



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA – UEPB
CAMPUS V
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS - CCBSA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

SARAH RACHAEL CÂNDIDO DE SOUZA MÉLO

**A atividade da enzima anidrase carbônica em ostras *Crassostrea brasiliana*
submetidas a regimes artificiais de marés**

**JOÃO PESSOA - PB
2018**

SARAH RACHAEL CÂNDIDO DE SOUZA MÉLO

**A atividade da enzima anidrase carbônica em ostras *Crassostrea brasiliana*
submetidas a regimes artificiais de marés**

Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Fisiologia Animal Comparada.

Orientador(a): Prof. Dra. Enelise Marcelle Amado.

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

M528a Melo, Sarah Rachael Candido de Souza.
A atividade da enzima anidrase carbônica em ostras *Crassostrea brasiliana* submetidas a regimes artificiais de marés [manuscrito] : / Sarah Rachael Candido de Souza Melo. - 2018.
36 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2018.

"Orientação : Profa. Dra. Enelise Marcelle Amado, Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA."

1. Praia de Cabo Branco. 2. *Crassostrea brasiliana*. 3. Hemolinfa. 4. Brânquia. 5. Manto.

21. ed. CDD 571.1

SARAH RACHAEL CÂNDIDO DE SOUZA MÉLO

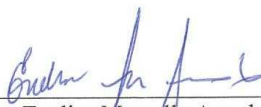
**A atividade da enzima anidrase carbônica em ostras *Crassostrea brasiliana*
submetidas a regimes artificiais de marés**

Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Estadual da
Paraíba, como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Fisiologia Animal
Comparada.

Aprovada em: 18/06/2018.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Enelise Marcelle Amado (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dra. Daniela Santos Pontes
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Cleber Ibraim Salimon
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Aos meus pais: Waldenir de Souza Mélo e
Otanilda Cândida de Souza Mélo (in memoriam), DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, dedico a Deus, pela força que colocou no meu coração para lutar até alcançar esta grande etapa na minha vida.

Dedico a minha mãe, Otanilda, que infelizmente não está mais presente fisicamente, mas sempre estará presente em minha mente e em meu coração, sei que de onde estiver, está olhando por mim, e me orientando para os caminhos do bem. Dedico também ao meu pai, Waldenir, por me criar, educar, apoiar e acreditar em mim, incondicionalmente. Vocês são meus exemplos, a razão de cada passo correto que dei e darei em toda minha trajetória de vida.

Agradeço ao meu namorado, Alysson, pela compreensão e apoio em todos os momentos dessa caminhada.

Muito obrigada à minha orientadora, Enelise Amado, por me permitir contribuir com o Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA), por todo apoio, paciência, aprendizado e por estar sempre disposta a ajudar. Tenho uma admiração enorme pela senhora!

Obrigada a todos os integrantes do laboratório! Um obrigada especial aos amigos de campo: Otoniel, Kamila e Alice. Muito obrigada por todo o apoio e disponibilidade de vocês nas coletas nos recifes de ostras do Cabo Branco e pela ajuda nas amostragens. Agradeço também aos amigos de sala: Alice, Anderson, Bárbara, Felipe, Glacy, Jicaury, Kamila, Maria Helena, Otoniel, Juliana, Raissa, Samara, Tatiana, que fizeram parte da minha rotina ao longo do curso, por dividirem preocupações, risadas e confidências.

Enfim, agradeço a todos os professores que passaram pela minha graduação. Sou grata a cada um pelos ensinamentos.

*“Faça da pedra de tropeço, um degrau de subida.
Transforme cada fato negativo em uma experiência positiva”.*

Bruce Lee

RESUMO

A enzima anidrase carbônica (AC) é uma metaloenzima que contém um átomo de zinco e que catalisa a hidratação reversível do CO_2 em bicarbonato (HCO_3^-) e H^+ com alta eficiência, e está presente em praticamente todos os organismos vivos. Essa enzima exerce papel importante em diversos processos biológicos e fisiológicos como: fotossíntese, respiração, transporte iônico, regulação ácido-base e calcificação. O objetivo principal desse trabalho foi analisar a atividade da anidrase carbônica na hemolinfa, brânquia e manto em ostras *Crassostrea brasiliiana* de um costão rochoso submetidas a regimes artificiais de marés. As ostras foram coletadas nos recifes da praia do Cabo Branco – PB em maré baixa em três pontos: ponto 1, ponto 2, e ponto 3. Nos pontos 1 e 3, as ostras ficam naturalmente emersas em maré baixa, e no ponto 2, as ostras ficam naturalmente imersas em maré baixa e maré alta. Após a coleta, as ostras de cada ponto foram aclimatadas e posteriormente foram submetidas ao mesmo experimento em laboratório: 3 horas imersas, 3 horas emersas e 3 horas re-imersas em salinidade 35‰. A hemolinfa, a brânquia e o manto foram então amostrados para dosagem da atividade da anidrase carbônica. Os resultados demonstraram respostas complexas de alterações na atividade da enzima em todos os tecidos analisados, não sendo possível evidenciar um padrão de resposta, mesmo entre as ostras dos pontos 1 e 3 que são habituadas à exposição aérea naturalmente. Também foi encontrada uma maior atividade da anidrase carbônica na hemolinfa das ostras, independente do ponto de coleta, quando comparadas com a brânquia e o manto. E além disso, foi observado um maior índice de condição nas ostras que sempre ficam imersas independente da variação da maré comparado com as ostras que passam períodos do dia emersas durante a maré baixa.

Palavras-Chave: Praia de Cabo Branco. *Crassostrea brasiliiana*. Hemolinfa. Brânquia. Manto.

ABSTRACT

The enzyme carbonic anhydrase (CA) is a metalloenzyme that contains a zinc atom and catalyzes the reversible hydration of CO₂ in bicarbonate (HCO₃⁻) and H⁺ with high efficiency and is present in practically all living organisms. This enzyme plays an important role in several biological and physiological processes such as photosynthesis, respiration, ion transport, acid-base regulation and calcification. The main objective of this work was to analyze the activity of carbonic anhydrase in the hemolymph, gill and mantle in *Crassostrea brasiliana* oysters from a rocky shore under artificial tidal regimes. Oysters were collected on the reefs of Cabo Branco beach - PB at low tide at three points: point 1, point 2 and point 3. In points 1 and 3, oysters naturally emerge at low tide, and at point 2, oysters are naturally immersed in low tide and high tide. After the collection, the oysters of each point were acclimatized and later they were submitted to the same experiment in the laboratory: 3 hours immersed, 3 hours emerged and 3 hours re-immersed in 35‰ salinity. The hemolymph, gill and mantle were then sampled for the determination of carbonic anhydrase activity. The results demonstrated complex responses of changes in enzyme activity in all tissues analyzed, and it is not possible to show a response pattern even among the oysters of points 1 and 3 that are accustomed to aerial exposure naturally. There was also a greater activity of carbonic anhydrase in the hemolymph of oysters, regardless of the collection point, when compared to the gill and the mantle. In addition, a higher condition index was observed in the oysters that always remain immersed independently of the variation of the tide compared to the oysters that spend periods of the day emerged during the low tide.

Key words: Cabo Branco Beach. *Crassostrea brasiliana*. Hemolymph. Gill. Mantle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Exemplar de <i>Crassostrea brasiliana</i>	13
Figura 2.	Desenho amostral dos recifes da Praia do Cabo Branco-PB. Ilustração reproduzida de Monteiro Neto, I. E. (2016).	17
Figura 3.	Animais em caixa de transporte.	18
Figura 4.	Esquema representativo do experimento.	19

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Dados abióticos das condições as quais as ostras *Crassostrea brasiliana* foram submetidas no laboratório. 18
- Tabela 2. Valores da média (\pm erro padrão da média) do comprimento, largura, altura, peso visceral e peso concha das ostras *Crassostrea brasiliana* coletadas nos recifes da praia de Cabo Branco. Letras diferentes indicam significância estatística entre os pontos, $p < 0,05$ 25

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Atividade da anidrase carbônica na hemolinfa das ostras. As colunas pretas representam os valores obtidos das ostras do ponto 1 expostas às condições experimentais. As colunas cinza-claros representam os valores obtidos das ostras do ponto 2 expostas às condições experimentais. As colunas cinza-escuros representam os valores obtidos das ostras do ponto 3 expostas às condições experimentais. As letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nos diferentes pontos de coletas das ostras (ponto 1, 2 e 3). As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nas diferentes condições experimentais das ostras (imerso, emerso e re-imerso). Letras diferentes indicam significância estatística, $p < 0,05$ 22

