Rafael Cancian Gomes da Cruz

Digestão de Diferentes Carboidratos em
Nausitora fusticula (Jeffreys, 1860)
(Teredinidae, Bivalvia)

São Paulo

2006

Rafael Cancian Gomes da Cruz

Digestão de Diferentes Carboidratos em
Nausitora fusticula (Jeffreys, 1860)
(Teredinidae, Bivalvia)

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências, na área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Pacheco
Jordão

São Paulo

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SERVIÇO DE BIBLIOTECA DO INSTITUTO
DE BIOCIÊNCIAS / USP**

C 957d

Cruz, Rafael Cancian Gomes da
Digestão de diferentes carboidratos em
Nausitora fusticula (Jeffreys, 1860) (Bivalvia,
Teredinidae) / Rafael Cancian Gomes da Cruz. –
São Paulo : R. C. G. C., 2006
111p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São
Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de
Fisiologia, 2006.

1. Bivalvia 2. Teredinidae 3. Digestão de
carboidratos 4. Digestão de celulose I. Universidade
de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento
de Fisiologia II. Título.

**LC: QL 430.6
QL 430.7.T4**

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr.(a):

Prof(a). Dr(a).:

Profa. Dra. Beatriz Pacheco Jordão

Aos meus Pais

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Beatriz Pacheco Jordão, pela orientação, e ajuda no desenvolvimento do presente trabalho.

Aos Professores Doutores Sonia G. B. C. Lopes, e Osmar Domaneschi do Departamento de Zoologia do IB/USP pelo conhecimento de teredinídeos e de bivalves, que foram a mim passados de uma forma ou outra.

Em especial ao biólogo e amigo Vinicius D'Afonseca, pelo auxílio nas coletas, manutenção dos animais, ajuda nos experimentos e principalmente pela amizade e companheirismo.

A Doutora Daniela Toma de Moraes, pelo auxílio no projeto de pesquisa e pelo fornecimento de inúmeras bibliografias e também pelo conhecimento prático e teórico da biologia dos Teredinaidae.

Aos ex-companheiros de laboratório Luis Alexander Gonzales, Carlos Eduardo Silva da Cruz e a Técnica Suely de Oliveira, pela ajuda, conversas e amizade.

A todos meus amigos, colegas, docentes e funcionários do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP que me

auxiliaram direta ou indiretamente no desenvolvimento do presente estudo.

Aos meus amigos Vinicius Dutra Castro pela revisão do texto, Ricardo Padila pelo apoio técnico, Ricardo Nascimento Antônio pela diagramação do texto, e Alberto Cavalcanti Figueiredo Neto pelas conversas, sugestões, e pela amizade de todos.

À minha namorada Camila Cavicchioli pelo suporte técnico, e por todo o apoio, incentivo, carinho, companheirismo e amor, tanto nos momentos fáceis quanto nos difíceis. Amo!

E por último, mas não menos importante, para os meus pais Juvenino Gomes da Cruz e Neide Cancian da Cruz, pelo apoio e compreensão incondicionais, e por não pouparem esforços para que eu obtivesse sucesso em mais uma etapa da minha vida, e principalmente pelo amor e carinho.

SUMÁRIO

1 - Resumo	X
2 - Abstract	XII
3 - Introdução	01
3.1 - Aspectos biológicos dos teredinídeos	01
3.2 - Digestão do material filtrado pelas brânquias	07
3.3 - A digestão da madeira nos teredinídeos	08
3.4 - Estudo das enzimas celulolíticas em teredinídeos	10
4 - Objetivos	15
5 - Material e Métodos	16
5.1 - Metodologia de coleta	16
5.2 - Manutenção dos animais no biotério	18
5.3 - Remoção dos animais da madeira	19
5.4 - Dissecção dos animais	21
5.5 - Preparação do material para os ensaios bioquímicos	22
5.6 - Determinação de massa protéica	22
5.7 - Determinação de atividades enzimáticas no trato digestivo de <i>N. fusticula</i>	23

6 - Resultados	25
6.1 - Determinação de massa protéica nos extratos de <i>N. fusticula</i>	25
6.2 - Determinação de atividades de carboidrases em diferentes órgãos de <i>N. fusticula</i>	28
6.2.1 - Distribuição de atividades enzimáticas sobre amido	30
6.2.2 - Distribuição de atividades enzimáticas sobre laminarina e liquenana	35
6.2.3 - Distribuição de atividades enzimáticas sobre carboximetilcelulose (CMC)	43
6.2.4 - Distribuição de atividades enzimáticas sobre maltose e β -glicosídeo	48
7 - Discussão	56
7.1 - Distribuição de massa protéica nos extratos de <i>N. fusticula</i>	56
7.2 - Digestão de carboidratos em <i>Nausitora fusticula</i>	58
7.2.1 - Digestão de amido	58
7.2.2 - Digestão de maltose	64
7.2.3 - Digestão de laminarina e liquenana	66
7.2.4 - Digestão de celulose	71
7.2.5 - Digestão de β -glicosídeo	78

7.3 – Organização do processo digestivo de carboidratos no trato digestório de <i>N. fusticula</i>	80
7.4 - Importância relativa da madeira e do material filtrado	85
8 - Conclusões	88
9 - Referências Bibliográficas	89

1 – Resumo

Os teredinídeos são bivalves perfuradores de madeira. Esses animais desenvolveram a capacidade de utilizar a madeira como fonte de nutrientes, mantendo a capacidade de alimentar-se de material em suspensão. A importância relativa da madeira na alimentação em relação aos hábitos suspensívoros, o local onde a digestão de celulose ocorre, e a origem da celulose envolvida no processo (endógena ou exógena), permanecem desconhecidos. O objetivo do trabalho, portanto, é investigar o processo digestivo nesses animais. *Nausitora fusticula* (Jeffreys, 1860) foi escolhida por ser uma espécie cuja anatomia é bem descrita e por ocorrer em grande abundância no litoral de São Paulo.

Os troncos contendo os animais foram coletados no manguezal da Praia Dura, Ubatuba-SP. Testes enzimáticos foram realizados em diferentes órgãos do trato digestivo (glândula digestiva especializada e normal, apêndice armazenador de madeira, intestino, canal anal) e brânquias; sobre amido, laminarina, liquenana, carboximetilcelulose (CMC), celulose microcristalina (Avicel®), maltose e β -glicosidase.

A digestão de carboidratos ocorre em todos os órgãos analisados, exceto para celulose microcristalina (Avicel®). As maiores atividades foram encontradas no divertículo digestivo especializado e no apêndice.

A presença de atividade enzimática nos ctenídeos aponta para a importância das bactérias da glândula de Deshayes. A digestão de carboximetilcelulose (CMC) ocorre em menor proporção que de outros carboidratos. A madeira é de importância significativa devido a digestão de hemiceluloses. Porém não foi possível determinar se a madeira é mais ou menos importante do que o material filtrado, nem precisamente a origem das enzimas que atuam nestes animais.

2 - Abstract

Teredinids are wood boring bivalves. They evolved to use wood as a source of nutrient, besides keeping the suspension-feeding habit. The role of wood and plankton in the diet of these animals, the structures in which digestion takes place and the origin of the cellulase (endogenous or exogenous) remain uncertain. *Nausitora fusticula* (Jeffreys, 1860) was chosen because the functional anatomy of this species is well described and it's common inhabitant of the mangroves of São Paulo state.

The logs containing *N. Fusticula* were collected in the mangrove of Praia Dura, Ubatuba, São Paulo. Enzymatic activities over starch, carboximetilcellulase (CMC), microcristalinecelulose (Avicel®), lichenan, laminarin, maltose and β -glucosid in different organs of the digestive tract and ctenidia of this species were analyzed.

The digestion of were detected in the organs analyzed, mainly on the appendix and the SDD, except for microcristaline cellulose (Avicel®). The enzymatic activities occur mainly in the appendix and the specialized digestive diverticule (SDD). The presence of enzymatic atctivity in the ctenidia suggests the importance of the glands of Deshayes in the digestive process. The digestion of CMC is less significant than of the other carbohydrates. The results suggest that

wood plays a significant role in the nutrition of this species, mainly due to digestion of hemicelulloses. Still, it is not possible to know if the wood is more important than the plankton in the diet, or to precisely identify the origin of the cellulase.

3 – Introdução

3.1 - Aspectos biológicos dos teredinídeos

Os teredinídeos são moluscos bivalves altamente especializados na perfuração e digestão de madeira. Diferentemente dos outros bivalves, apresentam um corpo vermiforme e concha bem reduzida em relação ao tamanho do corpo (fig. 1).

Figura 1: Vista lateral do corpo do teredinídeo *Nausitora fusticula* (Jeffreys, 1860), recém retirado da madeira. **A**, região anterior; **P**, região posterior; **Ch**, concha; **Cor**, coração; **Gn**, gônadas.

A família Teredinidae Latreille, 1925, juntamente com a família Pholadidae Rafinesque, 1815, constituem a superfamília Pholadacea da ordem Myoida Stoliczka, 1870 (Turner, 1966). Todos os bivalves perfuradores de madeira são membros destas famílias. Diferentemente dos Pholadidae, os Teredinidae ingerem e são capazes de digerir a madeira que perfuram, mantendo também a capacidade de alimentarem-se do plâncton e da matéria orgânica dissolvida na água, como os demais bivalves lamelibrânquios suspensívoros (Turner, 1966).

São abundantes em ambiente marinho e estuarino de regiões temperadas e tropicais, com algumas espécies capazes de suportar salinidades baixas, próximas de zero (Hoagland & Turner, 1981; Lopes e Narchi, 1993). Salinidade, temperatura, e a disponibilidade de madeira estão entre os principais fatores que controlam a distribuição destes animais (Turner, 1966). Qualquer tipo de madeira que se encontre, em tempo integral ou periodicamente, em contato com o meio marinho, pode servir de substrato para esses animais, preferencialmente as que se encontram mais conservadas e enrijecidas, ao invés das mais deterioradas e amolecidas (Board, 1970).

A anatomia dos teredinídeos está relacionada ao seu sucesso adaptativo. O corpo alongado, de aspecto vermiforme, ocupa integralmente a galeria em que se encontram, uma consequência do aumento da eficiência em explorar a madeira em que vivem. A reduzida concha, restringe-se à extremidade anterior do animal, e modificou-se para funcionar como uma ferramenta escavadora. Desenvolveram

também estruturas calcárias em sua extremidade posterior, chamadas de paletas, que podem fechar a abertura da galeria se, porventura, ocorrer algum distúrbio no meio externo.

São de grande importância em termos ecológicos funcionando como agente redutor, pois, além de digerirem, particulam a madeira, e, ao morrerem, deixam expostas suas galerias, facilitando, então, o ataque de bactérias e fungos decompositores, contribuindo para uma reciclagem mais rápida da matéria orgânica vegetal em ambientes estuarinos e de manguezal; mais de 90% da massa de madeira de *Rhizophora* sp. decomposta em manguezais nos primeiros quatro anos de decaimento, são devido a ação destes animais (Robertson, 1991).

Também têm grande importância em termos econômicos quando as madeiras que perfuram são as que compõem estruturas construídas e utilizadas pelos homens, como embarcações, atracadouros, palafitas e outras que entrem em contato com ambiente marinho. Meios de proteger essas estruturas vem sendo desenvolvidos desde a época dos impérios gregos e romanos até os dias de hoje (Turner, 1988).

Atualmente outro fator que desperta interesse econômico nos teredinídeos são as bactérias simbiotes da Glândula de Deshayes encontrada nos ctenídeos (brânquias) desses animais (Popham & Dickson, 1973; Popham, 1975). Essas bactérias são as únicas que têm, ao mesmo tempo, a habilidade de produzir uma celulase, e a de fixar nitrogênio (Waterbury *et al.* 1983), é o único registro de associação com uma bactéria celulolítica em um órgão que não pertence ao trato digestório.

Essas bactérias também produzem uma protease alcalina que apresenta, em testes preliminares, grande eficácia para limpar lentes de contato, embora seu uso em escala industrial ainda não seja possível (Greene, Griffin & Cotta, 1996).

Também possuem um potencial como fonte alimentar, constituindo parte da culinária de alguns locais como, por exemplo, o Norte do Brasil (Andrade, 1979).

Apresentam também órgãos internos relacionados a digestão de madeira, como um apêndice armazenador de madeira (com exceção do gênero *Kuphus* sp.), e um divertículo digestivo especializado. Também apresentam um canal anal, que liga o ânus à câmara suprabranquial, e a já mencionada Glândula de Deshayes, encontrada na região posterior dos ctenídeos (fig. 2 e 3).

O alongamento do estômago, a redução do estilete cristalino, a presença de um apêndice e um divertículo digestivo especializado desenvolvidos; além da presença de ctenídeo posterior e palpos labiais, ambos reduzidos, são características que, quando presentes, indicam uma maior utilização da madeira como fonte alimentar em relação ao material filtrado, enquanto que o contrário indica uma tendência a alimentarem-se preferencialmente do material filtrado (Turner, 1966; Turner & Johnson, 1971; Morton, 1978).

Figura 02. *Nausitora fusticula*. A. Topografia geral dos órgãos após da valva e do manto do lado esquerdo do corpo. B. Detalhes da região anterior. C. Detalhe da região do nefridioporo e gonoporo após leve deslocamento do ctenídeo mostrando cavidade epibranchial.. **a**, apêndice; **aa**, músculo adutor anterior; **ac**, ctenídeo anterior; **an**, ânus; **an.c**, canal anal; **at**, átrio; **bsa**, projeção em forma de bulbo do ducto excretor aferente; **bsi**, projeção em forma de bulbo do intestino; **ch**, capuz cefálico; **dh**, capuz dorsal; **dip**, palpo labial dorsal; **ec**, cavidade epibranchial; **ef**, ducto excretor eferente; **ex**, sifão exalante; **f**, pé; **go**, gônada; **god**, gonoduto; **gop**, gonoporo; **hc**, cavidade hipobranquial; **int**, intesino; **in**, sifão inalante; **k**, porção principal dos rins; **m**, manto; **mg**, volta marginal; **mc**, colar do manto; **NDD**, divertículo digestivo normal; **ned**, nefridioporo; **p**, paleta; **pa**, músculo adutor posterior; **pc**, ctenídeo posterior; **SDD**, divertículo digestivo especializado; **ss**, saco do estilete cristalino; **vê**, ventrículo; **vg**, gânglio visceral. Retirado de Lopes & Narchi, 1998. Em destaque alguns dos órgão analisados no presente estudo

Figura 03: Vista lateral dos órgãos do sistema digestório de *Nausitora fustícula*, após remoção parcial das glândulas digestivas simples e especializada. **a**, apêndice; **ar**, região anterior do estômago; **int**, intestino; **dh**, capuz dorsal; **mg**, intestino médio; **mr**, região mediana do estômago; **NDD**, divertículo digestivo normal; **prc**, ceco direito posterior; **scp**, projeção cônica semi-espiral; **SDD**, divertículo digestivo especializado. Retirado de Lopes, Narchi & Domaneschi, 1998. Em destaque alguns dos órgãos analisados no presente estudo.

