



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

INSTITUTO DE CIENCIAS DO MAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIENCIAS MARINHAS TROPICAIS

DAVID ARAUJO BORGES

***Octopus insularis*: descrição de desova e paralarvas recém-eclodidas, cultivo de sub-adultos em diferentes sistemas e aspectos da fisiologia digestória de animais selvagens e cultivados**

FORTALEZA

2013

DAVID ARAUJO BORGES

***Octopus insularis*: descrição de desova e paralarvas recém-eclodidas, cultivo de sub-adultos em diferentes sistemas e aspectos da fisiologia digestória de animais selvagens e cultivados**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Utilização e Manejo de ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Orientador: Profa. Dra. Helena Matthews-Cascon

FORTALEZA

2013

DAVID ARAUJO BORGES

***Octopus insularis*: descrição de desova e paralarvas recém-eclodidas, cultivo de sub-adultos em diferentes sistemas e aspectos da fisiologia digestória de animais selvagens e cultivados**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Utilização e Manejo de ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Aprovado em: 04/04/2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Helena Matthwes-Cascon (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Manuel Antônio d Andrade Furtado Neto
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Soares
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Emanuel Soares dos Santos
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

Prof^a. Dr^a. Karina Ribeiro
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Ao meu avô Rubens Martins Borges falecido
em 2012 e à minha esposa Lorena Soares
Monteiro Borges

AGRADECIMENTOS

A Deus por me fortalecer nos momentos mais necessários e por prover os meios necessários para a conclusão desse trabalho;

À minha orientadora Helena Matthwes-Cascon pelo apoio e paciência;

À minha esposa Lorena Soares Monteiro Borges por me ajudar em todo o trabalho, desde a montagem do LABPOLVO até a formatação deste trabalho;

Aos meus familiares pelo constante incentivo e paciência devido aos momentos de mau humor por conta de inúmeros fatores que somente um doutorando compreende;

Ao amigo e parceiro Airton Santos pela indispensável ajuda na coleta e identificação dos polvos utilizados nesse trabalho;

À comunidade do Porto dos Barcos, em particular ao Sr. Pedro Agobar por gentilmente ceder suas embarcações e petrechos de pesca para a captura dos polvos utilizados nesse trabalho;

Ao Prof. Tito Lotufo por ceder as dependências de seu laboratório para a observação das paralarvas e desovas;

À minha estagiária Jessica Lucinda pelos dois anos de trabalhos no LABPOLVO;

Ao pesquisador Rui Jorge pelo desenvolvimento em parceria do projeto de cultivo de polvo em gaiolas;

A todos do LABENZ que gentilmente me receberam no laboratório e pacientemente me ensinaram todo o trabalho de bancada desenvolvido quanto as análises bioquímicas de enzimas digestória, e em particular ao Prof. Ranilson Bezerra por prontamente me receber em seu laboratório, não poupando recursos para alcançarmos os resultados aqui expostos, e ao doutorando Augusto Freitas por toda a essencial ajuda nas análises e discussão dos dados do cap. 03;

A todos da UFRN, desde a Diretoria da EAJ aos colegas professores do Curso de Aquicultura, tanto pelo apoio para a conclusão desse trabalho, como pela compreensão de minhas constantes ausências para conseguir finalizar esse trabalho;

A todos que duvidaram de minha capacidade de concluir esse trabalho, pois na verdade deram-me força para mostrar minha competência como pesquisador;

A todos os meus amigos que de alguma forma me ajudaram em alguma fase desse trabalho;

À AECID por financiar parte dos experimentos desse trabalho;

Ao CNPq por fornecer a bolsa de pesquisa utilizada durante o Doutorado;

Ao BNB por financiar parte dos experimentos desse trabalho.

“O que fazemos por nós mesmos, morre conosco, mas o que fazemos pelos outros e pelo mundo, permanece e é imortal.”

Albert Pine.

