uma com 15 dias de maturação (T_{15}) e a segunda com 30 dias de maturação (T_{30}). A temperatura da água para os primeiros 15 dias de maturação foi mantida em $16,1 \pm 0,5$ °C e para os 15 dias restantes em $17,6 \pm 0,8$ °C.

Em cada tanque foram acondicionados: 1 animal para análise de astaxantina e histologia e 2 animais para desova, sendo então 3 animais por tanque para os primeiros 15 dias de maturação (T_{15}) e para os 15 dias restantes (T_{30}), totalizando 6 animais por tanque para os 30 dias de maturação.

Experimento II

Neste experimento os animais não foram limpos e nem induzidos à desova ao chegarem no laboratório, sendo colocados diretamente para a aclimação. Após a aclimação, os animais foram acondicionados nos tanques de maturação, em triplicata e distribuídos ao acaso, para o início do experimento.

Este experimento teve duração de 15 dias com duas induções à desova, uma com 7 dias de maturação (T_7) e a segunda com 15 dias de maturação (T_{15}). A temperatura da água foi mantida em $19,2 \pm 0,6$ °C.

Em cada tanque foram acondicionados: 1 animal para análise de astaxantina e histologia e 2 animais para desova, sendo então 3 animais por tanque para os primeiros 7 dias de maturação (T_7) e 3 para os 7 dias restantes (T_{15}), totalizando 6 animais por tanque para os 15 dias de maturação.

Experimento III

Após a aclimação, foram retirados os organismos incrustantes e os animais foram induzidos à desova por choque de temperatura, com água do mar tratada com UV, aclimatados para então, serem acondicionados nos tanques de maturação, em triplicata, para o início do experimento.

Este experimento teve duração de 30 dias com apenas uma desova, após os 30 dias de maturação (T_{30}). A temperatura para os 30 dias de maturação foi de $20,0 \pm 0,4$ °C.

Em cada tanque foram acondicionados: 1 animal para análise de astaxantina e histologia e 2 animais para desova, totalizando 3 animais por tanque para os 30 dias de maturação.

2.4. Eliminação de gametas

A técnica de indução à desova e fecundação foi a técnica utilizada pelo LMM, de acordo com Rupp (1994) e Rupp et al. (2004) e adaptada pelo LMM, com estresse por retirada de organismos

incrustantes das valvas, exposição à água com UV e variação da temperatura da água nos tanques de indução de 20 °C para 24 °C. O tempo de indução à desova foi fixado em uma hora.

Assim que os animais iniciaram a liberação dos gametas, estes foram separados em baldes de 2 L, para desova. Cada tratamento foi subdividido em A e B para a fecundação cruzada dos gametas dentro de cada tratamento, a qual foi realizada ao longo da desova. O gameta feminino era quantificado, fecundado e mantido em tanques separados por tratamento para o desenvolvimento larval.

2.5. Obtenção de larva “D” e Larvicultura

O cultivo larval foi desenvolvido conforme técnicas utilizadas pelo LMM-UFSC, que consistem basicamente na transferência dos embriões para os tanques de larvicultura; trocas de águas a cada 48 horas; peneiramento com diferentes tamises para repicagem e eliminação larvas mortas; alimentação diária com microalgas e temperatura da água controlada, variando de 23 a 24 °C, não foi utilizado antibiótico.

Para cada tratamento foi realizada a sua respectiva larvicultura individualmente em triplicata. Para os experimentos I e II foram utilizados tanques de 10 L e, para o experimento III, tanques de 14 L. A densidade inicial nos tanques de larvicultura foi de 100 oócitos.mL⁻¹ no primeiro dia para os 3 experimentos e no segundo repicada para 10 larvas.mL⁻¹ (larvas “D”) para os experimentos I e II. Para o experimento III foi utilizado 5 larvas.mL⁻¹ (larvas “D”). Os cultivos foram mantidos com aeração constante e fraca.

A espécie de microalga oferecida no segundo dia de larvicultura foi a *Isochrysis sp.* variedade *Tahit* (T-Iso) na concentração de 0,5 x10⁴ célula.mL⁻¹. A partir do terceiro dia: T-Iso, *Pavlova sp* (*Pav*) e *Chaetoceros calcitrans* (*Cc*), nas proporções 35:35:30, respectivamente, a uma concentração de 1x10⁴ célula.mL⁻¹. A partir do quinto dia: T-Iso, *Pav* e *Cc*, nas proporções 30:20:50, respectivamente, a uma concentração de 2x10⁴ célula.mL⁻¹. Estas microalgas foram cultivadas no meio Guillard F/2 modificado no LMM, em água filtrada e esterilizada, aeração contínua filtrada, temperatura de 22 °C e um regime de luz de 24 h. As microalgas foram utilizadas na fase exponencial de crescimento.

A avaliação do rendimento das larviculturas foi realizada com 13 dias, para os três experimentos, quando as larvas encontraram-se em estágio de larva pedivéliger.

2.6. Assentamento

Somente para o experimento III foi realizado o assentamento das larvas, desenvolvido conforme técnicas utilizadas pelo Laboratório LMM. As larvas utilizadas para o assentamento foram selecionadas por malha 125 e 145 micras (com pé ativo e presença de mancha ocular) no 13º dia de larvicultura. Para o assentamento foram utilizados coletores de malha *netlon* com folhas de pinus (*Pinus sp*) (Zanette 2007) em seu interior. Os coletores foram previamente aclimatados, por 13 dias com o mesmo tratamento dado as larvas durante a larvicultura, adicionando microalgas aos mesmos, conforme metodologia descrita por Zanette (2007). As larvas selecionadas foram colocadas nos tanques de assentamento já contendo os coletores previamente aclimatados, na densidade de 0,71 larvas.mL⁻¹ e mantido o volume de 14 L de água do mar com aeração constante; trocas de águas a

cada 48 horas; alimentação diária com microalgas e temperatura da água controlada, variando de 23 a 24 °C.

As espécies de microalgas oferecidas foram: *Isochrysis sp.* variedade *Tahit* (T-Iso), *Pavlova sp.* (Pav) e *Chaetoceros calcitrans* (Cc), nas proporções 30:50:20, respectivamente, a uma concentração inicial de 3×10^4 célula.mL⁻¹ uma vez por dia.

A avaliação do rendimento do assentamento foi realizada com 15 dias (Sühnel, 2002) de assentamento.

2.7. Avaliação do efeito das dietas

Para verificar o efeito da dieta foram realizadas análises da concentração de astaxantina e identificado o estágio sexual dos reprodutores, ambos na porção feminina das gônadas, no início da maturação (T₀) para todos os experimentos (I, II e III), com quinze dias (T₁₅) e trinta dias (T₃₀) de maturação para o experimento I, com sete dias (T₇) e com quinze dias (T₁₅) de maturação para o experimento II e com trinta dias de maturação (T₃₀) para o experimento III.

Também foi avaliada a sobrevivência de larvas “D” (com 24 horas de larvicultura) e pedivéliger (com 13 dias de larvicultura) para os três experimentos e a sobrevivência de pré-sementes para o experimento III (contagens realizadas em triplicata).

Análise de astaxantina

A extração de carotenóides foi realizada conforme metodologia descrita por Sühnel et al. (*in press*), colocando a amostra liofilizada em um recipiente de cerâmica, adicionando nitrogênio líquido, macerando-as e retirando uma alíquota de 50 mg. A esta alíquota de 50 mg foram adicionados 5 mL da solução extratora de acetona (Ac=O, Nuclear, P.A.) e *n*-hexano (Hex, TediaBrazil, P.A.) na proporção 1:3, respectivamente, permanecendo em agitação (agitador magnético Fisatom), protegidas da luz, em temperatura ambiente (23 °C). Após a extração, as amostras foram filtradas em papel filtro, tendo seu volume final ajustado para 3 mL, com posterior acondicionamento em frascos âmbar (10 mL), contendo atmosfera de N₂. As amostras permaneceram armazenadas em freezer (-18 °C) para posterior determinação do teor de astaxantina.

A astaxantina foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A metodologia utilizada para análise foi conforme descrito por Sühnel et al. (*in press*), onde alíquotas dos extratos carotenóidicos das amostras (300 µL) foram filtradas (fitros de 0,22 µ), seguido da injeção de 10 µL de cada amostra em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna C₁₈ de fase reversa Vydac (BioRad, 25 cm x 4,6 mm Ø) e detector UV-visível, operando em leitura de 470 nm. Como fase móvel, utilizou-se acetoneitrila: metanol (90:10, TediaBrazil, grau HPLC), em fluxo de 0,8 mL.min⁻¹.

A identificação da astaxantina foi realizada com base no tempo de retenção obtido a partir da análise de amostra padrão (0,461 mg.10 mL⁻¹ Hex, Sigma, USA), sob as mesmas condições experimentais e calculando-se a integral da área dos picos correspondentes, através de curva padrão externa ($y = 7.044,96x$, $r^2 = 0,994$).

Análise de Histologia

A análise histológica foi realizada na porção feminina da gônada dos reprodutores maturados em cada tratamento nos três experimentos.

Os cortes foram fixados em solução de Davidson e armazenados em álcool 70%. Após diferentes banhos em álcool etílico (de 70 a 100%), xilol e parafina, foram então montados em blocos de parafina.

Os blocos contendo as amostras de gônada foram cortados a 5 μ . As lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris e Eosina.

Para a identificação dos estádios de maturação foram realizadas duas avaliações por dois identificadores, aleatoriamente e sem identificação da lâmina. A descrição dos estágios foi realizada individualmente, pela análise microscópica com aumento de 200 e 400 vezes.

Foi padronizada uma pontuação para cada estágio sexual de 1 a 6 (Capítulo IV).

A determinação do estágio sexual segue padrão definido no Capítulo IV, os quais definem quatro estágios sexuais (1-gametogênese; 2A-pré-desova inicial; 2B-pré-desova avançada; 3A-desova inicial; 3B-desova avançada; e 4-reposo) de acordo com as características histológicas da gônada da vieira *N. nodosus*.

2.8. Análise estatística

Para comparação entre os tratamentos, os parâmetros avaliados, acúmulo de astaxantina, estágio sexual, quantidade total de gamentas eliminados por cada tratamento, sobrevivência de larvas "D" e pedivéliger e sobrevivência de pré-sementes foi realizada a análise descritiva, avaliação de normalidade dos erros e de homogeneidade de variância (Bartlett). Análise de variância múltipla (ANOVA) e de separação de médias com Teste Tukey para a comparação entre as médias (Zar, 1974). Utilizando programa *Statistica* versão 5. Para os resultados com porcentagem (estágios sexuais, sobrevivência de larvas "D", pedivéliger e pré-sementes) o valor absoluto foi transformado em Arcoseno para então ser aplicado o teste estatístico.

3. Resultados

3.1. Astaxantina na porção feminina da gônada de *Nodipecten nodosus*

Para os três experimentos realizados foi observado que não houve mortalidade dos reprodutores ao término de cada tempo de maturação testado.

Na Figura 1 estão apresentados os resultados da análise de astaxantina obtidos no experimento I, podemos observar que houve acúmulo significativo de astaxantina durante a maturação uma vez que T_0 foi menor que T_{15} e T_{30} para todos os tratamentos testados ($p < 0,05$). Na avaliação realizada com quinze dias de maturação (T_{15}) o tratamento Algamac50% apresentou a maior concentração de astaxantina ($p < 0,05$) na porção feminina da gônada ($25,34 \pm 0,39 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Para os reprodutores com trinta dias de maturação (T_{30}) os tratamentos Algamac50% ($26,63 \pm 0,36 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Algamac75% ($26,74 \pm 4,43 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e Algamac100% ($25,33 \pm 1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) não apresentaram diferença entre si, mas sim diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos Algamac 0% e Algamac25% na concentração de astaxantina na porção feminina da gônada.

Avaliando o tempo de maturação no experimento I (Tabela 6), observou-se que os tratamentos Algamac50%, Algamac75% e Algamac100% apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) no acúmulo de astaxantina entre T_{15} e T_{30} , havendo em T_{30} um maior acúmulo de astaxantina na porção feminina da gônada.

No experimento II (Figura 2) houve acúmulo de astaxantina durante a maturação, sendo que T_0 apresentou menor concentração de astaxantina que em T_7 e T_{15} para todos os tratamentos testados ($p < 0,05$). Na avaliação realizada com sete dias de maturação (T_7) o tratamento Algamac50% apresentou a maior concentração ($24,79 \pm 5,07 \mu\text{g.mL}^{-1}$) de astaxantina ($p < 0,05$). Para os reprodutores com quinze dias de maturação (T_{15}) os tratamentos Algamac50% ($25,45 \pm 1,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$), Algamac75% ($24,70 \pm 3,66 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e Algamac100% ($22,00 \pm 2,61 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentaram os maiores concentrações de astaxantina na porção feminina da gônada.

Avaliando o tempo de maturação no experimento II (Tabela 6), observou-se que os tratamentos Algamac25% e Algamac75% apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) no acúmulo de astaxantina entre T_7 e T_{15} , havendo em T_{15} um maior acúmulo de astaxantina na porção feminina da gônada.

Na análise de regressão realizada com os dados de acúmulo de astaxantina na porção feminina da gônada para as diferentes concentrações de astaxantina na dieta, experimentos I e II, observa-se que no experimento I somente em T_{30} a análise de regressão foi significativa ($p < 0,05$) com $R^2 = 0,71071$ e beta positivo, $\beta = 0,85307$. No experimento II a análise de regressão foi significativa ($p < 0,05$) para os dois tempos testados, sendo em T_7 o $R^2 = 0,37262$ e o beta positivo, $\beta = 0,63994$ e em T_{15} o $R^2 = 0,63108$ com um beta positivo de $\beta = 0,80795$.

Para o experimento III a quantidade de astaxantina na porção feminina da gônada dos reprodutores antes de iniciar a maturação (T_0) ($6,85 \pm 2,57 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentou-se diferente significativamente ($p < 0,05$) com os tratamentos Cm:Algamac50% ($13,09 \pm 2,72 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e Cm:H.pluvialis50% ($19,72 \pm 4,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Após a maturação de trinta dias (T_{30}) o tratamento Cm:H.pluvialis50%, apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) dos demais tratamentos testados (Figura 3) na concentração de astaxantina na porção feminina da gônada.

3.2. Estágios sexuais

Tanto para o experimento I quanto para o experimento II não houve diferença significativa entre os estágios sexuais dos reprodutores nos tempos testados em cada experimento (Figura 4). No experimento I, os reprodutores em T_0 apresentaram estágio de desova inicial e avançada (estágios 3A e 3B) e após quinze (T_{15}) e trinta (T_{30}) dias de maturação observa-se maturação da gônada, os quais apresentaram estágio sexual de pré-desova inicial e avançada (estágios 2A e 2B). Para o experimento II os animais em T_0 apresentaram estágio de pré-desova 2A, assim como após sete (T_7) e quinze (T_{15}) dias de maturação em estágios 2A e 2B.

Já para o experimento III (Figura 5), o estágio sexual dos reprodutores no início do experimento (T_0), gametogênese (estágio 1), apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) para os tratamentos Cm:Algamac50% e Cm:H.pluvialis50%. O tratamento Cm100% ao final do experimento

(T₃₀) continuava no estágio de gametogênese (estágio 1) e os outros tratamentos Cm:Algamac50% e Cm:H.pluvialis50% apresentaram estágio de pré-desova (estágio 2A).

3.3. Eliminação de gametas

Para o experimento I (Tabela 4), após a maturação de quinze dias (T₁₅), os oócitos eliminados por todos os tratamentos não fecundaram. Já para a maturação de trinta dias nos tratamentos Algamac50% e Algamac75% houve fecundação dos gametas, sendo o tratamento Algamac75% diferente significativamente ($p < 0,05$), com um total de $13.566.667 \pm 367,77$ oócitos eliminados por um animal, do tratamento Algamac50% com um total de $5.833.333 \pm 91,00$ oócitos eliminados por 2 animais.

Para o experimento II (Tabela 4), na eliminação de gametas após sete dias (T₇) de maturação o tratamento Algamac50% apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) dos demais tratamentos, com um total de $10.800.000 \pm 127,05$ oócitos eliminados por 4 animais. Já para a eliminação com quinze dias (T₁₅) de maturação, o tratamento Algamac100% apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) dos demais tratamentos, com um total de $10.133.333 \pm 102,13$ oócitos eliminados por 3 animais.

Para o experimento III (Tabela 5), o tratamento Cm100% apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) dos demais tratamentos, com um total de $29.162.500 \pm 96,44$ oócitos eliminados por 6 animais.

3.4. Rendimento larval

Neste item, Tabela 4, experimento I (T₃₀), o tratamento Algamac75% diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais. No Algamac75% foi obtido um percentual de larvas "D" de $22, 51 \pm 2,94$ %, contra $7,39 \pm 3,34$ % do Algamac50%. Nos demais tratamentos o resultado foi zero. A diferença estatística continuou a favor do Algamac75% ($p < 0,05$) com relação ao rendimento da larvicultura em larvas aptas para o assentamento, aos 13 dias de cultivo. Foram obtidas no Algamac75% $5,47 \pm 1,45$ % de larvas aptas para o assentamento, contra $1,11 \pm 0,50$ % do Algamac50%.

No experimento II (Tabela 4), a partir de oócitos da desova com sete dias de maturação (T₇), os tratamentos Algamac25% e Algamac50% apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais. No Algamac25% foi obtido um percentual de $34,07 \pm 3,51$ % de larvas "D" e no Algamac50% $35,72 \pm 2,04$ %. Aos 13 dias de larvicultura, o tratamento Algamac50% apresentou o melhor resultado ($p < 0,05$), com $35,44 \pm 2,04$ % de rendimento de larvas prontas para o assentamento.

No experimento II, T₁₅ (Tabela 4), o tratamento Algamac100% apresentou o melhor resultado ($p < 0,05$), com uma porcentagem de obtenção de larva "D" de $36,68 \pm 1,81$ %. Esta diferença ($p < 0,05$) persistiu aos 13 dias de larvicultura, com $21,55 \pm 2,27$ % de rendimento em larvas aptas para o assentamento.

No experimento III, T₃₀ (Tabela 5), o tratamento Cm:H.pluvialis50% foi o que apresentou mais larvas "D" ($82,54 \pm 2,62$ %) diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos demais. A diferença ($p < 0,05$) continuou sendo mantida aos 13 dias de larvicultura, com $43,01 \pm 7,71$ % de rendimento em larvas olhadas.

3.5. Obtenção de pré-sementes

Neste item, no experimento III (Tabela 5), os resultados dos tratamentos não diferiram entre si. A obtenção de pré-sementes aos 15 dias de assentamento, variou de $16,03 \pm 4,84 \%$ a $18,59 \pm 3,13 \%$ entre os tratamentos, em relação ao número de larvas olhadas inicialmente estocadas.

4. Discussão

Tem sido observado para espécies marinhas que a composição de dietas tem um importante efeito sobre a reprodução e a qualidade dos gametas (Robinson, 1992; Samain et al., 1992).

Segundo Utting and Millican (1997), as reservas de alimento antes de entrar no processo de vitelogênese são fundamentais. Estes autores também relatam que um melhor estado nutricional aumenta a fecundidade e a qualidade dos ovos produzidos. De mesma forma, Uriarte et al. (2001) demonstrou que existe um efeito do estado nutricional dos reprodutores e a qualidade das larvas resultantes.

No presente estudo, os melhores rendimentos de larva "D" e pedivéligar foram obtidos para os reprodutores com maiores concentração de astaxantina na porção feminina da gônada, nos experimentos I e II (Algamac50%, Algamac75% e Algamac100%) e no experimento III (Cm:H.pluvialis50%) na porção feminina da gônada. Estas dietas também apresentaram maiores porcentagens de carboidratos. Contudo, segundo Navarro et al. (2000) e Navarro (2001), os moluscos bivalves apresentam dificuldade em absorver os carboidratos. O que sugere que o carotenóide astaxantina proporcionou este efeito positivo no rendimento das larvas.

Segundo os autores Farias e Uriarte (2001) e Farias et al. (1997) dietas com maiores quantidades proteicas proporcionam um aumento da fecundidade para *Argopecten purpuratus*. No presente estudo, observou-se que os tratamentos com maior porcentagem de proteína total nas dietas não foram os que apresentaram melhores resultados de aumento da fecundidade.

De mesma forma, os autores Caers et al. (1999), Martinez et al. (2000) Palma-Fleming et al. (2002), para *A. purpuratus*, indicam que maior reserva de lipídeos nos oócitos proporciona um efeito positivo na sobrevivência larval. Contudo, no presente estudo observou-se que os melhores rendimentos de larva foram obtidos para as dietas Algamac50%, Algamac75% e Algamac100%, as quais apresentam menor porcentagem de lipídeos totais na dieta em relação aos tratamentos Algamac0% e Algamac 25%, indicando que o carotenóide astaxantina proporcionou um efeito positivo no rendimento larval.

A concentração de astaxantina nas diferentes dietas testadas nos experimentos I e II foi menor no tratamento Algamac0%, aumentando a concentração de astaxantina na dieta, conforme o aumento da quantidade de Algamac AST até o tratamento Alagamac100%. Já para o experimento III, a maior quantidade de astaxantida na dieta foi no tratamento Cm:Algamac50% e a menor no tratamento Cm100%.

A quantidade baixa de astaxantina obtida no tratamento Cm:H.pluvialis50% está relacionada à metodologia de estresse utilizada para a produção de carotenóides na microalga *Haematococcus pluvialis*. O método utilizado por este experimento de estresse com nitrogênio no meio de cultivo foi

definido em função de diferentes pré-testes realizados, dos quais a metodologia citada neste trabalho de produção da microalga *H. pluvialis*, foi a que se obteve melhor resultado de acúmulo de astaxantina na microalga encistada.

Nos resultados de astaxantina na porção feminina da gônada observou-se o acúmulo de astaxantina nos reprodutores maturados tanto com as dietas com Algamac AST, quanto com a dieta basal em relação aos animais em T_0 . As microalgas utilizadas na dieta basal, controle, apesar de apresentar pequenas quantidades de astaxantina, estas quantidades já foram suficientes para proporcionar um acúmulo de astaxantina na porção feminina da gônada dos reprodutores.

Para os experimentos I e II o maior acúmulo de astaxantina na porção feminina da gônada foi observado para o tratamento Algamac50% apesar de não ser o tratamento com maior quantidade de astaxantina. Este fato também foi observado no experimento III, onde apesar do tratamento Cm:Algamac 50% apresentar maior quantidade de astaxantina, houve um maior acúmulo de astaxantina na porção feminina da gônada dos reprodutores no tratamento Cm:H.pluvialis50%.