3.2 - Digestão do material filtrado pelas brânquias

A digestão do material filtrado pelas brânquias nos teredinídeos, em geral, ocorre de maneira semelhante aos demais bivalves lamelibrânquios. O material filtrado pelas brânquias é levado à boca via correntes ciliares e então passa por um esôfago tipicamente achatado, chegando ao estômago, onde ocorre a fase extracelular da digestão. Aqui atuam as enzimas provenientes do estilete cristalino (uma estrutura em forma de bastão) e das esférulas de fragmentação, que são originadas de vacúolos digestivos, secretados pelo epitélio dos divertículos digestivos. Ao mesmo tempo, através da força centrífuga da rotação do estilete cristalino, as partículas vão sendo lançadas para as áreas de seleção na parede do estômago. As partículas de tamanho e densidade suficientemente pequenas são encaminhadas para os divertículos digestivos via correntes ciliares, onde serão fagocitadas e submetidas à fase intracelular da digestão, e conseqüente absorção dos produtos finais. As partículas maiores e sem valor nutritivo são encaminhadas para o intestino para serem descartadas. Algumas partículas encaminhadas aos divertículos digestivos podem, ainda, não serem fagocitadas e, então, retornar e serem encaminhadas para o intestino (Owen, 1966; Purchon, 1968; Morton, 1983).

O modelo da digestão em bivalves acima descrito pode apresentar uma série de variações adaptativas aos hábitos e habitat de diferentes espécies, como revisado por Purchon (1971). Esse autor chama a atenção

para o papel de outras estruturas no processo digestório desses animais, bem como possíveis variações no ritmo digestivo.

3.3 - A digestão da madeira nos teredinídeos

A madeira é composta basicamente por 40% (em peso) de celulose (polímero de β -1,4-glucana) na forma cristalina, 30% (em peso) de hemicelulose e por 30% de lignina (Dean, 1978). A celulose, na forma cristalina é insolúvel em água e é estável. Associadas à celulose nas paredes vegetais, estão as hemiceluloses, uma mistura de polissacarídeos, principalmente xilanas, glucanas, mananas e glucomanas, cujos resíduos de glicose são unidos principalmente por ligações β -1,4. A lignina é uma resina altamente inerte, que incrusta os carboidratos, controlando assim, a permeabilidade da madeira a água.

Para que um animal possa alimentar-se da madeira deve ocorrer primeiramente a delignificação da parede celular, separando a lignina dos carboidratos (Dean, 1978). A hemicelulose é degradada a monossacarídeos através da ação de exo e endo-hidrolases. Para ser degradada em produtos solúveis, a celulose cristalina deve ser inicialmente exposta a algum fator que hidrate e exponha as fibras solubilizando a celulose cristalina. Em seguida, é exposta à ação de exo e endo- β -1,4-glucanases, produzindo celotreatose, celotriose e, principalmente, celobiose, que por sua vez, sofrerão a ação de β -

glicosidases, catalisado a hidrólise dessas moléculas em glicose (produto final da digestão da celulose).

Entre as hemiceluloses que possuem ligações β -1,3, encontramos a liquenana e a laminarina.

A liquenana é um polímero de glicose, sendo a mesma unida por ligações β -1,3 e β -1,4. Esse polissacarídeo é um importante constituinte da parede celular de gramíneas (Bacic *et al.*, 1988). A laminarina é uma β -glucana formada principalmente de glicoses unidas por ligações β -1,3, podendo conter algumas ligações β -1,6 (Bacic *et al.*, 1988). Em plantas superiores, esse polissacarídeo é componente de paredes especiais, tais como a placa celular, as células mãe do pólen e a placa crivada. Ele também é depositado em resposta à injúria ou infecção (Bacic *et al.*, 1988). Laminarina ocorre em algas, protozoários, fungos e líquens. Nos animais em geral, os níveis de laminarinase são geralmente maiores em herbívoros e micrófagos e moderados ou reduzidos em carnívoros, embora haja algumas exceções (Vonk & Western, 1984).

As liquenases (endo- β -1,3, β -1,4 glucanases) hidrolisam liquenana e β -glucanas de cereais. Quanto as laminarinases, são conhecidos dois tipos. Uma enzima que é ativa sobre laminarina e β -1,3, β -1,4 glucanas e outra que hidrolisa laminarina mas tem ação limitada sobre β -1,3, β -1,4 glucanas. As duas enzimas estão presentes em fontes microbianas (Jeffries & MacMillan, 1981).

Nos teredinídeos, a raspagem da madeira em finas partículas, através de sua concha, quebra a lignina e expõe os polissacarídeos. Essas finas

partículas, após serem ingeridas, chegam ao estômago, sendo submetidas às áreas de seleção do mesmo, quando podem então ser encaminhadas diretamente aos divertículos digestivos especializados. Alternativamente podem ser primeiramente encaminhadas para o apêndice, sofrendo a ação de algumas enzimas digestivas extracelulares e posteriormente serem encaminhadas para os divertículos digestivos especializados onde ocorre uma digestão intracelular (Potts, 1923; Morton, 1978). Em espécies de Teredinidae que possuem canal anal fechado, com esfíncter, as partículas ainda podem ficar armazenadas nesta estrutura antes de serem eliminadas como fezes (Lopes *et al.*, 2000).

3.4 - Estudo das enzimas celulolíticas em teredinídeos

Harington (1921) foi o primeiro a mostrar que um extrato da glândula digestiva de *Teredo norvegica* Schumacher, 1817 era capaz de produzir glicose a partir da madeira. Atividade de β -1,4-glucanase também foi verificada para *Teredo navalis* Linnaeus, 1758 (Deschamps, 1957; Kadota, 1959), *Bankia setacea* (Tyron, 1863) (Crosby & Reid, 1971), *Bankia indica* [que é de acordo com Turner, 1966 *Bankia Carinata* (Gray) 1827] (Nair, 1955, 1956, 1957) e *Teredo* sp. (Greenfield & Lane, 1953; Greenfield, 1955).

Em todas as espécies de teredinídeos estudadas, a atividade dos extratos dos tecidos em substratos de celulose cristalina é muito baixa

(Harington, 1921; Boynton & Miller, 1927; Kadota, 1959; Cutter & Rosenberg, 1972; Rosenberg & Cutter, 1973), embora 80% da celulose e 15 a 56% de hemicelulose constituintes da madeira sejam digeridas durante sua passagem pelo trato digestivo (Dore & Miller, 1923).

Bankia gouldi (Bartsch, 1908) apresenta um padrão de atividade celulolítica muito semelhante ao fungo *Aspergillus niger*, que cresce bem em hemiceluloses, mas não em celulose cristalina (Dean, 1978).

Bactérias que possuem atividade celulolítica foram encontradas no apêndice e no intestino de *T. navalis* (Deschamps, 1953; Hidaka e Saito, 1956; Kadota, 1959) e de *B. setacea* (Liu & Walden, 1970). Crosby & Reid (1971) analisaram o estilete cristalino, as glândulas digestivas, o apêndice e o intestino de *Bankia setacea*. Não encontraram atividade de celulase no estilete cristalino e, nas glândulas digestivas, a atividade encontrada foi baixa. Porém no apêndice e intestino, analisados conjuntamente, a atividade mostrou-se muito intensa e estaria associada, provavelmente, a ação de bactérias do trato digestivo, já que não foi observada nenhuma secreção de enzimas pela parede desses órgãos. No entanto, Liu & Walden (1970) observaram um baixo número de bactérias no apêndice de *Bankia setacea*, e concluíram que havia quebra da celulose até a formação de glicose nesse órgão e que as enzimas celulolíticas eram endógenas e não bacterianas.

Em uma série de estudos (Rosenberg & Breiter, 1972; Cutter & Rosenberg, 1972; Rosenberg & Cutter, 1973), o apêndice (com e sem conteúdo) de várias espécies de teredinídeos foi analisado e uma bactéria

do gênero *Cellulomonas* sp. foi isolada. Esses estudos confirmaram a atividade da celulase bacteriana e indicaram que a contribuição da celulase bacteriana é suficiente para a decomposição da madeira, justificando sua utilização como fonte primária de alimento.

Morton (1978) verificou que a celulase bacteriana era, provavelmente, de menor importância na digestão dos teredinídeos. Esse autor conclui que a afirmação de Rosenberg & Cutter (1973) de que as partículas de madeira, entrando no estômago induziriam a produção de celulase não é baseada em fatos e não pode ser aceita, uma vez que se verificaram partículas sendo encaminhadas para dentro das glândulas digestivas, e que nessas ocorre a digestão intracelular. Neste mesmo trabalho o autor propõe um ciclo duplo de alimentação e digestão do material filtrado e da madeira não concomitantes, ou seja, quando ocorre um não ocorre o outro, e vice-versa. Turner (1984) vai contra o proposto por Morton (1978) e afirma que os teredinídeos não interrompem o processo de filtrar o plâncton enquanto cavam a madeira e vice-versa e que estes dois processos ocorrem simultaneamente.

Popham & Dickson (1973) e Popham (1975), observaram a presença de bactérias na glândula de Deshayes encontrada em associação às brânquias. Essas bactérias são as únicas que, ao mesmo tempo, produzem uma celulase e também são capazes de fixar nitrogênio (Greene & Freer, 1986; Waterbury *et al.*, 1983). Essas bactérias foram isoladas de 24 espécies representantes de 9 dos 14 gêneros de Teredinidae e são representantes da mesma espécie *Teredinibacter*

turnerae (Distel *et al.*, 2002). Atividade proteolítica e celulásica (Greene *et al.*, 1988; Iman *et al.*, 1993) e propriedades de ligação a celulase (Iman *et al.*, 1990) foram demonstradas para esta bactéria.

Waterbury *et al.* (1983) propôs que essas bactérias podem ser a fonte primária de celulase para os teredinídeos. No entanto, exceto o trabalho de Saraswathy & Nair (1971), onde observaram que a glândula de Deshayes apresenta ductos que se ligam ao esôfago, nenhum outro autor conseguiu evidenciar a presença destes ductos em contato com o esôfago, ou com qualquer outra parte do trato digestório destes animais.

Portanto, o mecanismo de digestão da madeira em teredinídeos permanece obscuro, bem como a importância relativa da madeira em relação ao material filtrado da água; e, como visto, os trabalhos mais recentes nesta linha com enfoque na biologia da digestão desses animais datam das décadas de 70 e 80. Também não se sabe ao certo se há um padrão digestivo geral ou um diferente para cada espécie, tornando necessários estudos isolados para diferentes espécies bem como estudos comparativos a respeito da digestão desses animais.

Nausitora fusticula (Jeffreys, 1860) foi escolhida para o presente estudo, pois é um teredinídeo cuja anatomia geral, bem como a anatomia funcional do estômago e do trato digestivo, e o detalhamento das correntes ciliares internas nos órgãos digestivos são bem conhecidos (Lopes e Narchi, 1998; Lopes, Narchi & Domaneschi, 1998). Estes autores concluíram neste estudo baseados nos critérios propostos por Turner

(1966), que a madeira tem menor importância na alimentação em relação ao material filtrado pelas brânquias.

Além disto *Nausitora fusticula* ocorre em grande abundância no litoral do Estado de São Paulo. No Brasil, sua ocorrência até agora, foi descrita nos litorais de São Paulo (Lopes e Narchi, 1993) e Paraná (Muller & Lana, 1987). Esta espécie apresenta alguns dos órgãos do trato digestivo bastante visíveis e relativamente fáceis de serem dissecados (figs. 2 e 3).

Em nosso laboratório, estudos preliminares evidenciaram a presença de enzimas celulolíticas em *Nausitora fusticula*. Este trabalho foi apresentado na XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), que se realizou no período de 17 a 20 de maio de 2003, em Caxambu (MG).

4 - Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

1. - Investigar o processo digestivo nos teredinídeos
2. - Verificar a importância relativa da madeira em relação ao material filtrado
3. - Identificar em que estruturas ocorrem as carboidrases que atuam nestes animais.

5 – Material e Métodos

5.1 - Metodologia de coleta

Os troncos contendo *Nausitora fusticula* foram coletados no manguezal da Praia Dura, Ubatuba, São Paulo (45°15' W e 23°30' S) (Figs. 04 e 05). Esse manguezal foi escolhido com base nos trabalhos de Lopes & Narchi (1993), que indica *N. fusticula* como sendo a espécie de teredinídeos mais abundante no local, sendo a mesma encontrada em praticamente todo o manguezal.

Figura 04: Aspecto do manguezal da Praia Dura, na desembocadura dos Rios Escuro e Comprido, em Ubatuba, São Paulo - SP, durante a maré alta.

Figura 5: Maguezal da Praia Dura, na desembocadura dos Rios Escuro e Comprido ($45^{\circ}15' W$ e $23^{\circ}30' S$), em Ubatuba, São Paulo – SP. (*) área onde as coletas foram realizadas e a área verde representa a área original do bosque.

Fonte: Hertz, R. (1991). Manguezais do Brasil. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.

Os troncos encontrados no chão do bosque foram lascados com o auxílio de um facão com o intuito de verificar a existência de galerias feitas pelos animais. Havendo animais dentro destas galerias, os troncos eram coletados. Quando necessário, os troncos foram cortados em tamanhos menores com o auxílio do próprio facão, ou por um serrote.

Depois de retirados do manguezal, esses troncos foram lavados em água corrente, e, ainda úmidos, acondicionados em cubas plásticas posteriormente cobertas por sacos plásticos escuros para protegê-los do ressecamento. Em seguida, foram transportados para o Biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP.

Foi feito um total de quatro coletas. As coletas ocorreram, aleatoriamente em maio e novembro de 2004, e em abril e setembro de 2005.

5.2 - Manutenção dos animais no biotério

Os troncos contendo os animais, obtidos das coletas, foram mantidos em um aquário (Fig. 6) com água a uma salinidade de 20 ppm, obtida da mistura de água marinha, trazida da base do CEBIMAR/USP de São Sebastião – SP, e de água doce, na proporção aproximada de 2 partes de água salgada pra 1 parte de água doce. O aquário foi mantido sempre sob

aeração contínua. A temperatura do ar esteve sempre entre 20°C (mínima) e 25°C (máxima).

A cada duas semanas a água do aquário era trocada e o aquário limpo, mantendo assim, os espécimes sob condições ideais para que pudessem se manter vivos.

Figura 6. Vista superior do aquário onde os troncos contendo os animais foram mantidos.

5.3 - Remoção dos animais da madeira

Os animais foram removidos dos troncos de madeira com o auxílio de um alicate, de uma faca de corte e de uma pinça. O processo de retirada de animais da madeira fragmentava-os muito, então, apenas os animais inteiros (Fig. 7), foram transferidos para uma cuba contendo uma solução

salina preparada previamente, a salinidade 20ppm. Os animais danificados foram descartados.

Separaram-se, então, os animais identificados como *N. fusticula* com base na classificação de Turner (1966), dos teredinídeos de outras espécies. Em seguida, foram selecionados os indivíduos *N. fusticula* com comprimento total do corpo maior que aproximadamente 5cm, e menor ou igual a aproximadamente 15cm. Os indivíduos *N. fusticula* menores e maiores que o parâmetro descrito acima, e os indivíduos inteiros de outras espécies foram fixados em álcool glicerinado.

Figura 7. Pedaco de madeira fotografado durante a retirada dos animais da madeira. No campo podem ser vistos um animal exposto quase inteiramente, e a região anterior de outros dois. **Ca**, canal anal; **Ch**, concha; **Cor**, coração; **TC**, tubo calcário.