RESUMO

Dentre os cefalópodes os polvos são considerados espécies de grande interesse econômico para a aquicultura. Sua pesca vem decrescendo gradualmente desde os anos 1990, o que levou a um aumento na demanda por polvos. Em 2006 pesquisadores encontraram na costa do nordeste do Brasil uma espécie de polvo inicialmente identificada como o *Octopus vulgaris*, e posteriormente, em 2008, identificado como *Octopus insularis*. No capítulo 01 desse trabalho foi realizada a descrição de paralarvas recém-eclodidas de *O. insularis* sendo definido seu hábito de vida inicial como planctônico com fototaxia positiva e ausência de fase lecitotrófica. Foi determinado que o tempo entre o início da desova e a eclosão dos ovos é de aproximadamente 25 dias. Identificou-se que o *O. insularis* põem seus ovos em cachos com uma densidade média de 390 ovos/cm de cacho e não foi verificada variação do tamanho dos ovos em virtude da variação do tamanho das fêmeas. Para o capítulo 02 foi desenvolvido toda uma estrutura laboratorial com sistema fechado de recirculação de água para a realização dos testes de predileção de alimento bem como para os testes de engorda do *O. insularis*. Inicialmente foi realizado o teste de dupla escolha de alimento com sub-adultos de *O. insularis* utilizando “Y” de acrílico. Os alimentos testados foram siri (*Callinectes bocourti*) gastrópode (*Stramonita brasiliensis*) e sardinha (*Sardinella spp*), sendo todos testados dois a dois. Observou-se a captura de todos os alimentos, contudo houve uma clara predileção do siri e do peixe frente ao gastrópode. Mesmo observando-se uma maior frequência de captura dos animais pelo alimento siri, não foi verificada uma diferença significativa entre a frequência de captura do siri e do peixe. Posteriormente realizou-se o cultivo de sub-adultos do *O. insularis* a 23 e 28°C sendo utilizado siri como alimento. Para todos os índices de crescimento utilizados, o cultivo a 28°C foi superior ao a 23°C sendo observado para 28°C um ganho de peso total (ΔW) de 309,8g, um ganho de peso relativo (GR) de 100,9%, uma taxa de crescimento absoluta (AGR) de 9,4g/dia e uma taxa de crescimento específica (SGR) de 2,1%BW/dia. Mesmo havendo uma maior ingestão de alimento pelo grupo cultivado a 28°C não se observou diferença significativa entre o fator de conversão alimentar (FCA) entre os grupos cultivados a 23 e 28°C. Foi realizado também o cultivo de sub-adultos do *O. insularis* em gaiolas flutuantes sendo ofertado diferentes proporções de siri e peixe na alimentação dos indivíduos. Observou-se um maior crescimento dos animais alimentados apenas com siri sendo obtidos valores de AGR de 13,6g/dia e SGR de 1,4%BW/dia. Não foi observada diferença significativa para os índices de crescimento dos grupos alimentados apenas com

peixe e alimentados com 50% de peixe e 50% de siri. Durante o capítulo 03 foram analisadas algumas das enzimas digestivas do trato digestório de animais selvagens e cultivados da espécie *O. insularis*. Para a atividade proteolítica alcalina total observou-se uma maior atividade na glândula salivar posterior (GSP) em indivíduos selvagens. Para a atividade proteolítica total ácida não foi observada diferença significativa entre o grupo selvagem e cultivado, sendo observada atividade significativa apenas na glândula digestiva (GD). A atividade de tripsina foi observada na GD e GSP dos dois grupos tendo o grupo cultivado apresentado valores bem mais baixos de atividade que o grupo selvagem. Para a atividade de quimotripsina foram observadas atividades na GSP e intestino (INTEST) dos dois grupos analisados tendo o grupo selvagem apresentado maiores valores de atividade enzimática. Ao analisar a atividade de aminopeptidases referente a 9 diferentes aminoácidos verificou-se que para a maioria desses aminoácidos houve uma maior atividade do grupo selvagem frente ao grupo cultivado. Verificou-se também uma forte relação dessas aminopeptidases que ocorrem na GSP de animais do grupo selvagem com a composição do musculo desses animais. Quanto a atividade de amilase foi observado uma elevada atividade em vários órgão do trato digestório, marcadamente a glândula salivar anterior (GSA), GSP, ceco (CEC), GD e INTEST, sendo novamente presenciada uma maior atividade por parte do grupo selvagem.