Avaliando o tempo de maturação, no experimento I, no qual os animais foram induzidos à eliminação de gametas antes do início da maturação, o maior acúmulo de astaxantina na gônada foi obtido com trinta dias de maturação (T_{30}) nos tratamentos com Algamac50%, Algamac75% e Algamac100%. Para o experimento II, onde os animais não foram induzidos à eliminação de gametas antes de iniciar o experimento, sete dias de maturação (T_7) foram suficientes para proporcionar um maior acúmulo de astaxantina nos tratamentos Algamac50% e Algamac100%.

A vieira, por ser um molusco filtrador, apresenta seletividade na ingestão de partículas. Ward et al. (1992) desmossa que *Placopecten magellanicus* reconhece sinais químicos das partículas orgânicas, os quais estimulam o animal a filtrar estas partículas capturando e ingerindo-as. Esta seletividade na ingestão de partículas pode explicar a maior preferência por microalgas vivas. Onde no presente estudo observou-se o maior acúmulo de astaxantina com a dieta com *Haematococcus pluvialis*. Contudo, cabe destacar que a utilização de microalgas secas mostrou ser viável para *Nodipecten nodosus*. No qual, após trinta dias de maturação, alimentados os reprodutores com 100% da dieta Algamac AST (tratamento Algamac100%), não foi observada mortalidade dos mesmos e foi observado o acúmulo de astaxantina indicando que os animais ingeriram a microalga seca.

Os autores Langdon and Önal (1999) testando dietas seca (spray-dried) na alimentação de *Mytilus galloprovincialis*, obtiveram melhores resultados de crescimento dos animais utilizando uma combinação de três microalgas secas, *Schizochytrium sp.*, *Spirulina platensis* e *Haematococcus pluvialis*, comparado a uma dieta com a microalga viva *Isochrysis galbana* variedade *Tahit* (T-Iso).

Para os resultados de estágio sexual, no experimento I, os reprodutores em T_0 apresentaram estágio de desova inicial (3A) e avançada (3B), isto porque estes animais foram induzidos à desova antes de iniciar o experimento. Após a maturação, para ambas as avaliações, T_{15} e T_{30} foi observada uma maturação das gônadas. Contudo, esta maturação manteve-se, predominantemente, no estágio de pré-desova inicial (2A). Este estágio inicial pode estar relacionado à baixa temperatura da água nos tanques durante o experimento, a qual foi de $16,1 \pm 0,5$ °C e para os 15 dias restantes em $17,6 \pm 0,8$ °C.

Em ambiente natural, o autor Garcia (2005) observou uma correlação ente a temperatura e o desenvolvimento gonádico de *N. nodosus*. O autor Rupp (1994) obteve bons resultados de maturação e crescimento gonádico para *N. nodosus* com temperaturas de 24,0 a 27,0 °C. Da mesma forma, Velasco e Barros (2007) utilizaram 25 °C para maturação desta mesma espécie em laboratório.

No experimento II, os reprodutores não foram induzidos a desova e seu estágio sexual em T_0 foi de pré-desova inicial (2A). Para ambas as avaliações, T_7 e T_{15} , observou-se que os reprodutores, além de apresentar estágio sexual de pré-desova inicial (2A) maturaram apresentando também, estágio sexual de pré-desova avançada (2B). A temperatura de maturação ($19,2 \pm 0,6$ °C) neste experimento foi elevada em 1,6 °C em relação ao experimento I, proporcionando assim, uma melhor maturação dos reprodutores.

Já para o experimento III, onde os animais foram induzidos à desova antes de iniciar o experimento, observou-se em T_0 que os reprodutores apresentaram estágio sexual de gametogênese (1), os animais já vieram do campo neste estágio. Após a maturação em laboratório de 30 dias, somente os reprodutores tratados com dieta rica em astaxantina maturaram (estágio sexual de pré-desova inicial 2A). Isto indica que a dieta com apenas a microalga diatomácea *Chaetoceros muelleri* (Cm100%) não foi suficiente para proporcionar a maturação dos reprodutores.

Para pectinídeos de ocorrência na América Latina, Farias-Molina (2001) cita a utilização de dois tipos de microalgas para a maturação em laboratório, principalmente a microalga flagelada *Isochrysis galbana* (T-Iso) e a diatomácea do gênero *Chaetoceros*. Alguns autores, como Caers et al. (1999) e Martinez et al. (1992) para *Argopecten purpuratus* e Villavicencio (1997) para *Nodipecten subnodosus* utilizaram mais de 3 espécies de microalgas na maturação de reprodutores.

Quando avaliado o efeito das dietas na eliminação de gametas, observa-se que o experimento I, após a maturação de 15 dias, os oócitos eliminados não fecundaram após adição de espermatozóides, isto foi identificado por não apresentarem divisão celular após o início da fecundação. Os animais neste experimento apresentam estágio sexual de pré-desova inicial e avançada. Contudo, a não divisão celular dos oócitos indica que os gametas, mesmo maduros não eram viáveis. Isto pode estar relacionada à temperatura de maturação destes reprodutores, conforme descrito acima.

Já após 30 dias de maturação (T_{30}) neste experimento, subindo 1,5 °C a temperatura de maturação dos reprodutores, os tratamentos Algamac50% e Algamac75% eliminaram gametas que fecundaram e geraram larvas viáveis.

Os valores obtidos de oócitos por desova para este estudo são similares aos obtidos por Velasco et al. (2007), para *N. nodosus*, utilizando a mudança de temperaturas como estímulos para liberação de gametas. Contudo, observa no experimento II, tratamento o Algamac0% (T_{15}) e para o experimento III, tratamento Cm100% (T_{30}), que apesar dos reprodutores eliminarem uma grande quantidade de gametas, os rendimentos de larvas pedivéliger não foram os melhores, mostrando que não há uma relação entre a quantidade de gametas eliminados e o rendimento de larvas.

Quando avaliado o rendimento da larvicultura para o experimento II, tanto para larva "D", quanto para larvas pedivéliger com 13 dias, o tratamento Algamac 100% apresentou melhores resultados. Cabe destacar que o tratamento Algamac25% também apresentou bons resultados de

larva “D”, contudo após 13 dias de larvicultura o rendimento caiu e ficou menor que os tratamentos com maiores quantidades de astaxantina na dieta.

Para a recuperação de pré-sementes no experimento III, observou-se que o assentamento não variou em função das dietas testadas na maturação dos reprodutores. Estes resultados são similares com os obtidos por Uriarte et al. (2004), os quais citam que a dieta dada a reprodutores afeta somente a prole durante a fase larval e que não afeta a sobrevivência das pré-sementes.

Os resultados do presente estudo indicam que a utilização de dietas ricas em astaxantina na maturação da vieira *N. nodosus*, favorecem o desenvolvimento gonádico da porção feminina dos reprodutores. Bem como, proporcionam um efeito positivo no rendimento de larvas “D” e pedivéliger.

5. Conclusão

Este trabalho mostrou ser viável a utilização da microalga seca *Haematococcus pluvialis* (dieta com 100% desta microalga seca) na alimentação de reprodutores da vieira *N. nodosus* mantidos em laboratório por 30 dias.

Nos resultados de acúmulo de astaxantina, nos experimentos I e II os tratamentos Algamac50%, Algamac75% e Algamac100% e no experimento III tratamento Cm:H.pluvialis50%, proporcionaram o maior acúmulo de astaxantina na porção feminina da gônada de reprodutores da vieira *N. nodosus*.

Avaliando o tempo de maturação, no experimento I, foram necessários trinta dias para obter um maior acúmulo, nos tratamentos Algamac50%, Algamac75% e Algamac100%, e no experimento II, sete dias de maturação nos tratamentos Algamac50% e Algamac100%.

No experimento III as dietas ricas em astaxantina favoreceram a maturação de *N. nodosus*.

A maturação de reprodutores de *N. nodosus* com a microalga *H. pluvialis* seca (Algamac AST) nos experimentos I e II favoreceu o rendimento larval. No experimento III, a microalga *H. pluvialis* viva, favoreceu um maior rendimento na larvicultura.

As dietas testadas durante a maturação, no experimento III não afetaram a recuperação de pré-sementes de *N. nodosus*.

6. Agradecimentos

Agradecemos ao FINEP, FAPESC e ao CNPq pelo suporte financeiro neste projeto e a CAPES/UFSC pela bolsa de Doutorado.

7. Referências

- Boussiba, S. and Vonshak, A., 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *H. pluvialis*. *Plant. Cell Physiol.* 32, 1077, 82.
- Boussiba, S., Bing, W. Yuan, I.P., Zarka, A. and Chen, T., 1999. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stress. *Biotech. Lett.* 21, 601, 4.
- Caers, M., Coutteau, P., Cure, K., Morales, V., Gajardo, G., Sorgeloos, P., 1999. The Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819): II. Manipulation of the fatty acid composition and lipid content of the eggs via lipid supplementation of the broodstock diet. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 123 B, 97-103.
- Cordero, B., Otero, A., Patiño, M., Arredondo, B.O., Fabregas, J., 1996. Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. *Biotechnol. Lett.* 18, 213-218.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 3, 350-356.
- Escarria, S., Reyes, C. y Rohan, D. 1989. Estudio bioquímico de la escalopa *Argopecten circularis*. *Ciencias Marinas* 15, 63-72.
- Farías-Molina, A., Uriarte, I., Varas, P., 1997. Estudio de los requerimientos nutricionales del ostión del norte *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) durante el acondicionamiento reproductivo. *Revista de Biología Marinha y Oceanografía* 32, 2, 127-136.
- Farías-Molina, A., 2001. Nutrición en moluscos Pectínidos. *In: Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura.* A. N. Maeda-Martínez (ed.), Cap. 5: p.89-104.
- Farías-Molina, A. and Uriarte, I., 2001. Effect of microalgal protein on the gonad development and physiological parameters for the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Journal of Shellfish Research* 20, 2, 97-105.
- Folch, J., Less, M., Stone-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-508.
- García, N., 2005. Influencia de los parámetros ambientales en el ciclo gametogénico de la vieira *Nodipecten (=Lyropecten) nodosus* (L.1758). Tesis de maestría en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 52pp.
- Guillard, R.R.L., Lorenzen, C.J., 1972. Yellow-green algae with chlorophyllid-c. *Journal of Phycology* 8, 10-14.
- Gu, W.L., An, G.H. and Johnson, E.A. 1997. Ethanol increases carotenoid production in *Pha. a rhodozyma*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19, 114-117.
- Hernández, J., Uriarte, I., Farias, A., 2000. Estudio comparativo de las progenies del ostión del norte (*Argopecten purpuratus*) y la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*), en reproductores acondicionados con distintas calidades de dieta. *En: Libro de Resúmenes, XX Congreso Ciencias del Mar, Coquepción, Chile* p. 136.
- Johnson, E.A. and Schroeder, W.A., 1995. Microbial carotenoids. *In: Fiechter, A. (Ed.), Advances Biochemical Engineering and Biotechnology*, vol. 53. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 119-178.
- Langdon, C. and Önal, E., 1999. Replacement of living microalgae with spray-dried diets for the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture* 180, 283-294.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-75.

- Mantiri, D.M., Negre-Sadargues, G., Castillo, R., Trilles, J.P., 1995. Evolution of carotenoid metabolic capabilities during the early development of the European lobster *Homarus gammarus* (L. 1758). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 111, 553-558.
- Manzoni, G. C. and Rupp, G. S., 1993. Estudo da biologia reprodutiva e viabilidade de cultivo de *Lyropecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Pectinidae) na Ilha do Arvoredo – SC. Florianópolis: UFSC, 35 pp. (Relatório final, Projeto).
- Manzoni, G. C. , Poli, C. R., Rupp, G. S., 1996. Período Reproductivo del pectínido *Nodipecten nodosus* (Mollusca:Bivalvia) en los alrededores de la Isla Arvoredo (27° 17'S - 48° 22'W) - Santa Catarina - Brasil. *In: Silva, A. & Merino, G. (Ed). Acuicultura en Latinoamérica. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura/ 2do Simposio Avances y Perspectivas de la Acuicultura en Chile.* p. 197-201.
- Martínez, G., Torres, M., Uribe, E., Díaz, M.A., Pérez, H., 1992. Biochemical composition of broodstock and early juvenile Chilean scallop, *Argopecten purpuratus* Lamarck, held in two different environments. *J. Shellfish Res.* 11, 307-313.
- Martínez, G., Aguilera, C., Mettifogo, L., 2000. Interactive effects of diet and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. *Aquaculture* 183, 149-159.
- Meyers, P. S., 1994. Developments in World aquaculture, feed formulation and role of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry* 66, 1069-1076.
- Menasveta, P., Choosuwap, J., Piyatiratitivorakul, S., Fast, A., Latscha, T., 1994. Effect of dietary astaxanthin on gonadal maturation and spawning of giant tiger prawn (*Penaeus monodon Fabricius*). *In: The Third Asian Fisheries Forum* (Chou, L.M., Munro, A.D., Lam, T.J., Chen, T.W., Cheong, L.K., Hooi, K.W., Phang, V.P.E. & Tan, C.H., eds), Asian Fisheries Society, Manila, Philippines p. 713–716.
- Miki, W.N., Yamaguchi K. and Konosu S., 1982. Comparison of carotenoids in the ovaries of marine fish and shellfish. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 71, 1, 7-11.
- Navarro, J.M., Leiva, G.E., Martínez, G., Aguilera, C., 2000. Interactive effects of diet and temperature on the scope for growth of the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditioning. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 247, 67-83.
- Navarro, J.M., 2001. Fisiología energética de pectinídeos Iberoamericanos. *In: Los Moluscos Pectinídeos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura.* A. N. Maeda-Martínez (ed.), Cap. 3: p.61-76.
- Olson, J.A., 1993. Vitamin A and carotenoids as antioxidants in a physiological context. *J. Nutr. Sci. Vitam.* 39, S57–S65.
- Ostini, S. and Poli, C. R., 1990. A situação do cultivo de moluscos no Brasil. *In: HERNANDEZ, R.A. (Ed.). Cultivo de moluscos en América Latina.* Bogotá: CIID, Memorias Segunda Reunion Grupo de Trabajo Técnico 311-325.
- Palma-Fleming, H., Navarro, J.M., Peña, E., Martínez, G., 2002. Effect of three conditioning diets on the fatty acid composition of gonads and muscle of *Argopecten purpuratus*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 36, 605-620.
- Passos, R., 2006. Extração e caracterização química de carotenóides provenientes de biomassas de interesse para a aquicultura. Tese de Doutorado, UFSC, Florianópolis-SC, 145 pp.
- Petit, H., Sance, S., Negre-Sadargues, G., Castillo, R., Trilles, J.P., 1991. Ontogeny of carotenoid metabolism in the prawn *Penaeus japonicus* (Bate, 1888) (Crustacea Penaeidae). A qualitative approach. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 99, 667–671.
- Robinson, A., 1992. Gonadal cycle of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. *Aquaculture* 106, 89-97.

- Rupp, G.S., 1994. Obtenção de reprodutores, indução à desova e cultivo larval e pós-larval de *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Pectinidae). Florianópolis: UFSC: 1994. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina. 125 pp.
- Rupp, G. S., Thompson, R. J. and Parsons G. J., 2004. Influence of food supply on postmetamorphic growth and survival of hatchery-produced lion's paw scallop, *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758). *Journal of Shellfish Research* 23, 1, 5-13.
- Samain, J.F., Séguineau, C., Cochard, J.C., Delaunay, F., Nicolas, J.L., Matty, Y., Galois, R., Mathieu, M., Moal, J., 1992. What about growth variability for *Pecten maximus* production? *Océanis* 18, 49-66.
- Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Robert, R., Quéré, C., Le Coz, J.R., Samaian, J.F., 1996a. Effect of fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. *Aquaculture* 143, 361-378.
- Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F., 1996b. Fatty acids and egg quality in great scallop. *Aquacult Int.* 4, 191-200.
- Sühnel, S., 2002. Recuperação de pré-sementes da vieira *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) após diferentes períodos de permanência em laboratório e no mar. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil, 54pp.
- Sühnel, S., Lagreze, F., Ferreira, J.F., Campestrini, L. H., Maraschin, M., *in press*. Carotenoid extraction from the gonad of the scallop *Nodipecten nodosus* (Bivalvia; Pectinidae). *Brazilian Journal of Biology*, accepted in 2008.
- Sühnel, S., Lagreze, F., Bercht, M. Ferreira, J.F., Schaefer, A.L.C., Magalhães, A.R.M., Maraschin, M., dados ainda não publicados. The relations between the reproductive cycle, astaxanthin levels and gonadic maturation in the scallop *Nodipecten nodosus* (Bivalvia; Pectinidae). *Brazilian Journal of Biology*. Submetido em julho de 2008.
- Tjahjono A.E., Kakizono T., Hayama Y., Nishio N., Nagai S., 1994. Isolation of resistant mutants for a green alga *Haematococcus pluvialis*, and their hybrid formation by protoplast fusion for breeding of higher astaxanthin producers. *J. Ferment. Bioeng.* 77, 352-357.
- Uriarte, I., Rupp, G., Abarca, A., 2001. Producción de juveniles de pectínidos Iberoamericanos bajo condiciones controladas. *In: Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. A. N. Maeda-Martinez (ed.), Cap. 8: p.147-171.
- Uriarte, I., Farias, A., Hernandez, J., Schäfer, C., Sorgeloos, P., 2004. Reproductive conditioning of Chilean scallop (*Argopecten purpuratus*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): effects of enriched diets. *Aquaculture* 230, 349-357.
- Utting, S.D. and Millican, P.F. 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture* 155, 45-54.
- Velasco, L.A. and Barros, J. 2007. Potencial for hatchery broodstock conditioning of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. *Aquaculture* 272, 767-773.
- Velasco, L.A.; Barros, E. and Acosta, E. 2007. Spawning induction and early development of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. *Aquaculture* 266, 153-165.
- Villavicencio, G., 1997. Acondicionamiento gonadal, desarrollo embrionario y cultivo de larvas de la almeja mano de león, *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835), alimentados con cuatro especies de microalgas. Tesis de Ingeniero en Acuicultura, Instituto Tecnológico del Mar, La Paz, México. 93 pp.
- Ward, J.E., Cassell, H.K. and MacDonald, B.A. 1992. Chemoreception in the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). I. Stimulatory effects of phytoplankton metabolites on clearance and ingestion rates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163, 235-250.

Wilson, J.A., Chaparro, O.R., Thompson, R.J. 1996. The importance of broodstock nutrition on the viability of larvae and spat in the Chilean oyster *Ostrea chilensis*. *Aquaculture*, v. 139 p. 63–75.

Zar, J. H. 1974. *Biostatistical analysis*. S.A.: Prentice-Hall, 357 pp.

Zanette, G., 2007. Influência do tipo de coletor e do tempo de larvicultura na taxa de assentamento da vieira *Nodipecten nodosus* (L.) em laboratório. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil, 34 pp.

Tabela 1. Descrição da composição das dietas utilizada em cada tratamento dos experimentos I e II, indicando as diferentes proporções de dieta basal (microalgas viva: *Isochrysis sp.*, *Chaetoceros muelleri* e *Skeletonema sp.* nas proporções 50:25:25, respectivamente) e de microalga seca *Haematococcus pluvialis* (Algamac AST). Quantidade de proteína total, carboidrato total e lipídeos totais em porcentagem e de astaxantina em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ nas diferentes dietas utilizadas para a alimentação das vieiras *N. nodosus* durante os experimentos de maturação.

Tratamento	Composição da dieta	Proteína total (%)	Carboidrato total (%)	Lipídeos totais (%)	Astaxantina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Algamac0%	100% da dieta basal (controle)	26,87	15,11	31,01	3,13
Algamac25%	75% da dieta basal e 25% de Algamac AST	23,33	26,05	25,01	12,56
Algamac50%	50% da dieta basal e 50% de Algamac AST	20,30	35,44	19,87	22,00
Algamac75%	25% da dieta basal e 75% de Algamac AST	17,66	43,58	15,41	31,43
Algamac100%	100% de Algamac AST	24,20	50,70	11,50	40,86

Tabela 2. Descrição da composição das dietas utilizadas no experimento III, indicando as diferentes proporções em *Chaetoceros muelleri* (microalga viva), em *Haematococcus pluvialis* (microalga seca - Algamac AST) e em *H. pluvialis* (microalga viva). Quantidade de proteína total, carboidrato total e lipídeos totais em porcentagem e de astaxantina em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ nas diferentes dietas utilizadas para a alimentação das vieiras *N. nodosus* durante os experimentos de maturação.

Tratamento	Composição da dieta	Proteína total (%)	Carboidrato total (%)	Lipídeos totais (%)	Astaxantina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Cm100%	100% de <i>C. muelleri</i> (controle)	28,68	17,70	24,62	2,69
Cm:Algamac50%	50% de <i>C. muelleri</i> e 50% de Algamac AST	20,38	38,26	13,70	21,78
Cm:H.pluvialis50%	50% de <i>C.muelleri</i> e 50% de <i>H. pluvialis</i> viva	22,64	34,27	23,86	5,38

Tabela 3. Porcentagem média e desvio padrão da quantidade total de proteína, carboidrato, lipídeos e astaxantina nas microalgas utilizadas nas diferentes dietas testadas.

Microalga	Proteína total (%)	Carboidrato total (%)	Lipídeos totais (%)	Astaxantina ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
<i>Isochrysis sp</i> variedade <i>Tahiti</i>	26,10 \pm 1,64	15,29 \pm 0,96	32,49 \pm 5,41	3,28 \pm 0,08
<i>Chaetoceros muelleri</i>	28,68 \pm 1,72	17,07 \pm 7,89	24,62 \pm 1,20	2,69 \pm 0,07
<i>Skeletonema sp.</i>	28,44 \pm 1,00	9,15 \pm 6,22	33,43 \pm 1,96	3,28 \pm 0,08
<i>Haematococcus pluvialis</i> viva	15,36 \pm 1,26	54,26 \pm 4,60	14,14 \pm 0,06	8,07 \pm 0,01
ALGAMAC AST	24,2*	50,7*	11,5*	40,86 \pm 1,05

*Dados fornecidos por Aquafauna Bio-Marine, Inc. para Algamac AST

Tabela 4. Experimentos I e II: quantidade de fêmeas que emitiram gametas e média e desvio padrão (de três contagens) da quantidade de: oócitos totais, larvas “D” obtidas e rendimentos de larvas pedivéliger (com 13 dias de larvicultura) para *N. nodosus*.