5.4 - Dissecção dos animais

A dissecção foi realizada sob estereomicroscópio com o auxílio de uma tesoura cirúrgica pequena e de uma pinça de ponta fina. Este processo fragmentava alguns órgãos de alguns animais, que eram então inteiramente dispensados. Foram dissecados 57 animais, divididos em 11 lotes sendo que cada um desses lotes contiveram o total de animais obtidos no dia, variando entre 4 e 7 indivíduos cada.

Coletaram-se as seguintes regiões do trato digestivo: apêndice armazenador de madeira (apêndice), divertículo digestivo especializado (DDE), divertículo digestivo normal (DDN), canal anal e intestino, além de uma porção das brânquias. Essas estruturas estão destacadas nas figuras 2 e 3. Devido ao seu reduzido tamanho, bem como a dificuldade de acesso, o estilete cristalino ou o saco do estilete onde o mesmo se encontra, não foram utilizados neste estudo.

Cada um dos órgãos utilizados foi transferido para tubos específicos. O número de órgãos em cada um dos tubos variou conforme o número de animais dissecados no mesmo dia. Em seguida, o lote dissecado era transferido para um freezer, a temperatura de menos 20°C, até sua utilização.

5.5 - Preparação do material para os ensaios bioquímicos

Os lotes foram descongelados e congelados, repetiu-se este procedimento mais duas vezes mais duas vezes. Então as partes do todo digestivo foram homogeneizadas em água destilada com o auxílio de um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem e filtradas em malha de nylon de 100 μm . De cada homogeneizado foi separado 1ml em tubos de ensaio para controle. O restante foi centrifugado a 100.000Xg durante 1 hora a 4°C. Em seguida, foi coletado o sobrenadante resultante da centrifugação com o auxílio de uma pipeta Pasteur, e transferiu-se o mesmo para tubos de ensaio. O precipitado remanescente foi re-suspendido em 1,0 ml de água destilada com o auxílio de uma seringa, e também transferido para tubos de ensaio. Esses procedimentos devem nos permitir diferenciar atividades enzimáticas solúveis das restritas à membrana.

O volume dos sobrenadantes e precipitados, bem como do homogeneizado inicial, foram medidos. A partir dessas medidas calculou-se a quantidade de órgãos por ml de material nos tubos.

5.6 - Determinação de massa protéica

Para cada um dos lotes, a massa protéica de cada órgão foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) (Coomassie Blue G), utilizando albumina de ovo na confecção da curva padrão.

5.7 - Determinação de atividades enzimáticas no trato digestivo de *N. fusticula*

Os ensaios enzimáticos foram realizados pela incubação de uma alíquota do material a ser analisado com uma alíquota de uma solução-tampão citrato-fosfato pH 6,5 100mM mais o substrato de mesmo volume. Em todos os ensaios, os volumes foram de 100µl de material e 100µl de substrato-tampão, exceto para os ensaios com maltose, onde foram utilizados 50µl de amostra e 50µl de substrato-tampão. Os diferentes substratos utilizados, suas concentrações nos ensaios, e os produtos determinados estão apresentados na Tabela 1.

Todos os ensaios foram realizados a 30°C por 4 diferentes períodos de tempo. Após esses tempos a mistura foi fervida por 3 minutos e os produtos da ação enzimática foram quantificados.

Em cada determinação, controles sem enzima (brancos de substrato) foram incubados do mesmo modo que os experimentais. A atividade enzimática foi expressa em mUnidades (mU), definida como a quantidade de enzima que hidrolisa um μ mol de substrato (ou de ligação) por minuto (Nomenclature Comittee of the International Union of Biochemisrty, 1983).

Tabela 1. Metodologia dos ensaios enzimáticos (*).

Substrato	Concentração do Substrato no Ensaio	Produto Medido	Referência
amido solúvel (<i>Zea mays</i> , Polypharma)	0,50% (p/v) **	Grupo redutor (DNS)	Noelting & Bernfeld (1948)
carboximetilcelulose (CMC) (Sigma)	0,25% (p/v)	Grupo redutor (DNS)	Noelting & Bernfeld (1948)
liquenana (<i>Cetraria islandica</i> , Sigma)	0,125% (p/v)	Grupo redutor (DNS)	Noelting & Bernfeld (1948)
laminarina (<i>Laminaria digitata</i> , Sigma)	0,25% (p/v)	Grupo redutor (DNS)	Noelting & Bernfeld (1948)
celulose microcristalina (Avicel®)	1% (p/v)	Grupo redutor (DNS)	Noelting & Bernfeld (1948)
maltose (sigma)	7 mM	Glicose (TGO)	Dalqvist (1968)
paranitrofenil- β - glicopiranosídeo (Sigma)	20 mM	paranitrofenolato	Terra et al.(1979)

* Todos os ensaios foram realizados em tampão citrato-fosfato pH 6,5 100mM

** à preparação de amido solúvel foi adicionado cloreto de sódio de forma a obter-se uma concentração final no ensaio de 100mM.

6 - Resultados

6.1 - Determinação de massa protéica nos extratos de *N. fusticula*

Dentre os órgãos analisados, o divertículo digestivo especializado e o ctenídeo posterior apresentaram as maiores massas protéicas, entre 5,37 a 28,59 mg de proteína/animal e entre 2,21 a 7,34 mg de proteína/animal, respectivamente, nos lotes ensaiados. Durante a dissecação notou-se que, estes órgãos são claramente maiores que os demais.

O apêndice e o intestino apresentaram, por outro lado, os menores valores de massa protéica; de 0,16 a 1,58 mg de proteína/animal e 0,17 a 1,43 mg de proteína/animal, respectivamente, nos lotes ensaiados. Também foi notado que, de maneira geral, estes órgãos são de tamanho reduzido em relação aos demais órgãos analisados. A dissecação destes foi muito difícil devido não só ao tamanho dos mesmos, mas também por estes encontrarem-se intimamente ligados uns com os outros (Fig. 02).

O divertículo digestivo normal e o canal anal apresentaram valores de massa protéica intermediários: de 0,66 a 3,54 mg de proteína/animal e de 0,51 a 2,43 mg de proteína/animal respectivamente, nos lotes ensaiados.

De maneira geral, a quantidade de massa protéica, apresenta-se de maneira proporcional ao tamanho dos órgãos. Exceto para o canal anal que apresentou valores intermediários e é um órgão grande.

A variação dos valores obtidos nos diferentes lotes deve ser devido ao fato dos animais apresentarem tamanhos diferentes, mesmo estando em fase de vida semelhante.

Analisando-se as quantidades relativas de massa protéica entre material particulado e solúvel após a ultracentrifugação observa-se, no entanto, um padrão bastante constante de distribuição. Esses resultados estão apresentados na Tabela 2. Em todas as regiões analisadas, observou-se uma predominância bastante marcante, de massa protéica na fração solúvel (Tab. 2). A fração solúvel compreende material celular não particulado mais conteúdo luminal não particulado de cada região.

As recuperações da massa protéica das frações sedimento e sobrenadante, resultantes da ultracentrifugação de homogeneizados, estiveram entre 56 e 81% (Tab. 2).

Tabela 2 – Quantidades relativas de massa protéica, e recuperação das frações sobrenadante e sedimento nos diferentes órgãos de *N. fusticula*.

	Ctenídeo Posterior	Apêndice	DDN	DDE	Intestino	Canal Anal
% Sbte.	67 ±5	90 ±5	68 ±5	84 ±3	78 ±6	64 ±8
% Sed.	33 ±5	10 ±5	32 ±5	16 ±3	22 ±6	36 ±8
% Recup.	73 ±5	81 ±20	76 ±4	69 ±8	56 ±11	81 ±12

Sbte. e Sed. correspondem às frações não sedimentadas e sedimentadas, respectivamente, após a ultracentrifugação (ver material e métodos). % de recuperação corresponde à relação entre as massas protéicas do sedimento + sobrenadante / homogeneizado. **DDN** e **DDE**, respectivamente, divertículos digestivos normal e especializado. Valores expressos como média e $\pm$ desvio padrão (n= 6 lotes).

6.2 - Determinação de atividades de carboidrases em diferentes órgãos de *N. fusticula*

De maneira geral, observou-se atividade enzimática sobre todos os substratos testados em todos os órgãos analisados, com exceção de celulose microcristalina (Avicel®), que não demonstrou atividade enzimática em nenhum dos órgãos analisados.

Os números de atividade enzimática variaram devido aos lotes conterem animais de diferentes tamanhos assim como observado para massa protéica. No entanto, quando são expressos em atividade específica (mU/mg de proteína), os valores podem ser melhor comparados (Fig. 9).

As maiores atividades específicas, na grande maioria dos substratos analisados, são observadas para o apêndice, seguido pelo divertículo digestivo especializado. Ao contrário o ctenídeo apresenta os menores valores de atividade específica dentre os órgãos analisados. Chama a atenção também as altas atividades sobre β -glicosídeo no apêndice e divertículo digestivo especializado (Fig. 9).

Fig. 9. Valores atividades específicas (mU/mg de proteína) nos diferentes órgãos de *N. fusticula* nos homogeneizados gerais. **Ap**, apêndice; **CA**, canal anal; **Ctn**, ctenídeo posterior; **DDN** e **DDE**, respectivamente, divertículos digestivos normal e especializado; **Int**, intestino. Valores expressos como média e $\pm$ desvio padrão n= 4 lotes.

6.2.1 - Distribuição de atividades enzimáticas sobre o amido

A atividade enzimática sobre o amido foi verificada, em cada uma das regiões, nas frações solúveis e precipitadas por ultracentrifugação (conforme descrito em Material e Métodos).

Em todas as regiões observou-se predominância, de atividade enzimática na fração solúvel, sendo esta mais marcante no apêndice, divertículo digestivo normal e intestino (Tab. 3).

A tabela 4 mostra os valores de atividade específica (mU/mg de proteína) encontrada em cada uma das regiões e nas frações solúveis e sedimentadas correspondentes.

Os maiores valores de atividade específica sobre o amido foram vistos no apêndice (Tab. 4), o que indica que há uma maior concentração de enzimas atuando sobre o amido neste órgão em relação aos demais órgãos analisados. Observam-se, também, valores significativos e bem próximos entre o divertículo digestivo normal (DDN) e o divertículo digestivo especializado (DDE) (Tab. 4). Considerando-se o desvio padrão, os valores de atividade específica para os mesmos podem ser considerados iguais. O intestino também apresentou uma atividade específica significativa. As menores atividades específicas sobre o amido foram encontradas no canal anal e no ctenídeo posterior (Tab. 4).

Tabela 3 – Quantidades relativas de atividade enzimática sobre amido, e recuperação das frações sobrenadante e sedimento nos diferentes órgãos de *N. fusticula*.

	Ctenídeo Posterior	Apêndice	DDN	DDE	Intestino	Canal Anal
% <i>Sbte.</i>	74 ±3	94 ±3	90 ±7	94 ±8	87 ±5	68 ±1
% <i>Sed.</i>	27 ±3	6 ±3	10 ±7	6 ±8	13 ±5	32 ±1
% <i>Recup.</i>	59 ±8	57 ±8	56 ±12	78 ±4	49 ±7	78 ±5

Sbte. e sedimento Sed. correspondem às frações não sedimentadas e sedimentadas respectivamente, após a ultracentrifugação (ver material e métodos). % de recuperação corresponde à relação entre as atividades do sedimento + sobrenadante / homogeneizado. **DDN** e **DDE**, respectivamente, divertículos digestivos normal e especializado. Valores expressos como média e desvio padrão n= 3 lotes.

Tabela 4: Valores atividades específicas (mU/mg de proteína) sobre o amido nos diferentes órgãos de *N. fusticula* nos homogeneizados gerais e nas frações sobrenadante e sedimento.

	Ctenídeo Posterior	Apêndice	DDN	DDE	Intestino	Canal Anal
Hom.	2,10 ±0,36	28,08 ±1,43	9,68 ±0,76	10,52 ±3,37	7,32 ±0,85	3,94 ±0,05
Sbte.	2,07 ±0,66	22,77 ±2,44	8,99 ±1,19	16,16 ±3,05	7,20 ±2,09	2,87 ±1,39
Sed.	1,70 ±0,38	10,85 ± 4,13	9,84 ±2,60	-----	-----	4,01 ±1,99

Hom. homogeneizado. Sbte. e sedimento Sed. correspondem às frações não sedimentadas e sedimentadas respectivamente, após a ultracentrifugação (ver material e métodos). **DDN** e **DDE**, respectivamente, divertículos digestivos normal e especializado. Valores expressos como média e desvio padrão n= 4 lotes (homogeneizado e sobrenadante) n=3 lotes (sedimento) . (----) valores não disponíveis.

Ao analisarmos as frações solúveis e sedimentadas, referentes as diferentes regiões, podemos destacar o enriquecimento de atividade amilásica (maior atividade específica) nas frações solúveis do apêndice, e do divertículo digestivo especializado (Tab. 4).

Uma maneira de facilitar a análise dos dados obtidos relativos às atividades enzimáticas é observá-los de acordo com suas atividades específicas relativas ($\% \text{ mU/animal} / \% \text{ mg proteína/animal}$) e distribuição de massa protéica ($\% \text{ mg proteína/animal}$) como proposto por De Duve *et al.* (1955). Nessa forma de representação (vide Fig. 10 e outras), a altura do paralelograma indica enriquecimento da enzima na referida fração (quando é maior que 1) ou não (quando é menor que 1). A área do paralelograma representa a atividade enzimática total naquela fração.

Observamos assim, que a atividade amilásica é majoritariamente solúvel nas regiões analisadas (Fig. 10). Além disto, ocorre um discreto enriquecimento de amilase nessa fração (valores maior que 1), exceto no canal anal (Fig. 10). Não foi possível a realização desta análise para o divertículo digestivo especializado.

Figura 10. Atividade específica relativa sobre amido (% mU/an/% mg prot./an.) pela distribuição de massa protéica (% mg de proteína/ animal) entre as frações sobrenadante (área clara) e sedimento (área escura) de alguns órgãos. **DDN** divertículo digestivos normal. Valores expressos como média e $\pm$ desvio padrão n=3 lotes.

6.2.2 - Distribuição de atividades enzimáticas sobre laminarina e liquenana.

As atividades sobre estes carboidratos foram verificadas em cada uma das regiões nas frações solúveis e precipitadas.

Observou-se predominância, de atividade na fração solúvel sobre ambos os carboidratos em todas as regiões analisadas, sendo esta, mais marcante no apêndice, divertículo digestivo normal e intestino (Tabs. 5 e 7). Exceção é feita ao ctenídeo posterior para liquenana onde a atividade aparece distribuída igualmente entre as frações solúvel e sedimentada.

As tabelas 6 e 8 mostram os valores de atividades específicas (mU/mg de proteína) encontrados em cada região e nas frações solúvel e sedimentada correspondentes.

Os maiores valores de atividade específica foram observados no apêndice para laminarina, e no apêndice e no divertículo digestivo normal para liquenana; em ambos os carboidratos os valores médios no apêndice foram próximos de 20 mU/mg de proteína (Tabs. 6 e 8). Para laminarina, em ordem decrescente de valor encontra-se, em segundo lugar o divertículo digestivo especializado, os demais órgãos apresentam valores quantitativamente próximos (Tab. 6). Para liquenana, o divertículo digestivo especializado e o intestino apresentam os segundos maiores valores médios de atividade específica (Tab. 8).