Gráfico 2. Atividade da anidrase carbônica na brânquia das ostras. As colunas pretas representam os valores obtidos das ostras do ponto 1 expostas às condições experimentais. As colunas cinza-claros representam os valores obtidos das ostras do ponto 2 expostas às condições experimentais. As colunas cinza-escuros representam os valores obtidos das ostras do ponto 3 expostas às condições experimentais. As letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nos diferentes pontos de coletas das ostras (ponto 1, 2 e 3). As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nas diferentes condições experimentais das ostras (imerso, emerso e re-imerso). Letras diferentes indicam significância estatística, $p < 0,05$ 23

Gráfico 3. Atividade da anidrase carbônica no manto das ostras. As colunas pretas representam os valores obtidos das ostras do ponto 1 expostas às condições experimentais. As colunas cinza-claros representam os valores obtidos das ostras do ponto 2 expostas às condições experimentais. As colunas cinza-escuros representam os valores obtidos das ostras do ponto 3 expostas às condições experimentais. As letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nos diferentes pontos de coletas das ostras (ponto 1, 2 e 3). As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nas diferentes condições experimentais das ostras (imerso, emerso e re-imerso). Letras diferentes indicam significância estatística, $p < 0,05$ 24

Gráfico 4. Índice de Condição das ostras *Crassostrea brasiliiana*. As letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nos diferentes pontos de coletas das ostras (ponto 1, 2 e 3). Letras diferentes indicam significância estatística, $p < 0,05$ 25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	ENZIMA ANIDRASE CARBÔNICA	12
1.2	MOLUSCOS BIVALVES	12
1.3	EXPOSIÇÃO AÉREA DOS MOLUSCOS BIVALVES	14
1.4	ÍNDICE DE CONDIÇÃO	15
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	METODOLOGIA	17
3.1	ÁREA DE ESTUDO	17
3.2	ACLIMATAÇÃO	18
3.3	DESENHO EXPERIMENTAL	18
3.4	MORFOMETRIA, AMOSTRAGEM DOS TECIDOS E ÍNDICE DE CONDIÇÃO	19
3.5	ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ANIDRASE CARBÔNICA	20
3.6	DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS	20
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
4	RESULTADOS	22
4.1	ATIVIDADE DA ANIDRASE CARBÔNICA NA HEMOLINFA	22
4.2	ATIVIDADE DA ANIDRASE CARBÔNICA NA BRÂNQUIA	23
4.3	ATIVIDADE DA ANIDRASE CARBÔNICA NO MANTO	24
4.4	MORFOMETRIA E ÍNDICE DE CONDIÇÃO	25
5	DISCUSSÃO	26
6	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENZIMA ANIDRASE CARBÔNICA

A enzima anidrase carbônica (AC) é uma metaloenzima que contém um átomo de zinco e que catalisa a hidratação reversível do CO₂ em bicarbonato (HCO₃⁻) e H⁺ com alta eficiência, e está presente em praticamente todos os organismos vivos. Essa enzima exerce papel importante em diversos processos biológicos e fisiológicos como: fotossíntese, respiração, transporte iônico, calcificação (Hewett-Emmett e Tashian, 1996) e participa nos processos de regulação ácido-base, ou seja, na manutenção do pH dentro de certos limites através da catálise da reação de hidratação do CO₂: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ (Azevedo e Freire, 2005).

É evidente, em vários estudos, a presença da anidrase carbônica na hemolinfa, brânquia e manto de moluscos. A ação dessa enzima pode ser detectada através da metodologia que envolve o monitoramento do pH, pela liberação de H⁺ como resultado da sua atividade. Na hemolinfa, a anidrase carbônica em ostras está relacionada a respiração (Nielsen e Frieden, 1972). No manto essa enzima está relacionada ao crescimento da concha (Ren *et al.*, 2014). No entanto, na brânquia, o papel é incerto, mas possivelmente a AC está relacionada na excreção de amônia (Henry, 1996).

Considerando que a enzima anidrase carbônica exerce funções na hemolinfa e em tecidos de ostras, é plausível o estudo laboratorial para se ter conhecimento da atividade da AC e dos mecanismos fisiológicos utilizados pelas ostras *Crassostrea brasiliana* para lidarem com a hipóxia durante a simulação da exposição aérea. Esse estudo é bastante relevante, tanto para a pesquisa científica em João Pessoa - PB, quanto para o melhor entendimento da fisiologia da espécie em questão.

1.2 MOLUSCOS BIVALVES

Os moluscos bivalves são organismos filtradores, em vista disso obtém seu alimento por meio do batimento ciliar branquial, produzindo correntes de água para o seu interior. Alimentam-se principalmente de fitoplâncton, zooplâncton e matéria orgânica particulada em suspensão (Moreira, 1995). Por serem organismos filtradores, a composição nutricional pode sofrer interferência de vários fatores, como: espécie, sexo, grau de maturação sexual, tamanho, temperatura, tipo de alimentação e estação do ano (Caetano, 2006).

As ostras possuem um papel fundamental nos ambientes costeiros, promovendo uma grande variedade de funções. A estrutura populacional desses animais persiste por longos

períodos e interage com vários processos ecológicos. Diante disso, uma redução das populações de moluscos pode gerar um efeito negativo na estrutura e no funcionamento de todo o ecossistema (Norling e Kautsky, 2007).

Os moluscos bivalves possuem um sistema circulatório semiaberto, onde a hemolinfa flui entre a brânquia e o manto. A hemolinfa é composta por uma fração celular (células circulantes ou hemócitos), e por uma fração líquida constituída pelo plasma (Vieira, 2014). Esses organismos possuem alta tolerância a diferentes fatores ambientais como salinidade, disponibilidade de oxigênio e pH; e podem sobreviver facilmente em laboratório. Inclusive possuem uma boa morfologia, fornecendo uma quantidade de hemolinfa e tecidos adequada para diversos estudos, como analisar a atividade da anidrase carbônica nesses organismos, que é o foco do estudo em questão.

As ostras são representantes dos moluscos bivalves (Classe Bivalvia – Família Ostreidae) apresentando duas valvas, cabeça rudimentar, hemolinfa, brânquia, manto e um músculo muito forte, chamado de adutor, que mantém as conchas fechadas e protegidas contra predação e dessecação (Brusca e Brusca, 2007; Zhang, 2012). As ostras são animais filtradores e costumam manter parte das suas conchas ligeiramente abertas, por onde entra a água com a sua alimentação. Nessas horas, o músculo fica relaxado, mas, ao menor sinal de perigo, se contrai, fechando as valvas fortemente (Christo, 2006).

Figura 1: Exemplar de *Crassostrea brasiliiana*.



A ostra *Crassostrea brasiliiana* é um molusco bivalve pertencente à Ostreidae, apresenta interesse comercial e ocorre em praticamente todo o litoral brasileiro. As espécies deste gênero são consideradas eurialinas, euritêrmicas, desovam irregularmente ao longo do ano, sendo adaptadas a ambientes estuarinos e apresentam boa tolerância à hipóxia (Greenway e Storey,

1999; Christo, 2006), apresentando grande importância para a descoberta de novos estudos (Figura 1).

1.3 EXPOSIÇÃO AÉREA DOS MOLUSCOS BIVALVES

Os moluscos bivalves do litoral podem exercer períodos de exposição aérea, no qual a duração de horas ou dias vai depender da sua distribuição na costa e do ciclo das marés. Conseqüentemente, as ostras experimentam uma restrição no tempo disponível para alimentação, variações de temperaturas e podem sofrer dessecação, enfrentando um grande desafio fisiológico. Sabe-se que as taxas de consumo de oxigênio dos moluscos bivalves emersos são invariavelmente inferiores às taxas mínimas medidas quando imersos. Esses animais quando estão emersos, enfrentam a dificuldade de manter a respiração aeróbia e as respostas comportamentais para regular a perda de água. Diante dessa dificuldade, os bivalves utilizam vias metabólicas anaeróbias quando os tecidos são privados de oxigênio (Sadok *et al.*, 1999).

O ambiente costeiro sujeita seus habitantes a uma ampla variação nas concentrações de oxigênio e também flutuações na disponibilidade de CO₂ ao longo do dia. Moluscos bivalves, como a ostra *Crassostrea brasiliana* são expostas periodicamente a essas mudanças na disponibilidade de oxigênio devido às oscilações da maré. Durante as marés baixas, esses organismos são capazes de suportar os períodos de privação de oxigênio. Quando a maré sobe, as conchas se abrem e os organismos são reoxigenados (Abele *et al.*, 2007).

Vários estudos indicam que os períodos de ciclos de exposição aérea de moluscos bivalves seguido de re-imersão na água do mar em virtude das oscilações nos níveis de maré, podem ser responsáveis por grandes variações na fisiologia dos moluscos bivalves (Steffani e Branchi, 2003).