Palavras-chave: *Octopus insularis*. Paralarva. Sub-adultos. Cultivo. Índices de crescimento. Fisiologia digestória.

ABSTRACT

From cephalops, octopuses are considered economically interesting species for aquaculture. Their fishery has been steadily decreasing since 1990's, which has led to increase in the demand for octopuses. In 2006 researchers have found in the Brazilian northeast coast a kind of octopus initially identified as *Octopus vulgaris*, and later, in 2008, identified as *Octopus insularis*. In chapter 01 of this thesis was describe newly-hatched paralarvae of *Octopus insularis* and defined its first life habit as planktonic with a positive phototaxis and no lecitotrófica phase. It has been determined that the time between the onset of spawning and hatching is approximately 25 days. It was found that the *O. insularis* lay their eggs in clusters with an average density of 390eggs/cm and no egg size variance was observed due to variation in female's size. For chapter 02 was developed a laboratory system with closed recirculating water for food preference and grow out experiments with *O. insularis* sub-adults. For the first test, the double choice food, acrylics "Y" were used. The foods tested were crab (*Callinectes bocourti*) gastropod (*Stramonita brasiliensis*) and sardines (*Sardinella spp*), all tested paired. We observed the capture of all foods, however there was a clear preference of crab and fish across the gastropod. Even observing a higher crab frequency capture, no significant difference was observed between the frequency of catching crab and fish. Later we tested the grow out of *O. insularis* sub-adults at 23 and 28°C using crab as food. For all ongrowing indices used, grow out at 28°C show higher values than at 23°C. A total weight gain (ΔW) of 309.8g, a relative weight gain (GR) of 100.9%, an absolute growth rate (AGR) of 9.4g/day and a specific growth rate (SGR) of 2.1%BW/day were registered for 28°C test. Even with a higher food intake by the 28°C cultured group, there was no difference between the feed conversion rate (FCA) between groups cultured at 23 and 28°C. It was also accomplished the *O. insularis* sub-adults grow out in floating cages being offered different proportions of crabs and fish as food. It was observed a higher growth by the animals feed exclusively by crabs, and this test shown an AGR of 13.6g/day, and a SGR of 1.4%BW/day. There were no significant difference in the growth rates of the groups fed only fish and fed 50% fish and 50% crab. In chapter 03 were analyzed some of the digestive enzymes of the digestive tract of wild and cultured *O. insularis* species. For the total alkaline protease activity was observed greater activity in the posterior salivary gland (GSP) in wild individuals. For total acidic proteolytic activity no significant difference between the wild and cultured group was observed. Significant activity was only observed in the digestive gland (GD). Trypsin activity was observed in GD and GSP for both groups, wild and cultured, although cultured

group have shown much lower activity than wild group. For chymotrypsin activity, activities were observed in the intestine (INTEST) and GSP for both analyzed groups, however wild group presented higher values of enzyme activity. Analyzing the aminopeptidases activity for 9 different amino acids, it was found a greater activity, for most of analyzed amino acids, in wild group than cultured group. There is also a strong relationship between these aminopeptidases that occur in the wild group GSP and muscle composition of animals from this same group. For amylase activity, was observed a high activity in various organ of the digestive tract, specifically the anterior salivary gland (GSA), GSP, cecum (CEC), GD and INTEST, and again wild group shown a higher activity than culture group.

Keywords: *Octopus insularis*. Paralarvae. Sub-adults. Grow out. Growth index. Digestive physiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produção das principais espécies, ou grupo de espécies de moluscos procedentes da aquicultura em 2010. Fonte: FAO 2012.....	20
Figura 2: Ovos de <i>Octopus insularis</i> . A- estagio inicial; B- data da eclosão.....	31
Figura 3: Paralarva de <i>Octopus insularis</i> ; A- visão ventral; B- vista dorsal 1; C- vista dorsal 2; D- cabeça dorsal com cromatóforos dos braços expandidos.....	33
Figura 4: Gráfico de correlação do peso da fêmea com a quantidade de ovos por peso vivo de fêmea	35
Figura 5: Estrutura do terceiro braço hectocotilizado de indivíduo macho de <i>O. vulgaris</i> (adaptado de Wells, 1978).....	44
Figura 6: A- Sistema de cultivo com tampas de vidro; B- sistema de cultivo com quadros de madeira e telas de 2.000 µm.	47
Figura 7: Filtro primário ascendente	48
Figura 8: Filtro secundário de torres; A – vista lateral; B – vista frontal.....	49
Figura 9: A - Vista geral da nova estrutura do laboratório ; B – Vista superior da caixa de cultivo com quatro espaços amostrais.....	51
Figura 10: Embarcação utilizada na pesca industrial de polvo.	51
Figura 11: Estrutura utilizada para o transporte individual de polvo vivo.....	52
Figura 12: Dimensões do “Y” de acrílico utilizado no teste de dupla escolha de alimento.....	53
Figura 13: Estrutura em “Y” e alimentos utilizados no teste de dupla.....	54