Tabela 5 – Atividades enzimática relativa sobre laminarina, e recuperação das frações sobrenadante e sedimento nos diferentes órgãos de *N. fusticula*.

	Ctenídeo Posterior	Apêndice	DDN	DDE	Intestino
% Sbte.	77 ±1	97±5	90 ±14	97 ±6	84 ±22
% Sed.	23 ±1	3 ±5	10 ±14	3 ±6	16 ±22
% Recup.	53 ±2	69 ±10	92 ±12	69 ±7	77 ±32

Sbte. e Sed. correspondem às frações não sedimentadas e sedimentadas respectivamente, após a ultracentrifugação (ver material e métodos). % de recuperação corresponde à relação entre as atividades do sedimento + sobrenadante / homogeneizado. **DDN** e **DDE**, respectivamente, divertículos digestivos normal e especializado. Valores expressos como média e desvio padrão n= 3 lotes.

Tabela 6: Valores atividades específicas (mU/mg de proteína) sobre laminarina nos diferentes órgãos de *N. fusticula* nos homogeneizados gerais e nas frações sobrenadante e sedimento.

	Ctenídeo Posterior	Apêndice	DDN	DDE	Intestino	Canal Anal
Hom.	1,84 ±0,38	19,69 ±6,94	3,94 ±2,06	13,94 ±3,76	3,35 ±2,21	7,71 ±3,92
Sbte.	1,57 ±0,06	13,82 ±4,20	2,73 ±1,34	15,35 ±5,57	4,80 ±1,46	2,50 ±0,85
Sed.	0,79 ±0,09	7,33 ±1,76	-----	2,98 ±0,84	-----	-----

Hom. valores do homogeneizado geral. Sbte. e Sed. correspondem às frações não sedimentadas e sedimentadas respectivamente, após a ultracentrifugação (ver material e métodos). **DDN** e **DDE**, respectivamente, divertículos digestivos normal e especializado. Valores expressos como média e desvio padrão n= 4 lotes (homogeneizado e sobrenadante) n=3 lotes (sedimento) . (-----) não obteve-se valor médio.

Tabela 7 – Atividade enzimática relativa sobre liquenana, e recuperação das frações sobrenadante e sedimento nos diferentes órgãos de *N. fusticula*.

	Ctenídeo Posterior	Apêndice	DDN	DDE	Intestino	Canal Anal
% Sbte.	50 ±4	78±1	78 ±1	74 ±4	78 ±10	87 ±13
% Sed.	50 ±4	22 ±1	22 ±1	26 ±4	22 ±10	13 ±13
% Recup.	107 ±29	92 ±36	92 ±34	78 ±21	74 ±28	112 ±28

Sbte. e Sed. correspondem às frações não sedimentadas e sedimentadas respectivamente, após a ultracentrifugação (ver material e métodos). % de recuperação corresponde à relação entre as massas protéicas do sedimento + sobrenadante / homogeneizado. **DDN** e **DDE**, respectivamente, divertículos digestivos normal e especializado. Valores expressos como média e desvio padrão n= 3 lotes.

Tabela 8: Valores atividades específicas (mU/mg de proteína) sobre liquenana nos diferentes órgãos de *N. fusticula* nos homogeneizados gerais e nas frações sobrenadante e sedimento.

	Ctenídeo Posterior	Apêndice	DDN	DDE	Intestino	Canal Anal
Hom.	1,92 ±0,90	20,13 ±1,89	15,57 ±4,63	11,12 ±3,45	11,81 ±0,29	6,19 ±1,87
Sbte.	4,58 ±0,72	33,23 ±4,60	12,28 ±1,60	18,60 ±0,38	22,34 ±1,94	18,25 ±5,08
Sed.	4,11 ±0,64	55,65±1,24	8,08 ±1,48	15,10 ±2,13	15,20 ±1,84	----

Hom. valores do homogeneizado geral. Sbte. e Sed. correspondem às frações não sedimentadas e sedimentadas respectivamente, após a ultracentrifugação (ver material e métodos). **DDN** e **DDE**, respectivamente, divertículos digestivos normal e especializado. Valores expressos como média e desvio padrão n= 4 lotes (homogeneizado e sobrenadante) n=3 lotes (sedimento) . (----) não se obteve valor médio.

Para a laminarina não foi possível determinar a atividade para a fração sedimentada resultantes da ultracentrifugação no divertículo digestivo normal, intestino e canal anal. Nas demais regiões notou-se maior enriquecimento na fração sobrenadante (Tab. 6).

Em relação a liquenana, foram encontrados valores de atividade específica igualmente distribuídos nas duas frações nos ctenídeos, valores maiores para a fração solúvel nos divertículos digestivos normal e especializado, e valores mais altos para a fração sedimentada no apêndice e no intestino (Tab. 8), sendo que neste último a atividade na fração sedimentada foi aproximadamente cinco vezes em relação ao sobrenadante.

As figuras 11 e 12 representam esses resultados segundo De Duve *et al.* (1955). Nota-se que tanto em relação a laminarina quanto a liquenana a atividade é majoritariamente solúvel (área do paralelogramo). Além disso, é notado um enriquecimento (altura do paralelogramo) discreto no apêndice para a laminarina (Fig. 11), e no intestino e divertículo digestivo normal para liquenana (Fig. 12). Ao contrário, observa-se um enriquecimento significativo na fração sedimentada no canal anal para laminarina (Fig. 11), e no apêndice e DDE para a liquenana.

Observamos, ainda, que no canal anal para a liquenana (Fig. 12) não houve enriquecimento de nenhuma das frações. Não foi possível realizar-se tal análise em relação aos divertículos digestivos normal e especializado e intestino para lamainarina.

Figura 11. Atividade específica relativa sobre laminarina (% mU/an/% mg prot./an.) pela distribuição de massa protéica (% mg de proteína/ animal) entre as frações sobrenadante (área clara) e sedimento (área escura) de alguns órgãos. Valores expressos como média e $\pm$ desvio padrão n=3 lotes.

Figura 12. Atividade específica relativa sobre liquenana (% mU/an/% mg prot./an.) pela distribuição de massa protéica (% mg de proteína/ animal) entre as frações sobrenadante (área clara) e sedimento (área escura) de alguns órgãos. **DDN** e **DDE**, respectivamente, divertículo digestivos normal e especilaizado. Valores expressos como média e $\pm$ desvio padrão n=3 lotes.

6.2.3 - Distribuição de atividades enzimáticas sobre carboximetilcelulose (CMC).

A atividade enzimática sobre CMC foi verificada nas frações solúveis e sedimentadas resultantes da ultracentrifugação em todas as regiões analisadas de *N. fusticula*, exceto no divertículo digestivo especializado, intestino e no canal anal, onde toda a atividade foi encontrada nas respectivas frações solúveis (Tab. 9).

Em todos os demais órgãos a maior parte das atividades foram encontradas nas frações solúveis (Tab. 9).

A tabela 10 mostra os valores de atividade específica (mU/mg de proteína) de carboximetilcelulase encontrados em cada região e nas frações solúveis e sedimentadas correspondentes.

Os maiores valores de atividade específicas aparecem divididos entre o apêndice, divertículo digestivo normal, intestino e canal anal (Tab. 10).

Em relação as frações resultantes da ultracentrifugação, observa-se que os valores de atividade específica entre das frações solúveis foram maiores que as das frações sedimentadas no ctenídeo posterior, e no divertículo digestivo normal; e o contrário, observou-se para o apêndice e para o divertículo digestivo especializado (Tab. 10). Não se verificou atividade no sedimento do intestino, e no canal anal.

Tabela 9 – Quantidades relativas de atividade enzimática sobre CMC, e recuperação das frações sobrenadante e sedimento nos diferentes órgãos de *N. fusticula*.

	Ctenídeo Posterior	Apêndice	DDN	DDE	Intestino	Canal Anal
% <i>Sbte.</i>	84 ±22	60 ±1	81 ±3	40 ±12	100 ±0	100 ±0
% <i>Sed.</i>	16 ±22	34 ±1	19 ±3	60 ±12	0 ±0	0 ±0
% <i>Recup.</i>	89 ±22	102 ±19	68 ±15	65 ±4	67 ±23	55 ±7

Sbte. e Sed. correspondem às frações não sedimentadas e sedimentadas respectivamente, após a ultracentrifugação (ver material e métodos). % de recuperação corresponde à relação entre as massas protéicas do sedimento + sobrenadante / homogeneizado. **DDN** e **DDE**, respectivamente, divertículos digestivos normal e especializado. Valores expressos como média e desvio padrão n= 3 lotes.

Tabela 10: Valores atividades específicas (mU/mg de proteína) sobre CMC nos diferentes órgãos de *N. fusticula* nos homogeneizados gerais e nas frações sobrenadante e sedimento.

	Ctenídeo Posterior	Apêndice	DDN	DDE	Intestino	Canal Anal
Hom.	0,89 ±0,02	3,69 ±1,04	3,43 ±1,42	1,07 ±0,09	4,25 ±0,73	3,54 ±1,02
Sbte.	1,89 ±0,34	5,04 ±1,18	2,67 ±0,18	1,30 ±0,21	5,75 ±1,50	2,91 ±0,83
Sed.	1,65 ±0,54	12,15 ±1,23	2,63 ±0,60	8,94 ±1,89	----	----

Hom. valores do homogeneizado geral. Sbte. e sedimento Sed. correspondem às frações não sedimentadas e sedimentadas respectivamente, após a ultracentrifugação (ver material e métodos). **DDN** e **DDE**, respectivamente, divertículos digestivos normal e especializado. Valores expressos como média e desvio padrão, n= 4 lotes (homogeneizado e sobrenadante) n=3 lotes (sedimento) , (----) valores não disponíveis.

Na análise através do paralelograma de De Duve (1950), Notamos um maior enriquecimento na fração sedimentada tanto no apêndice quanto no divertículo digestivo especializado. No divertículo digestivo normal é observado um maior enriquecimento na fração solúvel (Fig. 13).

Figura 13. Atividade específica relativa sobre CMC (% mU/an/% mg prot./an.) pela distribuição de massa protéica (% mg de proteína/ animal) entre as frações sobrenadante (área clara) e sedimento (área escura) de alguns órgãos. **DDN** e **DDE**, respectivamente, divertículos digestivos normal e especializado. Valores expressos como média e desvio padrão n=3 lotes.

6.2.4 - Distribuição de atividades enzimáticas sobre maltose e β -glicosídeo.

A atividade sobre ambos os carboidratos foi verificada nas frações solúveis e sedimentada em cada uma das regiões, exceto na fração sedimentada no canal anal para β -glicosídeo (Tabs 11 e 13).

Tanto para maltose quanto para β -glicosídeo os valores obtidos para a fração solúvel foram maiores do que aqueles obtidos para as frações sedimentadas em todos os órgãos analisados (Tabs. 11 e 13) .

Os valores de atividade específica (mU/mg de proteína) para maltose encontram-se na tabela 12, e para β -glicosídeo na tabela 14 .

Nota-se dois perfis totalmente diferentes de distribuição de atividade específica nos diferentes órgãos entre maltose e β -glicosídeo. Para maltose observamos uma distribuição bem homogênea entre os órgãos analisados apresentando valores baixos próximos de 5 mU/mg de proteína, ficando apenas o intestino e o canal anal com um valor médio um pouco mais baixo que as demais (Tab. 12). Já para β -glicosídeo observa-se valores muito mais altos tanto para o apêndice quanto para o divertículo digestivo especializado (Tab. 14) em relação aos demais órgãos, que apresentaram valores bem menores que os vistos para estes órgãos (Tab. 14).

Tabela 11 – Quantidades relativas de atividade enzimática sobre maltose, e recuperação das frações sobrenadante e sedimento nos diferentes órgãos de *N. fusticula*.

	Ctenídeo Posterior	Apêndice	DDN	DDE	Intestino	Canal Anal
% <i>Sbte.</i>	71 ±7	91 ±6	70 ±5	77 ±16	96 ±5	63 ±7
% <i>Sed.</i>	29 ±7	9 ±6	30 ±5	23 ±16	4 ±5	37 ±7
% <i>Recup.</i>	72 ±20	60 ±12	86 ±23	79 ±24	52 ±4	82 ±11

Sbte. e Sed. correspondem às frações não sedimentadas e sedimentadas respectivamente, após a ultracentrifugação (ver material e métodos). % de recuperação corresponde à relação entre as massas protéicas do sedimento + sobrenadante / homogeneizado. **DDN** e **DDE**, respectivamente, divertículos digestivos normal e especializado. Valores expressos como média e desvio padrão n= 3 lotes.

Tabela 12: Valores atividades específicas (mU/mg de proteína) sobre maltose nos diferentes órgãos de *N. fusticula* nos homogeneizados gerais e nas frações sobrenadante e sedimento.

	Ctenídeo Posterior	Apêndice	DDN	DDE	Intestino	Canal Anal
Hom.	4,12 ±0,19	4,84 ±0,73	4,57 ±1,85	5,71 ±1,71	2,24 ±1,32	3,37 ±0,35
Sbte.	2,94 ±0,07	6,05 ±0,88	5,20 ±1,50	3,69 ±1,09	0,98 ±0,07	5,04 ±1,13
Sed.	1,75 ±0,23	2,85 ±1,50	7,62 ±1,45	1,64 ±0,34	-----	3,37 ±1.14

Hom. valores do homogeneizado geral. Sbte. e Sed. correspondem às frações não sedimentadas e sedimentadas respectivamente, após a ultracentrifugação (ver material e métodos). **DDN** e **DDE**, respectivamente, divertículos digestivos normal e especializado. Valores expressos como média e desvio padrão n= 4 lotes (homogeneizado e sobrenadante) n=3 lotes (sedimento) . (---) valores não disponíveis.

Tabela 13 – Quantidades relativas de atividade enzimática sobre β -glicosídeo, e recuperação das frações sobrenadante e sedimento nos diferentes órgãos de *N. fusticula*.

	Ctenídeo Posterior	Apêndice	DDN	DDE	Intestino	Canal Anal
% <i>Sbte.</i>	86 $\pm$5	96 $\pm$1	69 $\pm$11	89 $\pm$2	92 $\pm$1	100 $\pm$0
% <i>Sed.</i>	14 $\pm$5	4 $\pm$1	31 $\pm$11	11 $\pm$2	8 $\pm$1	0 $\pm$0
% <i>Recup.</i>	76 $\pm$19	58 $\pm$4	69 $\pm$31	72 $\pm$13	57 $\pm$10	81 $\pm$25

Sbte. e Sed. correspondem às frações não sedimentadas e sedimentadas respectivamente, após a ultracentrifugação (ver material e métodos). % de recuperação corresponde à relação entre as massas protéicas do sedimento + sobrenadante / homogeneizado. **DDN** e **DDE**, respectivamente, divertículos digestivos normal e especializado. Valores expressos como média e desvio padrão n= 3 lotes.

Tabela 14: Valores atividades específicas (mU/mg de proteína) sobre β -glicosídeo nos diferentes órgãos de *N. fusticula* nos homogeneizados gerais e nas frações sobrenadante e sedimento.