Os moluscos bivalves apresentam três estratégias durante a emersão: o uso de ar-respiratório (McMahon, 1988), a depressão da taxa metabólica durante o fechamento da concha e o uso do metabolismo anaeróbio, levando à acumulação de produtos finais (De Zwaan, 1983), como por exemplo: ATP, ácido pirúvico e ácido láctico. Essas estratégias são mecanismos que facilitam a sobrevivência desses organismos sob condições de exposição aérea ou hipóxia.

No entanto, a sobrevivência à hipóxia e conseqüentemente a acidose extracelular pode afetar o metabolismo, mudando o uso da via metabólica aeróbica para a via metabólica anaeróbica para produzir energia (Grieshaber *et al.*, 1994; Pannunzio e Storey, 1998). Essa transição de respiração, reflete na ausência de um fluxo de água através das brânquias, das superfícies do manto como um local de troca respiratória (Coleman, 1976). Há também

evidências que sugerem que os organismos diminuem seu metabolismo durante o estresse hipóxico (Burnett, 1997). E como as ostras emersas são expostas ao ar regularmente, podem enfrentar várias temperaturas diferentes ao longo do dia, que também influenciam o seu metabolismo (Willson, e Burnett, 2000).

1.4 Índice de condição

O índice de condição (IC) é utilizado para avaliar a condição do organismo no seu habitat, ou seja, avaliar o crescimento das ostras em relação as suas conchas e as suas vísceras. Diante disso, quanto maior o peso úmido das vísceras em relação as conchas, maior será o índice de condição, e conseqüentemente melhor será o estado fisiológico do animal (Lawrence e Scott, 1982; Lucas e Beninger, 1985). Assim, o IC é importante para entender como a fisiologia das ostras estão sendo afetadas de acordo com o local onde se encontram.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a atividade da anidrase carbônica na hemolinfa, na brânquia e no manto em dois grupos de ostras *Crassostrea brasiliiana* de um costão rochoso submetidas a regimes artificiais de marés: ostras que ficam naturalmente imersas durante a maré baixa e ostras que ficam naturalmente emersas durante a maré baixa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

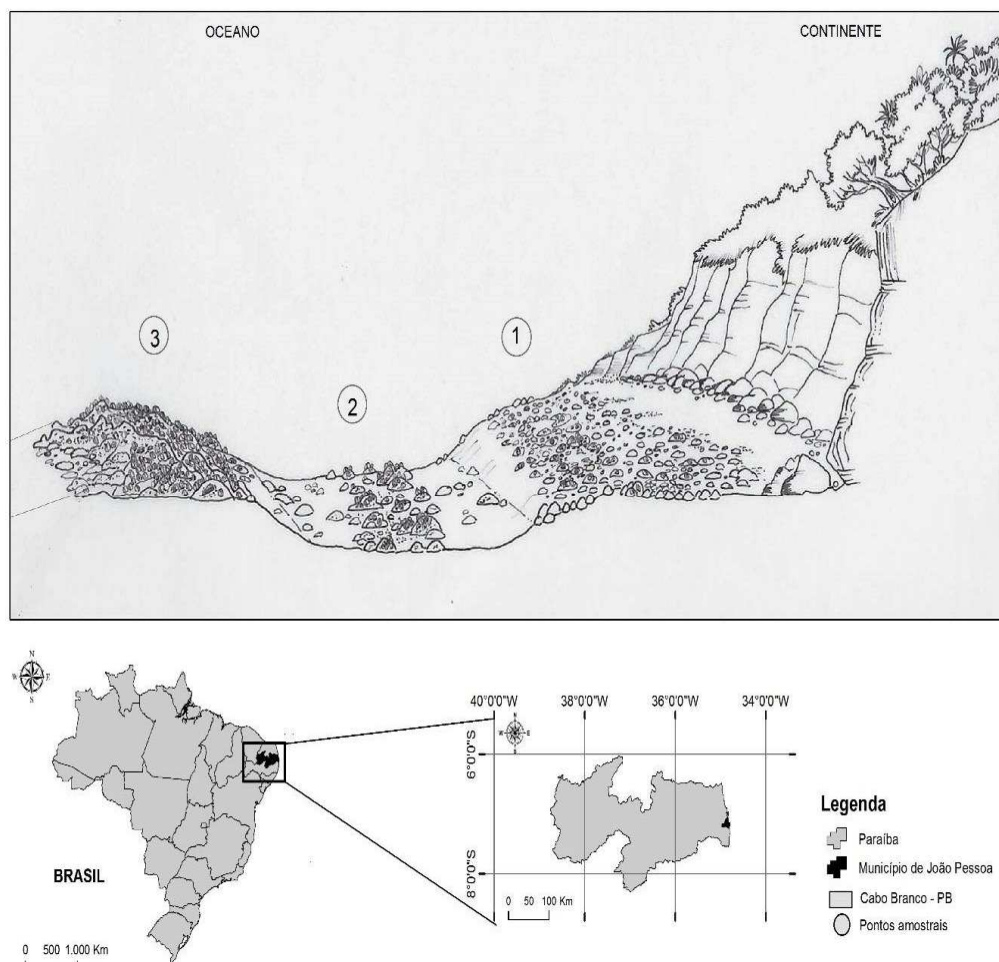
- Investigar nas ostras que ficam naturalmente emersas durante a maré baixa se existe diferença na atividade da anidrase carbônica durante um período de imersão, emersão e re-imersão experimental;
- Investigar nas ostras que ficam naturalmente imersas durante a maré baixa se existe diferença na atividade da anidrase carbônica durante um período de imersão, emersão e re-imersão experimental;
- Comparar as repostas dos dois grupos de ostras na atividade da anidrase carbônica após serem submetidas ao regime experimental.
- Analisar a morfometria e o índice de condição dos dois grupos de ostras.

3 METODOLOGIA

3.1 ÁREA DE ESTUDO

Para esse estudo foram realizadas três coletas das ostras entre os meses de setembro (2017) a abril (2018) nos recifes da praia do Cabo Branco (7°08'46''Sul, 34°47'53''Oeste), João Pessoa – PB em maré baixa em três pontos: O ponto 1 é localizado a 22 metros da barreira do Cabo Branco, sendo o mais próximo da linha da praia; o ponto 2 é localizado a 232 metros da barreira, sendo o intermediário da linha da praia; enquanto o ponto 3 é localizado a 367 metros da barreira, sendo o mais distante da linha da praia (Figura 2). As ostras dos pontos 1 e 3, ficam naturalmente emersas em maré baixa, e as ostras do ponto 2, ficam naturalmente imersas em maré baixa e maré alta. As coletas das ostras foram realizadas durante o dia, aleatoriamente e com o auxílio de um facão.

Figura 2. Desenho amostral dos recifes da Praia do Cabo Branco-PB. Ilustração reproduzida de Monteiro Neto, I.E. (2016).



3.2 ACLIMATAÇÃO

Após a coleta, as ostras foram transportadas para o laboratório de Ecofisiologia Animal, do Curso de Ciências Biológicas do Campus V da Universidade Estadual da Paraíba. No laboratório as ostras foram mantidas durante 4 dias, antes do início dos experimentos, num sistema de água do mar natural ventilado e arejado, equipado com um filtro e aeradores de aquários (Figura 3), e alimentadas com ração de peixe. Após a aclimatação as ostras foram submetidas aos experimentos conforme descrito na tabela 1.

Figura 3: Animais em caixa de transporte.



Tabela 1: Dados abióticos das condições que as ostras *Crassostrea brasiliiana* foram submetidas no laboratório.