Figura 14: A – gaiola de 60 refúgios; B – gaiola de 48 refúgios com altura inicial de 2,00 m.....	58
Figura 15: Projeto de gaiola com 48 refúgios, altura 1,70 m e volume útil 1,89 m ³	59
Figura 16: Locais utilizados para o cultivo de polvo em gaiolas flutuantes.....	60
Figura 17: A – Abertura utilizada pelo animal para fuga; B e C – Indivíduos mortos após fuga; D – Aquários com suas telas e ligas individuais de proteção contra fuga.....	63
Figura 18: Crescimento de indivíduos cultivados a 23 e 28°C.	73
Figura 19: Peso inicial (Wi), peso final (Wf) e ganho total de peso (ΔW) dos tratamentos Sr, Px e SR + Px ; letras iguais implicam em igualdade entre os tratamentos.....	77
Figura 20: Sistema digestório do <i>O. vulgaris</i> (Adaptado de Wells, 1978).....	98
Figura 21: Correlação da concentração dos aminoácidos histidina, tirosina, prolina, serina, leucina e arginina no musculo do <i>O. insularis</i> e a atividade observada na GSP.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Coleta, número de indivíduos transportados, indivíduos mortos, peso médio, biomassa transportada e densidade de estocagem no transporte de exemplares de <i>O. insularis</i>	30
Tabela 2: Morfometria comparativa do <i>Octopus insularis</i> comparada com o <i>Octopus vulgaris</i> e medição dos ovos do <i>O. insularis</i>	34
Tabela 3: Peso das fêmeas, peso das desovas, total de ovos por desova, peso médio dos ovos e quantidade de ovos por grama de fêmea.	35
Tabela 4: Comparação do número e distribuição de cromatóforos na cabeça – dorsalmente, sifão, manto – dorsalmente e manto – ventralmente de paralarvas do <i>O. insularis</i> e do <i>O. vulgaris</i>	37
Tabela 5: Coleta, número de indivíduos transportados, indivíduos mortos, peso médio, biomassa transportada e densidade de estocagem no transporte de exemplares de <i>O. insularis</i>	65
Tabela 6: Frequência observada e espera de consumo ou não consumo de um dos dois alimentos (GTP x Px).	66
Tabela 7: Frequência observada e esperada de captura de GTP e peixe.	67
Tabela 8: Frequência observada e espera de consumo ou não consumo de um dos dois alimentos (GTP x Sr).	68
Tabela 9: Frequência observada e esperada de captura de GTP e siri.	69
Tabela 10: Frequência observada e espera de consumo ou não consumo de um dos dois alimentos (Sr x Px).	70
Tabela 11: Frequência observada e esperada de captura de peixe e siri.	71
Tabela 12: Peso médio inicial, peso médio final, ganho de peso total médio, ganho relativo de peso médio, taxa de crescimento absoluto, taxa de crescimento específica, quantidade líquida de alimento ingerida e fator de conversão alimentar de indivíduos cultivados.	72