	Ctenídeo Posterior	Apêndice	DDN	DDE	Intestino	Canal Anal
Hom.	0,80 $\pm$0,28	59,60 $\pm$8,63	3,98 $\pm$0,79	43,96 $\pm$5,41	1,75 $\pm$1,00	1,06 $\pm$0,29
Sbte.	0,68 $\pm$0,04	56,10 $\pm$3,89	5,75 $\pm$1,26	53,95 $\pm$4,13	1,65 $\pm$0,35	1,78 $\pm$0,28
Sed.	0,22 $\pm$0,06	-----	1,49 $\pm$0,58	32,19 $\pm$2,07	4,79 $\pm$1,28	-----

Hom. valores do homogeneizado geral. Sbte. e Sed. correspondem às frações não sedimentadas e sedimentadas respectivamente, após a ultracentrifugação (ver material e métodos). **DDN** e **DDE**, respectivamente, divertículos digestivos normal e especializado. Valores expressos como média e desvio padrão n= 4 lotes (homogeneizado e sobrenadante) n=3 lotes (sedimento) , (---) valores não disponíveis.

Nota-se que as atividades específicas aparecem predominantemente na fração solúvel dos órgãos analisados para ambos os carboidratos (Tabs. 12 e 14). Exceção é feita ao divertículo digestivo normal para a maltose e ao intestino para β -glicosídeo onde notam-se maiores valores nas respectivas frações sedimentadas.

Na análise das figuras 14 e 15 notamos um maior enriquecimento nas frações solúveis no divertículo digestivo especializado para a maltose, e no apêndice, canal anal, e divertículos digestivos normal e especializado para β -glicosídeo. Um maior enriquecimento na fração sedimentada é notado no divertículo digestivo normal para a maltose (Fig 14). No canal anal para a maltose é notado um enriquecimento igual entre as duas frações (Fig 14). Não realizou-se essa análise para o intestino e apêndice em maltose, e para o intestino em β -glicosídeo.

Figura 14. Atividade específica relativa sobre maltose (% mU/an/% mg prot./an.) pela distribuição de massa protéica (% mg de proteína/ animal) entre as frações sobrenadante (área clara) e sedimento (área escura) de alguns órgãos. **DDN** e **DDE**, respectivamente, divertículos digestivos normal e especializado. Valores expressos como média e $\pm$ desvio padrão n=3 lotes.

Figura 15. Atividade específica relativa sobre β -glicosídeo (% mU/an/% mg prot./an.) pela distribuição de massa protéica (% mg de proteína/animal) entre as frações sobrenadante (área clara) e sedimento (área escura) de alguns órgãos. **DDN** e **DDE**, respectivamente, divertículos digestivos normal e especializado. Valores expressos como média e $\pm$ desvio padrão n=3 lotes.

7 - Discussão

7.1 - Distribuição de massa protéica nos extratos de *N. fusticula*

Os resultados para a determinação de massa protéica em *N. fusticula*, apresentados no presente trabalho, estão de acordo com os encontrados no trabalho preliminar realizado em nosso laboratório (Jordão *et al.*, 2003). Neste trabalho, igualmente ao presente, foi observada uma grande heterogeneidade nos valores de massa protéica dos diferentes órgãos entre os lotes analisados. Também foi encontrada uma maior massa protéica para o divertículo digestivo especializado e para os ctenídeos, menores valores para o apêndice e intestino, e valores intermediários para o divertículo digestivo normal e para o canal anal. Foi observado ainda que igualmente ao presente trabalho a maior parte da massa protéica foi encontrada nas frações solúveis (Jordão *et al.* Op. Cit.)

As recuperações de massa protéica das frações sobrenadante e sedimento, resultantes do processo de ultracentrifugação nos diferentes órgãos estiveram entre 56 e 81% (Tab. 2). Esses resultados indicam que, de maneira geral, a perda de material neste processo é relativamente pequena.

A grande variação de massa protéica entre os diferentes lotes, como já mencionado anteriormente, é atribuída ao fato destes animais apresentarem diferentes tamanhos (variações intra-específicas) mesmo

estando em fase de vida semelhante. Mas também se deve considerar o fato de que o manto dos teredínideos tem grande capacidade de contração, podendo, então, os mesmos reduzir-se em até duas vezes em relação ao seu tamanho original (Board, 1970), dificultando a determinação do real tamanho dos animais, e conseqüente padronização para este parâmetro.

Um possível método para facilitar a obtenção de animais de tamanhos similares seria utilizando coletores de pinho, que consistem num a certa quantidade de lâminas retangulares de madeira de *Pinus* sp., de 0,75 cm de espessura, prensadas entre duas placas de acrílico por parafusos de latão (Moraes, 2003). Esse método além de facilitar a obtenção de animais inteiros, também garante um maior controle do tamanho dos animais, já que estes têm períodos de assentamento larval e curva de crescimento determinada (Lopes & Narchi, 1997). Porém este método requer um maior tempo para que seja possível obterem-se animais de tamanho e em número ideais para o presente estudo.

7.2 - Digestão de carboidratos em *Nausitora fusticula*

7.2.1 - Digestão do amido

Dentre os órgãos analisados a maior concentração de enzimas agindo sobre o amido foi demonstrada no apêndice (Fig.9), indicando uma importância deste órgão na digestão deste carboidrato.

O apêndice ou ceco armazenador de madeira (wood storing cecum), como também é chamado, é relacionado ao armazenamento e digestão da madeira, pois diversos autores demonstraram partículas de madeira dentro no apêndice (Lazier, 1924; Turner, 1966; Morton & McQuinston, 1974; Morton, 1978). Em *N. fusticula*, Lopes et al. (1998), verificou que o apêndice dos exemplares analisados encontrava-se invariavelmente cheios de partículas de madeira.

Porém, a grande atividade específica demonstrada sobre o amido no apêndice (Tab. 4) sugere que, em *N. fusticula*, as partículas provenientes do material filtrado pelos ctenídeos também sejam encaminhadas para esta região.

Moraes (1999) verificou diatomáceas no conteúdo do apêndice de *Neoteredo reynei* (Bartsch, 1920), o que corrobora para a sugestão de que partículas além da madeira sejam enviadas para esta região não só em *N. fusticula*.

Purchon (1960) considerou o apêndice dos Teredinidae homólogo ao apêndice dos Tellinacea que funciona como uma estrutura de

armazenamento de partículas em excesso. Essa estrutura nos Teredinidae e Pholadidae se desenvolveu devido à necessidade desses animais lidarem com uma grande quantidade de partículas de madeira (Morton, 1978).

A grande atividade específica sobre o amido encontrada no apêndice pode indicar que, nos bivalves onde este órgão ou uma estrutura homóloga são encontrados, o mesmo não apresenta apenas a função de armazenamento das partículas em excesso e sim funcione também como sítio para uma digestão extracelular de partículas filtradas pelos ctenídeos. A análise de atividades enzimáticas no apêndice dos Tellinacea poderia confirmar o sugerido acima.

A grande atividade específica encontrada nos divertículos digestivos (Fig. 9, Tab. 4) indicam uma digestão intracelular de amido nos mesmos, e conseqüentemente uma provável produção enzimática nessa região. Estas enzimas, por meio das esférulas de fragmentação, podem também agir posteriormente em outras regiões do trato digestivo.

Em *N. fusticula* os ductos dos divertículos digestivos normal e especializado são segregados. Os ductos do divertículo digestivo especializado abrem-se sempre ao longo da tiflossole maior e os ductos do divertículo digestivo normal abrem-se ao longo da tiflossole menor (Lopes *et al.*, 1998). Isto indica uma especificidade do material encaminhado para um e para outro. O divertículo digestivo normal é encontrado em todos os bivalves lamelibrânquios suspensívoros (Yonge, 1926; Owen, 1966; Morton, 1983), e esta ligada a digestão do material filtrado pelas brânquias. O divertículo digestivo especializado é encontrado apenas na

família Teredinidae e, igualmente ao apêndice, é relacionado com a digestão de partículas de madeira (Potts, 1923; Younge, 1926; Turner, 1966; Morton, 1978).

Porém as atividades específicas sobre o amido entre os dois tipos de divertículos digestivos (normal e especializado) foram de igual valor (Tab. 4), o que pode indicar que em *N. fusticula* a função do divertículo digestivo especializado não seja apenas a quebra dos carboidratos provenientes da madeira, mas também a quebra de carboidratos originários do material filtrado pelos ctenídeos, ou seja, parte do material proveniente da filtração nos ctenídeos pode ser encaminhada para o divertículo digestivo especializado também.

Younge (1926) observou que partículas de sacarato de ferro são fagocitadas pelas células dos divertículos digestivos especializados de *Teredo norvegica*, porém em menor número do que nas células do divertículo digestivo normal do mesmo. No entanto corpúsculos de sangue de tubarão (dogfish blood corpuscles) foram fagocitados exclusivamente pelo divertículo digestivo normal. O que aponta que há uma segregação, mas também vai a favor de que não só partículas de madeira sejam encaminhadas para o mesmo.

Morton (1983), em sua revisão sobre digestão dos bivalves, mostra que muitos autores evidenciaram uma amilase para o divertículo digestivo normal. O presente estudo também indica uma amilase agindo neste órgão, com uma atividade específica significativa (Tab. 4).

A atividade de amilase encontrada para o ctenídeo posterior é proveniente das bactérias da Glândula de Deshayes (Popham, 1973; Popham & Dickson, 1975) as quais têm a habilidade de digerir a madeira bem como fixar nitrogênio (Waterbury et al., 1983). No entanto, não há menção na literatura de produção de amilase por estas bactérias.

No intestino e observou-se uma atividade relativamente baixa (Fig. 9, Tab. 4). Lopes *et al.* (1998) descrevem que a tiflossole maior termina na região bulbosa do intestino. Nesta região esta tiflossole é bem desenvolvida e espiralada, o que aumenta o tempo de permanência das partículas nesta região, contribuindo provavelmente para que as mesmas possam ser expostas às enzimas digestivas por um maior período de tempo.

Atividade de amilase já foi registrada no intestino dos bivalves *Ensis* sp. (Graham, 1931; *Apud.* Purchon, 1971), e para *Ostrea edulis* e *Crassostrea angulata* (Mathers, 1970; *Apud.* Purchon, 1971).

No canal anal as atividades sobre o amido e outros substratos foram baixas, indicando que esta região não tem um importante papel no processo de quebra das moléculas do alimento em *N. fusticula*. Da pequena atividade sobre o amido, notou-se neste órgão um maior enriquecimento na fração sedimentada em relação à fração solúvel (Fig. 10). Isso indica que essas enzimas ou são ligadas à membrana, ou apareceram no sedimento por arraste do material sólido do conteúdo luminal do mesmo durante a ultracentrifugação. A segunda hipótese

parece mais provável uma vez que o canal anal é um órgão de grande diâmetro e apresenta-se sempre com grande quantidade de conteúdo.

Nos demais órgãos as atividades demonstraram um enriquecimento na fração solúvel (Fig. 10, Tab. 4). Isto indica que as enzimas que estão agindo sobre o amido são solúveis. Assim, estas enzimas ou devem se encontrar em vesículas no epitélio do mesmo para serem lançados para o meio (digestão extracelular), ou em vacúolos digestivos (digestão intracelular).

Nos divertículos digestivos supõe-se que a atividade verificada se deva a enzimas produzidas nessas mesmas regiões. Isso devido às significativas atividades específicas demonstradas nos mesmos, e de que neles a digestão ocorre intracelularmente (como mencionado anteriormente).

É universalmente aceito para os bivalves que a digestão do amido ocorre majoritariamente extracelularmente no estômago, através da ação das enzimas do estilete cristalino (Yonge, 1923; Owen, 1966; Purchon, 1968; Morton, 1983). A presença de uma amilase no estilete cristalino é relatada para inúmeros bivalves nas revisões sobre digestão de bivalves dos três últimos autores acima citados. Nair (1955), em seu estudo em *Bankia Indica*, demonstrou grande atividade de amilase para o estilete cristalino, e indicou ser este a principal fonte desta enzima nesta espécie.

O estilete cristalino por ser de tamanho reduzido nos teredinídeos torna muito difícil sua dissecação e conseqüente estudo desta estrutura separadamente, principalmente por estar dentro dos limites da concha

(Fig. 2). No presente estudo esta estrutura não foi estudada devido a estas dificuldades. De acordo com Rosenberg & Cutter (1973) e Mann (1984) nos teredinídeos as enzimas liberadas pelo estilete cristalino estão relacionadas com a digestão do fitoplâncton.

No apêndice as altas atividades específicas observadas, apontam para a produção de amilase nesta região, porém não é possível afirmar com precisão se esta atividade é devida a enzimas secretadas nessa região ou a enzimas exportadas de outros órgãos, como os divertículos digestivos (via esférulas de fragmentação), e o estilete cristalino.

Pode-se considerar também que as enzimas sejam provenientes das bactérias da Glândula de Deshayes, sendo esta hipótese apoiada pela atividade enzimática observada nos ctenídeos de *N. fusticula* no presente trabalho, que são significativas levando em consideração que as glândulas de Deshayes ocupam pequena parte dos ctenídeos. Ou ainda pode-se considerar que algumas ou todas as hipóteses propostas anteriormente ocorram conjuntamente.

Para o intestino e canal anal, devido às baixas atividades encontradas pode-se propor que estas enzimas sejam provenientes das regiões precedentes aos mesmos no trato digestório de *N. fusticula* como os divertículos digestivos, apêndice, estilete cristalino, ou ainda das bactérias da glândula de Deshayes.

Os resultados encontrados para a distribuição das atividades sobre o amido estão de acordo com os do trabalho preliminar realizado em nosso laboratório (Jordão et al. 2003), onde também se encontrou grande

atividade para o divertículo digestivo especializado, atividade específica maior para o apêndice, e os ctenídeos apresentando uma atividade significativa. Também a maioria das atividades foram registradas predominantemente na fração solúvel.

7.2.2 - Digestão de maltose

A maltose é o dissacarídeo resultante da quebra do amido. É formado por duas sub-unidades de glicose, que é o produto final a ser absorvido.

Em *N. fusticula* observou-se digestão de maltose em todos os órgãos analisados no presente estudo, com atividades próximas entre os mesmos, porém com valores médios menores que 10 mU/mg de proteína (Fig. 9). Estes dados indicam que a digestão final de carboidratos pode estar ocorrendo em todas as regiões do trato digestivo aqui.

Novamente, como para a atividade de amilase, os valores de atividades específicas sobre a maltose, observados entre os dois tipos de divertículos digestivos (normal e especializado), são virtualmente iguais (Tab. 12), o que reforça a sugestão de que, em *N. fusticula* ambos os divertículos digestivos podem estar envolvidos com a digestão do material filtrado pelos ctenídeos.

A atividade sobre maltose registrada no apêndice também indica que não só as partículas de madeira adentram esta estrutura, como discutido anteriormente para o amido.

A atividade sobre maltose encontrada no intestino de *N. fusticula* novamente mostra que esta região é de importância na digestão desses animais, no que concerne a quebra de alimentos especialmente a região bulbosa do mesmo. Mathers (1970 Apud. Purchon, 1971) verificou a presença de maltase na parede celular do intestino de *Ostrea edulis* e *Crassostrea angulata*.