Ponto de coleta de origem			
Fatores abióticos	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
Salinidade (‰)	35	35	35
PH	8,18	8,2	8,4
Temperatura (°C)	23	23	23

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

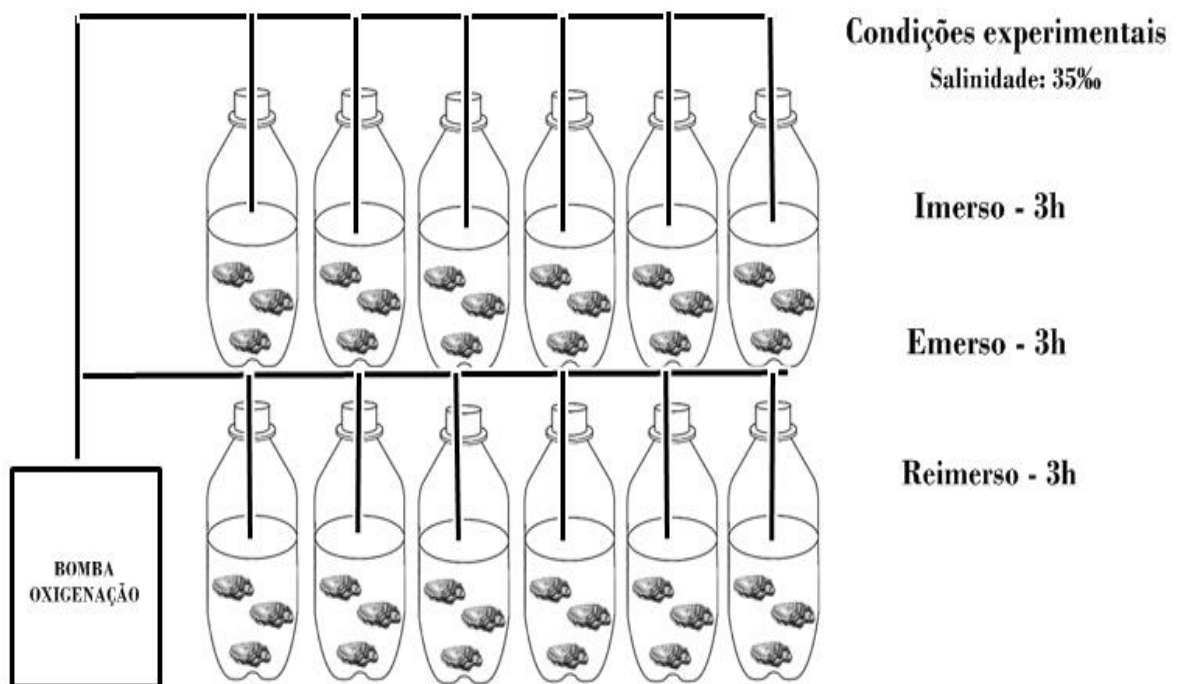
Após o período de aclimatação, as ostras foram submetidas a um experimento que simula um regime de marés (Figura 4). Para cada ponto de coleta, foram utilizadas 36 ostras que foram distribuídas em 12 aquários (3 ostras por aquário) contendo 1L de água do mar, com salinidade, pH e temperatura conforme descrito na tabela 1.

A amostragem das ostras no laboratório foi então realizada seguindo as seguintes etapas:

- Na primeira etapa, as 36 ostras (3 em cada aquário) permaneceram por 3 horas imersas em água do mar.

- Na segunda etapa, após as 3 horas de imersão, uma ostra de cada aquário foi amostrada (totalizando 12 ostras amostradas); e as ostras restantes tiveram a água escoada do aquário, simulando a maré baixa.
- Na terceira etapa, após 3 horas de emersão, uma ostra de cada aquário foi amostrada (totalizando 12 ostras amostradas) e foi recolocado 1L de água do mar, simulando a maré alta.
- Na quarta etapa, após 3 horas de re-imersão, foi amostrada a última ostra de cada aquário (totalizando 12 ostras amostradas), e foi escoada toda a água do aquário.

Figura 4. Esquema representativo do experimento.



3.4 MORFOMETRIA, AMOSTRAGEM DOS TECIDOS E ÍNDICE DE CONDIÇÃO

No total, foram amostrados 108 indivíduos, sendo 36 desses coletados no ponto 1; 36 coletados no ponto 2 e os outros 36 coletados no ponto 3.

Para a morfometria, foram medidos o comprimento, a largura e altura da concha dos indivíduos com o auxílio de um paquímetro. As ostras foram então abertas e a hemolinfa foi extraída através do músculo adutor com o auxílio de uma seringa de 1 ml e uma agulha de 0,60 x 25 mm, e armazenada em freezer -20°C para posterior dosagem da atividade da anidrase

carbônica. Em seguida a concha e o conteúdo visceral total de cada indivíduo foram pesados em uma balança analítica (SHIMADZU AU220) e os valores foram utilizados para calcular o índice de condição, que consiste na relação entre o peso úmido do conteúdo visceral total/peso da concha * 100 (Lucas e Beninger, 1985). Em seguida brânquia e manto foram amostrados com auxílio de tesoura cirúrgica e pinça e armazenados em freezer -20°C para posterior dosagem da atividade da anidrase carbônica.

3.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ANIDRASE CARBÔNICA

Para determinação da atividade da anidrase carbônica na brânquia e no manto as amostras foram homogeneizadas utilizando homogeneizador (HOMO MIX) a 10% peso/volume com tampão tris-fosfato (225 mM Manitol, 75 mM Sacarose, 10 mM Tris Base, 10 mM NaH₂PO₄), pH 7,4. Após centrifugação (2000 x g, 5 min, 4°C) na centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5810R), foi retirado o sobrenadante dos *ependorfs*, no qual parte do sobrenadante foi utilizado para o ensaio da enzima, e outra parte para a determinação do teor total de proteína. Para determinação da atividade da AC na hemolinfa, uma alíquota da amostra foi utilizada sem centrifugação ou diluição. A atividade da anidrase carbônica foi determinada de acordo com o método estabelecido por Vitale *et al.*, (1999), cuja a queda no pH de uma mistura de 7,5 ml do tampão tris fosfato + 50 µl da hemolinfa ou do homogeneizado tecidual + 1 ml de água destilada saturada com gás carbônico foi monitorado de 4 em 4 s, durante 20 s, utilizando um medidor de pH de bancada (pH Meter PHS-3E). Para cada amostra, a taxa da reação catalisada (RC) foi estimada pelo coeficiente angular de uma regressão linear entre pH e tempo. A taxa da reação não catalisada (RNC) foi determinada usando apenas a solução tampão de homogeneização do tecido sem o homogeneizado. Foi calculada a atividade específica da anidrase carbônica (AAC) utilizando a fórmula: $AAC = [(RC/RNC) - 1] / \text{mg de proteína total ou ml de hemolinfa}$. Para o ensaio da anidrase carbônica, cada amostra de hemolinfa e todos os sobrenadantes de brânquia e manto foram homogeneizados no VORTEX QL-901.

3.6 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS

Para a dosagem do teor total de proteína dos homogeneizados de tecidos foi utilizado o protocolo descrito por Bradford (1976), usando diluição de 1:1, e BSA (albumina bovina) como padrão. A quantificação de proteínas foi realizada por leitura colorimétrica através de uma leitora de microplacas (Spectra Max® i3- Molecular Devices).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

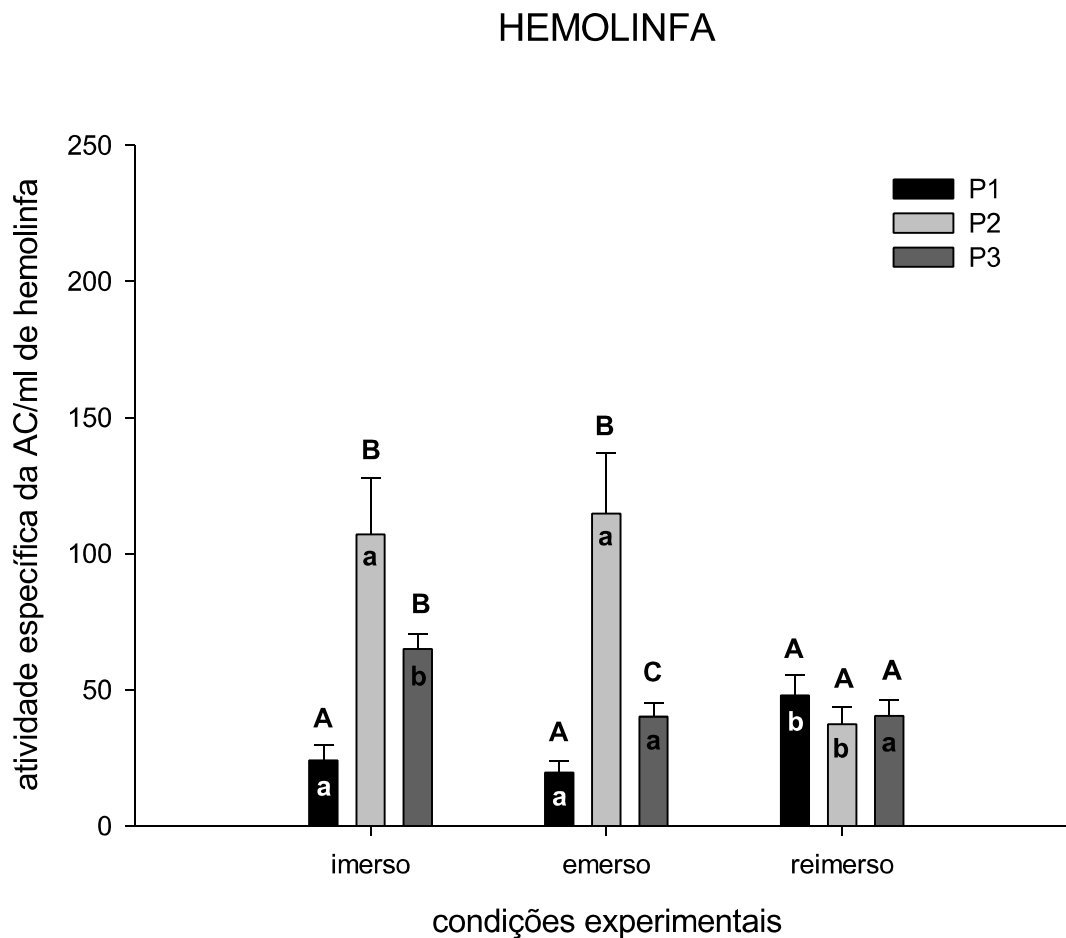
Os dados foram apresentados como média (\pm erro padrão da média) e para a análise estatística todos os dados tiveram a normalidade testada através do teste de *Shapiro-wilk*. Todos os dados apresentaram distribuição não normal. Com isso, os dados da anidrase carbônica da hemolinfa, brânquia e manto foram transformados antes de serem submetidos ao teste paramétrico *ANOVA* de dois fatores com *Holm-Sidak* como pós teste. Os fatores analisados foram condição experimental (imerso, emerso e re-imerso) e pontos de coleta (P1, P2 e P3). Os dados de índice de condição e morfometria foram submetidos ao teste *Kruskal-Wallis* seguido do teste de *Tukey*. Todas as análises foram realizadas através do programa estatístico Sigma plot®. E para todos os resultados obtidos o nível de significância foi de 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE DA ANIDRASE CARBÔNICA NA HEMOLINFA