Tabela 13: Peso inicial (Wi), peso final (Wf), biomassa inicial e final, densidade de estocagem inicial e final, ganho de peso total (ΔW), ganho relativo de peso (GR), taxa de crescimento absoluta (AGR), taxa de crescimento específica (SGR) total de alimento ofertado, fator de conversão alimentar (FCA), eficiência alimentar (FE) e sobrevivência de animais alimentados exclusivamente com siri, exclusivamente com peixe e com 50% de siri e 50% de peixe.	76
Tabela 14: Espécie utilizada, estrutura de cultivo, densidade de estocagem inicial, tipo de alimento utilizado, taxa de crescimento absoluta (AGR), taxa de crescimento específica (SGR), fator de conversão alimentar (FCA), eficiência alimentar (FE) e porcentagem da biomassa utilizada na alimentação de polvos cultivados por diferentes pesquisadores.	86
Tabela 15: Atividade proteolítica alcalina total (U/mg), utilizando azocaseína 1% (p/v), na glândula salivar posterior (GSP), glândula digestiva (GD), ceco (CEC) e intestino (INTEST) de indivíduos selvagens e cultivados.	105
Tabela 16: Atividade proteolítica ácida total (U/mg), utilizando hemoglobina 2% (p/v), na glândula digestiva (GD) de animais selvagens e cultivados.	105
Tabela 17: Atividade de tripsina (U/mg), utilizando Tosyl-Pro-Arg-p-Nan 1,5mM, na glândula digestiva (GD) e glândula salivar posterior (GSP) de animais selvagens e cultivados.	105
Tabela 18: Atividade de quimotripsina (U/mg), utilizando SApNA 8mM, na glândula salivar posterior (GSP) e intestino (INTEST) de indivíduos selvagens e cultivados.	106
Tabela 19: Atividade de Leucinopeptidase (U/mg), utilizando LeupNan 8mM, na glândula salivar anterior (GSA), glândula salivar posterior (GSP) e ceco (CEC) de indivíduos selvagens e cultivados	106
Tabela 20: Atividade de aminopeptidases utilizando-se substratos específicos β -naftilamida para alanina, arginina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, prolina, serina e tirosina, em glândula salivar posterior (GSP), glândula digestiva (GD) e glândula salivar anterior (GSA) de animais do grupo selvagem e cultivado.	107
Tabela 21: Atividade de amilase (mg maltose/min/mg de proteína), utilizando amido (2%), em glândula salivar anterior (GSA), glândula salivar posterior (GSP), ceco (CEC), glândula digestiva (GD) e intestino (INTEST), de animais selvagens e cultivados.	109

SUMARIO

INTRODUÇÃO	18
REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DA DESOVA E DESCRIÇÃO DE PARALARVAS DO <i>Octopus insularis</i>	25
1.1. Introdução	25
1.2. Objetivos	27
1.3. Objetivos Específicos	27
1.4. Metodologia	27
1.4.1. Coleta e transporte de indivíduos	27
1.4.2. Desova em laboratório, descrição de paralarvas e definição de modo de vida inicial	28
1.4.3. Caracterização da desova	29
1.5. Resultados	30
1.5.1. Coleta e transporte de indivíduos	30
1.5.2. Desova em laboratório, descrição de paralarvas e definição de modo de vida inicial	30
1.5.3. Caracterização da desova	34
1.6. Discussão	36
1.6.1. Coleta e transporte de indivíduos	36
1.6.2. Desova em laboratório, descrição de paralarvas e definição de modo de vida inicial	36
1.6.3. Caracterização da desova	38
1.7. Conclusões	40
1.8. Referências	41
CAPÍTULO 2 – TESTE DE PREDILEÇÃO DE ALIMENTO E CULTIVO EM DIFERENTES TEMPERATURAS E SISTEMAS, DE SUB-ADULTOS DE <i>Octopus insularis</i>	44
2.1. Introdução	44
2.2. Objetivos	46
2.3. Objetivos Específicos	46
2.4. Metodologia	47
2.4.1. Montagem e definição da estrutura ideal do laboratório de cultivo de polvo – LABPOLVO	47
2.4.2. Captura e transporte de indivíduos para os diferentes experimentos	51
2.4.3. Teste de dupla escolha de alimento	53
2.4.4. Cultivo, em laboratório, a 23 e 28°C	55
2.4.5. Cultivo em gaiolas com 3 diferentes dietas	57
2.5. Resultados	62
2.5.1. Montagem e definição da estrutura ideal do laboratório de cultivo de polvo – LABPOLVO	62
2.5.2. Captura e transporte de indivíduos para os diferentes experimentos	64
2.5.3. Teste de dupla escolha de alimento	65
2.5.4. Cultivo, em laboratório, a 23 e 28°C	71
2.5.5. Cultivo em gaiolas com 3 diferentes dietas	74
2.6. Discussão	78
2.6.1. Montagem e definição da estrutura ideal do laboratório de cultivo de polvo – LABPOLVO	78
2.6.2. Captura e transporte de indivíduos para os diferentes experimentos	79
2.6.3. Teste de dupla escolha de alimento	80
2.6.4. Cultivo, em laboratório, a 23 e 28°C	81