Para os ctenídeos a atividade sobre a maltose pode indicar que as bactérias da glândula de Deshayes também apresentem uma maltase, e, portanto podem finalizar a digestão do amido em glicose. Assim como para o amido, não foram encontrados dados na literatura referente a digestão da maltose por esses microrganismos.

No divertículo digestivo especializado e apêndice, foi encontrado um maior enriquecimento de maltase na fração solúvel em relação a sedimentada nas atividades (Tab. 12, Fig. 14), indicando que a enzima que está atuando nestes órgãos é solúvel. Porém as baixas atividades específicas nestes órgãos não indicam claramente que as enzimas que atuam sobre a maltose estão sendo produzidas nos mesmos.

No divertículo digestivo normal (Tab. 12, Fig. 14) observou-se um maior enriquecimento de maltase na fração sedimentada, embora a maior parte da atividade tenha sido detectada na fração solúvel (Fig. 14). Isso indica que a maltase pode ocorrer em pelo menos 2 tipos moleculares:

uma integrante de membrana e outra solúvel, secretada para os vacúolos digestivos ou para a região luminal. Como estas são enzimas de digestão final que agem clivando a maltose em duas glicoses, o descrito acima é razoável, já que os produtos da digestão estariam próximos dos locais de absorção.

No canal anal observaram-se valores de atividade enzimática baixos sobre a maltose (Tab. 12) igualmente divididos entre as duas frações (Fig. 14). Provavelmente os valores de maltase na fração sedimentada são devido a arraste pela parte sólida do conteúdo, e na fração solúvel provenientes de órgãos precedentes ao mesmo.

Porém as atividades sobre maltose nos órgãos do trato digestório podem ser devido parcialmente à ação de enzimas provenientes das bactérias da glândula de Deshayes, devido aos valores de atividade específica sobre maltose no ctenídeo, sendo estes os maiores observados para o órgão em questão (Fig. 9).

7.2.3 - Digestão de laminarina e liquenana

Tanto laminarina quanto liquenana, podem ser provenientes do material filtrado pelos ctenídeos, e também da madeira. Porém a calose e outras hemiceluloses, que são constituintes da parede secundária de angiospermas e gimnospermas, são β -1,3-glucana (Bacic *et al.*, 1988), então as enzimas que atuam sobre laminarina e liquenana podem também

ter ação sobre estes polissacarídeos, podendo, assim, as atividades sobre estes carboidratos estarem mais claramente relacionadas com a madeira raspada pela concha.

Para ambos carboidratos, observamos maiores valores de atividade específica novamente para o apêndice (Fig 9). Levando-se em consideração que estes carboidratos podem se encontrar também na dieta suspensívora, podemos sugerir que a atividade encontrada no apêndice indique que não apenas o material proveniente da madeira é direcionado a este órgão, e sim também o material filtrado.

No entanto, a digestão do material filtrado deve ser secundária neste órgão, pois em *N. fusticula* o apêndice encontra-se sempre cheio de partículas de madeira (Lopes *et al.*, 1998), sendo o mesmo observado em outras espécies (Lazier, 1924; Saraswathy & Nair, 1971; Morton & McQuinston 1974; Lopes *et al.* 2000). Estas altas atividades podem indicar uma digestão das hemiceluloses provenientes da madeira. Dore & Miller (1923) observaram que 15 a 56% das hemiceluloses da madeira são digeridas durante sua passagem pelo trato digestório em *Teredo Navalis*.

Para o divertículo digestivo especializado, as atividades sobre CMC registradas para este órgão indicam que este é de grande importância para a digestão química de hemiceluloses provenientes da madeira, já que muitos autores verificaram partículas de madeira sendo encaminhadas para o órgão em questão (Potts, 1923; Younge, 1926; Turner, 1966; Morton, 1983).

No presente trabalho a atividade específica sobre a laminarina é relativamente baixa no divertículo digestivo normal, já a atividade sobre liquenana, neste mesmo órgão, é três vezes maior (Tabs. 8 e 10). Estas atividades podem indicar que estes carboidratos realmente estão presentes na dieta suspensívora, já que os divertículos digestivos normais são relacionados à digestão do material filtrado pelos ctenídeos (Potts, 1923; Younge, 1926; Turner, 1966; Morton, 1983).

A atividade de laminarinase já foi descrita para divertículo digestivo normal para vários bivalves (Morton, 1983; Sova *et al.* 1970). Para os teredinídeos, não foi encontrado nada específico para a digestão desses carboidratos na literatura revisada.

Nos ctenídeos, as atividades encontradas sobre laminarina e liquenana (Tabs. 8 e 10) podem ser provenientes das bactérias da glândula de Deshayes. Um fato a favor disto é que as enzimas que atuam sobre estes carboidratos são muito comuns em fontes microbianas (Jeffries & MacMillan, 1981), porém não é mencionado nada na literatura em relação a presença de enzimas nestas bactérias que atuem sobre estes carboidratos.

As atividades demonstradas para o intestino sobre ambos os carboidratos (Tabs. 8 e 10), igualmente ao observado para o amido, apontam para importância desta região para a digestão química de carboidratos, em especial a região bulbosa do mesmo.

No divertículo digestivo especializado (Fig. 12) observou-se um maior enriquecimento da atividade sobre liquenana na fração sedimentada, mas

a maior parte da atividade foi demonstrada na fração solúvel (Fig. 12). Isso indica que as enzimas que estão agindo sobre este carboidrato possam ter dois tipos de ação, ou seja, uma estar ligada a membrana e outra ser solúvel e estar dentro de vacúolos digestivos, sendo ambas produzidas neste órgão.

No apêndice observa-se um enriquecimento da atividade enzimática sobre laminariana na fração solúvel (Fig. 11). Este fato, somado as altas atividades específicas para este carboidrato (Tab. 8), indicam que a laminarinase que está agindo no mesmo é solúvel e pode estar sendo produzida nesta região. Sobre a liquenana observa-se o oposto, ou seja, um enriquecimento na fração sedimentada (Fig. 12), porém este não é muito significativo, e a maior parte da atividade aparece no sobrenadante (Fig. 12, Tab. 10). As enzimas que atuam sobre moléculas grandes, como β -glucanas, são em sua maioria solúveis, então é mais provável que esta enzima seja solúvel, e tenha aparecido no sedimento por arraste. As altas atividades também apontam para que a enzima que está atuando sobre a liquenana nesta região seja produzida no mesmo.

No divertículo digestivo normal as atividades sobre liquenana apresentaram um enriquecimento na fração solúvel (Fig. 12), o que indica que a enzima é solúvel e possivelmente encontra-se dentro de vacúolos digestivos nas células do mesmo. A alta atividade observada sobre liquenana (Tab. 10), aliadas ao fato de que neste órgão a digestão ocorre intracelularmente levam a crer que uma liquenase é produzida por suas células.

No intestino a atividade sobre liquenana foi a mais alta observada dentre os outros carboidratos analisados no presente estudo (Fig. 9), e esta apresentou um enriquecimento na fração solúvel do mesmo (Fig. 12). Devido as atividades sobre a liquenana terem sido altas tanto nos divertículos digestivos, quanto no apêndice, e estas maiores do que a observada no intestino (Tab. 10), é provável que as enzimas que estão atuando no intestino sejam procedentes destes últimos.

O enriquecimento observado na fração sedimentada do canal anal (Figs. 11 e 12) provavelmente deve-se a arraste pelo material sólido do conteúdo, sendo as enzimas que atuam neste órgão sobre os carboidratos em questão são solúveis. As atividades no canal anal sobre ambos carboidratos foram mais baixas do que as observadas no intestino, então é provável que as enzimas sejam provenientes de órgãos precedentes ao intestino no tubo digestivo.

As atividades sobre a laminarina, encontradas nos diversos órgãos de *N. fusticula* podem ser em parte provenientes do estilete cristalino. Sova *et al.* (1970), mostrou em seu trabalho de distribuição de lamainarinase em invertebrados marinhos, que as maiores atividades entre todas as espécies de diversos filos e classes por eles analisadas, foram encontradas no estilete cristalino de duas espécies de bivalves. Porém, devido ao fato de *N. fusticula* possuir um estilete cristalino reduzido (Lopes *et. al*, 1998), é mais provável que elas sejam provenientes ou do divertículo digestivo especializado ou do apêndice, ou ainda de ambos.

Também não podemos descartar a possibilidade das enzimas que atuam sobre ambos os carboidratos terem procedência exógena, devido a atividade observada nos ctenídeos (Tabs. 8 e 10).

Deve-se considerar também que uma mesma enzima pode ser ativa sobre ambos os carboidratos. É relatada na literatura uma laminarinase que é ativa sobre a laminarina, β -1,3, β -1,6 glucanas, e também sobre β -1,3, β -1,4 glucanas (Jeffries e MacMillan, 1981). Genta (2000) em seu trabalho de com o inseto *Periplaneta americana* purificou duas enzimas que agem tanto sobre a laminarina, quanto sobre a liquenana. Porém as diferentes distribuições das atividades enzimáticas sobre estes carboidratos entre os diferentes órgãos, e os diferentes enriquecimento observado no apêndice indicam que mais de uma enzima estão agindo sobre estes carboidratos em *N. fusticula*.

Para uma melhor compreensão da origem destas enzimas estudos bioquímicos e biomoleculares mais específicos podem ser de grande valia.

7.2.4 - Digestão de celulose.

Foram analisadas as atividades sobre a celulose em duas formas, uma insolúvel e microcristalina (Avicel®), próxima de como é encontrada na madeira, e sobre carboximetilcelulose (CMC), uma celulose solúvel.

Todas as tentativas de se detectar atividade enzimática para celulose microcristalina (Avicel®) falharam, o que não condiz com a literatura

revisada. Muitos autores demonstraram atividade em extratos de tecidos de diferentes teredinídeos em substratos de celulose cristalina, embora estas sejam muito baixas (Harington, 1921; Boynton & Miller, 1927; Kadota, 1959; Nair, 1955, 1956, 1957; Cutter & Rosenberg, 1972; Rosenberg & Cutter, 1973).

As partículas de madeira que adentram o trato digestivo de *Bankia setacea* apresentam a celulose em estrutura cristalina (Dean, 1978). Se o mesmo for verdadeiro para *N. fusticula* esperar-se-ia uma atividade sobre celulose microcristalina, o que não foi constatado no presente estudo.

Dean (1978), estudou atividade de celulasas de vários organismos, inclusive do teredinídeo *Bankia Setacea* sobre diferentes substratos, mostrando que a celulose cristalina nativa é relativamente resistente à degradação, quando comparada a outras formas de celulose, e que a atividade sobre celulose microcristalina é baixa, porém mensurável.

Nossos resultados demonstraram ausência de atividade enzimática sobre Avicel® nos ctenídeos, que abrigam as bactérias da glândula de Deshayes.

Estas bactérias são representantes de uma única espécie (*Teredinibacter turnerae* Distel *et al.*, 2002) e já foi isolada de 24 espécies representantes de 9 dos 14 gêneros de Teredinidae, incluindo espécies do gênero *Nausitora*, mas não *N. fusticula*. Essas bactérias crescem em culturas de celulose microcristalina (Waterbury *et al.*, 1983; Greene & Freer, 1986), mas, apesar da atividade observada nestas bactérias serem apropriadas para uma dieta de madeira, não há evidências diretas sobre a

participação destas bactérias na digestão dos teredinídeos, e nem está claro como as enzimas produzidas nos ctenídeos são transportadas para o trato digestório (Distel & Roberts, 1997).

Saraswathy & Nair (1971) observaram que as Glândulas de Deshayes se comunicam através de ductos com a parte anterior do esôfago em *Teredo furcifer*. No entanto, nenhum outro estudo anatômico conseguiu evidenciar esses ductos entrando em contato com nenhuma parte do trato digestório (Morton & MacQuiston, 1974; Waterbury *et al.* 1983; Lopes *et.al*, 1998, 2000).

Caso o observado por Saraswathy & Nair (1971) for válido para *N. fusticula* esperar-se-ia uma atividade sobre celulose microcristalina agindo em alguns dos órgãos do trato digestório, fato não confirmado no presente estudo.

É sugerido por Morton (1978) que as enzimas provenientes das bactérias da glândula de Deshayes, atuam no apêndice. No presente estudo também não foi evidenciada uma atividade sobre celulose microcristalina no apêndice de *N. fusticula*.

A reatividade dos polímeros de celulosas a degradação pelas enzimas celulolíticas está em função do grau de solubilidade e da estrutura cristalina, sendo a atividade maior em substratos mais solúveis e com as fibras mais expostas (Dean, 1978).

Carboximetilcelulose (CMC) é um polímero de β -1,4-D-glicopirranose, não cristalino, e solúvel em água. É considerado um substituto solúvel da celulose cristalina (Northcote, 1972; Dean, 1978; Martin, 1983).

No presente estudo observou-se atividade sobre este carboidrato em todos os órgãos analisados. Porém essas atividades foram bem menos significativas do que as atividades sobre os outros carboidratos analisados.

Muitos autores sugerem a presença de uma celulase endógena nos divertículos digestivos especializados (Dore & Miller, 1923; Corsby & Reid, 1971; Rosenberg & Cutter, 1973; Morton, 1978 e Mann, 1981, 1984). Porém no presente estudo, diferentemente das outras enzimas analisadas, o divertículo digestivo especializado apresentou uma atividade específica muito baixa (Fig. 9), o que sugere que a digestão de CMC neste órgão é de importância secundária.

Vários autores apontam atividade celulásica no apêndice, sendo o mesmo apontado no presente trabalho para *N. fusticula*. Greenfield and Lane (1953) verificaram que os extratos do trato digestivo que continham o apêndice (cecum) de *Teredo* sp. teriam alta capacidade de produção de grupos redutores a partir da celulose. Mann (1984) afirma que o apêndice funcionaria como um incubador das partículas de madeira ali encontrada, para ação de enzimas celulolíticas.

Lopes et al.(1998) observou que a tiflossole do apêndice de *N.fusticula* apresenta uma movimentação ondulatória muito intensa, o que ajudaria na movimentação e conseqüente digestão das partículas ali incubadas.

Crosby & Reid (1971) analisaram em *Bankia setacea* o apêndice e intestino conjuntamente, demonstrando uma alta atividade celulolítica. Os

testes histoquímicos para o apêndice não revelaram nenhuma secreção de enzimas celulolíticas pela parede destes órgãos sugerindo que essa atividade se deva a ação de bactérias.

No divertículo digestivo normal (encontrada em todos os bivalves lamelibrânquios) foi observada uma atividade significativa sobre CMC, esta curiosamente maior do que a observada para o divertículo digestivo especializado (Tab. 10). Na dieta suspensívora há celulose, como por exemplo, na parede celular de diatomáceas, e esta atividade celulolítica no divertículo digestivo normal é observada também para outros bivalves de outras famílias (Morton, 1983).

Lopes *et al.* (2000), afirmam que o canal anal de *Neoterredo reynei* (Bartsch, 1920) devido as suas características anatômicas como, a presença de um esfíncter, e seu grande tamanho (cerca de 80% do tamanho corpóreo), somadas a compactação das fezes no mesmo, e epitélio com microvilosidades tipicamente absortivo, seja um importante sítio para a digestão da madeira nesta espécie.