Dentre os valores encontrados para a atividade da enzima anidrase carbônica (AC) na hemolinfa, percebe-se que as ostras do ponto 1 aumentaram a atividade da enzima na condição experimental re-imerso. As ostras do ponto 2 reduziram a atividade da anidrase carbônica na condição experimental re-imerso. E as ostras do ponto 3 aumentaram a atividade da AC na condição experimental imerso.

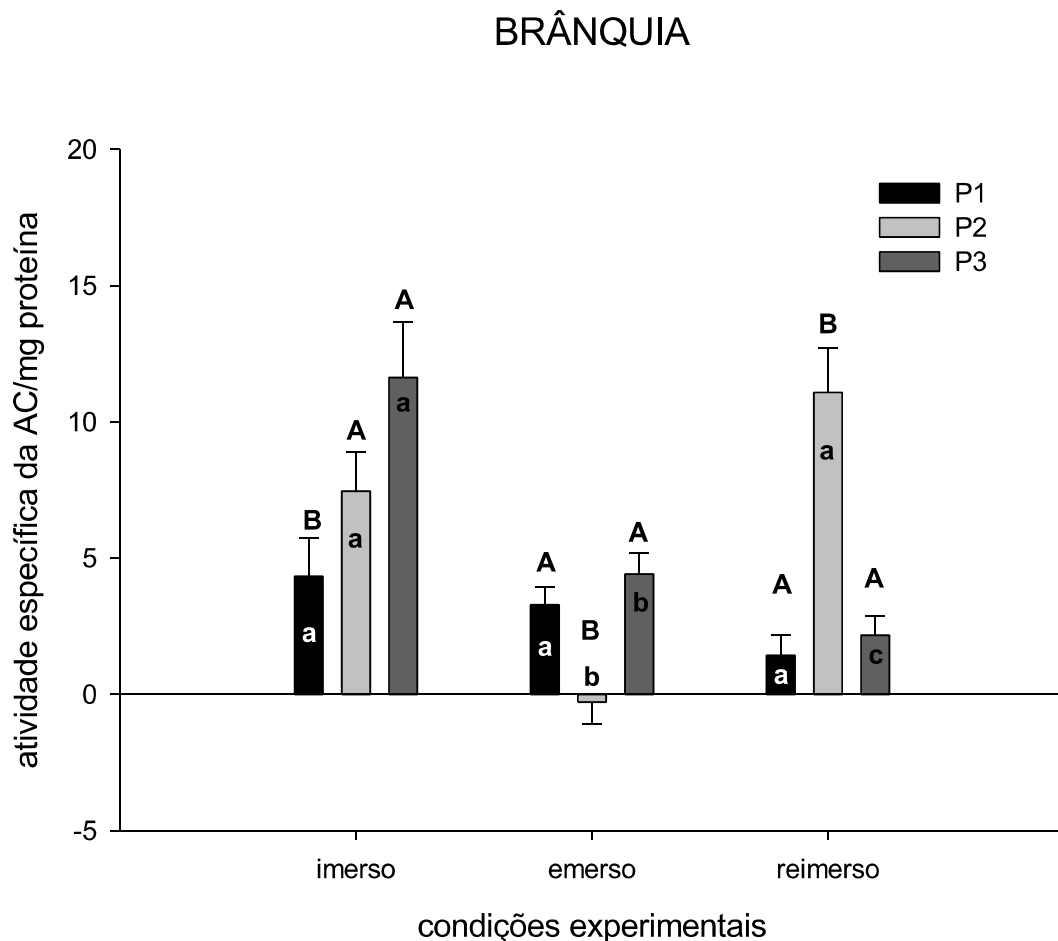
Gráfico 1. Atividade da anidrase carbônica na hemolinfa das ostras. As colunas pretas representam os valores obtidos das ostras do ponto 1 expostas às condições experimentais. As colunas cinza-claros representam os valores obtidos das ostras do ponto 2 expostas às condições experimentais. As colunas cinza-escuros representam os valores obtidos das ostras do ponto 3 expostas às condições experimentais. As letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nos diferentes pontos de coletas das ostras (ponto 1, 2 e 3). As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nas diferentes condições experimentais das ostras (imerso, emerso e re-imerso). Letras diferentes indicam significância estatística, $p < 0,05$.



4.2 ATIVIDADE DA ANIDRASE CARBÔNICA NA BRÂNQUIA

Dentre os valores encontrados para a atividade da enzima anidrase carbônica (AC) na brânquia, percebe-se que as ostras do ponto 1 não apresentam diferenças significativas entre as condições experimentais. As ostras do ponto 2 reduziram a atividade da anidrase carbônica na condição experimental emerso, apresentando valores negativos, e aumentaram a atividade da enzima na condição experimental re-imerso. E as ostras do ponto 3 apresentam diferenças estatísticas entre as condições experimentais, aumentando a atividade da AC na condição experimental imerso e diminuindo a atividade da enzima nas condições experimentais emerso e re-imerso.

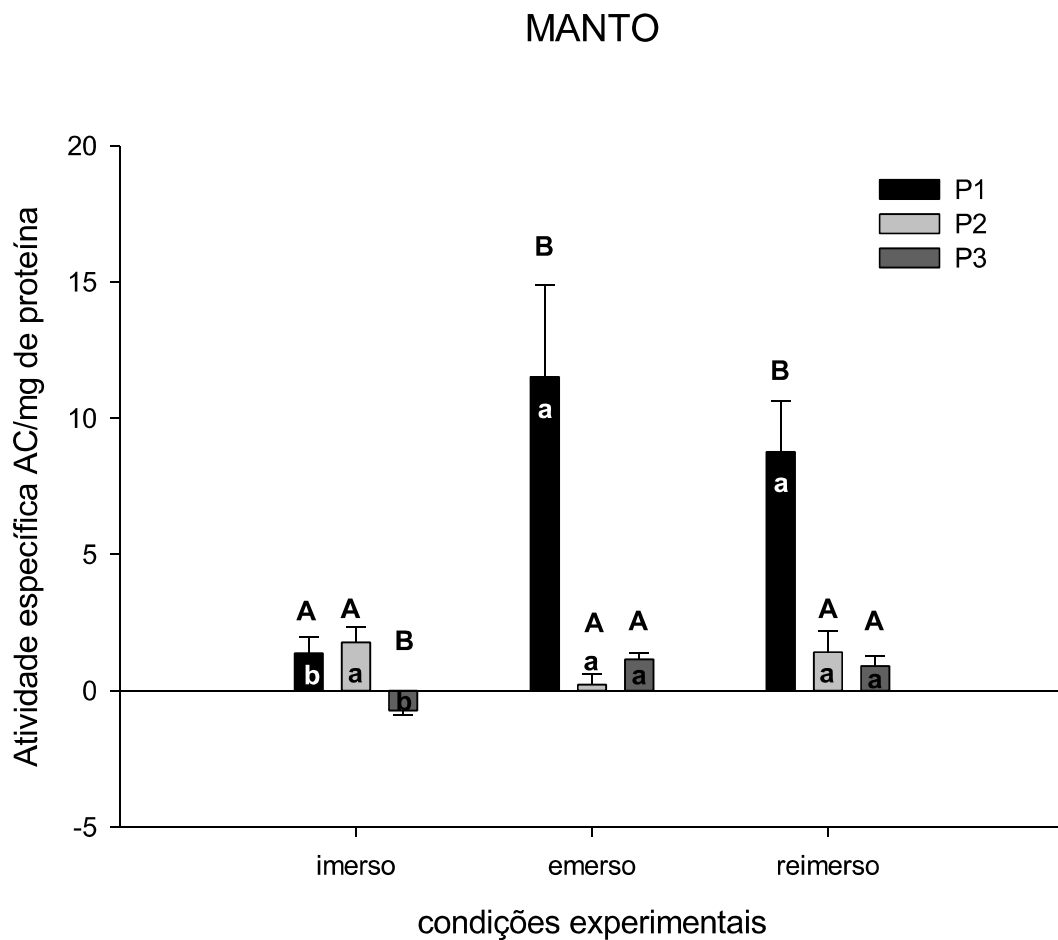
Gráfico 2. Atividade da anidrase carbônica na brânquia das ostras. As colunas pretas representam os valores obtidos das ostras do ponto 1 expostas às condições experimentais. As colunas cinza-claros representam os valores obtidos das ostras do ponto 2 expostas às condições experimentais. As colunas cinza-escuros representam os valores obtidos das ostras do ponto 3 expostas às condições experimentais. As letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nos diferentes pontos de coletas das ostras (ponto 1, 2 e 3). As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nas diferentes condições experimentais das ostras (imerso, emerso e re-imerso). Letras diferentes indicam significância estatística, $p < 0,05$.