2.6.5.	Cultivo em gaiolas com 3 diferentes dietas	84
2.7.	Conclusões	89
2.8.	Referências	91
CAPÍTULO 3 – ASPECTOS DA FISIOLOGIA DIGESTÓRIA DO <i>Octopus insularis</i>: DESCRIÇÃO DAS PRINCIPAIS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE ANIMAIS SELVAGENS E COMPARAÇÃO COM ANIMAIS CULTIVADOS		97
3.1.	Introdução	97
3.2.	Objetivos	99
3.3.	Objetivos Específicos	99
3.4.	Metodologia	100
3.4.1.	Captura de animais e sistema de cultivo	100
3.4.2.	Extração enzimática e determinação da concentração de proteína total solúvel ...	101
3.4.3.	Ensaio enzimáticos	102
3.4.4.	Análise de regressão de atividade de algumas aminopeptidases da GSP de animais selvagens e a composição do musculo de animais selvagens	104
3.5.	Resultados	104
3.6.	Discussão	109
3.7.	Conclusões	113
3.8.	Referências	114
CONSIDERAÇÕES FINAIS		118
ANEXO A - AMINOGRAMA DE AMOSTRA COMPOSTA DO MUSCULO DE 4 EXEMPLARES SELVAGENS DE <i>Octopus insularis</i>		119

INTRODUÇÃO

A classe Cephalopoda forma um das três maiores ramificações do filo Mollusca, e seus componentes estão entre os indivíduos mais atrativos dentre os invertebrados marinhos, com sua impressionante capacidade de mudar de cor, aparentemente instantânea (Nixon e Young, 2003). Abaixo se pode ver a distribuição taxonômica do Gênero *Octopus*:

- ❖ Reino: Animalia
- ❖ Filo: Mollusca
- ❖ Classe: Cephalopoda
- ❖ Ordem: Octopoda
 - Sub-ordem: Incirrata
- ❖ Família: Octopodidae
- ❖ Gênero: Octopus

A classe Cephalopoda é composta por moluscos com simetria bilateral. A concha, em algumas espécies de sepias e polvos, é completamente ausentes, mesmo tratando-se de moluscos. O corpo é coberto por um saco muscular, o manto, o qual é a principal estrutura locomotora ao ser utilizada a propulsão a jato. O manto encerra os órgãos do sistema respiratório, digestivo, circulatório, excretor e reprodutor. A grande cabeça dos cefalópodes geralmente é bem dividida do resto do corpo, com a exceção de algumas espécies de polvo. Possuem olhos bem desenvolvidos, uma coroa de apêndices que envolvem a boca e um sifão (Nesis, 1987).

Cefalópodes são considerados como a classe mais ativa e especializada de moluscos. São em sua maioria nadadores velozes, carnívoros e pelágicos. Compartilham algumas características com alguns vertebrados mais evoluídos como: olhos com lentes, pupila e pálpebras, sistema nervoso bem desenvolvido e capacidade de aprender (de Goot, 1995 apud Vaz-Pires *et al.*, 2004). Todos os cefalópodes conhecidos são carnívoros, e se utilizam dos seus versáteis aparatos utilizados para a alimentação (braços e tentáculos) para se alimentarem de uma enorme gama de diferentes organismos e diferentes tamanhos, especialmente peixes, crustáceos e outros moluscos (Boyle e Rodhouse, 2005).