Tratamentos	Número de fêmeas que desovaram	Quantidade de oócitos eliminados por desova	Quantidade de larvas “D” (%)	Quantidade de larvas pedivéliger (%)
Experimento I T15				
* Para todos os tratamentos na fecundação não foi observada divisão celular				
Experimento I T30				
Algamac 0%	0	0	0	0
Algamac 25%	2	9.316.667 ± 1,15 ^a	0	0
Algamac 50%	2	5.833.333 ± 91,00 ^b	7,39 ± 3,34 ^a	1,11 ± 0,50 ^a
Algamac 75%	1	13.566.667 ± 367,77 ^c	22,51 ± 2,94 ^b	5,47 ± 1,45 ^b
Algamac 100%	4	7.816.667 ± 61,10 ^d	0	0
Experimento II T7				
Algamac 0%	3	3.873.332 ± 100,01 ^a	21,20 ± 0,58 ^a	2,00 ± 0,58 ^a
Algamac 25%	3	5.779.999 ± 148,07 ^b	34,07 ± 3,51 ^b	12,00 ± 3,51 ^b
Algamac 50%	4	10.800.000 ± 127,05 ^c	35,72 ± 2,04 ^b	35,44 ± 2,04 ^c
Algamac 75%	2	3.733.332 ± 136,59 ^a	17,13 ± 5,12 ^a	15,89 ± 3,72 ^b
Algamac 100%	0	0	0	0
Experimento II T15				
Algamac 0%	4	9.333.333 ± 76,50 ^a	15,31 ± 0,67 ^a	3,00 ± 0,58 ^a
Algamac 25%	3	5.250.000 ± 129,22 ^b	36,40 ± 2,69 ^b	5,22 ± 2,78 ^a
Algamac 50%	5	9.333.333 ± 96,50 ^a	20,55 ± 0,80 ^c	13,33 ± 2,33 ^b
Algamac 75%	1	4.516.667 ± 90,71 ^c	9,60 ± 0,34 ^d	14,33 ± 1,86 ^b
Algamac 100%	3	10.133.333 ± 102,13 ^d	36,68 ± 1,81 ^b	21,55 ± 2,27 ^c

As letras minúsculas na tabela representam as diferenças estatisticamente significativa.

Tabela 5. Experimento III: quantidade de fêmeas que eliminaram gametas, e média e desvio padrão (de três contagens) da quantidade de: oócitos totais, larvas “D” obtidas, rendimentos de larvas pedivéliger (com 13 dias de larvicultura) e obtenção de pré-sementes de *N. nodosus*.

Tratamento	Número de fêmeas que desovaram	Número total de oócitos	
Cm100%	6	29.162.500 ± 96,44 ^a	
Cm:Algamac 50%	4	16.666.666 ± 47,57 ^b	
Cm:H.pluvialis 50%	6	28.324.999 ± 18,56 ^a	

Tratamento	Quantidade de larva “D” (%)	Rendimento de larvas pedivéliger (%)	Quantidade de pré-sementes (%)
Cm100%	28,09 ± 0,48 ^a	27,14 ± 3,91 ^a	17,68 ± 0,80 ^a
Cm:Algamac 50%	33,33 ± 1,72 ^b	23,17 ± 4,50 ^a	16,03 ± 4,84 ^a
Cm:H.pluvialis 50%	82,54 ± 2,62 ^c	43,01 ± 2,71 ^b	18,59 ± 3,13 ^a

As letras minúsculas na tabela representam as diferenças estatísticas.

Tabela 6. Significância estatística (p) para as comparações de quantidade de astaxantina na porção feminina da gônada nos diferentes tempos de maturação em cada tratamento, para os experimentos I e II.

Tratamento	Experimento I	Experimento II
	Comparação entre T ₁₅ e T ₃₀	Comparação entre T ₇ e T ₁₅
Algamac0%	p = 0,152	p = 0,053
Algamac25%	p = 0,318	p = 0,010 *
Algamac50%	p = 0,014 *	p = 0,847
Algamac75%	p = 0,043 *	p = 0,009 *
Algamac100%	p = 0,010 *	p = 0,156

* São os resultados considerados estatisticamente diferentes com $p < 0,05$ ou $p < 0,01$

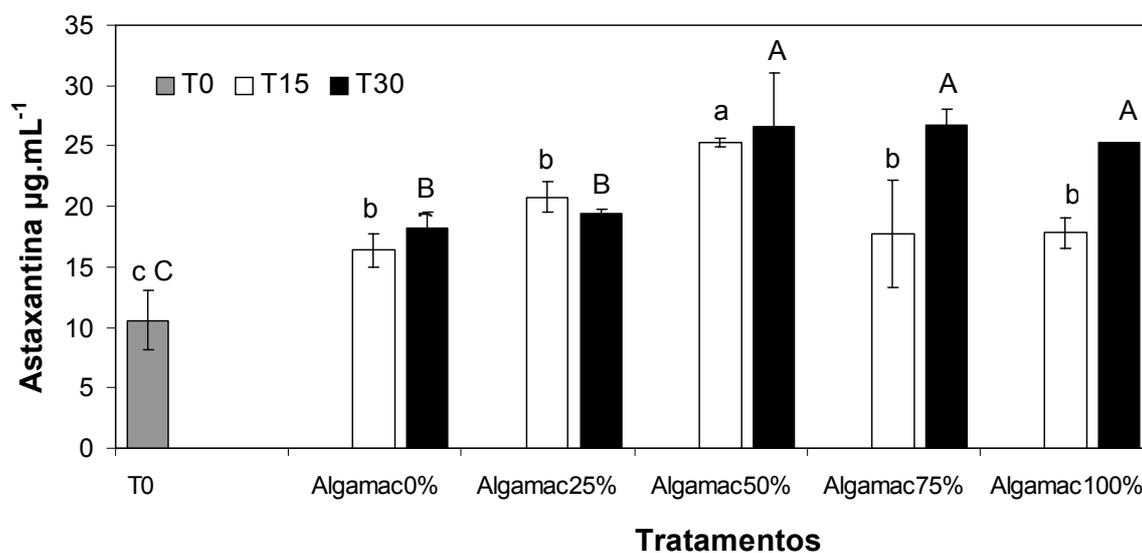


Figura 1. Experimento I: média e desvio padrão da quantidade de astaxantina na porção feminina da gônada de *N. nodosus* após maturação de 15 e 30 dias, em laboratório, com diferentes dietas enriquecidas com Algamac AST e com dieta basal de microalgas (Algamac 0% - controle). As letras no gráfico representam as diferenças estatísticas, sendo as minúsculas para o tempo T₁₅ e as maiúsculas para o tempo T₃₀ de maturação.

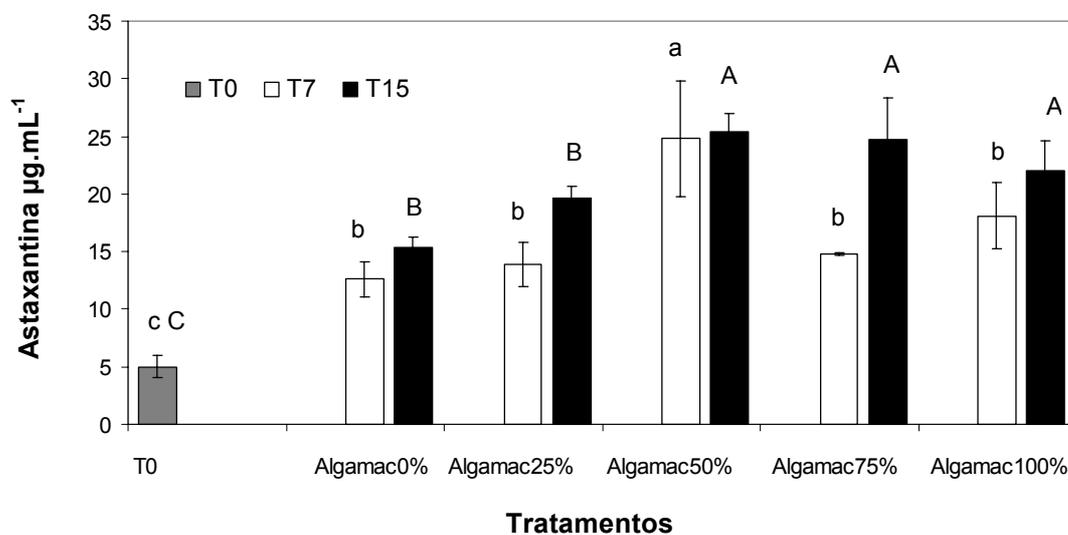


Figura 2. Experimento II: média e desvio padrão da quantidade de astaxantina na porção feminina da gônada de *N. nodosus* após maturação de 07 e 15 dias, em laboratório, com diferentes dietas enriquecidas com Algamac AST e com dieta basal de microalgas (Algamac 0% - controle). As letras no gráfico representam as diferenças estatísticas, sendo as letras minúsculas para o tempo T₇ e as maiúsculas para o tempo T₁₅ de maturação.

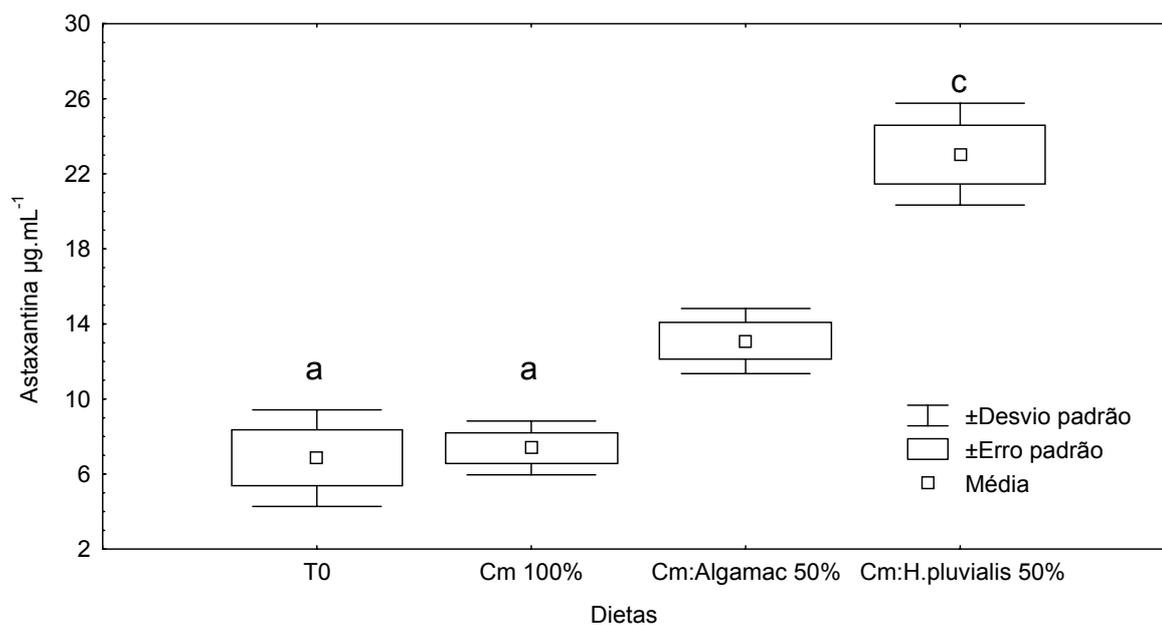


Figura 3. Experimento III: média, desvio padrão e erro padrão da quantidade de astaxantina na porção feminina da gônada de *N. nodosus* após maturação de 30 dias em laboratório com apresentando dados iniciais (T0) e de 3 tratamentos: Cm100% (controle); Cm:Algamac 50% e Cm:H.pluvialis 50%. As letras minúsculas no gráfico representam as diferenças estatísticas.

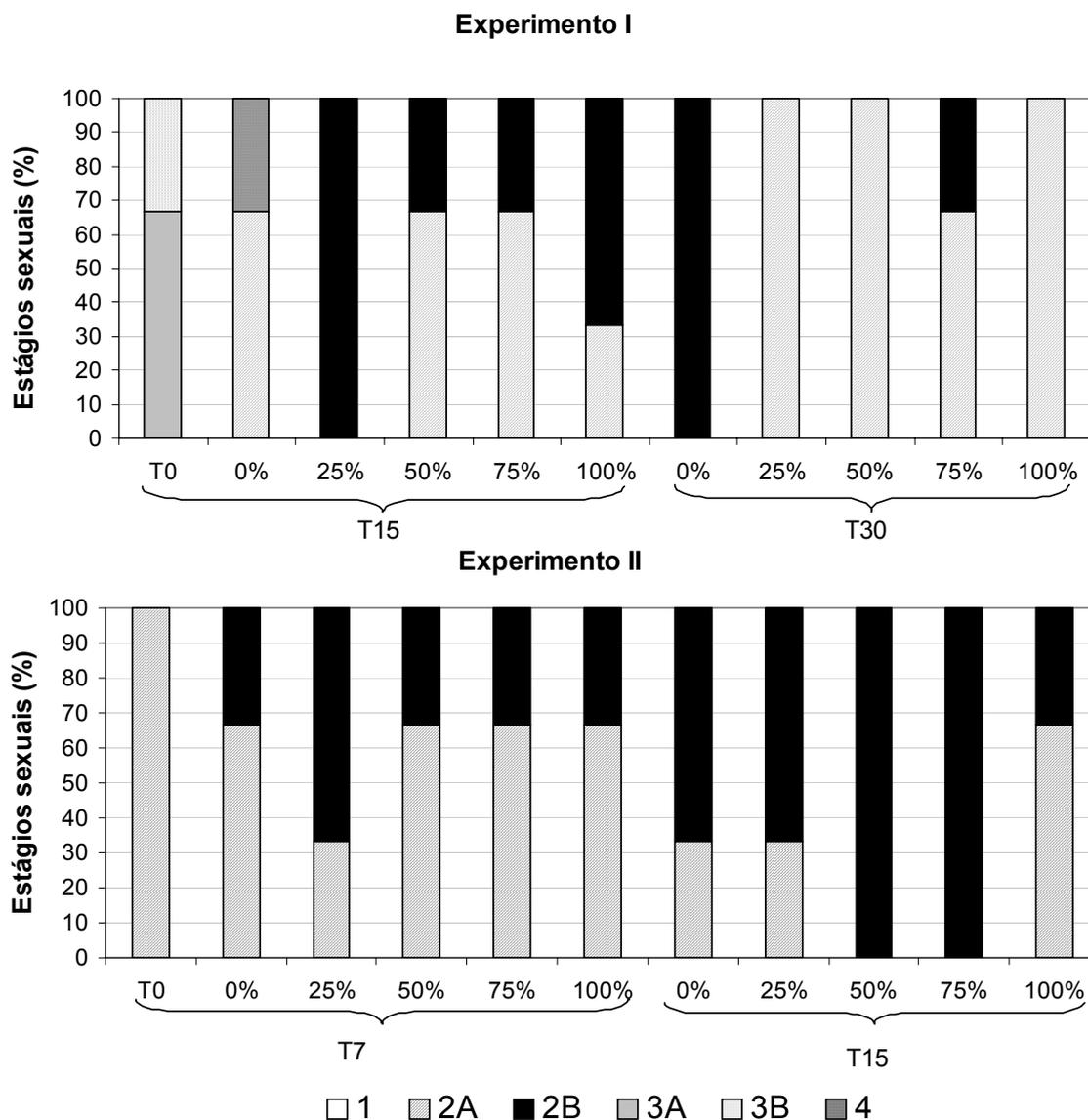


Figura 4. Experimento I e II: estgios sexuais da porção feminina da gônada da vieira *N. nodosus* no início da maturação (T₀) e para as cinco dietas testadas no experimento I, após quinze (T₁₅) e trinta (T₃₀) dias de maturação e no experimento II, após sete (T₇) e quinze (T₁₅) dias de maturação. Onde: (1) estágio de gametogênese; (2A) estágio de pré-desova inicial; (2B) estágio de pré-desova avançada; (3A) estágio de desova inicial; (3B) estágio de desova avançada e (4) estágio de repouso. T₀ = tempo zero; 0% = Algamac0%; 25% = Algamac25%; 50% = Algamac50%; 75% = Algamac75%; 100% = Algamac100%.

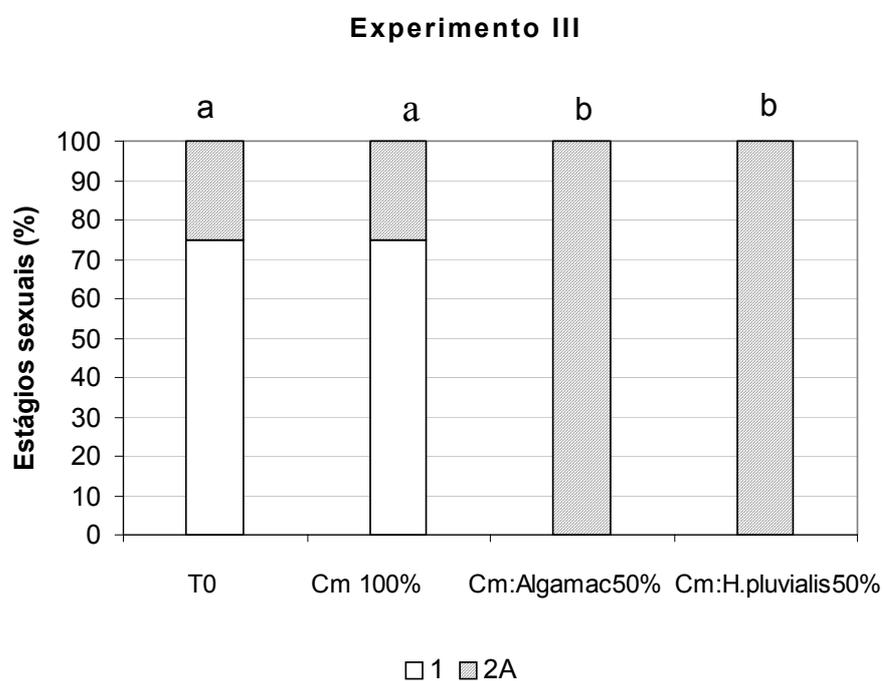


Figura 5. Experimento III: estágios sexuais da porção feminina da gônada da vieira *N. nodosus* no início da maturação (T_0) e após trinta (T_{30}) dias de maturação para as três dietas testadas. Onde: (1) estágio de gametogênese e (2A) estágio de pré-desova inicial. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas.

CAPÍTULO VI – Avaliação dos parâmetros hemato-imunológicos durante o ciclo reprodutivo da vieira *Nodipecten nodosus* (L. 1758) em associação com uma dieta enriquecida com carotenóides. Parte II – Acúmulo de astaxantina, maturação e rendimento larval

Revista à qual será enviado para publicação: Aquaculture

Avaliação dos parâmetros hemato-imunológicos durante o ciclo reprodutivo da vieira *Nodipecten nodosus* em associação com uma dieta enriquecida com carotenóides. Parte II – Acúmulo de astaxantina, maturação e rendimento larval

Simone Sühnel^{1*}, Francisco Lagreze¹, Delano D. Schleder², Marguerita A. Barracco², Marcelo Maraschin³, Jaime Fernando Ferreira¹.

^{1*}Laboratório de Moluscos Marinhos/UFSC, Servidão dos Coroas s/n, Barra da Lagoa, Florianópolis/SC-Brasil Cep.88061-600

²Laboratório de Imunologia Aplicada à Aqüicultura/UFSC, C.P. 476, Florianópolis/SC-Brasil Cep. 88040-900

³Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal/UFSC, Rodovia Edmar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis/SC-Brasil Cep.88040-900

(*)Autor para correspondência: Simone Sühnel

Laboratório de Moluscos Marinhos - UFSC

Servidão dos Coroas s/n, Barra da Lagoa, Florianópolis/SC-Brasil Cep. 88061-600

e-mail: ssuhnel@gmail.com

Telefone: (55) (48) 3232 3279

Resumo

Na primeira parte deste estudo foram avaliados os parâmetros hemato-imunológicos em reprodutores da vieira *Nodipecten nodosus* maturados com dieta rica em astaxantina. Nesta parte do estudo, foram apresentados os resultados de acúmulo de astaxantina, estágio sexual, eliminação de gametas e rendimento larval. Foram testadas duas dietas uma com NatuRose como fonte de astaxantina e outra composta por uma mistura de microalgas (*Isochrysis sp.*, *Chaetoceros muelleri* e *Skeletonema sp.*), dieta controle na maturação de *N. nodosus* em laboratório. Nos resultados obtidos observou-se que o tratamento com NatuRose50% apresentou 100% dos animais em estágio pré-desova avançada (2A). No acúmulo de astaxantina, observou-se uma maior quantidade de astaxantina na porção feminina da gônada de reprodutores maturados com NatuRose50%. Na eliminação de gametas e número de fêmeas que desovaram observou-se que o tratamento NatuRose50% apresentou maiores valores, assim como na obtenção de larva “D” e no rendimento em larvas pedivéliger. Estes resultados indicam que dietas ricas em astaxantina proporcionaram um efeito positivo na maturação e na sobrevivência de larvas.

Palavras Chave: *Nodipecten nodosus*, maturação, dieta, rendimento larval, astaxantina,.

1. Introdução

Os moluscos, como todos os invertebrados, dispõem de um sistema imunológico que os protege contra patógenos. Seu sistema imune está restrito a uma imunidade inata ou natural, não possuindo o sistema adaptativo altamente específico dos vertebrados.

De forma semelhante a todos os animais, o sistema imune dos moluscos está relacionado principalmente ao seu sangue ou hemolinfa. Este sistema engloba reações celulares, desempenhadas pelas células circulantes ou hemócitos, reações humorais, onde atuam proteínas e outras moléculas plasmáticas e reações integradas em sistemas multiméricos que envolvem respostas celulares e humorais (Vargas-Albores and Barracco, 2001). Os hemócitos são classificados em dois grupos celulares hemócitos granulares ou granulócitos e hemócitos hialinos ou agranulócitos (Hine, 1999). Os granulócitos, de modo geral, parecem ser as células mais ativas na função imunológica. Embora sua composição e função possam variar grandemente entre os bivalves por diversos fatores, são capazes de fagocitar ativamente, produzir enzimas digestivas, gerar espécies reativas de oxigênio, ativar o mecanismo da enzima fenoloxidase e produzir lectinas com diferentes padrões de ligação ao patógeno (Hine, 1999). Para *N. nodosus*, Schleder et al. (*in press*) descreve a presença de ambos hemócitos granulares e hialinos.

Estudos sobre a relação entre o estado nutricional de moluscos e o estado imunológico são importantes para identificar se a alimentação fornecida a reprodutores em laboratório é adequada a fim de obter melhores resultados reprodução.

Para moluscos, Delaporte et al. (2003) demonstraram que ostras *Crassostrea gigas* e clams *Ruditapes philippinarum* alimentados com *Chaetoceros calcitrans* apresentaram maiores concentrações de hemócitos, de espécies reativas de oxigênio e de atividade fagocítica do que animais alimentados com *Isochrysis galbana* (T-Iso) ou *Tetraselmis suecica*. Assim como, Hégaret et al. (2004) demonstraram que ostras *Crassostrea virginica* alimentadas com *Skeletonema costatum* apresentaram maior atividade fagocítica do que ostras alimentadas com *Tetraselmis chui* ou uma mistura de ambas as microalgas.

Em peixes, Amar et al. (2004) demonstraram que uma dieta suplementada com carotenóides, ou seja, com algas *Dunaliella salina* e *Phaffia rhodozyma* ricas em astaxantina, levou a modulação de alguns parâmetros do sistema imune inato da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

Os autores Schleder et al. (*in press*), mostraram que na maturação de reprodutores da vieira *N. nodosus* alimentada com uma dieta rica em astaxantina apresentou uma tendência a diminuição na produção de ânions superóxidos (ROS) do que uma dieta com menores quantidades de astaxantina.