Em *N. fusticula* o canal anal não é proporcionalmente tão grande quanto em *N. reynei*, e também não possui esfíncter, porém apresenta epitélio com microvilos (Lopes et al, 1998), e uma certa compactação das fezes (menor comparada com a de *N. reynei*) fato constatado através de observação durante a retirada dos animais da madeira, já que, em várias ocasiões, encontravam-se as duas espécies convivendo na mesma madeira (às vezes em galerias paralelas).

A atividade sobre CMC detectada no canal anal de *N. fusticula* indica que ocorra uma digestão de CMC neste órgão. No entanto, esta atividade parece não ser muito significativa, mas sugere indiretamente que ele pode ser importante para a digestão de outras espécies de teredinídeos, que provavelmente têm diferentes estratégias para lidar com a madeira.

Payne *et al.* (1972, *apud.* Morton, 1983) demonstrou uma celulase verdadeira, e uma poli- β -glicosidade no intestino do bivalve *Scorbicularia plana*. Bactérias isoladas do intestino demonstraram crescimento em cultura de celulose pura (Morton, 1978), porém este fato não significa necessariamente que estas bactérias estejam secretando uma enzima *in vivo* (Mann, 1984).

A significativa atividade sobre CMC no intestino observada no presente estudo (a mais significativa dentre os órgãos analisados) novamente aponta para importância desta região para a digestão química nesta espécie.

A atividade de CMCase encontrada nos ctenídeos de *N. fusticula* indica a importância das bactérias da glândula de Deshayes. Greene *et al.* (1988) purificaram e caracterizaram uma endoglucanase extracelular produzida por bactérias da glândula de Deshayes do teredinídeo *Psiloteredo healdi* (Bartsch, 1931). Estes autores evidenciaram que essa endoglucanase tem atividade sobre CMC, além de outras formas solúveis de celulose. Também se verificou que esta CMCase liga-se ativamente a substratos celulósicos (Iman *et al.* 1993). Estes dados corroboram os dados obtidos no presente estudo.

O enriquecimento, e a grande quantidade de atividade observados na fração sedimentada em relação à fração solúvel no apêndice, e no divertículo especializado (Fig. 13) indicam que as enzimas que atuam sobre CMC nestas regiões ou são constituinte de membrana ou apareceram no sedimento por arraste. A primeira hipótese é improvável devido ao fato de que enzimas que atuam em moléculas grande tendem a ser solúveis (Genta, 2000), porém a maior parte da atividade apareceu no sedimento, o que também descarta o fato de que a enzima é solúvel e parte de sua atividade apareceu enriquecida na fração sedimentada por arraste de material sólido do conteúdo.

Assim as atividades enzimáticas sobre CMC na fração sedimentada apêndice e divertículo digestivo especializado podem ser devido a bactérias que não tiveram suas células rompidas nos processos de ultracentrifugação e de congelamento e descongelamento.

Outras evidências, como as atividades praticamente iguais entre as regiões do trato digestório que apresentam uma grande luz (apêndice, intestino e canal anal) sobre CMC (Fig. 9), e a atividade demonstrada nos ctenídeos sobre o mesmo substrato, apontam também para uma CMCase exógena atuando no trato digestório de *N. fusticula*, como também proposto por Deshamps (1953), Hidaka & Saito (1954), Crosby e Reid (1971), Rosenberg & Breiter (1972), Cutter & Rosenberg (1972), Rosenberg & Cutter (1973).

Nair (1956) demonstrou uma atividade celulásica no estilete cristalino de *Bankia indica*, portanto não se pode descartar a possibilidade das

enzimas celulolíticas que estão agindo em *N. fusticula* serem, em parte, provenientes do mesmo.

Os resultados obtidos para a distribuição CMCase estão, de maneira geral, de acordo com os de nosso trabalho preliminar (Jordão *et al.* 2003).

7.2.5 - Digestão de β -glicosídeo

β -glicosídeos são provenientes da digestão de β -glucanas assim, como celobiose, celotriose e celotreatose. A enzima β -glicosidase cliva os β -glicosídeos em duas moléculas de glicose, as quais podem ser então absorvidas.

No presente estudo encontramos uma maior atividade específica para esta enzima no apêndice, sendo mais do que o dobro das sobre outros substratos encontradas para este órgão (Fig. 9). Este fato mostra que no apêndice ocorre a redução completa de β -glucanas (CMC, Laminarina, Liquenana e outras) à glicose. Liu & Walden (1970) indicaram a presença de uma celobiose em *Bankia Setacea*. É bem possível que a absorção da glicose resultante esteja ocorrendo nesta região.

Outro fato que reforça a idéia de que a absorção de glicose ocorra no apêndice, é a presença de microvilosidades no epitélio interno do mesmo (Lopes *et al.*, 1998).

Os dados de atividade específica no divertículo digestivo especializado (Tab. 14), comparado aos valores obtidos para outras enzimas, indicam que de fato a principal função dos divertículos digestivos especializados seja a digestão de moléculas menores como dímeros e oligômeros. Morton (1978) afirma que a "celulase" que age nos divertículos digestivos é na verdade uma celobiase, pois hidrolizou muito mais celobiose que carboximetilcelulose.

Nair (1956) evidenciou uma celobiase no divertículo digestivo especializado e que esta enzima provavelmente é de grande importância na digestão de celulose. O observado por este autor vai de acordo com as atividades enzimáticas observadas sobre β -glicosídeo no presente trabalho.

Outro fator que apóia a grande atividade sobre β -glicosídeo nos divertículo digestivo especializado, é que o tecido conjuntivo desse órgão é rico em glicogênio (Younge, 1926), o que evidencia que neste órgão ocorre a absorção da glicose. É razoável então, que a digestão final ocorra próximo onde os produtos da digestão são absorvidos.

O enriquecimento acentuado na fração solúvel em relação à fração sedimentada nos órgãos analisados demonstra que as enzimas que atuam sobre β -glicosídeo são solúveis (Fig. 15).

No caso do divertículo digestivo especializado isto sugere, devido as suas características de digestão intracelular e as altas atividades sobre β -glicosídeo, que estes órgãos produzem uma β -glicosidase.

No apêndice devido as altas atividades sobre β - glicosídeo, que foram as maiores atividades observadas no presente estudo dentre todas as observadas para outros substratos em todos os órgãos analisados (Fig. 9), pode-se supor que estas atividades devam-se a enzimas produzidas no próprio órgão.

Nos demais órgãos do trato digestório, é provável que as enzimas que atuam sobre este carboidrato sejam de procedência ou do apêndice, ou do divertículo digestivo especializado, ou ainda de ambos.

A atividade sobre β - glicosídeo encontrada nos ctenídeos indica que as bactérias da glândula de Deshayes são capazes de realizar a digestão final de glicose, o que era esperado pois essas bactérias crescem em cultura pura de celulose (Waterbury *et al.* 1983, Greene & Freer, 1986). No entanto as β - glicosidases provenientes dessas bactérias parecem ser de menor importância no processo digestivo de *N. fusticula*.

7.3 – Organização do processo digestivo de carboidratos no trato digestório de *N. fusticula*

Para facilitar a compreensão do processo digestivo de *N. fusticula* a figura 16 mostra os possíveis trajetos que o alimento pode seguir dentro do trato digestório desses animais, além de onde supostamente as bactérias da glândula de Deshayes, ou suas enzimas, podem estar entrando em comunicação com o trato digestório. Os possíveis trajetos

foram baseados através do estudo anato-funcional do estômago de *N. fusticula* realizado por Lopes *et al.*, 1998.

As partículas filtradas pelos ctenídeos e raspadas pela concha de *N. fusticula* são encaminhadas até a boca. Da boca as partículas vão para o esôfago, então para o estômago. Do estômago as partículas são selecionadas por tamanho e densidade, e podem ser enviadas ou para os divertículos digestivos, ou para o apêndice ou para o intestino para serem descartadas posteriormente. Do apêndice as partículas podem retornar ao estômago e serem lá reselectionadas e serem encaminhadas ou para os divertículos digestivos ou para o intestino. Dos divertículos digestivos as partículas podem voltar para o estômago sendo novamente submetidas a uma seleção e serem encaminhadas para o apêndice ou para o intestino. Do intestino as partículas podem ainda eventualmente retornar ao estômago para serem reselectionadas ou então serem descartadas e seguirem para o canal anal, em seguida para a cavidade suprabranquial e expelidas via sifão exalante (Fig. 16).

Figura 16: Trajetos possíveis das partículas dentro do trato digestório de *N. fusticula*. As setas contínuas indicam os sentidos dos trajetos, e as descontinuas os possíveis locais onde as glândulas de Deshayes entram em contato com o trato digestório.

Os resultados sugerem que a digestão de carboidratos em *Nausitora fusticula* é realizada majoritariamente pelo divertículo digestivo especializado devido a suas grandes dimensões em comparação aos outros órgãos do trato digestório. Este órgão também apresenta grande capacidade de hidrolisar a produtos finais todos os substratos analisados, principalmente β -glicosídeos.

Entretanto, o apêndice apresenta uma concentração enzimática muito maior, ou enzimas mais ativas do que o divertículo digestivo especializado, possuindo teoricamente uma capacidade digestória muito maior que o mesmo. Porém apesar disto o apêndice, contraditoriamente,

apresenta um tamanho muito menor do que o divertículo digestivo especializado.

Isto pode ser devido ao fato que nos divertículos digestivos a digestão ocorre intracelularmente (Potts, 1923; Owen, 1966; Purchon, 1968; Morton, 1983) o que confere uma absorção mais eficiente dos produtos da digestão. No divertículo digestivo normal a digestão também é intracelular, porém os resultados obtidos no presente estudo indicam que este divertículo tem uma participação menor na digestão de carboidratos.

Assim, o apêndice provavelmente tem a função de digerir as moléculas que não tem tamanho e densidade apropriados para serem fagocitados pelos divertículos digestivos, garantindo um melhor aproveitamento do material nutritivo ingerido.

Lopes et al (1998) notou que é muito mais intensa a entrada de partículas no apêndice do que a saída. As partículas maiores de digestão mais difícil e demorada ficariam neste órgão armazenadas, e expostas a uma maior atividade enzimática (como observado no presente estudo) por um período maior de tempo.

Deve se levar em consideração que a digestão extracelular ocorre na maioria dos bivalves no estômago (Owen, 1966; Purchon, 1968; Morton, 1983). Porém no estômago o material ingerido é sujeito à intensa seleção realizada por áreas de seleção na parede do mesmo. Em *N. fusticula* os palpos labiais são reduzidos o que indica que o estômago tem grande papel na seleção do material ingerido (Lopes et al, 1998). Então a

vantagem de ocorrer uma intensa digestão extracelular no apêndice é que o estômago passa realizar a função seletora mais eficientemente.

O presente estudo também sugere que o apêndice é capaz de realizar a digestão final dos carboidratos até glicose e a sua parede interna apresenta microvilosidades (Lopes *et al.*, 1998) que indicam função absorptiva. Liu & Walden (1970) encontraram no apêndice de *Bankia Setacea* 23 enzimas, não provenientes de bactérias, relacionadas ao metabolismo da glicose, dentre estas algumas relacionadas ao ciclo do ácido cítrico, que indica uma biossíntese neste órgão e também a glicogenogênese.

Quanto a digestão de madeira há uma concordância geral de que, as partículas raspadas pela concha ao entrarem no estômago, sofrem inicialmente, o ataque de enzimas digestivas provenientes de fontes exógenas. Então esta digestão extracelular é continuada por mais tempo no apêndice, que reduzem a celulose em formas solúveis, e em seguida a produtos menores principalmente celobiose. Estes produtos então seriam encaminhadas para a glândula digestiva especializada onde se completaria a digestão, através de enzimas endógenas com a produção de glicose (Rosenberg & Cutter, 1972; Morton e McQuinston, 1974; Morton, 1978; Mann, 1981). A fonte exógena das enzimas que atuariam no estômago e apêndice, provavelmente seriam as enzimas provenientes das bactérias da glândula de Deshayes (Morton e McQuinston, 1974; Morton, 1978; Waterbury *et al.*, 1983).

Os resultados obtidos no presente estudo vão de acordo com o descrito acima, mas mostra também a importância de outros órgãos como o intestino na digestão de madeira. Mostra também que o apêndice tem grande capacidade de realizar a digestão final dos carboidratos de origem da madeira, devido a grande atividade específica sobre β -glicosídeo. Este último fato indica que grande parte do material não precisa ser encaminhada posteriormente ao divertículo digestivo especializado para que se complete a digestão, sendo os produtos finais absorvidos pela parede do mesmo como discutido anteriormente.

No entanto, para uma maior compreensão da digestão na família Teredinidae se fazem necessários estudos bioquímicos, histológicos e biomoleculares mais específicos. O presente estudo também mostra que esses estudos não devem se restringir a apenas uma espécie e sim se devem realizar estudos comparativos, porque é provável que esses animais possuam diferentes estratégias para lidar com o alimento ingerido.

7.4 - Importância relativa da madeira e do material filtrado

O presente estudo sugere que a madeira tem uma relevante importância na dieta de carboidratos em *N. fusticula*. No entanto os resultados apontam que esta importância possa estar principalmente relacionada a digestão de hemiceluloses, pois as hemicelulases

apresentaram maiores atividades que CMCase. Outro fato que aponta para que a madeira seja de importância foram as altas atividades sobre β -glicosídeo no divertículo digestivo especializado e no apêndice.

As hemiceluloses são de digestão mais fácil, por serem solúveis (Northcote 1972; Dean 1978; Bacic *et al.* 1988), enquanto que a celulose na madeira é insolúvel. A digestão de celulose ocorre, porém registraram-se atividades muito baixas de CMC e para celulose microcristalina (Avicel®) os valores foram nulos, mostrando que esta é de menor importância para *N. fusticula*.

Em nosso trabalho preliminar (Jordão *et al.* 2003), as atividades enzimáticas específicas (mU/mg de proteína) observadas em diferentes órgãos de *N. fusticula* indicam que a madeira pode ter importância relevante na dieta desses animais, devido aos valores significativos de atividade de celulase, e laminarinase nos órgãos analisados, em relação a amilase.

Lopes & Narchi (1998) e Lopes *et al.* (1998) através de estudos anato-funcionais em *N. fusticula* concluíram, baseados nos aspectos propostos por Turner (1966), que a madeira é de menor importância em relação ao material filtrado como alimento nesta espécie.

Porém *N. fusticula* apresenta palpos labiais reduzidos, um grande divertículo digestivo especializado, e um estômago alongado o que aponta também para a importância da madeira nesta espécie.

Novamente se fazem necessários estudos comparativos para saber a importância da madeira para *N. fusticula* em relação a outras espécies de Teredinídeos.

8 - Conclusões

- A digestão de carboidrato em *N. fusticula* dentre os órgãos analisados é realizada majoritariamente no divertículo digestivo especializado

- O apêndice apesar de ser de tamanho moderado (Turner, 1966) apresenta a maior concentração de enzimas que atuam sobre os carboidratos estudados, exceto para CMC e maltose.

- As bactérias das glândulas de Deshayes possivelmente têm importância no processo digestivo destes animais

- A madeira é de importância significativa na dieta de *N. fusticula*. Porém não foi possível determinar se esta é mais ou menos importante em relação ao material filtrado.