Dentre os cefalópodes os polvos são considerados espécies de interesse econômico para a aquicultura. Sua pesca vem decrescendo gradualmente em todo o mundo desde os anos 1990, o que levou a um aumento na demanda por polvos. Com a elevação da demanda cresceu também o aparato científico-tecnológico para o cultivo desses animais desde os seus ovos ou paralarvas até um segundo estágio (Uriarte *et al.*, 2011).

O polvo é considerado um predador generalista, alimentando-se de crustáceos, moluscos, poliquetas e peixes (Smith, 2003). O *O. vulgaris* é um oportunista, e sua dieta geralmente reflete a abundância da disponibilidade de presas. Quanto à disponibilidade de presas, pode-se verificar que a dieta é variada conforme se modifica a profundidade e tipos de habitat. A dieta também está relacionada com o tamanho dos indivíduos e estágio de maturação sexual. Uma variação sazonal foi constatada por Cortez *et al.* (1995) para o *O. minus* e para o *O. vulgaris*.

Octopus vulgaris é uma espécie bentônica, nerítica, ocorrendo desde a linha da costa até o bordo externo da plataforma continental, em profundidades variando de 0 a 200m, sendo encontrada em diferentes tipos de substrato como: rochoso, recifes de coral e substrato de gramíneas (Mangold, 1983).

Segunda a FAO (2012), o cultivo de polvo ainda é tão insipiente que não chega nem a figurar entre as principais espécies de moluscos cultivados em 2010 (figura 1)

No mercado internacional a participação de cefalópodes (lulas, sepias e polvos) foi de 4% em 2010. Espanha, Itália e Japão são os principais consumidores e importadores destas espécies. Tailândia é o maior exportador de lulas e sepias, seguido pela Espanha, China e Argentina, enquanto que Marrocos e Mauritânia são os principais exportadores de polvo, e recentemente o México passou também a figurar como um importante fornecedor de polvo para a Europa. Com a diminuição das capturas de polvos vem aumentando o interesse do cultivo dessas espécies. Dessa forma existe uma expectativa para se verificar se as novas tecnologias que estão sendo testadas serão capazes de produzir quantidades significativas de polvo para o crescente mercado, sendo encorajadores os atuais resultados (FAO, 2012).

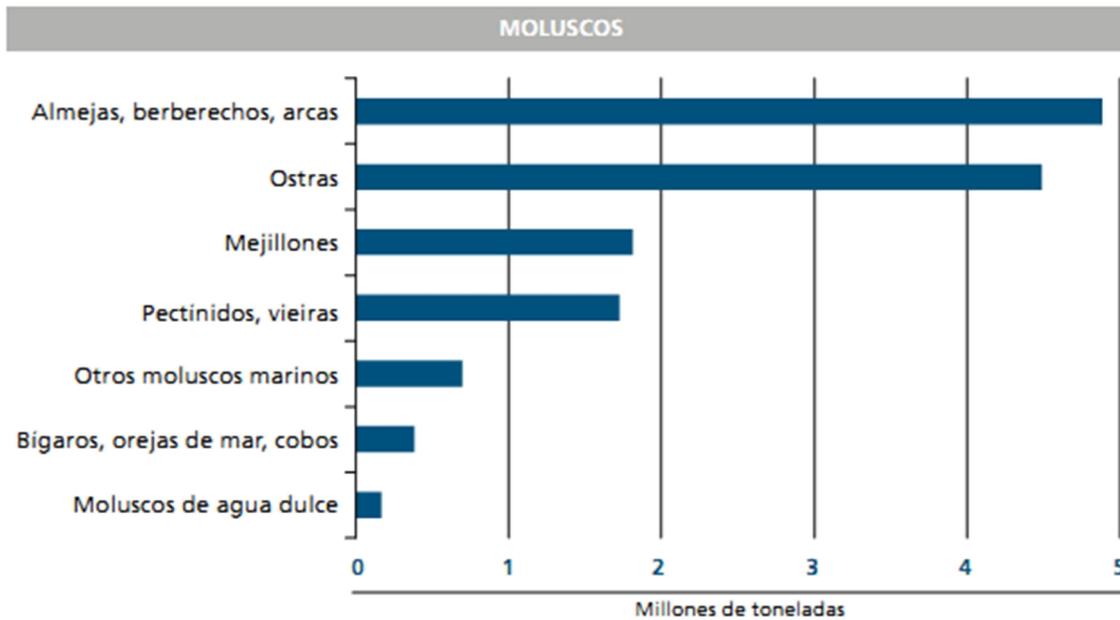


Figura 1: Produção das principais espécies, ou grupo de espécies de moluscos procedentes da aquicultura em 2010. Fonte: FAO 2012.