Neste sentido, como continuação do trabalho desenvolvido por Schleder et al. (*in press*) o presente trabalho pretende avaliar os efeitos da utilização das dietas ricas em astaxantina no estágio sexual, acúmulo de astaxantina na porção feminina da gônada de reprodutores e no rendimento de larvas da vieira *N. nodosus*.

2. Materiais e Métodos

Os experimentos de maturação de reprodutores e larvicultura foram realizados no Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM/CCA/UFSC), localizado na Barra da Lagoa/Florianópolis e as análises de carotenóides, com HPLC, foram realizadas no Laboratório de Morfogênese do Departamento de Fitotecnia (FIT/CCA/UFSC) e as análises histológicas no Laboratório de Diagnóstico e Patologia em Aqüicultura (LADPAQ/CCA/UFSC).

2.1 Delineamento experimental

Neste trabalho foi testado o enriquecimento da dieta de reprodutores de *N. nodosus* com a microalga *Haematococcus pluvialis* seca, produzida comercialmente por NatuRose® (Cyanotech), como fonte de astaxantina durante a maturação de reprodutores da vieira *N. nodosus*.

A porcentagem de NatuRose utilizada neste experimento foi de 50%, a qual apresentou melhores resultados em outros dois experimentos realizados (Capítulo V), nos quais foram utilizadas 5 porcentagem de substituição da dieta Algamac AST, outra fonte comercial de astaxantina com a microalga seca *H. pluvialis*.

2.2 Dieta

Para este estudo foram testados dois tratamentos, um tratamento com NatuRose50% e outro uma dieta basal (controle) (Tabela 1). A dieta basal foi composta pela mistura de microalgas das espécies *Isochrysis sp.* variedade *Tahit* (CCMP 1324, T-Iso), *Chaetoceros muelleri* (CCMP 1316, Cm) e *Skeletonema sp.* (CCMP 795, Sk), nas proporções 50:25:25, respectivamente, utilizada como controle (dieta utilizada pelo Laboratório de Moluscos Marinhos). Estas microalgas foram cultivadas no meio Guillard F/2 modificado no LMM, em água filtrada e esterilizada, aeração contínua filtrada, temperatura de 22 °C e um regime de luz de 24 h. As microalgas foram utilizadas na fase exponencial de crescimento.

Para todos os tratamentos, a concentração final de alimento fornecida foi de 5×10^4 cél.mL⁻¹ (3,66 mg.L⁻¹).

2.3. Maturação de reprodutores

Os reprodutores (70-75 mm de altura e 18 meses de idade) cultivados em espinhel, a 2m de profundidade, foram coletados na área de cultivo experimental da EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural), localizada em Santa Catarina (SC), região sul do Brasil, na praia do Canto Grande, Bombinhas (27°12'5,39"S e 48°30'47,7"N). Os animais foram imediatamente transportados em caixas de isopor, com água do mar a 23 °C, para o laboratório. No laboratório, os animais foram aclimatados a 19 °C, em jejum, por 12 horas (*over night*).

Após a aclimação, os animais foram acondicionados nos tanques de maturação para o início do experimento. Neste experimento os animais não foram limpos e nem induzidos à desova ao chegarem do mar.

Este experimento teve duração de 15 dias com uma indução à desova ao final do período. Foram utilizados tanques de 10 litros, em triplicata, para cada tratamento. A temperatura da água foi

mantida em $19,1 \pm 0,4$ °C, com aeração constante. Foi utilizado fluxo contínuo aberto de entrada de água do mar a uma vazão de $333 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ por animal e para alimento de $33 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ por animal.

Os tanques de alimentação foram limpos diariamente e renovado o alimento para cada tratamento, após este manejo o fluxo de água e de alimento em cada tanque de maturação eram regulados conforme os valores descritos acima.

O NatuRose foi hidratado em água salgada antes de ser ministrado aos reprodutores. Os tanques de alimentação foram mantidos com aeração constante.

2.4. Eliminação de gametas

A técnica de indução à desova e fecundação foi à utilizada pelo LMM, de acordo com Rupp (1994) e Rupp et al. (2004) e adaptada pelo LMM, com estresse por retirada de organismos incrustantes das valvas, exposição à água com UV e variação da temperatura da água nos tanques utilizados para a indução a desova de 20 °C para 24 °C. O tempo de indução a desova foi fixado em uma hora.

Assim que os animais iniciaram a liberação dos gametas estes foram separados em baldes de 2 L, para desova. Cada tratamento foi subdividido em A e B para a fecundação cruzada dos gametas dentro de cada tratamento, a qual foi realizada ao longo da desova. O gameta feminino foi quantificado, fecundado e mantido em tanques separados por tratamento para o desenvolvimento larval.

2.5. Obtenção de larva “D” e Larvicultura

O cultivo larval foi desenvolvido conforme técnicas utilizadas pelo LMM-UFSC, de acordo com Rupp (1994) e Rupp et al. (2004) e adaptada pelo LMM que consiste basicamente na transferência dos embriões para os tanques de larvicultura; trocas de águas a cada 48 horas; peneiramento com diferentes tamises para repicagem e eliminação larvas mortas; alimentação diária com microalgas e temperatura da água controlada, variando de 23 a 24 °C, não foi utilizado antibiótico.

Para cada tratamento foi realizada a sua respectiva larvicultura individualmente, em triplicata, em tanques de 14 litros. A densidade inicial nos tanques de larvicultura foi de $100 \text{ oócitos}\cdot\text{mL}^{-1}$ no primeiro dia e no segundo repicada para $10 \text{ larvas}\cdot\text{mL}^{-1}$ (larvas “D”). Os cultivos foram mantidos com aeração constante e fraca.

A espécie de microalga oferecida no segundo dia de larvicultura foi a *Isochrysis sp.* variedade *Tahit* (T-Iso) na concentração de $0,5 \times 10^4 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$. A partir do terceiro dia: T-Iso, *Pavlova sp* (*Pav*) e *Chaetoceros calcitrans* (*Cc*), nas proporções 35:35:30, respectivamente, a uma concentração de $1 \times 10^4 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$. A partir do quinto dia: T-Iso, *Pav* e *Cc*, nas proporções 30:20:50, respectivamente, a uma concentração de $2 \times 10^4 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$. Estas microalgas foram cultivadas no meio Guillard F/2 modificado no LMM, em água filtrada e esterilizada, aeração contínua filtrada, temperatura de 22 °C e um regime de luz de 24 h. As microalgas foram utilizadas na fase exponencial de crescimento.

A avaliação do rendimento das larviculturas foi realizada com 24 horas (larva “D”) e com 13 dias (larva pedivéliger) para os três experimentos.

2.6 Avaliação do efeito das dietas

Após a maturação de 15 dias (T_{15}), um lote de animais foi utilizado para quantificação de astaxantina e histologia da porção feminina da gônada ($n=3$) e outro para desova ($n=21$). Também foi coletada a hemolinfa para avaliação dos parâmetros hemato-imunológicos apresentados por Schleder et al. (*in press*),

Após a desova foi avaliada a eliminação de gametas e o rendimento larval de larvas “D” (com 24 horas de larvicultura) e pedivéliger (com 13 dias de larvicultura).

Análise de astaxantina

A extração de carotenóides foi realizada conforme metodologia descrita por Sühnel et al. (*in press*), colocando a amostra liofilizada em um recipiente de cerâmica, adicionando nitrogênio líquido, macerando-as e retirando uma alíquota de 50 mg. A esta alíquota de 50 mg foram adicionados 5 mL da solução extratora de acetona (Ac=O, Nuclear, P.A.) e *n*-hexano (Hex, TediaBrazil, P.A.) na proporção 1:3 respectivamente, permanecendo em agitação (agitador magnético Fisatom), protegidas da luz, em temperatura ambiente (23 °C). Após a extração, as amostras foram filtradas em papel filtro, tendo seu volume final ajustado para 3 mL, com posterior acondicionamento em frascos âmbar (10 mL), contendo atmosfera de N_2 . As amostras permaneceram armazenadas em freezer (-18 °C) para posterior determinação do teor de astaxantina.

A astaxantina foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A metodologia utilizada para análise foi conforme descrito por Sühnel et al. (*in press*), onde alíquotas dos extratos carotenóides das amostras (300 μ L) foram filtradas (filtros de 0,22 μ m), seguido da injeção de 10 μ L de cada amostra em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna C_{18} de fase reversa Vydac (BioRad, 25 cm x 4,6 mm \varnothing) e detector UV-visível, operando em leitura de 470 nm. Como fase móvel, utilizou-se acetonitrila: metanol (90:10, TediaBrazil, grau HPLC), em fluxo de 0,8 mL.min⁻¹.

A identificação da astaxantina foi realizada com base no tempo de retenção obtido a partir da análise de amostra padrão (0,461 mg.10 mL⁻¹ Hex, Sigma – MO, USA), sob as mesmas condições experimentais e calculando-se a integral da área dos picos correspondentes, através de curva padrão externa ($y = 7044,96x$, $r^2 = 0,994$).

Análise histológica

A análise histológica foi realizada na porção feminina da gônada dos reprodutores maturados em cada tratamento testado.

Os cortes foram fixados em solução de Davidson e armazenados em álcool 70 %. Após diferentes banhos em álcool etílico (de 70 a 100 %), xilol e parafina, foram então montados em blocos de parafina.

Os blocos contendo as amostras de gônada foram cortados a 5 μ . As lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris e Eosina.

Para a identificação dos estágios de maturação foram realizadas duas avaliações por dois identificadores à cegas e sem tendência. A descrição dos estágios foi realizada individualmente, pela análise microscópica com aumento de 200 e 400 vezes.

Foi padronizada uma pontuação para cada estágio sexual de 1 a 6 (Capítulo IV).

A determinação do estágio sexual segue padrão definido no Capítulo IV, os quais definem seis estágios de maturação (1-gametogênese; 2A-pré-desova inicial; 2B-pré-desova avançada; 3A-desova inicial; 3B-desova avançada; e 4-reposo) de acordo com as características histológicas da gônada da vieira *N. nodosus*.

2.7 Análise estatística

Para comparação entre os tratamentos, nos parâmetros avaliados, acúmulo de astaxantina, estágio sexual, quantidade total de gametas eliminados por cada tratamento, sobrevivência de larvas “D” e pedivéliger foi realizada a análise descritiva, avaliação de normalidade dos erros e de homogeneidade de variância (Bartlett). Análise de variância múltipla (ANOVA) e de separação de médias com Teste Tukey para a comparação entre as médias (Zar, 1974). Utilizando programa *Statistica* versão 5. Para os resultados com porcentagem (estágios sexuais, sobrevivência de larvas “D” e pedivéliger) o valor absoluto foi transformado em Arcoseno para então ser aplicado o teste estatístico.

3. Resultados

3.1 Estágios sexuais

O estágio sexual dos animais (Figura 1) em T_0 foi identificado como pré-desova inicial (2A), em 33% dos animais, e avançada (2B) em 66% e após 15 dias de maturação o tratamento NatuRose0% (M0%) permaneceu em estágio sexual de T_0 . Já o tratamento NatuRose50% (M50%) apresentou 100% em estágio de pré-desova avançada (2B) de maturação. Após a desova, apenas 33% os reprodutores no tratamento NatuRose0% (D0%) desovaram (estágio 3B), já para o tratamento NatuRose50% (D50%) 100% dos animais desovaram (estágio 3B).

3.2 Quantidade de astaxantina

A quantidade de astaxantina na porção feminina da gônada para os reprodutores (Figura 2) em T_0 ($10,39 \pm 5,49 \mu\text{g.mL}^{-1}$) não apresentou diferença dignificativa para aos animais maturados no tratamento NatuRose0% (M0% $12,05 \pm 1,49 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Já para o tratamento NatuRose50% (M50% $18,73 \pm 1,42 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a quantidade de astaxantina foi diferente significativamente ($p < 0,05$) apresentando um maior acúmulo de astaxantina em relação a T_0 e NatuRose0% (M0%). Após a desova, o tratamento NatuRose50% (D50% $8,48 \pm 4,66 \mu\text{g.mL}^{-1}$) não apresentou diferença significativa em relação ao tratamento NatuRose0% (D0% $11,68 \pm 3,30 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

3.3 Eliminação de gametas e rendimento larval

O numero de fêmeas que desovaram (Tabela 2) foi maior para o tratamento NatuRose50% (14 fêmeas) do que o tratamento NatuRose0% (6 fêmeas), assim como o número de oócitos totais

liberados por NatuRose50% ($22.082.918 \pm 122,07$ oócitos) foi diferente significativamente ($p < 0,05$) do tratamento NatuRose0% ($7.366.645 \pm 55,56$ oócitos).

Após 24 horas da fecundação, o tratamento NatuRose50% ($34,96 \pm 1,55$ %) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) na obtenção de larvas "D" em relação do tratamento NatuRose0% ($13,93 \pm 2,03$ %). Após 13 dias de larvicultura, o tratamento NatuRose50% ($4,28 \pm 0,42$ %) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) no rendimento de larvas pedivéliger (Tabela 2) em relação ao tratamento NatuRose0% ($0,66 \pm 0,57$ %).

4. Discussão

Os reprodutores maturados com dieta rica em astaxantina apresentaram estágio sexual mais avançado que os reprodutores maturados sem adição de NatuRose. Para este experimento a maturação em laboratório com NatuRose favoreceu o desenvolvimento dos gametas femininos. Além disso, estes dados mostraram que o maior acúmulo de astaxantina foi obtido nos reprodutores maturados com dieta rica em astaxantina.

Após a eliminação de gametas, o tratamento NatuRose50% apresentou 100% dos animais em estágio de desova avançada (3B) indicando que os gametas estavam bem maduros e a qualquer estímulo houve a liberação dos mesmos. Fato este, não observado no tratamento NatuRose0%, onde apenas 33% dos animais desovaram.

Nos parâmetros hematológicos analisados neste experimento por Schleder et al. (*in press*) em T0, após 15 dias de maturação e após a desova, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) para a produção de ânions superóxidos basal entre os tratamentos NatuRose0% e NatuRose50%, indicando que os animais alimentados com maior concentração de astaxantina e que apresentaram maior acúmulo de astaxantina na porção feminina da gônada (tratamento NatuRose50%) os carotenóides atuaram como antioxidante no animal.

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas produzidas que possuem um papel importante na degradação de microorganismos invasores, no entanto, também podem danificar o tecido do hospedeiro. Para neutralizar os efeitos não desejados, existem enzimas antioxidantes como: a glutationa-redutase, a catalase e SOD. Além disto, tem sido reportado vários compostos de baixo peso molecular tais como: a glutationa, carotenóides e as vitaminas C e E (Roch, 1999; Vargas-Albore e Barracco, 2001). Neste sentido os carotenóides podem atuar como compostos antioxidantes.

Os autores Camus et al. (2002) evidenciaram o aumento na produção de ERO e depleção na defesa antioxidante (glutationa) em *Chlamys islandicus* expostos ao benzopireno. Hégaret and Wikfors (2005) também observaram o incremento das ERO em *Argopecten irradians* infectados pelo protozoário *Prorocentrum minimum*.

A propriedade antioxidante dos carotenóides é devido às duplas ligações conjugadas, onde ocorre a desativação dos radicais livres e o seqüestro do oxigênio singleto (EROS espécies reativas de oxigênio) (Miki, 1991). A maior proteção é dada por aqueles carotenóides que têm nove ou mais ligações duplas conjugadas. O licopeno é mais efetivo antioxidante que o β -caroteno no seqüestro de oxigênio singleto, bem como a astaxantina e a cantaxantina são melhores antioxidantes que o β -caroteno (Rodriguez-Amaya, 1997; Edge et al., 1997; Padula, 1999).

Em estudo realizado por Chien e Jeng (1992), foi verificada uma correlação positiva entre os níveis de concentração de pigmento nos tecidos e a sobrevivência de camarões alimentados com dietas com 100 mg.kg^{-1} de astaxantina, sugerindo que os carotenóides funcionam como uma reserva de oxigênio intracelular por seu seqüestro de oxigênio intracelular.

Os autores Kobayashi e Sakamoto (1999), demonstraram que a astaxantina purificada da microalga de *Haematococcus pluvialis*, é um potente agente antioxidante *in vitro* sob condições hidrofóbicas e hidrofílicas.

Bem como, Naguib (2000) e Rengel et al. (2000), relatam que a astaxantina, que é um ketocarotenoide oxidado a partir de β -caroteno, tem uma maior atividade antioxidante comparado com α -caroteno, β -caroteno, Luteína, Lycopeno, Canthaxantina e Vitamina E.

Além deste efeito antioxidante dos carotenóides, a maturação mais avançada (estágio sexual de pré-desova 2B) observada nos reprodutores maturados com dieta enriquecida com carotenóides favoreceu também no desempenho dos reprodutores na eliminação de gametas, gerando uma maior quantidade de gametas viáveis (fecundaram com sucesso e apresentaram divisão celular) quando comparados com os reprodutores maturados sem a adição de NatuRose.

Tanto na avaliação das larvas "D", com 24 horas de larvicultura, quanto após 13 dias de larvicultura na avaliação das larvas pedivéliger, o tratamento enriquecido com astaxantina apresentou melhores resultados de rendimento larval.

Para peixes também foi observado este efeito, onde segundo Meyers (1994), larvas e alevinos de salmão, de reprodutores alimentados com dieta sem fontes de carotenóides, apresentaram menor taxa de sobrevivência (<15%), quando comparados com reprodutores alimentados com dieta devidamente suplementada com carotenóides.

De mesma forma, para camarões, Lorenz (1998) e Howell e Matthews (1991), indicam que em estudos com reprodutores de camarão, os animais alimentados com dietas deficientes em carotenóide apresentaram deformidade nas larvais, bem como uma baixa sobrevivência destas. Segundo Cuzon et al. (2004), a utilização de astaxantina na alimentação do camarão *Litopennaeus vannamei* proporcionou uma maior sobrevivência de larva náuplios.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que reprodutores maturados com dietas enriquecidas astaxantina favorecem a sobrevivência das larvas, assim como no acúmulo de astaxantina na gônada feminina de reprodutores da vieira *N. nodosus*.

5. Conclusão

Neste estudo, a utilização de dieta rica com astaxantina (NatuRose50%) na maturação de reprodutores proporcionou um maior acúmulo de astaxantina na porção feminina da gônada de *N. nodosus*. Além disso, um efeito positivo na maturação dos gametas femininos de *N. nodosus*.

As dietas com *H. pluvialis* seca, durante a maturação de reprodutores de *N. nodosus*, proporcionou um efeito positivo no rendimento larval.

6. Agradecimentos

Agradecemos ao FINEP, FAPESC e CNPq pelo apoio financeiro e à CAPES/UFSC pela bolsa de Doutorado.

7. Referências

- Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Watanabe, T., 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. *Fish Shellf. Immunol.* 16, 527-537.
- Camus, L., Jones, M.B., Børseth, J.F., Grøsvik, B.E., Regoli, F., Depledge, M.H., 2002. Total oxyradical scavenging capacity and cell membrane stability of haemocytes of the Arctic scallop, *Chlamys islandicus*, following benzo(a)pyrene exposure. *Mar. Environ. Res.* 54, 425–430.
- Camus, L., Jones, M.B., Børseth, J. F., Grøsvik, B.E., Regoli, F., Depledge, M.H., 2002. Total oxyradical scavenging capacity and cell membrane stability of haemocytes of the Arctic scallop, *Chlamys islandicus*, following benzo(a)pyrene exposure. *Marine Environmental Research* 54, 3-5, 425-430.
- Chien, Y.H. and Jeng, S.C., 1992. Pigmentation of kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels feeding regimes. *Aquaculture* 102, 333–346.
- Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C., Guillaume, J., 2004. Nutricion of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture* 235, 513-551.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quéré, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C., Samain J.F., 2003. Effect of a monospecific algal diet on immune functions in two bivalves species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Biol.* 206, 3053-3064.
- Edge, R. Mcgarvey, D.J., Truscott, T.G., 1997. The carotenoids as anti-oxidants – a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology* 41, 189-200.
- Guillard, R.R.L., Lorenzen, C.J., 1972. Yellow-green algae with chlorophyllid-c. *Journal of Phycology* 8, 10-14.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., 2005. Time-dependent changes in emocytes of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, and northern bay scallops, *Argopecten irradians irradians*, exposed to a cultured strain of *Prorocentrum minimum*. *Harm. Algae* 4, 187–199.
- Hine, P. M., 1999. The inter-relationship of bivalve haemocytes Review. *Fish Shelf. Immunol.* 9, 367-385.
- Howell, B.K. and Matthews, A.D., 1991. The carotenoids of wild and blue disease affected farmed tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricus). *Comparative Biochemistry and Physiology* 98B, 375-379.
- Kobayashi, M. and Sakamoto, Y., 1999. Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green algae *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Lett.* 21, 265–269.
- Lorenz, T., 1998. A Review of the Carotenoid, Astaxanthin, as a Pigment and Vitamin Source for Cultured *Penaeus* Prawn. *NatuRose™ Technical Bulletin*, nº 051 (www.cyanotech.com).
- Meyers, P. S. 1994. Developments in World aquaculture, feed formulation and role of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry* 66, 1069-1076.
- Miki, W., 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure & Appl. Chem.* 63, 141-146.
- Naguib, Y. M. A., 2000. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1150–1154.
- Padula, M., 1999. Degradação de β -caroteno e cantaxantina em sistema-modelo de baixa umidade à temperatura ambiente. Formação de produtos não voláteis e voláteis. Tese de Mestrado, UNICAMP, Campinas-SP.

Rengel, D., Diez-Navajas, A., Serna-Rico, A., Veiga, P., Muga, A., Milicua, J. C. G., 2000. Exogenously incorporated ketocarotenoids in large unilamellar vesicles. Protective activity against peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1463, 179–187.

Roch, P., 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrate. *Aquaculture* 172, 125-145.

Rodriguez-Amaya, D., 1997. Carotenóides: estruturas, propriedades e funções. *Ciência de Alimentos-Avanços e perspectivas na América Latina*. Campinas: Fundação Cargill. Cap. 3, p 20-31.

Rupp, G.S., 1994. Obtenção de reprodutores, indução à desova e cultivo larval e pós-larval de *Nodipecten nodosus* (Linnaeus,1758) (Bivalvia:Pectinidae). Florianópolis: UFSC: 1994. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, 125 pp.

Rupp, G. S., Thompson, R. J. and Parsons G. J., 2004. Influence of food supply on postmetamorphic growth and survival of hatchery-produced lion's paw scallop, *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758). *Journal of Shellfish Research* 23, 1, 5-13.