9 – Referências Bibliográficas

- ANDRADE, J. 1979. *Folclore na região do Salgado*, Pará. 2. ed., São Paulo, Escola de Folclore, 83p.
- BACIC, A., HARRIS, P. J. & STONE, B. A. 1988. Structure and function of plant cell walls. In: Stumpf, P. K. & Conn, E. E. (eds.) *The Biochemistry of plants* Academic Press, N. Y., **14**, 297-371.
- BLUM, H., BEIR, H. & GROSS, H. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99.
- BOARD, P., A. 1970. Some observations on the tunneling of shipworms. *J.Zool., lond.*, **161**, 193-201.
- BOYNTON, L. C. & MILLER, R. C. 1927. The occurrence of a cellulase in the shipworm. *J. Biol. Chem.*, **LXXV**, 3, 613-618.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- CARPENTER, E. J. & CULLINEY, J. L. 1975. Nitrogen fixation in marine shipworms. *Science*, **187**, 551-552.
- CROSBY, N. D. & REID, R. G. B. 1971. Relationships between food, phylogeny, and cellulose digestion in the Bivalvia. *Can. J. Zool.*, **49**, 617-622.

- CUTTER, J. M. & ROSENBERG, F. A. 1973. The role of cellulolytic bacteria in the digestive processes of the shipworm. II. Requirement for bacterial cellulase in the digestive system of teredine borers. In: Walters, A. H. & Hueck van der Plass, E. M. (eds.). *Biodeterioration of materials*. Applied Science, London, 42-51.
- DALQVIST, A. 1968. Assay of intestinal dissacharidases. *Anal. Biochem.*, **22**, 99-107.
- DEAN, R. C. 1978. Mechanisms of wood digestion in the shipworm *Bankia gouldi* Bartsch: enzyme degradation of celluloses, hemicelluloses, and wood cell walls. *Biol. Bull.*, **155**, 297-316.
- DE DUVE, C.; PRESSMAN, B.C.; GIANETTO, R.; WATTIAUX, R. & APPLEMAN, F. 1955. Tissue fractionates studies. 6. Intracellular distribution pattern of enzymes in rat liver tissues. *Biochem. J.* **60**, 604-617.
- DESCHAMPS, P. 1953. La nutrition chez les mollusques téréridinides: possibilité de rétraction et fermeture de l'étui calcaire. Chromatographie quantitative des sucres. *Bull. Soc. Zool. France*, **82**, 72-81.
- DISTEL, D. L. & ROBERTS, S. J. 1997. Bacterial endosymbionts in the gills of the deep-sea wood-boring bivalves *Xylophaga atlantica* and *Xylophaga washingtona*. *Biol. Bull.* **192**, 253-261.
- DISTEL, D. L.; DELONG, E. F. & WATERBURY, J. B. 1991. Phylogenetic characterization and in situ localization of the bacterial symbiont of shipworms (Teredinidae: Bivalvia) by using 16S rRNA sequence

- analysis and oligodeoxynucleotide probe hybridization. *Appl. Environm. Microbiol.*, **57**(8), 2376-2382.
- DISTEL, D. L., MORRILL W., MACLAREN-TOUSSAINT N., FRANKS D. and WATERBURY J. 2002. *Teredinibacter turnerae* gen. nov., sp. nov., a dinitrogen-fixing, cellulolytic, endosymbiotic γ -proteobacterium isolated from the gills of wood-boring molluscs (Bivalvia: Teredinidae). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 2261-2269.
- DORE, W. H. & MILLER, R. C. 1923. The digestion of wood by *Teredo navalis*. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, **22**, 383-400.
- GABRIEL, O. & WANG, S. 1969. Determination of enzymatic activity in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.*, **27**, 545-554.
- GREENE, R. V. & FREER, S. N. 1986. Growth characteristics of a novel nitrogen-fixing cellulolytic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**(5), 982-986.
- GREENE, R. V., GRIFFIN, H. L. & COTTA, M., A. 1996. Utility of alkaline protease from marine shipworm bacterium in industrial cleansing applications. *Biotech. Letters*, **18**(7), 759-764.
- GREENE, R. V., GRIFFIN, H. L. & FREER, S. N. 1988. Purification and characterization of an extracellular endoglucanase from the marine shipworm bacterium. *Arch. Biochem. Biophys.*, **267**(1), 334-341.
- GREENFIELD, L. J. & LANE, C. E. 1953. Cellulose digestion in *Teredo*. *J. Biol. Chem.*, **204**, 699-672.

- GREENFIELD, L. J. 1955. Concentration of *Teredo* Cellulase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **89**, 241-243.
- HARINGTON, C. R. 1921. A note on the physiology of the shipworm (*Teredo norvegica*). *Biochem. Journal*, **15**, 736-741.
- HIDAKA, T. & SAITO, K. 1956. Studies on the cellulose decomposing bacteria found in the digestive organs of *Teredo* (*Teredo navalis* sp.) II on the bacterial cellulase. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.*, **5**, 172-177.
- HOAGLAND, K. E. & TURNER, R. D. 1981. Evolution and adaptative radiation of wood-boring bivalves (Pholadacea). *Malacologia*, **21**, 11-148.
- IMAN, S. H.; GREENE, R. V. & GRIFFIN, H. L. 1990. Adhesive properties of a symbiotic bacterium from a wood-boring marine shipworm. *Appl. environ. microbiol.*, **56**(5), 1317-1322.
- IMAN, S. H.; GREENE, R. V. & GRIFFIN, H. L. 1993. Binding of extracellular carboxymethylcellulase activity from the marine shipworm bacterium to insoluble cellulosic substrates. *Appl. environ. microbiol.*, **59**(5), 1259-1263.
- JEFFRIES, T. W. & MACMILLAN, J. D. 1981. Action patterns of (1,3)-Beta-D glucanases from *Oerskovia xanthineolytica* on laminaran, lichenan and yeast glucan. *Carbohydr. Res*, **95**, 87-100.
- JORDÃO, B. P., CRUZ, R. C. G. DA & MORAES, D. T. de 2003. Digestion of carbohydrates in the digestive tract of *Nausitora fusticula* (Jeffreys,

- 1860) (Mollusca, Bivalvia). Resumos, XXXII Reunião Annual da SBBq, p. 147.
- KADOTA, H. 1959. Cellulose-decomposing bacteria in the sea. In: Ray, D. L. (ed.) *Marine Boring and Fouling Organisms*. Seattle, University of Washington Press, 332-340.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- LIU, D. L. & WALDEN, C. C. 1970. Enzymes of glucose metabolism in the caecum of the marine borer *Bankia setacea*. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **27**(6), 1141-1146.
- LOPES, S. G. B. C. & NARCHI, W. 1993. Levantamento e distribuição das espécies de Teredinidae (Mollusca, Bivalvia) no manguezal da Praia Dura, Ubatuba, São Paulo, Brasil. *Bolm Inst. Oceanogr.*, 41(1/2): 29-38.
- LOPES, S. G. B. C. & NARCHI, W. 1997. Recrutamento larval e crescimento de Teredinidae (Mollusca, Bivalvia) em região entremarés de manguezais. *Revista brasileira de oceanografia*, **45**(1/2), 77-88.
- LOPES, S. G. B. C. & NARCHI, W. 1998. Funcional anatomy of *Nausitora fusticula* (Jeffreys, 1860) (Bivalvia: Teredinidae). *The Veliger*, **41**(3), 274-288.
- LOPES, S. G. B. C., NARCHI, W. & DOMANESCHI, O. 1998. Digestive Tract and Funcional Anatomy of the Stomach of *Nausitora fusticula* (Jeffreys, 1860) (Bivalvia: Terdinidae). *The Veliger*, **41**(4), 351-365.

- LOPES, S. G. B. C., DOMANESCHI, O., MORAES, D. T. DE, MORITA, M. & MESERANI, G. L. C. 2000. Functional anatomy of the digestive system of *Neoterredo reynei* (Bartsch, 1920) and *Psiloterredo healdi* (Bartsch, 1931) (Bivalvia, Teredinidae). In: Harper, E. M., Taylor, J. D. & Crame, J. A. (eds.) *The Evolutionary Biology of the Bivalvia*. Geological Society, London, Special Publications, **177**, 257-271.
- MANN, R. 1984. Nutrition in the Teredinidae. In: COSTLOW, J. D., TIPPER, R. C. (ed.) 1984 *marine biodeterioration: an interdisciplinary study*. Annapolis, Naval Institute Press, p. 24-29.
- MARTIN, M. M. 1983. Celulose digestion in insects. *Comp. Biochem. Physiol.*, **75A**(3), 313-324.
- MORAES, D. T. 1999. Estudo da anatomia funcional dos órgãos envolvidos com a alimentação de *Neoterredo reynei* (Bartsch, 1920) (Bivalvia, Teredinidae). 131f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MORAES, D. T. 2003. Anatomia e taxonomia das espécies do gênero *Bankia* Gray, 1842 (Bivalvia, Teredinidae) do litoral brasileiro. 73f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MORTON, B. 1978. Feeding and digestion in shipworms. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, **16**, 107-144.
- MORTON, B. 1983. Feeding and Digestion in Bivalvia. In: HOCHACHKA P. W. (ed.) *The Mollusca*. v. 5. Academic Press, New York, 65-147.

- MORTON, B. & MCQUINSTON, R. W. 1974. The daily rhythm of activity in *Teredo navalis* Linnaeus correlated with the functioning of the digestive system. *Forma et functio*, 7, 59-80.
- MULER, A. C. P. & LANA, P.C. 1987. Padrões de distribuição geográfica de Teredinidade (Mollusca, Bivalvia) do estado do Paraná. *Ciência e Cultura*, 39(12): 1175-1177.
- NAIR, N. B. 1955. The digestive enzymes of *Bankia indica*, Nair. *Curr. Sci.*, **24**, 126-127.
- NAIR, N. B. 1956. The path of enzymic hydrolysis of cellulose in the wood-boring pelecypod *Bankia indica* Nair. *J. sci. industr. Res.*, **13B**, 155-156.
- NAIR, N. B. 1957. Physiology of digestion in *Bankia indica* – the enzymatic activity of the crystalline style. *J. sci. industr. Res.*, **16C**, 39-41.
- NOELTING, G. & BERNFELD, P. 1948. Sur les enzymes amylolytiques. III – La amylase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d' α -amylase. *Helv. Chim. Acta*, **31**, 286-290.
- NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY (NC-IUB). 1983. Recommendations 1981. *Bocem. J.*, **213**, 561-571.
- NORTHCOTE, D. H., 1972. Chemistry of the plant cell wall. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, **23**, 113-132.
- OWEN, G. 1966. Digestion. In: *Physiology of Mollusca*, v. II, K. M. WILBUR and C. M. YOUNGE (eds.), Academic press, New York, 53-96.

- POPHAM, J. D. & DICKSON, M. R. 1973. Bacterial associations in the teredo *Bankia australis* (Lamellibranchia: Mollusca). *Mar. Biol.*, **19**: 338-340.
- POPHAM, J. D. 1975. Further observations of the gland of Deshayes in the teredo *Bankia australis* (Bivalvia, Mollusca). *Veliger*, **18(1)**: 55-56.
- POTTS, F. A. 1923. The structure and function of the liver of *Teredo*, the shipworm. *Proc. Camb. Philos. Soc., Biol. Sci.*, **1**, 1-17.
- PURCHON, R. D. 1960. The stomach in the Eulamellibranchia: stomach types IV and V. *Proc. Zool. Soc. Lond.*, **135**(3): 431-498.
- PURCHON, R. D. 1968. Feeding and Digestion in Bivalvia. *The Biology of the Mollusca*. Oxford, Pergamon Press.
- PURCHON, R. D. 1971. Digestion in filter feeding bivalves – A new concept. *Proc. Malac. Soc. Lond.*, **39**, 253-262.
- ROBERTSON, A., I. 1991. Plant-animal interactions and the structure and function of mangrove forest ecosystems. *Austral. J. Ecol.*, **16**, 433-443.
- ROSENBERG, F. A & BREITER, H. 1972. The role of cellulolytic bacteria in the digestive processes of the Shipworm. I. Isolation of some cellulolytic microorganisms from the digestive system of teredine borers and associated waters. *Mater. Org.*, **4**, 147-159.
- ROSENBERG, F. A & CUTTER, J. 1973. The role of cellulolytic bacteria in the digestive processes of the Shipworm. In: Acker, R. F. et al.(ed.)

- Materials in the sea*. Evanston, Northwestern, University Press, 778-796.
- SARASWATHY, M. & NAIR, N. B. 1971. Observations on the structure of the shipworms, *Nausitora hedley*, *Teredo furcifera* and *Teredora princesae* (Bivalvia: Teredinidae). *Trans. R. Soc. Edinb.*, **68**(14): 507-566.
- SIPE, A. R.; WILBUR, A. E. & CARY, S. C. 2000. Bacterial symbiont transmission in the wood-boring shipworm *Bankia setacea* (Bivalvia, Teredinidae). *Appl. Environm. Microbiol.*, **66**, 1685-1691.
- SOVA, V. V.; ELYAKOVA & VASKOVSKY, V. E. The distribution of laminarinases in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, **32**, 459-464.
- TERRA, W. R., FERREIRA, C., & BIANCHI, A. G. 1979. Distribution of digestive enzymes among the endo and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *J. Insect Physiol.*, **25**, 487-494.
- TURNER , R. D. 1966. A survey and illustrated catalogue of the Teredinidae (Mollusca: Bivalvia). Cambridge, *The Museum of Comparative Zoology*. 265p.
- TURNER , R. D. 1984. An overview of research on marine bores: past progress and future direction. In: Costlow, J. D. & Tipper, R. C. (ed.) 1984 *marine biodeterioration: an interdisciplinary study*. Annapollis, Naval Institute Press, p. 3-16.

- TURNER , R. D. 1988. Wood, phytoplankton, dissolved organic material and nitrogen in teredinid nutrition (Mollusca: Bivalvia: Teredinidae). In: Thompson, M.; Tirmizi, N., M. (ed.) *Marine Science of the Arabian Sea. Proceedings of an international Conference*. American Institute of Biological Sciences.
- TURNER, R. D. & JOHNSON, A. C. 1971. Biology of the marine wood-boring molluscs. In: Jones, E. B. G.; Eltringham, S. K. (ed.) *Marine borers, fungi and fouling organisms of wood*. Paris, Organisation for Economic Co-operation and Development, 259-301.
- VONK, J. H. & WESTERN, J. R. H. 1984. *Comparative biochemistry and physiology of enzymatic digestion*. Academic Press, N. Y.
- WATERBURY, J. B.; CALLOWAY, C. B. & TURNER, R. D. 1983. A cellulolytic nitrogen-fixing bacterium cultured from the gland of Deshayes in shipworms (Bivalvia: Teredinidae). *Science*, **221**, 1401-1403.
- YOUNGE, C. M. 1923. Studies on the comparative physiology of digestion. I, The mechanism of feeding, digestion and assimilation in the Lamellibranch *Mya*. *Brit. Journ. Exper. Biol*, **1**, 15-63.
- YOUNGE, C. M. 1926. The digestive diverticula in the Lamellibranchs. *Trans. Royal Soc. Edinburgh*, **54**, 703-718.