4.3 ATIVIDADE DA ANIDRASE CARBÔNICA NO MANTO

Dentre os valores encontrados para a atividade da enzima anidrase carbônica (AC) no manto, percebe-se que as ostras do ponto 1 reduziram na condição experimental imerso e aumentaram na condição experimental emersa e re-imersa. Enquanto as ostras do ponto 2, não tiveram diferenças estatísticas. E as ostras do ponto 3 reduziram a atividade da anidrase carbônica na condição experimental imerso, apresentando valores negativos.

Gráfico 3. Atividade da anidrase carbônica no manto das ostras. As colunas pretas representam os valores obtidos das ostras do ponto 1 expostas às condições experimentais. As colunas cinza-claros representam os valores obtidos das ostras do ponto 2 expostas às condições experimentais. As colunas cinza-escuros representam os valores obtidos das ostras do ponto 3 expostas às condições experimentais. As letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nos diferentes pontos de coletas das ostras (ponto 1, 2 e 3). As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nas diferentes condições experimentais das ostras (imerso, emerso e re-imerso). Letras diferentes indicam significância estatística, $p < 0,05$.



4.4 MORFOMETRIA E ÍNDICE DE CONDIÇÃO

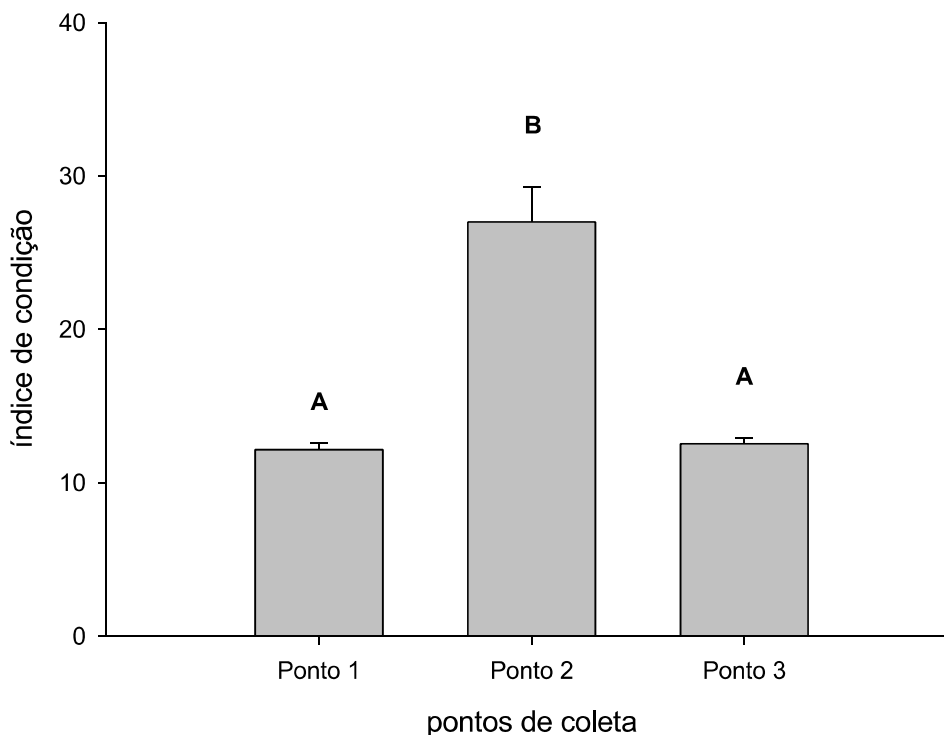
Os valores encontrados para a morfometria e índice de condição das ostras *Crassostrea brasiliana* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores da média (\pm erro padrão da média) do comprimento, largura, altura, peso visceral e peso concha das ostras *Crassostrea brasiliana* coletadas nos recifes da praia de Cabo Branco. Letras diferentes indicam significância estatística entre os pontos, $p < 0,05$.

Pontos amostrais	Morfometria			Índice de condição	
	Comprimento	Largura	Altura	Peso visceral	Peso concha
Ponto 1	4,0 \pm 0,18 ^a	2,7 \pm 0,19 ^a	0,87 \pm 0,08 ^a	1,0 \pm 0 ^a	9,0 \pm 1,0 ^a
Ponto 2	2,9 \pm 0,13 ^b	1,7 \pm 0,15 ^b	0,4 \pm 0,03 ^b	2,62 \pm 0,32 ^b	10,14 \pm 0,9 ^b
Ponto 3	4,4 \pm 0,14 ^a	3,3 \pm 0,14 ^c	0,7 \pm 0,21 ^a	1,22 \pm 0,09 ^a	9,83 \pm 0,7 ^a

A partir dos dados de morfometria foi possível observar que as ostras do ponto 2 apresentaram tamanhos menores na altura e comprimento das conchas. E em relação a largura, as ostras do ponto 1, 2 e 3 apresentaram tamanhos diferentes. Segundo aos dados de índice de condição foi possível observar que as ostras do ponto 2 apresentam maiores pesos viscerais e pesos da concha comparadas aos pontos 1 e 3.

Gráfico 4. Índice de Condição das ostras *Crassostrea brasiliana*. As letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas observadas nos diferentes pontos de coletas das ostras (ponto 1, 2 e 3). Letras diferentes indicam significância estatística, $p < 0,05$.



5 DISCUSSÃO

A anidrase carbônica está presente em vários processos metabólicos de organismos envolvendo CO₂, e exercendo várias funções diferentes (Henry *et al.*, 2012). Nesse trabalho, foi analisado a atividade da enzima anidrase carbônica da hemolinfa, brânquia e manto de dois grupos de ostras marinhas, *Crassostrea brasiliiana*, submetidas as condições de laboratório a uma simulação do ciclo das marés. Existe uma extensa literatura que mostra que os bivalves marinhos podem lidar com a exposição aérea através de respostas morfológicas, fisiológicas e comportamentais (Grieshaber *et al.*, 1994; McMahon, 1988; Shick *et al.*, 1988). Em geral, os bivalves que habitam a costa fecham suas conchas quando estão emersos para conservar a água, se proteger contra predadores e mudam para o metabolismo anaeróbico; e também abrem suas conchas quando estão imersos e permite a manutenção do metabolismo aeróbico (Boyden, 1972; McMahon, 1988; Widdows *et al.*, 1979).

No presente estudo, os resultados para a atividade da anidrase carbônica (AC) na hemolinfa mostraram que as ostras dos pontos 1, 2 e 3 apresentaram diferentes atividades dessa enzima na condição experimental emersa. Segundo Scanes *et al.*, (2017), as ostras *Saccostrea glomerata*, fecham suas conchas durante à emersão, limitando a respiração. À medida que o organismo excreta CO₂ metabólico através de mecanismos aeróbicos e anaeróbicos, ocorre aumento do gás carbônico na hemolinfa, ocorrendo assim, uma acidose extracelular. Quando ocorre aumento do gás carbônico na hemolinfa, isso impede que os processos fisiológicos dos bivalves se normalizem, diminuindo o metabolismo até retornar ao estado de pressão normal do gás carbônico. Ou seja, na acidose, os organismos experimentam uma acidificação dos fluidos e tecidos corporais, afetando processos fisiológicos importantes (Burnett, 1997).