Schleder, D.D., Kayser, M., Sühnel, S., Ferreira, J.F., Rupp, G.S., Barraco, M.A. Evaluation of hemato-immunological parameters during the reproductive cycle of the scallop *Nodipecten nodosus* in association with a carotenoid-enriched diet. *Aquaculture* (2008), doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.05.001

Sühnel, S., Lagreze, F., Ferreira, J.F., Campestrini, L. H., Maraschin, M., *in press*. Carotenoid extraction from the gonad of the scallop *Nodipecten nodosus* (Bivalvia; Pectinidae). *Brazilian Journal of Biology*, accepted in 2008.

Sühnel, S., Lagreze, F., Bercht, M. Ferreira, J.F., Schaefer, A.L.C., Magalhães, A.R.M., Maraschin, M., dados ainda não publicados. The relations between the reproductive cycle, astaxanthin levels and gonadic maturation in the scallop *Nodipecten nodosus* (Bivalvia; Pectinidae). *Brazilian Journal of Biology*. Enviado em julho de 2008.

Vargas-Albores, F. and Barraco, M. A., 2001. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos con énfasis en pectínidos. *In: MAEDA-MARTÍNEZ A. N. Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura*. La Paz: Limusa, p.127-140.

Zar, J. H., 1974. *Biostatistical analysis*. S.A.: Prentice-Hall, 357 pp.

Tabela 1. Descrição da composição das dietas utilizada em cada tratamento testado indicando as diferentes composições em dieta basal (microalgas viva: *Isochrysis sp.*, *Chaetoceros muelleri* e *Skeletonema sp.* nas proporções 50:25:25, respectivamente) e em microalga seca *Haematococcus pluvialis* (NatuRose®).

Nome dos tratamentos	Composição
NatuRose0%	100% dieta basal (controle)
NatuRose50%	50% dieta basal e 50% de NatuRose®

Tabela 2. Quantidade de fêmeas que emitiram gametas e média e desvio padrão (em três contagens) da quantidade de: oócitos eliminados, larvas “D” (24h) obtidas e rendimento de larvas pedivéliger (com 13 dias de larvicultura) para *N. nodosus*. As letras minúsculas na tabela representam as diferenças estatísticas.

Tratamentos	Número de fêmeas que desovaram	Total de oócitos eliminados	Quantidade de larvas “D” (%)	Rendimento de larvas pedivéliger (%)
NatuRose0%	6	7.366.645 ± 55,56 ^a	13,93 ± 2,03 ^a	0,66 ± 0,57 ^a
NatuRose50%	14	22.082.918 ± 122,07 ^b	34,96 ± 1,55 ^b	4,28 ± 0,42 ^b

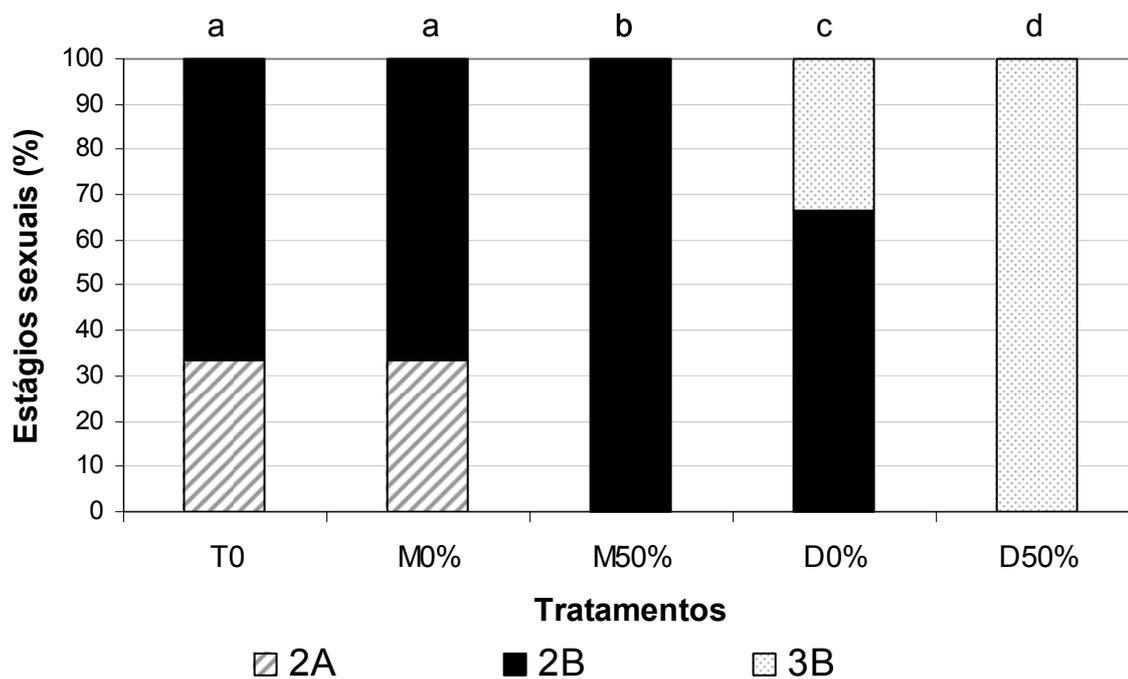


Figura 1. Estágios sexuais da porção feminina da gônada da vieira *N. nodosus* no início da maturação (T_0) ; após quinze dias de maturação, para os tratamentos NatuRose0% (M0%) e NatuRose50% (M50%); após desova, para os tratamentos NatuRose0% (D0%) e NatuRose50% (D50%). Onde: (2A) estágio de pré-desova inicial; (2B) estágio de pré-desova avançada e (3B) estágio de desova avançada. As letras minúsculas no gráfico representam as diferenças estatísticas.

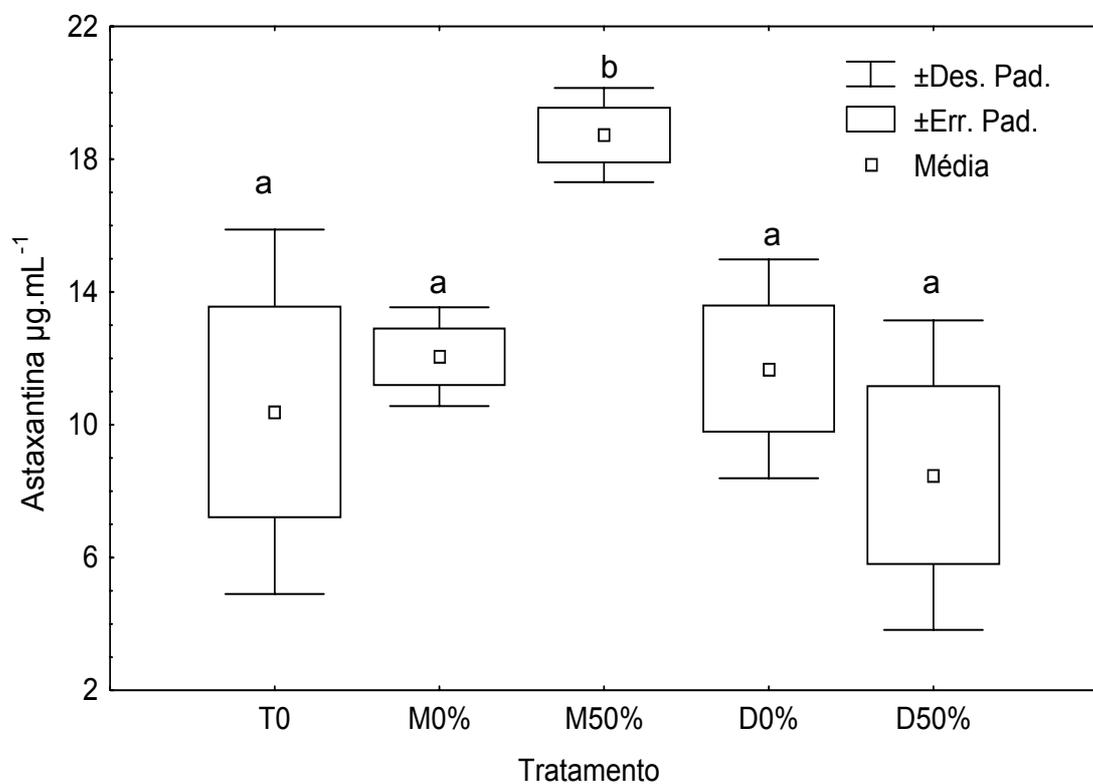


Figura 2. Média, desvio padrão e erro padrão da quantidade de astaxantina na porção feminina da gônada de *N. nodosus* no início da maturação (T_0); após maturação de 15 dias em laboratório para os tratamentos NatuRose0% (M0%) e NatuRose50% (M50%) e, após desova para os tratamentos NatuRose0% (D0%) e NatuRose50% (D50%). As letras minúsculas no gráfico representam as diferenças estatísticas.

CAPÍTULO VII – Efeito de dietas enriquecidas com os ácidos graxos EPA e DHA durante a maturação de reprodutores, sobre o rendimento larval e de pré-sementes de *Nodipecten nodosus* (L. 1758)

Revista à qual será enviado para publicação: Aquaculture

Efeito de dietas enriquecidas com os ácidos graxos EPA e DHA durante a maturação de reprodutores, sobre o rendimento larval e de pré-sementes de *Nodipecten nodosus* (L. 1758).

Simone Sühnel^{1*}, Francisco Lagreze¹, Guilherme Zanette¹, Mirella da Silva Scardua², Eduard Kraffe³, Philippe Soudant⁴, Jaime Fernando Ferreira¹.

¹Laboratório de Moluscos Marinhos/UFSC, Servidão dos Coroas s/n, Barra da Lagoa, Florianópolis/SC-Brasil Cep.88061-600

²Laboratório de Imunologia Aplicada à Aqüicultura/UFSC
C.P. 476, Florianópolis/SC-Brasil Cep. 88040-900

³UMR CNRS 6521, Université de Bretagne Occidentale, CS 3837, Brest 29238, France

⁴Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

(*)Autor para correspondência: Simone Sühnel

Laboratório de Moluscos Marinhos - UFSC

Servidão dos Coroas s/n, Barra da Lagoa, Florianópolis/SC-Brasil Cep. 88061-600

e-mail: ssuhnel@gmail.com

Telefone: (55) (48) 3232 3279

Resumo

Neste estudo foi testado o enriquecimento da dieta de reprodutores da vieira *Nodipecten nodosus* com os ácidos graxos EPA e DHA durante a maturação em laboratório. Para isto, os animais foram induzidos a eliminação de gametas para então serão acondicionados em tanques para maturação durante 30 dias, submetidos a 5 tratamentos: (1) Cm100%, (2) Cm+DHA, (3) T-Iso100%, (4) T-Iso+EPA e (5) Mix (mistura das microalgas *Isochrysis sp.*, *Chaetoceros muelleri* e *Skeletonema sp.*, nas proporções 50:25:25, respectivamente). Após o período de maturação, os animais foram induzidos a desova para produção de larvas seguido do assentamento. Foi avaliado o estágio sexual (histologia), eliminação de gametas e rendimento larval e de pré-sementes. Nos resultados obtidos, o tratamento T-Iso+EPA apresentou 100% de maturação, estágio 2B (pré-desova avançada), maior rendimento em larvas "D", pedivéliger e pré-sementes. A quantidade de oócitos liberados não apresentou relação com o estágio sexual dos reprodutores. Estes resultados indicam que a maturação com a dieta T-Iso+EPA proporcionou um efeito positivo na maturação dos reprodutores, assim como um maior rendimento larval e de pré-sementes em laboratório.

Palavras Chave: *Nodipecten nodosus*, maturação, enriquecimento de dieta, sobrevivência larval, ácido graxos EPA e DHA.

1. Introdução

A maturação de reprodutores é uma etapa importante no processo de produção de sementes de bivalves em laboratório. Esta maturação é usualmente atingida com a manipulação de regimes alimentares e da temperatura da água durante a maturação (Wilson et al., 1996).

Os moluscos bivalves apresentam ciclos estacionais de armazenamento de energia, o qual é regulado por fatores exógenos e endógenos. A energia é armazenada pelos animais durante períodos não reprodutivos sendo usada subsequente, de acordo com Barber and Blake (1985a, 1985b) e Bayne (1985) para: (a) suporte e a manutenção quando o alimento é escasso; (b) produzir um incremento líquido em massa em outros períodos do ano; (c) substituir perda de massa em outros períodos do ano; (d) produzir gametas.

A maturação de reprodutores de bivalves em laboratório procura a maximização da fecundidade, mantendo a qualidade dos ovos e a viabilidade larval (Utting and Millican, 1997). A qualidade das dietas fornecida aos reprodutores explica uma grande parte da variabilidade experimental durante o cultivo de bivalves. Bem como, afeta a composição dos gametas e a qualidade das larvas (Nevejan et al., 2003).

Segundo Utting and Millican (1997), as reservas de alimento antes de entrar no processo de vitelogenese são fundamentais. Estes autores também relatam que um melhor estado nutricional aumenta a fecundidade e a qualidade dos ovos produzidos. Uriarte et al. (2001) citam que existe um efeito do estado nutricional dos reprodutores na qualidade das larvas resultantes.

As reservas de energia, armazenadas nos oócitos, são catabolisadas no desenvolvimento embrionário (oócitos fertilizados) até a larva "D". Contudo, o catabolismo de energia ocorre para manter a larva durante o estágio transitório de consumidor endógeno para exógeno (Whyte et al., 1990). A sobrevivência de larvas de *Mercenaria mercenaria* e *Crassostrea virginica* está correlacionada com as reservas de lipídeos totais depositados nos oócitos durante a vitelogenese (Gallager and Mann, 1986).

Segundo Bayne et al. (1975), o desenvolvimento das larvas de *Mytilus edulis* esta correlacionado com o nível de lipídeos nos oócitos antes de serem fertilizados. A viabilidade das larvas de *Ostrea edulis* esta relacionada com o conteúdo lipídico, particularmente a fração lipídica neutral, no momento da liberação dos oócitos (Helm et al., 1973).

Diferentes qualidades de conteúdo lipídico, utilizadas em dietas na maturação de reprodutores, mostraram os efeitos das deficiências de ácidos graxos específicos em oócitos e larvas de bivalves (Utting and Doyou 1992; Millican and Helm 1994; Soudant et al. 1996a). Os ácidos graxos essenciais poli-insaturados (PUFAs) docosahexaenóico 22:6n-3 (DHA) e eicosapentaenóico 20:5n-3 (EPA) são importantes no crescimento e na sobrevivência de moluscos (Trider and Castell, 1980; Knauer and Southgate, 1997). Contudo, os moluscos bivalves não tem a capacidade de sintetizar os PUFAs (Chu and Greaves, 1991), os quais são adquiridos através da dieta.

O presente estudo testou a utilização de dois tipos de ácidos graxos no condicionamento de reprodutores de *Nodipeecten nodosus* em laboratório e seus efeitos na maturação, eliminação de gametas e rendimento larval e de pré-sementes.

2. Materiais e Métodos

O experimento de maturação de reprodutores e subsequente lavicultura e assentamento foram realizados no Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM/UFSC), localizado na Barra da Lagoa/Florianópolis e as análises histológicas no Núcleo de Estudos de Patologia em Aqüicultura (NEPA/UFSC).

2.1 Delineamento experimental

Neste trabalho foi testado o enriquecimento da dieta de reprodutores de *N. nodosus*, durante a maturação, com os ácidos graxos livres, docosahexaenóico (DHA) 22:6n-3 e eicosapentaenóico (EPA) 20:5n-3, produzidos comercialmente pela Société Polaris (França).

Foram testados 5 tratamentos (Tabela 1) com 3 repeti  es cada, totalizando 15 unidades experimentais. Todos os tratamentos receberam a mesma quantidade diária de microalga ($2,38 \times 10^{10}$ células.10 animais⁻¹.tanque⁻¹) variando somente o tipo de microalga usada. Um dos tratamentos recebeu uma dieta composta pela mistura de microalgas das espécies *Isochrysis sp.* (T-Iso), *Chaetoceros muelleri* (Cm) e *Skeletonema sp.* (Sk), nas propor  es 50:25:25, respectivamente (dieta utilizada pelo Laboratório Moluscos Marinhos). Dois dos tratamentos receberam dietas unialgais, de *Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis sp.* e os dois últimos tratamentos receberam, cada qual, um tipo de ácido graxo e uma dieta com uma microalga que o carece, sendo uma a microalga *C. muelleri* e o ácido graxo DHA e a outra a microalga *Isochrysis sp.* e o ácido graxo EPA. A quantidade de ácidos graxos utilizada foi adaptada dos trabalhos publicados em ostras *Crassostrea gigas* (Delaporte et al. 2006, 2007). No presente trabalho, foram administrados 17 mg de ácido graxo livre por tanque.10 animais⁻¹.dia⁻¹ (de cada um dos ácidos graxos).

Estas microalgas foram cultivadas no meio Guillard F/2 modificado no LMM, em água filtrada e esterilizada, aera  o contínua filtrada, temperatura de 22   C e um regime de luz de 24 h. As microalgas foram utilizadas na fase exponencial de crescimento.

2.2 Matur  o de reprodutores

Os reprodutores (70-75 mm de altura e 18 meses de idade) cultivados em espinhel, a 2 m de profundidade, foram coletados na área de cultivo experimental da EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural), localizada em Santa Catarina (SC), região sul do Brasil, na praia do Canto Grande, Bombinhas (27  12'5,39"S e 48  30'47,7"N). Os animais foram imediatamente transportados em caixas de isopor, com água do mar a 23   C, para o laboratório. No laboratório, foram retirados os organismos incrustantes e os animais foram induzidos    desova por diferença de temperatura, com água do mar tratada com UV, para então serem aclimatados por 12 horas (*overnight*) e após isto serem acondicionados nos tanques de matur  o para início do experimento. O experimento de matur  o teve dura  o de trinta dias (T_{30}).

Foram utilizados tanques de 15 L, em triplicata para cada tratamento, com 10 animais.tanque⁻¹, aera  o constante e fluxo contínuo aberto de entrada de água do mar a uma vazão de 333 mL.min⁻¹ por animal e para alimento de 33 mL.min⁻¹ por animal. Os tanques de matur  o não foram limpos durante o experimento. A temperatura da água manteve-se em $20,0 \pm 0,4$   C.

Os tanques utilizados para o alimento (microalgas) foram limpos diariamente e renovado o alimento para cada tratamento. Após este manejo o fluxo de entrada de água e de alimento em cada tanque, utilizados no experimento para maturação, era regulado conforme os valores descritos acima.

A adição do ácido graxo nos tratamentos era realizada fechando o sistema de água e de alimentação dos tanques de maturação, adicionado o ácido graxo e mantido o sistema de água e alimentação fechado por 1 hora para todos os tanques, inclusive os que não testaram o ácido graxo. Após este período, o sistema de água e de alimentação era aberto e regulado o fluxo de entrada.

2.3 Eliminação de gametas

A técnica de indução à desova e fecundação utilizadas no presente estudo são de acordo com Rupp (1994) e Rupp et al. (2004) e adaptada pelo LMM, que consistem basicamente em: estresse por retirada de organismos incrustantes das valvas, exposição à água com UV e variação da temperatura da água nos tanques de indução de 20 °C para 24 °C. O tempo de indução a desova foi fixado em uma hora.

Assim que os animais iniciaram a liberação dos gametas estes foram separados em baldes de 2 L, para desova. Cada tratamento foi subdividido em A e B para a fecundação cruzada dos gametas dentro de cada tratamento, a qual foi realizada ao longo da desova. O gameta feminino era quantificado, fecundado e mantido em tanques separados por tratamento para o desenvolvimento larval.

2.4 Obtenção de larva “D” e Larvicultura

O cultivo larval foi desenvolvido de acordo com Rupp (1994) e Rupp et al. (2004) e adaptado pelo LMM, que consiste basicamente na transferência dos embriões para os tanques de larvicultura; trocas de águas a cada 48 horas; peneiramento com diferentes tamises para repicagem e eliminação de larvas mortas; alimentação diária com microalgas e temperatura da água controlada, variando de 23 a 24 °C, não foi utilizado antibiótico.

Para cada tratamento foi realizada a sua respectiva larvicultura individualmente, em triplicata, em tanques de 14 L. A densidade inicial nos tanques de larvicultura foi de 100 oócitos.mL⁻¹ no primeiro dia e no segundo repicada para 5 larvas.mL⁻¹ (larvas “D”). Os cultivos foram mantidos com aeração constante e fraca.

A espécie de microalga oferecida no segundo dia de larvicultura foi a *Isochrysis sp.* variedade *Tahit* (T-Iso) na concentração de 0,5x10⁴ cél.mL⁻¹. A partir do terceiro dia: T-Iso, *Pavlova sp* (*Pav*) e *Chaetoceros calcitrans* (*Cc*), nas proporções 35:35:30, respectivamente, a uma concentração de 1x10⁴ cél.mL⁻¹. A partir do quinto dia: T-Iso, *Pav* e *Cc*, nas proporções 30:20:50, respectivamente, a uma concentração de 2x10⁴ cél.mL⁻¹. Estas microalgas foram cultivadas no meio Guillard F/2 modificado no LMM, em água filtrada e esterilizada, aeração contínua filtrada, temperatura de 22 °C e um regime de luz de 24 h. As microalgas foram utilizadas na fase exponencial de crescimento.

A avaliação do rendimento das larviculturas foi realizada com 24 horas (larva “D”) e com 13 dias (larva pedivéliger) para os três experimentos.

2.5 Assentamento

Foi realizado o assentamento das larvas, desenvolvido conforme técnicas utilizadas pelo Laboratório LMM. As larvas utilizadas para o assentamento foram selecionadas por malha 125 e 145 micras (com pé ativo e presença de mancha ocular) no 13º dia de larvicultura. Para o assentamento foram utilizados coletores de malha *netlon* com folhas de pinus (*Pinus sp*) (Zanette 2007) em seu interior. Os coletores foram previamente aclimatados, por 13 dias com o mesmo tratamento dado as larvas durante a larvicultura, adicionando microalgas aos mesmos, conforme metodologia descrita por Zanette (2007). As larvas selecionadas foram colocadas nos tanques de assentamento já contendo os coletores previamente aclimatados, na densidade de 0,71 larvas.mL⁻¹ e mantido o volume de 14 L de água do mar com aeração constante; trocas de águas a cada 48 horas; alimentação diária com microalgas e temperatura da água controlada, variando de 23 a 24 °C.

As espécies de microalgas oferecidas foram: *Isochrysis sp.* variedade *Tahit* (T-Iso), *Pavlova sp.* (Pav) e *Chaetoceros calcitrans* (Cc), nas proporções 30:50:20, respectivamente, a uma concentração inicial de 3x10⁴ cél.mL⁻¹ uma vez por dia.

A avaliação do rendimento do assentamento foi realizada com 15 dias (Sühnel, 2002) de assentamento.

2.6 Avaliação do efeito das dietas

Após a maturação de 30 dias (T₃₀), para cada tratamento foi separado um lote para histologia da porção feminina da gônada (n=4) e outro para desova (n=6).

Após a desova foi avaliada a eliminação de gametas e o rendimento larval de larvas “D” (com 24 horas de larvicultura), pedivéliger (com 13 dias de larvicultura) e pré-sementes.

Para análise futura, também foi coletada amostra de hemolinfa para avaliação dos parâmetros hemato-imunológicos, que serão apresentados em outro trabalho e não farão parte desta Tese. Bem como, um lote de animais para análise bioquímica do músculo, da gônada e das brânquias, a ser avaliada até o final de 2009 e que não farão parte desta Tese, mas sim deste paper a ser submetido à publicação.

Análise histológica

A análise histológica foi realizada na porção feminina da gônada dos reprodutores maturados em cada tratamento testado.

Os cortes foram fixados em solução de Davidson e armazenados em álcool 70%. Após diferentes banhos em álcool etílico (de 70 a 100%), xilol e parafina, foram então montados em blocos de parafina.

Os blocos contendo as amostras de gônada foram cortados a 5 µ. As lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris e Eosina.

Para a identificação dos estágios de maturação foram realizadas duas avaliações por dois identificadores, aleatoriamente e sem tendência. A descrição dos estágios foi realizada individualmente, pela análise microscópica com aumento de 200 e 400 vezes.

Foi padronizada uma pontuação para cada estágio sexual de 1 a 6 (Capítulo IV).

A determinação do estágio sexual segue padrão definido no Capítulo IV, os quais definem quatro estágios de maturação (1-gametogênese; 2A-pré-desova inicial; 2B-pré-desova avançada; 3A-desova inicial; 3B-desova avançada; e 4-reposo) de acordo com as características histológicas da gônada da vieira *N. nodosus*.

2.7 Análise estatística

Para comparação entre os tratamentos, os parâmetros avaliados, estágio sexual, quantidade total de gametas eliminados por cada tratamento, sobrevivência de larvas “D” e pedivéliger e sobrevivência de pré-sementes foi realizada a análise descritiva, avaliação de normalidade dos erros e de homogeneidade de variância (Bartlett). Análise de variância múltipla (ANOVA) e de separação de médias com Teste Tukey para a comparação entre as médias (Zar, 1974). Utilizando programa *Statística* versão 5. Para os resultados com porcentagem (estágios sexuais, sobrevivência de larvas “D”, pedivéliger e pré-sementes) o valor absoluto foi transformado em Arcoseno para então ser aplicado o teste estatístico.

3. Resultados

3.1. Estágios sexuais

O estágio sexual para os reprodutores (Figura 1) em T_0 , foi 75% em gametogênese (estágio 1) e 25% em pré-desova inicial (estágio 2A) e apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) dos tratamentos T-Iso100%, T-Iso+EPA e do Mix. No tratamento Cm100% os reprodutores apresentaram o mesmo estágio sexual que em T_0 . Já o tratamento Cm+DHA não apresentou diferença significativa dos demais tratamentos, estando os reprodutores 75% em estágio de pré-desova inicial (estágio 2A) e 25% em pré-desova avançada (estágio 2B). O tratamento T-Iso100% apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) de T_0 , Cm100% e Cm+DHA, estando 50% dos animais em estágio pré-desova inicial (estágio 2A) e 50% em pré-desova avançada (estágio 2B). Já o tratamento T-Iso+EPA apresentou 100% dos animais em estágio de pré-desova avançada (estágio 2B), sendo diferentes significativamente ($p < 0,05$) de T_0 , Cm100% e Cm+DHA. O tratamento Mix também apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) de T_0 , Cm100% e Cm+DHA, estando 75% dos animais em estágio de pré-desova avançada (estágio 2B) e 25% em estágio de pré-desova inicial (estágio 2A).

3.2. Eliminação de gametas, rendimento larval e de pré-sementes

A porcentagem de fêmeas que desovaram foi de 100% para os tratamentos Cm100%, T-Iso+EPA e Mix, seguido de 83,3% para o tratamento T-Iso100% e de 66,6% para o tratamento Cm+DHA (Tabela 2).

Para a eliminação de gametas (Tabela 2), houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os tratamentos testados. O tratamento Mix foi o tratamento que mais eliminou oócitos, ($31.250.000 \pm 26,00$ oócitos), seguido do tratamento Cm100% ($29.162.500 \pm 96,44$ oócitos), o terceiro tratamento foi o tratamento T-Iso100% ($13.325.000 \pm 13,50$ oócitos), o quarto foi o Cm+DHA ($11.566.666 \pm 91,50$ oócitos) e o com menor eliminação de oócitos foi o tratamento T-Iso+EPA ($8.516.500 \pm 8,50$ oócitos).

Para as diferentes dietas testadas na maturação dos reprodutores a recuperação de larvas "D", com 24 horas de larvicultura, (Figura 2), observou-se que o tratamento T-Iso+EPA apresentou a maior porcentagem de recuperação ($97,62 \pm 2,18\%$) apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) em relação os demais tratamentos. A segunda melhor porcentagem de recuperação de larvas "D" foi do tratamento Cm+DHA ($82,38 \pm 0,82\%$) apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) em relação os demais tratamentos. A terceira melhor recuperação de larvas "D" foi par ao tratamento Mix ($36,00 \pm 2,00\%$), o qual também apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) dos demais tratamentos. Os tratamentos T-Iso100% ($30,48 \pm 2,18\%$) e Cm100% ($28,09 \pm 0,48\%$), não apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$).

Para as diferentes dietas testadas na maturação dos reprodutores a recuperação de larvas pedivéliger, com 13 dias de larvicultura, (Figura 2), observou-se que o tratamento com melhor resultado foi também o T-Iso+EPA ($99,05 \pm 2,86\%$), sendo diferente significativamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos. O segundo melhor tratamento também foi o Cm+DHA ($73,33 \pm 4,36\%$) e apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) dos demais tratamentos. O terceiro tratamento foi o T-Iso100% ($56,19 \pm 4,36\%$) não apresentando diferença significativa do tratamento Mix ($52,38 \pm 1,65\%$). O tratamento com menor porcentagem de recuperação foi o Cm100% ($27,14 \pm 3,91\%$) de sobrevivência e apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) dos demais tratamentos.

Para as diferentes dietas testadas na maturação dos reprodutores a recuperação de pré-sementes, com 15 dias de assentamento, (Figura 2), observou-se que todos os tratamentos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si. O tratamento que apresentou maior porcentagem de recuperação foi, novamente, o T-Iso+EPA ($42,71 \pm 0,27\%$). O segundo melhor tratamento, na recuperação de pré-sementes, foi o Cm+DHA ($36,21 \pm 0,79\%$). O terceiro tratamento, o T-Iso100% ($28,78 \pm 0,51\%$). O quarto tratamento, o Mix ($21,33 \pm 0,76\%$) e a menor porcentagem de recuperação o tratamento Cm100% ($17,68 \pm 0,80\%$).

4. Discussão

A maturação gonádica é um processo que requer alto gasto energético (Barber and Blake, 1991), a manipulação de regimes alimentares e da temperatura da água (Wilson et al., 1996) é fundamental para o sucesso da reprodução em laboratório.

No presente estudo, o enriquecimento da dieta de reprodutores com o ácido graxo 20:5n-3 (EPA) favoreceu a maturação gonádica feminina. Por outro lado, em trabalho desenvolvido por Velasco e Barros (2007), a adição de emulsão de lipídeos na dieta de reprodutores de *N. nodosus* em laboratório apresentou um efeito negativo no desenvolvimento gonádico.

Segundo Barber e Blake (1985a) e Bayne (1985), para espécies de clima temperado, a energia armazenada pelos animais durante períodos não reprodutivos é utilizada, subsequentemente para a manutenção, quando o alimento é escasso, e para a produção de gametas.

Segundo Utting e Millican (1997), as reservas de alimento antes de entrar no processo de vitelogênese são fundamentais. Durante a vitelogênese, os oócitos adquirem suas reservas de lipídeos de três fontes principais: (a) do músculo adutor, no qual o glicogênio é convertido em lipídeo. (Bayne et al., 1982; Barber e Blake 1985a, 1985b); (b) da transferência de lipídeos das reservas na

glândula digestiva para a gônada feminina (Barber e Blake 1981,1985a); (c) diretamente do alimento quando os adultos são colocados sob estresse nutricional (Gallager e Mann 1986; Soudant et al. 1996b). Se o animal encontra-se sobre estresse alimentar e com uma dieta insuficiente em lipídeos, o processo de vitelogenese pode ser comprometido.

Observou-se neste estudo que o estágio sexual dos animais não determina que ele vá eliminar mais gametas, pois no tratamento T-Iso+EPA 100% dos reprodutores apresentaram estágio de pré-desova avançada (estágio 2B), contudo foi o tratamento que menos eliminou gametas. Já o tratamento Cm100% que apresentou 75% dos animais em estágio de gametogênese (estágio 1) eliminou 3,4 vezes mais oócitos que o tratamento T-Iso+EPA.

Estes resultados indicam que a quantidade de oócitos liberados durante a desova através de indução em laboratório não está relacionada com o estágio sexual, mas sim com outros fatores endógenos que precisam ser estudados.

Nos resultados de sobrevivência larval o maior rendimento foi observado para os tratamentos que foram enriquecidos com ácido graxo, sendo o melhor resultado para T-Iso+EPA e o segundo melhor para Cm+DHA. Estes resultados indicam que o enriquecimento da dieta dos reprodutores com ácidos graxos favoreceu a sobrevivência das larvas, tanto de larvas “D” quanto de larvas pedivéliger.

Estes resultados corroboram as informações de Uriarte et al. (2001), que citam que existe um efeito do estado nutricional dos reprodutores e a qualidade das larvas resultantes.

As reservas de energia, armazenadas nos oócitos, são catabolisadas no desenvolvimento embrionário (oócitos fertilizados) até a larva “D”. Whyte et al. 1990 cita que, para espécies de clima temperado, o catabolismo de energia ocorre para manter a larva durante o estágio transitório de consumidor endógeno para exógeno. Contudo, neste estudo observou-se que até o assentamento das larvas foi observada diferença significativas no rendimento das pré-sementes originadas a partir de reprodutores alimentados com dieta enriquecida com o ácido graxo 20:5n-3 (EPA) e com o ácido graxo 22:6n-3 (DHA).

O autor Palacios et al. (2005), sugere que o suprimento do ácido 22:6n-3 durante a maturação de *Nodipecten subnodosus* vem direto da dieta e não de reservas na glândula digestiva. Indicando a importância de fornecer uma dieta rica em ácidos graxos para a maturação de pectinídeos em laboratório.

A sobrevivência de larvas de *Mercenaria mercenaria* e *Crassostrea virginica* (Gallager e Mann, 1986) e de *Mytilus edulis* (Bayne et al., 1975), está correlacionada com as reservas de lipídeos totais depositados nos oócitos durante a vitelogenese e antes de serem fertilizados. A viabilidade das larvas de *Ostrea edulis* (Helm et al., 1973) esta relacionada com o conteúdo lipídico, particularmente a fração lipídica neutral, no momento da liberação dos oócitos.

Diferentes qualidades de conteúdo lipídico, utilizadas em dietas na maturação de reprodutores, mostraram os efeitos das deficiências de ácidos graxos específicos em oócitos e larvas de bivalves (Utting e Doyou 1992; Millican e Helm 1994; Soudant et al., 1996a).

Os ácidos graxos docosahexaenóico (DHA) 22:6n-3 e eicosapentaenóico (EPA) 20:5n-3 são importantes no crescimento e na sobrevivência de moluscos (Trider e Castell, 1980). O ácido graxo 20:5n-3 (EPA) nos moluscos está relacionada à reserva de energia durante a embriogênese (fonte de

energia) e seu conteúdo máximo no animal está ligado às funções específicas das membranas mediadas por alguns fosfolipídeos (Soudant et al., 1996b; Hall et al., 2002). Robinson (1992) cita que ácido graxo EPA, em moluscos bivalves, afeta a qualidade da desova e que este ácido graxo é o mais abundante durante a metamorfose. Já o ácido graxo 22:6n-3 (DHA) tem função, além de fonte de energia, estrutural (Helm et al., 1991; Marty et al., 1992).

É importante destacar, que deve ser considerada a relação entre estes dois ácidos graxos, o que justifica os bons resultados obtidos no presente estudos para os enriquecimentos, onde a microalga *Isochrysis sp.* por apresentar baixos níveis de EPA, foi enriquecida com o ácido graxo EPA e a *C. muelleri*, que apresenta carência em DHA, foi enriquecida com o ácido graxo DHA. O autor Nevenjan et al. (2003) cita que a relação entre os ácidos graxos DHA e EPA (DHA:EPA aproximadamente 1:2, respectivamente) é mais importante que os níveis absolutos dos dois ácidos graxos.

Estes resultados indicam que para a maturação de *N. nodosus* em laboratório é indicado o uso de enriquecimento da dieta com ácidos graxos, sendo os melhores resultados para uma dieta composta pela microalga *Isochrysis sp.* e enriquecida com o ácido graxo EPA (20:5n-3).

5. Conclusão

A dieta composta pela microalga *Isochrysis sp.* e enriquecida com o ácido graxo EPA proporcionou uma completa maturação dos reprodutores e apresentou melhores rendimentos de larvas “D” e pedivéliger, assim como de pré-sementes de *N. nodosus*.

A quantidade de oócitos liberados durante a desova não está relacionada com o estágio sexual dos reprodutores, mas sim com outros fatores que precisam ser avaliados.

6. Agradecimentos

Agradecemos ao FINEP, FAPESC e CNPq pelo apoio financeiro e a CAPES/UFSC pela bolsa de Doutorado. Somos extremamente gratos à empresa Société Polaris (França) pelos ácidos graxos EPA e DHA utilizados neste estudo.

7. Referências

- Barber B.J. and Blake N.J., 1981. Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 52, 121–134.
- Barber, B.J. and Blake N.J., 1985a. Intra-organ biochemical transformations associated with oogenesis in the bay scallop *Argopecten irradians concentricus* (Say) as indicated by C14 incorporation. Biol. Bull. (Woods Hole) 168, 39–49.
- Barber B.J. and Blake N.J., 1985b. Substrate catabolism related to reproduction in the bay scallop *Argopecten irradians concentricus*, as determined by O/N and RQ physiological indexes. Mar. Biol. 87, 13–18.
- Barber, B.J. and Blake, N.J., 1991. Reproductive physiology. In: Shumway, S.E. Scallop: biology, ecology and aquaculture, Elsevier Amsterdam pp.
- Bayne B.L., Gabbott P.A. and Widdows J., 1975. Some effects of stress in the adult on the eggs and larvae of *Mytilus edulis* L. J. Mar. Biol. Assoc. UK 55, 675–689.
- Bayne B.L., Bubel A., Gabbott P.A., Livingstone D.R., Lowe D.M. and Moore M.N., 1982. Glycogen utilization and gametogenesis in *Mytilus edulis* L. Mar. Biol. Lett. 3, 89–105.
- Bayne, B.L., 1985. Ecological consequences of stress. In: Bayne B.L., Brown D.A., Burns K., Dixon D.R., Ivanovici A., Livingstone D.R., Lowe D.M., Moore M.N., Stebbing A.R.D., Widdows J (eds) The effects of stress and pollution on marine animals. Praeger, New York, p. 141–157.
- Chu, F.L.E. and Greaves, J., 1991. Metabolism of palmitic, linoleic and linolenic acids in adult oyster, *Crassostrea virginica*. Mar. Biol. 110, 229-236.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Giudicelli, E., Lambert C., Séguineau, C., Jean-François Samain, J-F., 2006. Impact of 20:4n-6 Supplementation on the Fatty Acid Composition and Hemocyte Parameters of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. Lipids 41, 6, 567-576.
- Delaporte, M., Chu, F-L., Langdon, C., Moal, J., Lambert C., Jean-François Samain, J-F., Soudant, P., 2007. Changes in biochemical and hemocyte parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed T-Iso supplemented with lipid emulsions rich in eicosapentaenoic acid. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 343, 261–275.
- Gabbott, P.A., 1975. Storage cycles in marine bivalve molluscs. A hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. In: Proceedings of the 9th European Marine Biology Symposium. Aberdeen University Press, Aberdeen 191–211.
- Gallager, S.M., Mann, R., 1986. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. Aquaculture 56, 105–121.
- Guillard, R.R.L., Lorenzen, C.J., 1972. Yellow-green algae with chlorophyllid-c. Journal of Phycology 8, 10-14.
- Hall, J.M., Parrish, C.C. and Tompson, R. J., 2002. Eicosapentaenoic acid regulated scallop (*placopecten magellanicus*) membrane fluidity in response to cold. Biol. Bull. 202, 201-203.
- Helm, M.M.; Holland, D.L.; Stephenson, R.R., 1973. The effect of supplementary algal feeding of a hatchery breeding stock of *Ostrea edulis* L. on larval vigour. J Mar Biol Assoc UK v. 53 p. 673–684.
- Knauer, J. and Southgate, P.C., 1997. Growth and fatty acid composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a pray-dried freshwater microalga (*Spongiococcum excentricum*) and microencapsulated lipids. Aquaculture 154, 293-303.

- Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J. and Samain, J.F., 1992. Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163, 221-234.
- Millican, P.F. and Helm, M.M., 1994. Effects of nutrition on larvae production in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 123, 83-94.
- Nevejan N., Courtens V., Hauva, M., Gajardo, G., Sorgeloos, P., 2003. Effect of lipid emulsions on production and fatty acid composition of eggs of the scallop *Argopecten purpuratus*. *Marine Biology* 143, 327-338
- Palacios, E., Racotta, L.S., Kraffe, E., Marty, Y., Moal, J. and Samain, J.F., 2005. Lipid composition of the giant lion's-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) in relation to gametogenesis: I. Fatty acids. *Aquaculture* 250, 270-282.
- Robinson, A., 1992. Gonadal cycle of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. *Aquaculture* 106, 89-97.
- Rupp, G.S., 1994. Obtenção de reprodutores, indução à desova e cultivo larval e pós-larval de *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Pectinidae). Florianópolis: UFSC: 1994. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, 125 pp.
- Rupp, G. S., Thompson, R. J. and Parsons G. J., 2004. Influence of food supply on postmetamorphic growth and survival of hatchery-produced lion's paw scallop, *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758). *Journal of Shellfish Research*, 23, 1, 5-13.
- Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Robert, R., Quéré, C., Le Coz, J.R., Samaian, J.F., 1996a. Effect of fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. *Aquaculture* 143, 361-378.
- Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F., 1996b. Fatty acids and egg quality in great scallop. *Aquacult Int.* 4, 191-200.
- Sühnel, S., 2002. Recuperação de pré-sementes da vieira *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) após diferentes períodos de permanência em laboratório e no mar. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil, 54pp.
- Sühnel, S., Lagreze, F., Ferreira, J.F., Campestrini, L. H., Maraschin, M., *in press*. Carotenoid extraction from the gonad of the scallop *Nodipecten nodosus* (Bivalvia; Pectinidae). *Brazilian Journal of Biology*, accepted in 2008.
- Sühnel, S., Lagreze, F., Bercht, M., Ferreira, J.F., Schaefer, A.L.C., Magalhães, A.R.M., Maraschin, M., dados ainda não publicados. The relations between the reproductive cycle, astaxanthin levels and gonadic maturation in the scallop *Nodipecten nodosus* (Bivalvia; Pectinidae). *Brazilian Journal of Biology*. Enviado em julho de 2008.
- Trider, D.J. and Castell, J.D., 1980. Effect of dietary lipids on growth, tissue composition and metabolism of the oyster (*Crassostrea virginica*). *J. Nutr.* 110, 1303-1309.
- Uriarte, I., Rupp, G. y Abarca, A., 2001. Producción de juveniles de pectínidos Iberoamericanos bajo condiciones controladas. *In: Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. A. N. Maeda-Martínez (ed.), Cap. 8: p.147-171.
- Utting, S.D., Doyou, J., 1992. The increased utilization of egg lipid reserves following induction of triploidy in the Manila clam (*Tapes philippinarum*). *Aquaculture* 103, 17-28.
- Utting, S.D. and Millican, P.F., 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture* 155, 45-54.
- Velasco, L.A. and Barros, J., 2007. Potencial for hatchery broodstock conditioning of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. *Aquaculture* 272, 767-773.

Whyte, J.N.C., Bourne, N., Ginther, N.G., 1990. Biochemical changes during embryogenesis in the rock scallop *Crassadoma gigantea*. *Mar. Biol.* 106, 239–244.

Wilson, J.A., Chaparro, O.R., Thompson, R.J., 1996. The importance of broodstock nutrition on the viability of larvae and spat in the Chilean oyster *Ostrea chilensis*. *Aquaculture* 139, 63–75.

Zar, J. H., 1974. *Biostatistical analysis*. S.A.: Prentice-Hall, 357 pp.

Zanetti, G., 2007. Influência do tipo de coletor e do tempo de larvicultura na taxa de assentamento da vieira *Nodipecten nodosus* (L.) em laboratório. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil, 34 pp.

Tabela 1. Descrição da composição das dietas utilizada em cada tratamento testado indicando as diferentes microalgas utilizadas, o enriquecimento com os ácidos graxos EPA e DHA e a dieta basal (microalgas viva: *Isochrysis sp.*, *Chaetoceros muelleri* e *Skeletonema sp.* nas proporções 50:25:25, respectivamente).

Nome do tratamento	Composição da dieta
Cm100%	100% <i>Chaetoceros muelleri</i>
Cm+DHA	100% <i>Chaetoceros muelleri</i> + ácido graxo DHA
T-Iso100%	100% <i>Isochrysis sp.</i>
T-Iso+EPA	100% <i>Isochrysis sp.</i> + ácido graxo EPA
Mix	100% da dieta basal

Tabela 2. Quantidade de fêmeas que emitiram gametas, porcentagem de fêmeas que desovaram e média e desvio padrão da quantidade de oócitos totais eliminados após desova de *N. nodosus* para cada tratamento. As letras minúsculas na tabela representam as diferenças estatísticas.