A redução da atividade da anidrase carbônica na hemolinfa das ostras do ponto 2 na condição experimental re-imerso, provavelmente é devido a esses organismos não serem submetidos a exposição aérea no seu habitat natural, conseqüentemente não estão adaptados aos mecanismos da hipóxia. E em estudos de moluscos bivalves durante a emersão, muitos processos vitais são afetados, como por exemplo, o tempo disponível para alimentação é reduzido, a produção de amônia é interrompida, entre outros (Byrne e McMahon, 1994; Scanes *et al.*, 2017), talvez devido a esses efeitos, quando as ostras são re-imersas respondam a uma baixa atividade da enzima. E a alta atividade da AC na hemolinfa das ostras do ponto 1 na condição experimental re-imerso, e no ponto 3 na condição experimental imerso, provavelmente é devido a maré alta, porque quando a maré sobe, as ostras que estão imersas, abrem suas conchas e os organismos são reoxigenados (Abele *et al.*, 2007), ocasionado pelo aumento de O₂.

Estudos realizados por Dwyer e Burnett (1996), em ostras *Crassostrea virginica*, verificam que durante a exposição ao ar, as ostras acessavam o ar e aparentemente não eram completamente anaeróbicas. Já os estudos desenvolvidos por Booth *et al.* (1984), foi observado que a exposição aérea no mexilhão *Mytilus edulis*, induz uma acidose significativa na hemolinfa de seus bivalves, provavelmente quando as conchas das ostras estão fechadas, a pressão parcial de CO₂ sobe e o pH da hemolinfa diminui. Segundo Nielsen e Frieden, (1972), durante a maré baixa os moluscos bivalves passam períodos do dia com suas conchas fechadas e como consequência interrompem o processo de troca de O₂ por CO₂. De fato, a alta atividade da anidrase carbônica na hemolinfa está relacionada aos processos respiratórios, talvez essa enzima atue na remoção do CO₂.

As respostas relacionadas à hipóxia em experimentos laboratoriais são variáveis, podem não apresentar diferenças significativas ou até mesmo podem haver uma diminuição dos resultados (Hagerman e Uglow, 1985). No presente estudo, a atividade da anidrase carbônica nas brânquias das ostras do ponto 2 foi reduzida na condição experimental emersa. Esse resultado reflete no estudo de Monteiro Neto (2016), onde no ponto 2, as ostras *Crassostrea brasiliiana* não necessitam do mecanismo de fechamento das valvas para evitar a desidratação dos tecidos, desse modo, essas ostras não acumulam CO₂, sendo menos dependentes da atuação da anidrase carbônica.

A baixa atividade da AC das ostras do ponto 3 durante a condição experimental emerso, se dá pelo declínio na demanda metabólica, provavelmente devido à redução da atividade ciliar das brânquias (McMahon, 1988). E de acordo com Laradde e Storey (2002), quando moluscos bivalves de um costão rochoso são expostos ao ar, o fluxo de oxigênio das brânquias para os tecidos cai bruscamente devido a um decréscimo contínuo na concentração do O₂ dissolvido na água contida no interior das conchas, o qual é consumido rápido. E a alta atividade da anidrase carbônica na brânquia das ostras do ponto 2 na condição experimental re-imerso e das ostras do ponto 3 na condição experimental imerso, provavelmente pelo fato que ocorrem processos como a recarga de energia, aumento da atividade ciliar branquial necessária para excretar produtos finais metabólicos anaeróbicos dos tecidos para o ambiente externo (Sadok *et al* 1999; Booth e Mangum, 1978) e o reembolso da “dívida de oxigênio” (McMahon, 1988; Shick *et al.*, 1988). Cujo o tamanho da “dívida de oxigênio” é proporcional à duração do período de exposição e é pago durante a primeira hora de re-imersão (Widdows & Shick, 1985).

A amônia é um resíduo comum de ostras. Segundo Dwyer e Burnett (1996), sugere que é possível que o NH₃ contribua para a compensação do pH em ostras. Assim é provável que a influência da anidrase carbônica na brânquia esteja relacionada com a excreção de amônia,

sendo facilitadora do transporte de amônia, fornecendo íons H^+ para o protonamento de NH_3 em NH_4^+ (Henry, 1996).

A anidrase carbônica é bastante estudada em diferentes organismos, inclusive alguns estudos de moluscos sugerem que dados obtidos em experimentos de respostas fisiológicas à hipóxia realizados em laboratório são diferentes de dados obtidos em experimentos na natureza (Spicer, 2014). No presente estudo, os pontos 1 e 3 apresentou um aumento da atividade da anidrase carbônica no manto na condição experimental emerso. Este resultado corrobora do descrito por Monteiro Neto (2016), no qual em seu estudo *in situ* com as ostras *Crassostrea brasiliana*, a atividade da anidrase carbônica (AC) no manto aumentou nos pontos em que as ostras ficam emersas quando comparadas às ostras que ficam sempre imersas. Segundo este autor, a explicação para isto estaria relacionada com o retorno de íons Ca^{2+} e deposição de $CaCO_3$ na concha que libera H^+ , no qual deve ser removido do animal para evitar a acidificação dos fluidos corporais, embora o mecanismo para isso não seja esclarecido. É curioso que em relação ao ponto 1, os resultados foram significativos para atividade da AC na hemolinfa e nos demais tecidos. Apesar de ser um ponto próximo a barreira, e a praia do Cabo Branco apresentar um alto grau de vulnerabilidade à erosão costeira (Reis *et al.*, 2008), isso poderia afetar fortemente o desempenho e a sobrevivência desses organismos. Porém não parecem interferir na expressão da enzima.

A abertura das conchas permite a renovação rápida das reservas de O_2 da cavidade do manto (e a remoção do CO_2 acumulado) para os tecidos. Após o fechamento das conchas, o O_2 é retirado da cavidade do manto, minimizando a perda de água por evaporação (McMahon e Williams, 1984). As ostras mantinham suas conchas fechadas durante a exposição ao ar, quando o CO_2 se acumulava. O CO_2 é produzido por vias aeróbicas; no entanto, à medida que os limitados estoques de O_2 dentro da casca se esgotam, é possível que o CO_2 seja produzido por meios anaeróbicos (de Zwaan e Wijnsman, 1976).

Segundo Huang e Newell (2002), a exposição ao ar associado a dessecação é um dos principais estresses que os bivalves enfrentam ao longo do dia, apresentando diminuição dos níveis de oxigênio nos tecidos. Inclusive, a hipóxia pode ter efeito no crescimento, na alimentação e nas taxas metabólicas. No estudo de Gray *et al.*, (2002) na ostra *Crassostrea virginica*, foi observado que baixas concentrações de oxigênio podem afetar o crescimento do indivíduo. Nos resultados do presente estudo, indicam que as ostras do ponto 2 possuem tamanhos menores no comprimento e na altura das conchas, porém, essas ostras possuem maiores índices de condição (pesos viscerais e pesos da concha), provavelmente por apresentar maiores tempos de alimentação. Este resultado corrobora do descrito por Roegner e Mann

(1995), no qual em seu estudo com as ostras *Crassostrea virginica*, observou-se uma maior taxa de crescimento de ostras imersas do que as ostras emersas. Segundo o autor Ren *et al.*, (2014) em seu estudo destacou que fatores ambientais, como: a temperatura, pH e exposição aérea podem regular a expressão da enzima anidrase carbônica no manto do bivalve *Hyriopsis cumingi*, sugerindo de fato que AC desempenha papel no crescimento da concha. E de acordo com os resultados do manto do presente estudo, houve uma baixa atividade da anidrase carbônica dos pontos 1 e 3 na condição experimental imerso, no entanto, não há nenhuma evidência conclusiva para os efeitos de redução para a atividade da AC nessa condição experimental.

6 CONCLUSÃO

As ostras dos pontos 1, 2 e 3 apresentaram diferenças na atividade da anidrase carbônica entre as condições experimentais (imersão, emersão e re-imersão), apresentando respostas complexas, não sendo possível evidenciar um padrão de resposta mesmo entre as ostras habituadas à exposição aérea naturalmente (ponto 1 e ponto 3).

As ostras dos pontos 1, 2 e 3 apresentaram uma maior atividade na anidrase carbônica na hemolinfa comparadas no tecido da brânquia e do manto.

As ostras que ficam naturalmente imersas, localizadas no ponto 2, apresentaram maiores índices de condição comparadas as ostras que ficam naturalmente emersas, localizadas nos pontos 1 e 3 durante maré baixa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abele, D. et al. (2007). **Marine invertebrate mitochondria and oxidative stress**. *Front Biosci*, v. 12, p. 933–946.