Tratamento	Número de fêmeas que desovaram	Quantidade de fêmeas que desovaram (%)	Número médio de oócitos
Cm100%	6	100	29.162.500 ± 96,44 ^a
Cm+DHA	4	66,6	11.566.666 ± 91,50 ^b
T-Iso100%	5	83,3	13.325.000 ± 13,50 ^c
T-Iso+EPA	6	100	8.516.500 ± 8,50 ^d
Mix	6	100	31.250.000 ± 26,00 ^e

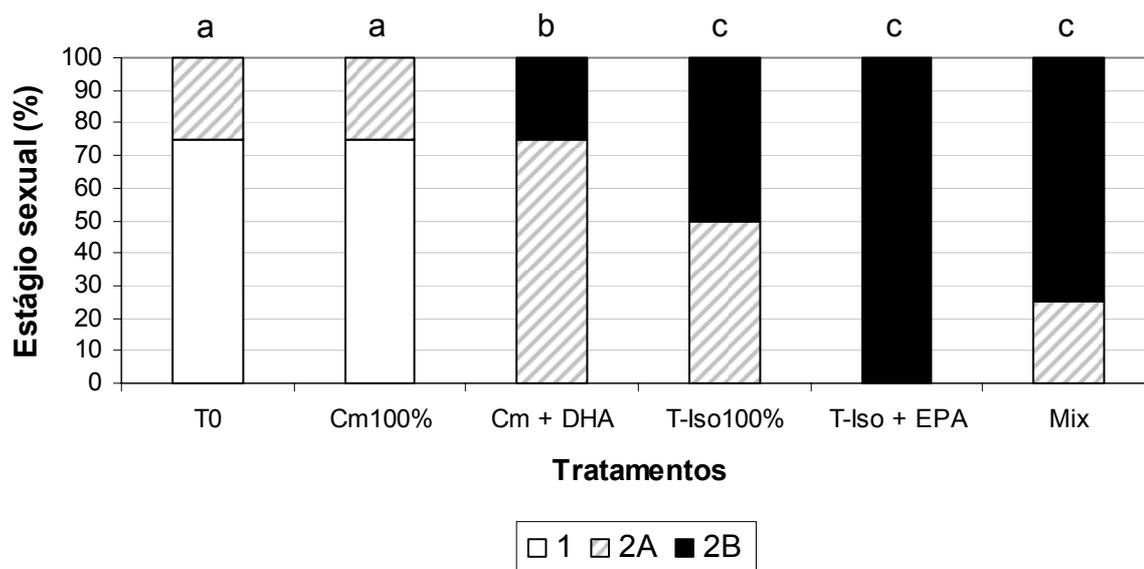


Figura 1. Estágios sexuais da porção feminina da gônada da vieira *N. nodosus* no início da maturação (T_0) e para as cinco dîtes testadas, após trinta dias (T_{30}) de maturação para os cinco tratamentos testados. Onde: (1) estágio de gametogênese; (2A) estágio de pré-desova inicial; (2B) estágio de pré-desova avançada. As letras minúsculas no gráfico representam as diferenças estatísticas.

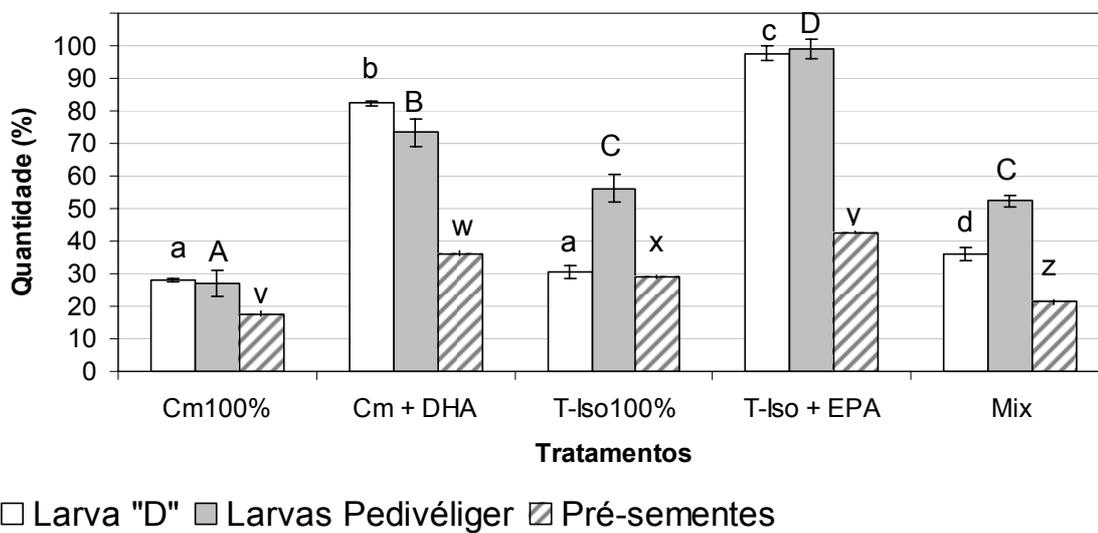


Figura 2. Quantidade média e desvio padrão do rendimento de larva "D", larvas pedivéliger e pré-sementes de *N. nodosus* em cada tratamento testado durante a maturação. As letras minúsculas **a**, **b**, **c** e **d** representam à análise estatística da recuperação de larvas "D"; As letras maiúsculas **A**, **B**, **C** e **D** representam a análise estatística da recuperação de larvas pedivéliger; e as letras minúsculas **v**, **w**, **x**, **y** e **z** representam a análise estatística da recuperação de pré-sementes.

CAPÍTULO VIII – Conclusões

8.1. Conclusões Gerais

Capítulo III

- Para a extração de carotenóides da gônada da vieira *N. nodosus* o método mais eficiente mostrou ser: extração com a solução extratora acetona:hexano 1:3 (Ac=O:Hex, 1:3) durante 15 minutos de incubação e armazenamento com atmosfera modificada com nitrogênio gasoso a -18 °C em vidro âmbar.

Capítulo IV

- A vieira *Nodipecten nodosus* apresenta quatro estágios sexuais bem definidos, sendo eles: (1) gametogênese; (2A) pré-desova inicial; (2B) pré-desova avançada; (3A) desova inicial; (3B) desova avançada; (4) repouso;
- A vieira *N. nodosus*, cultivada na localidade de Canto Grande, mostrou ocorrência de desova no verão, em dezembro e janeiro, e no final do inverno e começo do outono em julho, agosto e setembro.
- Em comparação com outros estágios, pré-desova avançada (estágio 2B) e de desova inicial (estágio 3A) mostraram maiores níveis de astaxantina;
- O carotenóide astaxantina é um importante componente na maturação da espécie *N. nodosus*.

Capítulo V

- É viável a utilização de uma dieta com 100% da microalga seca *Haematococcus pluvialis* na alimentação de reprodutores da vieira *N. nodosus* durante 30 dias em laboratório;
- Nos resultados de acúmulo de astaxantina, nos experimentos I e II os tratamentos Algamac50%, Algamac75% e Algamac100% e no experimento III tratamento Cm:H.pluvialis50%, proporcionaram o maior acúmulo de astaxantina na porção feminina da gônada de reprodutores da vieira *N. nodosus*.
- Avaliando o tempo de maturação, no experimento I, foram necessários trinta dias para obter um maior acúmulo, nos tratamentos Algamac50%, Algamac75% e Algamac100%, e no experimento II, sete dias de maturação nos tratamentos Algamac50% e Algamac100%.
- No experimento III a utilização de microalgas ricas em astaxantina favoreceram a maturação de reprodutores da vieira *N. nodosus*;
- A maturação de reprodutores da vieira *N. nodosus*, com a microalga *H. pluvialis* seca (Algamac AST) e viva favorecem um maior rendimento na larvicultura;
- As dietas testadas durante a maturação não afetaram a recuperação de pré-sementes de *N. nodosus*.

Capítulo VI

- A utilização de dieta rica com astaxantina (NatuRose50%) na maturação de reprodutores proporcionou um maior acúmulo de astaxantina na porção feminina da gônada e um efeito positivo na maturação dos gametas femininos de *N. nodosus*;
- O tratamento NatuRose50% proporcionou um efeito positivo no rendimento larval.

Capítulo VII

- A dieta composta pela microalga *Isochrysis sp.* e enriquecida com o ácido graxo EPA proporcionou uma completa maturação dos reprodutores e apresentou melhores rendimentos de larvas “D” e pedivéliger, assim como de pré-sementes de *N. nodosus*;
- A quantidade de oócitos liberados durante a desova não está relacionada com o estágio sexual dos reprodutores, mas sim com outros fatores que precisam ser avaliados;

8.2. Considerações Finais

No cultivo de moluscos bivalves, a obtenção de sementes é um fator importante para o sucesso da produção comercial. Para a vieira *Nodipecten nodosus* a obtenção de sementes é através da produção de pré-sementes em laboratório, o que indica a importância e necessidades de estudos sobre os aspectos reprodutivos desta espécie.

Diversos trabalhos já foram realizados para estudar a biologia de *N. nodosus*, como: Manzoni e Rupp (1993), Rupp (1994), Manzoni et al. (1996), Rupp (1997), Rupp et al. (2000a), Rupp et al. (2000b), De Bem et al. (2001a), De Bem et al. (2001b), De La Roche et al. (2002), Sühnel (2002), Rupp e Parsons (2004), Rupp et al. (2004a) e Rupp et al. (2004b), Garcia (2005), Velasco e Barros (2007), Velasco et al. (2007), Zanette (2007), entre outros. Contudo, ainda são necessários estudos sobre os fatores, exógenos (como: temperatura, alimento e salinidade) e endógenos (como: hormonais, estado nutricional) que afetam a maturação dos reprodutores em laboratório e, conseqüentemente, o rendimento de larvas e de pré-sementes.

Na alimentação dos reprodutores, durante a maturação em laboratório, diferentes substâncias podem afetar o sucesso na maturação sexual, bem como nas larvas e pré-sementes resultantes. Em revisão bibliográfica, observa-se que os carotenóides atuam neste processo, bem como os lipídeos, carboidratos e proteínas.

Com o intuito de contribuir para a tecnologia da produção de larvas e de pré-sementes em laboratório, avaliamos o efeito da utilização de dietas com diferentes composições de astaxantina (Capítulo V e capítulo VI) e de ácidos graxos EPA e DHA (Capítulo VII), em reprodutores da vieira *Nodipecten nodosus* mantidos em laboratório e seu efeito no ciclo reprodutivo, rendimento larval e produção de pré-sementes. A marca comercial da microalga *H. pluvialis* seca utilizada no Capítulo V foi o Algamac AST e no Capítulo VI o NatuRose, ambas fontes de astaxantina e que apresentam as mesmas características bioquímicas.

Para alcançar estes objetivos, foi necessário padronizar uma metodologia de extração de carotenóides da porção feminina da gônada de vieira *N. nodosus* (Capítulo III) e estudar a relação entre os carotenóides e os estágios sexuais desta espécie (Capítulo IV).

No Capítulo III, foi estabelecida uma metodologia prática para extrair e analisar os carotenóides da vieira *N. nodosus*. Esta metodologia dá suporte para futuros estudos que busquem aprofundar a influencia destes metabólitos secundários no sistema reprodutivo desta espécie. Bem como, a realização de análises rápidas da quantidade de carotenóides presentes na porção feminina da gônada em um sistema de produção comercial.

No Capítulo IV, foram definidos e descritos quatro estágios sexuais para *N. nodosus*, sendo eles: (1) gametogênese; (2A) pré-desova inicial; (2B) pré-desova avançada; (3A) desova inicial; (3B) desova avançada; (4) repouso. Esta descrição dá suporte a futuros estudos onde seja necessária a identificação do estágio sexual da porção feminina da gônada desta espécie.

Também foi avaliado quantidade do carotenóide astaxantina na porção feminina da gônada em cada estágio sexual. No qual se observou que há uma relação entre o estágio sexual e a quantidade de astaxantina, os gametas maduros apresentam maior concentração de astaxantina.

Estes resultados dão suporte para futuros estudos sobre a utilização de carotenóides na dieta de reprodutores durante a maturação de *N. nodosus*.

No Capítulo V, foi avaliado o efeito da astaxantina na maturação, rendimento de larvas e de pré-ementes. Os resultados obtidos mostram que os carotenóides são necessários para a maturação da vieira *N. nodosus* e que apresentam um efeito positivo no rendimento larval. Portanto, como os moluscos bivalves são incapazes de sintetizar os carotenóides (Farias-Molina 2001) é essencial que eles venham de uma dieta de fitoplancton rica em carotenóides. Esta dieta, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, pode ser composta por uma dieta basal (ver Capítulo V) e Algamac AST, a uma proporção de 1:1 ou por pelas microalgas *C. muelleri* e *H. pluvialis*, na proporção 1:1 para uma concentração final de $7,5 \times 10^4$ cel.mL⁻¹. Cabe destacar, que a concentração de $7,5 \times 10^4$ cel.mL⁻¹ foi determinada a partir de bioensaio realizado com 5 diferentes concentrações testadas.

No Capítulo VI, observou-se que os reprodutores alimentados com maior concentração de astaxantina na dieta que acumularam mais astaxantina na porção feminina da gônada e que esta maturação com astaxantina proporcionou um efeito positivo na recuperação de larvas.

Bem como, os reprodutores maturados com a dieta rica em astaxantina e que acumularam mais deste carotenóide na porção feminina da gônada, mantiveram níveis baixos na produção de ânions superóxidos basal. Esta baixa produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é importante, pois apesar das ERO atuarem na degradação de microorganismos invasores, elas, também podem danificar o tecido da vieira. Para neutralizar os efeitos os carotenóides acumulados, estão atuando como compostos antioxidantes.

No Capítulo VII, observou-se que os ácidos graxos proporcionaram um efeito positivo na maturação, rendimento larval e de pré-ementes e que a combinação da microalga *Isochrysis sp.* e o ácido graxo EPA geraram melhores valores nos efeitos avaliados. É importante destacar, que a combinação *Isochrysis sp.* e EPA geraram melhores resultados, provavelmente porque esta microalga é carente em EPA e seu enriquecimento com EPA favoreceu o balanço entre a proporção DHA:EPA na dieta.

Em resumo, tanto o carotenóide astaxantina, quanto os ácidos graxos EPA e DHA proporcionaram um efeito positivo na maturação e no rendimento larval da vieira *N. nodosus*. Observou-se um efeito positivo na recuperação de pré-ementes geradas a partir de reprodutores maturados com dietas enriquecidas com ácidos graxos. Além disto, observou-se que há uma relação entre o estágio sexual e o acúmulo de astaxantina na porção feminina da gônada, onde os gametas maduros apresentam maiores quantidade de astaxantina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ABBOTT, R.T.; DANCE, S.P. Compendium of seashells. F. L./USA: **American Malacologists**, 1974.
- AMAR, E.C. et al. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. **Fish Shellf. Immunol.**, v. 16, p.527-537, 2004.
- ARUMUGAM, M. et al. In vitro production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. **Eur. J. Cell. Biol.**, v. 79, p. 513–519, 2000.
- ASOKAN, R.; ARUMUGAM, M.; MULLAINADHAN, P. Functional analysis of plasma prophenoloxidase system in the marine mussel *Perna viridis*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 120A, p. 753-762, 1998.
- AUFFRET, M. Bivalve hemocyte morphology. In: Fisher, W. S. **Disease processes in marine bivalve mollusks American**, Bethesda: American Fisheries Society, p. 169–177, 1988.
- AVENDAÑO, R.E.; RIQUELME, C.E. Establishmentos of mixidculture probiotics and microalgae as food for bivalve larval. **Aquaculture Research**, v. 30, p. 893-900, 1999.
- BARBER, B.J.; BLAKE, N.J. Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus*. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 52, p. 121–134, 1981.
- BARBER, B.J.; BLAKE, N.J. Intra-organ biochemical transformations associated with oogenesis in the bay scallop *Argopecten irradians concentricus* (Say) as indicated by C14 incorporation. **Biol. Bull.** (Woods Hole) v. 168, p. 39–49, 1985a.
- BARBER, B.J.; BLAKE, N.J. Substrate catabolism related to reproduction in the bay scallop *Argopecten irradians concentricus*, as determined by O/N and RQ physiological indexes. **Mar. Biol.** v. 87 p. 13–18, 1985b.
- BARBER, B.J.; BLAKE, N.J. Reproductive physiology. In: Shumway, S.E. Scallop: biology, ecology and aquaculture, **Elsevier Amsterdam**, 1991.
- BAUERNFFEIND, J.C. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in food and feeds. **Journal Agric. Food Chem.** v.20, n. 3, p.450, 1972.
- BAYNE, B.L.; GABBOTT, P.A.; WIDDOWS, J. Some effects of stress in the adult on the eggs and larvae of *Mytilus edulis* L. **J. Mar. Biol. Assoc. UK** v. 55, p. 675–689, 1975.
- BAYNE, B.L. et al. Glycogen utilization and gametogenesis in *Mytilus edulis* L. **Mar. Biol. Lett.**, v. 3, p. 89–105, 1982.
- BAYNE, B.L. Ecological consequences of stress. In: Bayne B.L. et al. (eds) **The effects of stress and pollution on marine animals**. Praeger, New York, p. 141–157, 1985.
- BENDICH, A. Carotenoids and the immune response. **Journal of Nutrition**, v.119, p.112-115, 1989.
- BENDICH, A. B-carotene and the immune response. **Proccedings of the Nutrition Society**, v. 50, p. 263-274, 1990.
- BJERKENG, B.; STOREBAKKEN, T.; LIAAEN-JENSEN, S. Pigmentation of rainbow trout from start feeding to sexual maturation. **Aquaculture**, v.108, p. 333-346, 1992.
- BOONYARATPALIN, M., et al. Effects of β -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. **Aquaculture Research**, v. 32, n.9, p. 182-190, 2001.

BOURNE, N.; HODGSON, C.A.; WHYTE, J.N.C. A manual for scallop culture in British Columbia. Canadá: **Minister of Supply and services Canada**, 215p, 1989.

BOWER; S.M.; BLACKBOURN, J.; MEYER, G.R. Distribution, prevalence, and pathogenicity of the protozoan Perkinsus qugwadi in Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. **Can. J. Zool.**, v. 76, p. 954-959, 1998.

CAMUS, L. et al. Total oxyradical scavenging capacity and cell membrane stability of haemocytes of the Arctic scallop, *Chlamys islandicus*, following benzo(a)pyrene exposure. **Mar. Environ. Res.**, v. 54, p. 425-430, 2002.

BARRACCO, M.A.; MEDEIROS, I. D.; MOREIRA, F. M. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna Perna*. **Fish Shellf. Immunol.**, v. 9, p. 387-404, 1999.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. **Analyt. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITTON, G. Carotenoids. in: Hendry G.A.F.; Houghton J.D., editores. **Natural food colorants**. Glasgow and London: Blackie, p. 141-182, 1992.

CERENIUS, L.; SÖDERHÅLL, K. The prophenoloxidase system in invertebrates. **Immunol. Rev.**, v. 198, p. 72-82, 2004.

CHEW, K.K.; BEATTIE, J.H.; DONALDSON, J.D. Bivalve mollusc hatchery techniques, maturation and triggering of spawning. In: International Seminar on Shellfish Culture Development and Management, 4-9 march 1985, La Rochelle, **France. Proceedings**. p. 1-22. 1987.

CHEW, B.P.; PARK, J. S. Carotenoid Action on the Immune Response. **J. Nutr.**, v. 134, p. 257S-261S, 2004.

CHIEN, Y.H.; JENG, S.C. Pigmentation of kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels feeding regimes. **Aquaculture**, v. 102, p. 333-346, 1992.

CHIEN, Y.H.; PAN, C.H.; HUNTERB, B. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets. **Aquaculture**, v. 216, p. 177-191, 2003.

CHOUBERT, G.Y.; STOREBAKKEN, T. Dose response to astaxanthin and cantaxanthin pigmentation of rainbow trout feed various dietary carotenoids concentration. **Aquaculture** v. 81, p. 69-77, 1989.

CUZON, G. et al. Nutricion of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. **Aquaculture**, v. 235, p. 513-551, 2004.

D'ABRAMO, L.; CONKLIN, D.E.; AKIYAMA, D. Crustacean nutrition. *Advances in World Aquaculture*. **World Aquaculture Society**, v. 6, p. 164-193, 1997.

DE BEM, M.M. **Efeitos da adição de antibióticos no cultivo de larvas de *Nodipecten nodosus* (LINNAEUS, 1758) (BIVALVIA: PECTINIDAE)**. 110 f. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil, 1999.

DE BEM, M.M. et al. Effect of antibiotics on larval survival and microbial levels during larval rearing of the tropical *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Pectinidae). **Abstracts. 13th Internacional Pectinid Workshop**. Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile, p. 114-116. 2001a.

DE BEM, M.M., et al. Effect of marine bacterial on larval survival of the tropical *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Pectinidae). **Abstracts. 13th Internacional Pectinid Workshop**. Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile, p. 111-113. 2001b.

- DE LA ROCHE, J.P. et al. Embryonic and larval and postlarval growth of the tropical *Nodipecten nodosus* (= *Lyropecten nodosus*) (L., 1758) (Mollusca: Pectinidae). **Aquaculture Res.** v. 33, p. 819-827, 2002.
- DEMING, D.M.; ERDMAN, J.W. Mammalian carotenoid absorption and metabolism. **Pure Appl. Chem.**, v. 71, p. 2213-2223, 1999.
- EDGE, R.; MCGARVEY, D.J.; TRUSCOTT, T.G. The carotenoids as anti-oxidants – a review. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology**, v. 41, p. 189-200, 1997.
- ESCARRIA, S.; REYES, C.Y; ROHAN, D. Estudio bioquímico de la escalopa *Argopecten circularis*. **Ciencias Marinas** v. 15, p. 63-72, 1989.
- FARIAS-MOLINA, A. Nutrición en moluscos Pectínidos. In: Maeda-Martínez A. N. (ed.) **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura.**, Cap. 5: p.89-104, 2001.
- FITT, W.; HESLINGA, G.; WATSON, T. Use of antibiotics in the mariculture of giant clams (F. tridacnidae). **Aquaculture**, v. 104, p. 1-10, 1992.
- FONTANA, J.D. CAROTENÓIDES Cores Atraentes e Ação Biológica. Universidade Federal do Paraná. Disponível em http://www.herbario.com.br/dataherb06/1112_carotenoid.htm, 1997, acessado em 01/05/2008.
- GABBOTT, P.A. Storage cycles in marine bivalve molluscs. A hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. In: **Proceedings of the 9th European Marine Biology Symposium**. Aberdeen University Press, Aberdeen, p. 191–211, 1975.
- GALLAGER, S.M.; MANN, R. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. **Aquaculture** v. 56, p. 105–121, 1986.
- GOLDBLISTL, S.A.; KAPEL, M.; LUSK, G. The Role of Food and Technology in the Freeze Dehydration of Foods. **Food Technology**, v.17, p.139. 1963.
- GONZALEZ, M.; ARENAS, G. Characterization of the immune response of the north scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Mollusca: Bivalvia). **Cien. Mar.**, v. 28, p. 247-255, 2002.
- GOUVEIA, L. et al. Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 157-163, 1996.
- GU, W.L.; AN, G.H.; JOHNSON, E.A. Ethanol increases carotenoid production in *Pha.a rhodozyma*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 19, p. 114–117, 1997.
- HARDY, D., **Scallop farming**. Fishing news books, Oxford, England. 1991.
- HEGARET, H.; WIKFORS, G.H. Time-dependent changes in emocytes of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, and northern bay scallops, *Argopecten irradians irradians*, exposed to a cultured strain of *Prorocentrum minimum*. **Harm. Algae**, v. 4, p. 187–199, 2005.
- HELM, M.M.; HOLLAND, D.L.; STEPHENSON, R.R. The effect of supplementary algal feeding of a hatchery breeding stock of *Ostrea edulis* L. on larval vigour. **J. Mar. Biol. Assoc. UK**, v. 53, p. 673–684, 1973.
- HENRY, M.; AUFFRET, M.; BOUCAUD-CAMOU, E. Aspects ultrastructuraux et fonctionnels des hemocytes de quatre familles de Bivalves (Ostreidae, Veneridae, Mytilidae, Pectinidae). **Haliotis**, v. 10, p. 195–196, 1990.
- HERNANDEZ, J.; URIARTE, I.; FARIAS, A. Estudio comparativo de las progenies del ostión del norte (*Argopecten purpuratus*) y la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*), en reproductores acondicionados

con distintas calidades de dieta. En: Libro de Resúmenes, XX **Congreso Ciencias del Mar**, Cocepción, Chile, p. 136, 2000.

HINE, P.M. The inter-relationship of bivalve haemocytes Review. **Fish Shelf. Immunol.**, v. 9, p. 367-385, 1999.

HOSANG, K. Extração de pigmentos carotenóides a partir de resíduos do processamento de camarões (*Rarfantepenaeus paulensis*). 63f. Dissertação de Mestrado - **UFSC**, Florianópolis, 2001.

HOWELL, B.K.; MATTHEWS, A.D. The carotenoids of wild and blue disease affected farmed tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricus). **Comparative Biochemistry and Physiology** v. 98B, p. 375-379, 1991.

HUGHES, C. **Guía de Aditivos**. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, Espanha. 1994.

ILLANES, J.E. Cultivo del ostion del norte *Argopecten purpuratus*. In: HERNANDEZ, R. A. (Ed). **Cultivo de moluscos en America Latina**. Bogotá: CIID, p. 211-230. Memorias Segunda Reunion Grupo de Trabajo Tecnico, 1990.

JOHNSON, E.A.; SCHROEDER, W.A. Microbial carotenoids. In: Fiechter, A. (Ed.), **Advances Biochemical Engineering and Biotechnology**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, vol. 53, p. 119-178, 1995.

KATSUYAMA, M.; MATSUNO, T. Carotenoid and vitamin A, and metabolism of carotenoids, b-carotene, canthaxanthin, astaxanthin, zeaxanthin, lutein and tunaxanthin in tilapia *Tilapia nilotica*. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 90B, p. 131-139, 1988.

KAWAKAMI, T. et al. Effect of b-carotene, b-echinonone, astaxanthin, fucoxanthin, vitamin A and vitamin E on the biological defense of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 226, p. 165-174, 1998.

KELLEY, C.E.; HARMON, A.W. Method of determining carotenoid contents of Alaska pink shrimp and representative values for several shrimp products. **Fishery Bulletin**, v. 70, p. 111, 1972.

KOBAYASHI, M.; SAKAMOTO, Y. Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green algae *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnol. Lett.** v. 21, p. 265-269, 1999.

KURASHIGE, M. et al. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. **K. Physiol. Chem. Phys. Med. NMR**, v. 22, p. 27-38, 1990.

LEE, R.G. et al. Pigmentation of rainbow trout with extracts of floral parts from *Tagetes erecta* and *Curcubita maxima inarica*. **Rvue Reumaine de Biochemie**, v. 15, n. 4, p. 287-293, 1978.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica** 2ªed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LIGNELL, Å. **Medicament for improvement of duration of muscle function or treatment of muscle disorders or diseases, Patent Cooperation Treaty application #9911251**. AstaCarotene AB, Sweden. 1999.

LIÑAN-CABELLO, M.A.; PANIAGUA-MICHEL, J.J.; HOPKINS, P.M. Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. **Aquaculture Nutrition** v. 8, p. 299-309, 2002.

LIU, S. et al. Effects of temperature on non-specific immune parameters in two Scallop species: *Argopecten irradians* (Lamarck 1819) and *Chlamys farreri* (Jones & Preston 1904). **Aquacult. Res.**, v. 35, p. 678-682, 2004.

LODEIROS, C.J.S. Analisis cuantitativo y cualitativo de la flora bacteriana en "hatchery" de *Ostrea edulis* y su posible relacion com la patogenidad a nivel larvario. **Acta Científica Venezolana** v. 39, p. 249-256, 1988.

LODEIROS, C.J.S. et al. Growth and survival of the tropical scallop *Lyropecten (Nodipecten) nodosus* maintained in suspended culture at three depths. **Aquaculture**, v. 165, p. 41-50, 1997.

LOOSANOFF, V.L.; DAVIS, H.C. Rearing of bivalve mollusks. In: RUSSEL, F.S. **Advances in marine biology 1**. London: Academic Press, 1963.

LORENZ, T.A. **Review of the Carotenoid, Astaxanthin, as a Pigment and Vitamin Source for Cultured Penaeus Prawn**. NatuRose™ Technical Bulletin, nº 051, 1998. Disponível em www.cyanotech.com, acessado em 01/05/2008.

LORENZ, T. **Astaxanthin, Nature's Super Carotenoid**. BioAstin™ Technical Bulletin, nº 062, 2000. Disponível em www.cyanotech.com, acessado em 01/05/2008.

LUNA-GONZALEZ, A. et al. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. **Fish Shelf. Immunol.**, v. 15, p. 275–282, 2003.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 8th edn. Prentice-hall, Madri, 1997.

MANTIRI, D.M. et al. Evolution of carotenoid metabolic capabilities during the early development of the European lobster *Homarus gammarus* (Linne´ , 1758). **Comp. Biochem. Pysiol.**, v. 111B, p. 553–558, 1995.

MANZONI, G.C.; RUPP, G.S. **Estudo da biologia reprodutiva e viabilidade de cultivo de Lyropecten nodosus (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Pectinidae) na Ilha do Arvoredo – SC**. Florianópolis: UFSC, 35 p (Relatório final, Projeto), 1993.

MANZONI, G.C. **Aspectos da Biologia de Nodipecten nodosus, (Linnaeus, 1758) (MOLLUSCA : BIVALVIA), nos arredores da ilha do Arvoredo (Santa Catarina - Brasil), com vistas a sua utilização na aqüicultura**. 98f. Dissertação de Mestrado. Departamento de Aquicultura. Universidade Federal de Santa Catarina, 1994.

MANZONI, G.C.; POLI, C.R.; RUPP, G.S. Período Reproductivo del pectínido *Nodipecten nodosus* (Mollusca:Bivalvia) en los alrededores de la Isla Arvoredo (27o 17'S - 48o 22'W) - Santa Catarina - Brasil. In: Silva, A. ; Merino, G. (Ed). **Acuicultura en Latinoamérica. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura/ 2do Simposio Avances y Perspectivas de la Acuicultura en Chile**. p. 197 – 201, 1996.

MARTINEZ, G.; AGUILERA, C.; METTIFOGO, L. Interactive effects of diet and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. **Aquacultue**, v. 183, p. 149-159, 2000.

MARQUES, M.R.F.; BARRACCO, M.A. Lectins, as non-self recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture**, v. 191, p. 23-44, 2000.

MEYERS, P.S. Developments in World aquaculture, feed formulation and role of carotenoids. **Pure and Applies Chemistry**, v. 66, p.1069-1076, 1994.

MENASVETA, P. et al. Effect of dietary astaxanthin on gonadal maturation and spawning of giant tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius). In: Chou, L.M. et al. Eds. **The Third Asian Fisheries Forum**, Asian Sheries Society, Manila, Philippines p. 713–716, 1994.

MENASVETA, P.E.D. et al. Dietary prophylaxis against yellow-head disease in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). In: Flegel, T.W. ; Menasveta, P. ; Paisarnrat, S. eds **Shrimp Biotechnology in Thailand**, NSTDA, Bangkok, Thailand. p. 61–70. 1995.

MERA PHARMACEUTICALS, Inc. Technical Report TR.3005.001. **Haematococcus pluvialis and astaxanthin safety for human consumption**. 1999.

- MERCADO, L.A.; MARSHALL, S.H.; ARENAS, G.M. Detection of phenoloxidase (PO) in hemocytes of the clam *Venus antiqua*. **Malacologia**, v. 44, p. 17-22, 2002.
- MILLICAN, P.F.; HELM, M.M. Effects of nutrition on larvae production in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. **Aquaculture** v. 123 , p. 83–94, 1994.
- MITTA, G. et al. Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 24 p. 381-393. 2000.
- MITTA, G. et al. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defence. **J. Biol. Chem.**, v. 275 p. 12954-12962. 2000.
- MIKI, W.N.; YAMAGUCHI K.; KONOSU S. Comparison of carotenoids in the ovaries of marine fish and shellfish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.71, n.1, p.7-11, 1982.
- MIKI, W. Biological functions and activities of animal carotenoids. **Pure & Appl. Chem.**, v. 63, p. 141-146, 1991.
- MORTENSEN, S.H.; GLETTE, J. Phagocytic activity of scallop (*Pecten maximus*) haemocytes maintained in vitro. **Fish Shellf. Immunol.**, v. 6 , p. 111–121, 1996.
- MORETTO, E.; FETT, R. **Manual de aditivos para indústrias de alimentos**. 2ª ed. UFSC. 112p.
- NAGUIB, Y.M.A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1150–1154, 1988.
- NAVARRO, J.M. Fisiología energética de pectínidos Iberoamericanos. In: Maeda-Martinez, A. N. (ed.) **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura**. Cap. 3: p.61-76, 2001.
- NEVEJAN, N. et al. Effect of lipid emulsions on production and fatty acid composition of eggs of the scallop *Argopecten purpuratus*. **Marine Biology** v. 143, p. 327–338, 2003.
- NICOLAS, J.L. et al. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. **Dis. Aquat. Org.** v. 27, p. 67-76, 1996.
- NO, H.K.; STOREBAKKEN, T. Color stability of rainbow trout fillets during frozen storage. **Journal Food Sci.** v. 56, p. 969-972, 1991.
- OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in food. **Journal of Chromatography A**. v. 881, p. 543-555, 2000.
- OLSON, J.A. Vitamin A and carotenoids as antioxidants in a physiological context. **J. Nutr. Sci. Vitam.**, v. 39, p. S57–S65, 1993.
- OLSON, V.A.; OWENS, I.P. Costly sexual signals: are carotenoids rare, risky or required? **Trends Ecol. Evol.**, v. 13, p. 510–514, 1998.
- ONO, A. et al. A 13-week subchronic oral toxicity study of haematococcus color in F344 rats. **Kokuritsu Iyakuhiin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku**, v. 117, p. 91-98, 1999.
- ØSTERLIE, M.; BJERKENG, B.; LIAAEN-JENSEN, S. Accumulation of astaxanthin all-E, 9Z and 13Z geometrical isomers and 3 and 3' RS optical isomers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is selective. **Journal Nutr.**, v. 129, p. 391-398, 1999.
- ØSTERLIE, M.; BJERKENG, B.; LIAAEN-JENSEN, S. On bioavailability and deposition of bent Z-isomers of astaxanthin. **Proceedings of the First International Congress on Pigments in Food Technology**, Sevilla, Spain, 24-26 March p.157-161, 1999a.
- ØSTERLIE, M.; BJERKENG, B.; LIAAEN-JENSEN, S. Blood appearance and distribution of astaxanthin E/Z isomers among plasma lipoproteins in humans administered a single meal with

astaxanthin. Abstract 2A-13. **Abstracts of the Twelfth International Carotenoid Symposium**, Cairns, Australia, 18-23 July p. 72, 1999b.

OSTINI, S.; POLI, C.R. A situação do cultivo de moluscos no Brasil. In: HERNANDEZ, R.A. (Ed.). **Cultivo de moluscos en América Latina**. Bogotá: CIID, Memorias Segunda Reunion Grupo de Trabajo Tecnico, p. 311-325, 1990.

PADULA, M. **Degradação de β -caroteno e cantaxantina em sistema-modelo de baixa umidade à temperatura ambiente. Formação de produtos não voláteis e voláteis**. 183f. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas-SP. 1999.

PETIT, H. et al. Ontogeny of carotenoid metabolism in the prawn *Penaeus japonicus* Bate (1888) (Crustacea Penaeidae). A qualitative approach. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 99B, p. 667–671, 1991.

PIPE, R. K. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. **Histochem.**, v. 22, p. 595–603, 1990.

PIPE, R. K. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel, *Mytilus edulis*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 16, p. 111–122, 1992.

RENGEL, D. et al. Exogenously incorporated ketocarotenoids in large unilamellar vesicles. Protective activity against peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1463, p.179–187, 2000.

RENWRANTZ, L. et al. Conversion of phenoloxidase and peroxidase indicators in individual haemocytes of *Mytilus edulis* specimens and isolation of phenoloxidase from haemocyte extract. **J. Comp. Physiol. B**, v. 165, p. 647–658, 1996.

RIOS, E. C. **Seashells of Brazil**. Rio Grande: FURG, 2 ED. 1994.

ROBERT, R.; MINER, P.; NICOLAS, J.L. Mortality control of scallop larvae in the hatchery. **Aquacult. Int.** v. 4, p. 305-313, 1996.

ROCH, P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrate. **Aquaculture**, v. 172, p. 125-145, 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.; BODDIO, F.O.; BODRIO, P.A. **Curso sobre pigmentos naturais**. Campinas. SBCTA-FEAA/UNICAMP. 55p. 1984.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. **Carotenóides: estruturas, propriedades e funções**. Ciência de Alimentos – Avanços e perspectivas na América Latina. Campinas: Fundação Cargill. Cap. 3, p 20-31. 1997.

ROMAN, G.; MARTÍNEZ, G.; GARCIA, O.; FREITES, L. Reproducción. In: Maeda-Martinz A. N. (ed.) **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura.**, Cap. 2: p. 27-59. 2001.

RUPP, G.S.; POLI, C.R.; MANZONI, G.C., Perspectivas de cultivo de pectinídeos na região sudeste-sul do Brasil. **Resumo. 1. SIMBRAq**. Peruíbe, São Paulo, p.130. 1992.

RUPP, G.S. **Obtenção de reprodutores, indução à desova e cultivo larval e pós-larval de *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia:Pectinidae)**. Florianópolis: UFSC: 1994. 125 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina. 1994.

RUPP, G.S. **Desenvolvimento de tecnologia de produção de sementes de *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (BIVALVIA:PECTINIDAE)**. Programa RHA/PIBIQ/UFSC. 71p. (Relatório Final CNPq). 1997.

RUPP, G.S.; DE BEM, M.M.; POLI, C.R. Larviculturas experimentais de *Nodipecten nodosus* realizadas no LCMM entre 1995 e 1996. **Resumo. Aquaculture Brasil - 2000 / Simpósio Brasileiro de Aquicultura**, Florianópolis, SC. Novembro de 2000, 2000a.

- RUPP, G.S.; DE BEM, M.M.; POLI, C.R. Resultados de assentamento e produção experimentais de sementes de *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) realizados no LCMM em 1996. **Resumo. Aquicultura Brasil - 2000 / Simpósio Brasileiro de Aquicultura**, Florianópolis, SC. Novembro de 2000, 2000b.
- RUPP, G.S.; PARSONS G.J. Effects of salinity and temperature on the survival and byssal attachment of the lion's paw scallop *Nodipecten 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. e PARSONS, G.J. *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. **Elsevier B. V.** 2006.
- RUPP, G.S.; THOMPSON, R.J.; PARSONS G.J. Influence of food supply on postmetamorphic growth and survival of hatchery-produced lion's paw scallop, *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758). **Journal of Shellfish Research**, v. 23, n. 1, p. 5-13, 2004a.
- RUPP, G.S. et al. Effect of depth and stocking density on growth and retrieval of the postlarval lion's paw scallop, *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758). **Journal of Shellfish Research**, v. 23, n. 2, p. 473-482, 2004b.
- SCHLEDER, D.D. et al. Evaluation of hemato-immunological parameters during the reproductive cycle of the scallop *Nodipecten nodosus* in association with a carotenoid-enriched diet. **Aquaculture**, v. 280, p 256-263, 2008.
- SHUMWAY, S.E. **Scallops: biology, ecology and aquaculture**. Amsterdam: Elsevier. Prefácio, p. vii-viii. 1991.
- SIMÃO, A.M. **Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico**. São Paulo: Nobel, 1985.
- SKREDE, G.; STOREBAKKEN, T.; NAES, T. Color evaluation in raw, baked and smoked flesh of rainbow (Onchorhynchus mykiss) fed astaxanthin or canthaxanthin. **Journal Food Sci.** v. 55, p. 1574-1578, 1990.
- SMITH, J.T. **Cenozoic giant pectinids from California and Tertiary Caribbean province: *Lyropecten*, "*Macrochlamis*", *Vertipecten*, and *Nodipecten* species**. Washington: United States Government, (U.S. Geological Survey professional paper, 1391) 136 p. 1991.
- SÖDERHÄLL, K.; HÄLL, L. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 797, p. 99-104, 1984.
- SOUDANT, P. et al. Effect of fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. **Aquaculture**, v. 143, p. 361-378, 1996a.
- SOUDANT, P., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F. Fatty acids and egg quality in great scallop. **Aquacult Int** v. 4, p. 191-200, 1996b.
- SOUDANT, P. et al. The use of lipid emulsions for sterol supplementation of spat of the oyster *Crassostrea gigas*. **Aquaculture**, v. 184, p. 315-326, 2000.
- STANCHER, B.; ZONTA, F.; FAVRETTO, L.G. High-performance liquid chromatography of carotenoids from some marine shellfish. **Journal of Chromatography A**, v. 440, p. 37-46, 1988.
- STOREBAKKEN, T.; NO, H.K. Pigmentation of rainbow trout. **Aquaculture** v. 100, p. 209-229, 1992.
- SÜHNEL, S. **Recuperação de pré-sementes da vieira *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) após diferentes períodos de permanência em laboratório e no mar**. 54f. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil, 2002.
- TACON, A.G. Speculative review of possible carotenoid function in .sh. **Progr. Fish-Culturist**, v. 43, p. 205-208, 1981.

- TORRISSEN, O.J. Pigmentation of salmonids-effect of carotenoids in eggs and start-feeding diet on survival and growth rate. **Aquaculture**, v. 43, p. 185–193, 1984.
- TORRISSEN O.J. Pigmentation of salmonids: Interactions of astaxanthin and canthaxanthin on pigment deposition in rainbow trout. **Aquaculture**, v.79, p. 363-374, 1989.
- TORRISSEN, O.J.; HARDY, R.W.; SHEARER, K.D. Pigmentation of salmonids-carotenoid deposition and metabolism. **Rev. in Aquatic Sci.**, v. 1, p. 209-225, 1989.
- TUNKIJJANUKIJ, S.; MIKKELSEN, H.V.; OLAFSEN, J.A. A heterogeneous sialic acid-binding lectin with affinity for bacterial LPS from horse mussel (*Modiolus modiolus*) hemolymph. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 117, p. 273-286, 1997.
- URIARTE, I., RUPP, G, e ABARCA, A. Producción de juveniles de pectínidos Iberoamericanos bajo condiciones controladas. In: Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. A. N. MAEDA-MARTINEZ (ed.), Cap. 8: p.147-171. 2001.
- URIARTE, I. et al. Reproductive conditioning of Chilean scallop (*Argopecten purpuratus*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): effects of enriched diets. **Aquaculture** v. 230, p. 349–357, 2004.
- UTTING, S.D.; DOYOU, J. The increased utilization of egg lipid reserves following induction of triploidy in the Manila clam (*Tapes philippinarum*). **Aquaculture** v. 103, p. 17–28, 1992.
- UTTING, S.D.; MILLICAN, P.F. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. **Aquaculture**, v. 155, p. 45-54, 1997.
- VARGAS-ALBORES, F.; BARRACCO, M.A. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos con énfasis en pectínidos. In: MAEDA-MARTÍNEZ A. N. **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura**. La Paz: Limusa, p.127-140, 2001.
- VERNET, M. **Alimentación de la vieira tehuelche (*Chlamys tehuelchus*)**. Comisión Nacional de estudios Geo-heliofísicos, Centro Nacional Patagónico. Chubut, Argentina. 1977.
- VELEZ, A. Variación estacional de la composición química de los pectinidos *Pecten ziczac* y *Lyropecten nodosus*. **Boln. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente**. v. 26, n. 1-2, p.56-61, 1987.
- VELEZ, A.; LODEIRO, C. El cultivo en Venezuela. In: Hernandez, A. (Editor), **Cultivo de moluscos en América Latina**. Red Regional de Entidades y Centro de Acuicultura de América Latina. **CIID-Canada**, p. 345-369, 1990.
- VIEIRA, E.C.; GAZZINELLI, G.; MARES-GUIA, M. **Bioquímica celular e biología molecular**. 2ªed. Atheneu editora, 1991.
- WEBER, S. Determination of stabilized, added astaxanthin in fish feeds and premixes with HPLC. In: KELLER, H. R. (Ed.), **Analytical methods for vitamins and corotenoids in feeds**. Roche Publication n° 2264, Basel, Switzerland, p. 59-61, 1988.
- WYBAN, W.; G. MARTINEZ, J.; SWEENEY. Adding paprika to *Penaeus vannamei* maturation diet improves nauplii quality. **World Aquaculture**, 28 p. 59-62, 1997
- WHYTE, J.N.C.; BOURNE, N.; GINTHER, N.G. Biochemical changes during embryogenesis in the rock scallop *Crassadoma gigantea*. **Mar .Biol.**, v. 106, p. 239–244, 1990.
- WHYTE, J.N.C.; SHERRY, K.L. Pigmentation and composition of flesh of Atlantic Salmon fed diets supplemented with the yeast *Phaffia rhodozyma*. **North American Journal of Aquaculture**, v. 63, p. 52-57, 2001.

WILSON, J.A.; CHAPARRO, O.R.; THOMPSON, R.J. The importance of broodstock nutrition on the viability of larvae and spat in the Chilean oyster *Ostrea chilensis*. **Aquaculture**, v. 139, p. 63–75, 1996.

YAKOVLEVA, N.V.; SAMOILOVICH, M.P.; GORBUSHIN, A.M. The Diversity of Strategies of Defense from Pathogens in Molluscs. **J. Evol. Biochem. Phys.**, v. 37, p. 358.367, 2001.

YOKOYAMA, A.; MIKI, W. Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin producing bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, n.2, p. 139-144, 1995.

YUAN, J.P.; CHEN, F. Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. **Food Chemistry** v. 68, p. 443-448, 2000.

ZHANG, W.; WU, X.; WANG, M. Morphological, structural, and functional characterization of the haemocytes of the scallop, *Argopecten irradians*. **Aquaculture**, v.251, n1, p. 19-32, 2006.

ZHANG, D.H.; NG, Y.K.; PHANG, S. M. Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp. **Journal of Applied Phicology**, v. 9, n. 2, p. 147-155, 1997.