Azevedo, M.; Freire, C. A. O. (2005). **A osmorregulação como biomarcador para análise do impacto de contaminantes e avaliação de regiões costeiras brasileiras**. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia. Curitiba.

Booth, C.E., McDonald, D.G. & Walsh, P.J. (1984). **Acid-base balance in the sea mussel, *Mytilus edulis*. I. Effects of hypoxia and air-exposure on hemolymph acid-base status**. *Mar. Biol. Lett*, 5, 347-358.

Booth, C. E. and C. P. Mangum. 1978. **Oxygen uptake and transport in the lamellibranch mollusc *Modiolus demissus***. *Physiol. Zool.* 51:17-32.

Boyden, C. R. 1972. **Aerial respiration of the cockle *Cerastoderma edule* in relation to temperature**. *Comp. Biochem. Physiol.* 43A:697-712.

Bradford, M.M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brusca, R. C. & Brusca, G. J., 2007. **Invertebrados**. 2a.ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 968p.

Burnett, L.E., 1997. **The challenges of living in hypoxic and hypercapnic aquatic environments**. *Am. Zool.* 37, 633–640.

Byrne, R. A., & McMahon, R. F. (1994). **Behavioral and physiological responses to emersion in freshwater bivalves**. *American Zoologist*, 34(2), 194-204.

Caetano, R. (2006). **Biodisponibilidade de zinco de ostras (*Crassostrea gigas*) cultivadas em Florianópolis / SC**. Florianópolis, (Dissertação de Mestrado – Nutrição) – Universidade Federal de Santa Catarina.

Christo, S. W. 2006. **Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea Sacco*, 1897 na baía de Guaratuba (Paraná – Brasil): um subsídio ao cultivo.** Curitiba, 146 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas- Zoologia), Universidade Federal do Paraná.

Coleman, N., 1976. The aerial respiration of *Modiolus modiolus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 54A, 401–406.

De Zwaan, A., and T. C. M. Wijsman. 1976. **Anaerobic metabolism in bivalvia (Mollusca), characteristics of anaerobic metabolism.** *Comp. Biochem. Physiol.* 54B: 3 13-324.

De Zwaan, A. (1983) **Carbohydrate catabolism in bivalves.** In: Hochachka PW (ed) *The Mollusca*. Vol. 1. Metabolic biochemistry and molecular biomechanics. Academic Press, New York, pp 137±175.

Dwyer, J.J. & Burnett, L.E. (1996). **Acid-base status of the oyster *Crassostrea virginica* in response to air exposure and to infections by *Perkinsus marinus*.** *The Biological Bulletin*, 190(1), 139-147.

Gray, J. S. et al. (2002). **Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment.** *Marine Ecology Progress Series*. 238, 249–279.

Greenway, S. C; Storey K. B. (1999). **The effect of prolonged anoxia on enzyme activities in oysters (*Crassostrea virginica*) at different seasons.** *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 242(2), 259-272.

Grieshaber, M.K., Hardewig, I., Kreutzer, U., Portner, H.-O., 1994. **Physiological and metabolic responses to " hypoxia in invertebrates.** *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 125, 44–147.

Hagerman, L. and Uglow, R. F. (1985). **Effects of hypoxia on the respiratory and circulatory regulation of *Nephrops norvegicus*.** *Mar. Biol.* 87, 273-278.

Henry, R.P. (1996). **Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism.** *Annual Review of Physiology*, 58(1), 523-538.

Henry, R. P., Lucu, C., Onken, H., & Weihrauch, D. (2012). **Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals.** *Frontiers in physiology*, 3.

- Hewett-Emmett, D.; Tashian, R. E. (1996). **Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the α -, β -, and γ -carbonic anhydrase gene families.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 5, n. 1, p. 50-77.
- Huang, S. C. & Newell, R. I. E. (2002). **Seasonal variations in the rates of aquatic and aerial respiration and ammonium excretion of the ribbed mussel, *Geukensia demissa* (Dillwyn).** *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 270, 241–255.
- Larade K. & Storey, K. B. (2002) **A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates. In: Cell and Molecular Responses to Stress.** Vol 3: Sensing, Signalling, and Cell Adaptation (STOREY KB & STOREY JM, eds.). Elsevier Press, Amsterdã.
- Lawrence, D. R. & Scott, G. I. (1982). **The Determination and Use Condition Index of Oysters.** *Estuaries* Vol. 5, No. 1, p. 23-27
- Lucas, A., & Beninger, P. G. (1985). **The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture.** *Aquaculture*, 44(3), 187-200.
- McMahon, R. F. and C. J. Williams. 1984. **A unique respiratory adaptation to emersion in the introduced Asian freshwater clam *Corbicula fluminea* (Müller) (Lamellibranchia: Corbiculacea).** *Physiol. Zool.* 57:274-279.
- McMahon R. F (1988). **Respiratory Response to Periodic Emergence in Intertidal Molluscs.** *AMER. ZOOL.*, 28:97-114.
- Monteiro Neto, I.E. (2016). **Atividade da anidrase carbônica de ostras *Crassostrea brasiliiana* em condições naturais dos ciclos de maré e exposição aérea – um estudo em recifes costeiros.** Trabalho de conclusão do curso de Ciências Biológicas (UEPB).
- Moreira, F. M. (1995) **Estudo morfológico e quantitativo dos hemócitos do mexilhão *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia).** Trabalho de conclusão do curso de Ciências Biológicas (UFSC).
- Nielsen, S.A. & Frieden, E. (1972). **Carbonic anhydrase activity in molluscs.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 41(3), 461-468.
- Norling, P.; Kautsky, N. 2007. **Structural and functional effects of *Mytilus edulis* on diversity of associated species and ecosystem functioning.** *Mar Ecol Prog Ser* 351:163-175.

- Pannunzio, T.M., Storey, K.B., 1998. **Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea***. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 221, 277–292.
- Reis, C. M. M., Neumann, V. H. D. M. L., & de Lima, E. R. V. (2008). **Vulnerabilidade do litoral de João Pessoa (PB) à erosão costeira**. Estudos Geológicos, 18(2), 26.
- Ren, G. *et al.* (2014). **Characterization of a novel carbonic anhydrase from freshwater pearl mussel *Hyriopsis cumingii* and the expression profile of its transcript in response to environmental conditions**. Gene 546, 56–62.
- Roegner, G.C. & Mann, R. (1995). **Early recruitment and growth of the American oyster *Crassostrea virginica* (Bivalvia: Ostreidae) with respect to tidal zonation and season**. Marine ecology progress series. Oldendorf, 117(1), 91-101.
- Sadok, S., Uglow, R. F., Haswell, S. J (1999). **Some aspects of nitrogen metabolism in *Mytilus edulis*: effects of aerial exposure**. Marine Biology 135: 297- 305.
- Scanes, E.; Parker, L. M.; O'Connor, W. A.; Stapp, L. S. & Ross, P. M. (2017). **Intertidal oysters reach their physiological limit in a future high-CO₂ world**. Journal of Experimental Biology 220, 765-774.
- Shick JM, Widdows J, Gnaiger E (1988) **Calorimetric studies of behaviour, metabolism and energetics of sessile intertidal animals**. Am Zool 28: 161-181.
- Spicer, J. I. (2014). **What can an ecophysiological approach tell us about the physiological responses of marine invertebrates to hypoxia?.** Journal of Experimental Biology, 217(1), 46-56.
- Steffani C. N. & Branchi G. M. (2003) **Grown rate, condition, and shell shape of *Mytilus galloprovincialis*: responses to wave exposure**. Mar. Ecol. Prog. Ser. 246. 197-209.
- Vieira, G. C. (2014). **Caracterização preliminar dos hemócitos da perlífera nativa *Pteria hirundo***. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.
- Vitale, A.M. et al. (1999). **Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae)**. Comp. Biochem. Physiol. 122(C), 121-129.

Widdows, J., Bayne, B.L., Livingstone, D.R., Newell, R.I.E., Donkin, P., 1979. **Physiological and biochemical responses of bivalve molluscs to exposure to air.** *Comp. Biochem. Physiol.* 62A, 301–308.

Widdows J, Shick JM (1985) **Physiological responses of *Mytilus edulis* and *Cardium edule* to aerial exposure.** *Mar Biol* 85: 217- 232.

Willson, L.L. & Burnett, L.E. (2000). **Whole animal and gill tissue oxygen uptake in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*: Effects of hypoxia, hypercapnia, air exposure, and infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*.** *Journal of experiment.*

Zhang, G. et al. (2012). **The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation.** *Nature*, 490 (7418), 49-54.