Para uma dada espécie ser candidata a atividade da aquicultura ela deva apresentar algumas características específicas. O *Octopus vulgaris* apresenta uma série de características que o coloca como uma espécie promissora para a aquicultura marinha. Dentre essas características podemos citar: elevada prolificidade, 100.000 a 500.000 ovos por fêmea; rápido crescimento, com um ganho de mais de 5% do peso corpóreo por dia e elevada taxa de incorporação do alimento, 30 – 60% do alimento ingerido sendo incorporado ao seu peso (Aguado e Garcia, 2002).

Atualmente o cultivo de *O. vulgaris* é baseado na captura de indivíduos direto do mar pesando aproximadamente 750g, mantendo-os em gaiolas flutuantes e os alimentando com “by catch” oriundo de pesca de arrasto, até ser atingido o tamanho comercial de 2,5 a 3,5kg. Segundo Garcia *et al.* (2004) a lucratividade dessa atividade é baixa pois depende basicamente do suprimento de sub-adultos a serem cultivados e devido a não existência de rações comerciais.

Devido à ausência de produção de formas jovens em escala comercial, a terminação (termo técnico utilizado para a engorda de sub-adultos de uma dada espécie) pode ser feita com indivíduos de tamanhos variados. Iglesias *et al.* (1999) realizaram estudos que

demonstram diferentes resultados de terminação utilizando-se diferentes tamanhos de sub-adultos de polvo obtendo resultados animadores.

Em 2006 Leite e Haimovici (2006) encontraram um polvo de tamanho mediano, que inicialmente não era diferenciado do *Octopus vulgaris*, que ocorria comumente em águas rasas ao redor do Atol das Rocas, Arquipélago de Fernando de Noronha, Arquipélago de São Pedro e São Paulo e também em praias rochosas e sistemas de corais ao longo da costa nordestina do Brasil. Os espécimes encontrados, mais robustos que o *Octopus vulgaris*, não se encaixavam na descrição de espécies do Atlântico Leste, Oeste e Central, segundo revisões da época (Mangold, 1998; Voss e Toll, 1998).

Dessa forma em 2008 (Leite *et al.*, 2008) foi descrito a nova espécie de polvo que ocorre nas ilhas oceânicas no Nordeste brasileiro, bem como nas praias do litoral nordestino do Brasil. A nova espécie, *Octopus insularis*, recebeu esse nome por ocorrer em águas rasas e ter uma presença expressiva ao redor das ilhas oceânicas.

Em um dos únicos trabalhos sobre o *Octopus insularis*, Leite *et al.* (2009) descreveram essa espécie como um predador minucioso e oportunista, quanto a sua estratégia de forrageio, e relataram que essa espécie adota várias táticas de caça em função das variáveis do habitat e do tamanho de suas presas, utilizando-se principalmente da exploração quimiotátil para a localização das presas.

Por ser uma nova espécie, e conseqüentemente haver uma escassez de informações quanto à espécie, bem como devido à semelhança do *Octopus insularis* com o *O. vulgaris*, grande parte dos dados utilizados em pesquisas quanto ao *Octopus insularis* são comparativos aos dados do *O. vulgaris*, uma das mais estudadas espécie de polvo do mundo.

Este trabalho é resultado de uma árdua pesquisa dedicada ao levantamento de informações quanto à espécie *Octopus insularis*, uma espécie que pode ser uma forte candidata a ser utilizada na aquicultura marinha no nordeste do Brasil. No capítulo 01 deste trabalho foi descrito, pela primeira vez, as paralarvas recém eclodidas de uma desova de *Octopus insularis* ocorrida em laboratório, bem como definir seu habito de vida inicial. Neste capítulo também foram feitas observações quanto à desova desta espécie, sendo estimada a densidade de ovos por centímetro de cacho de desova, bem como a quantidade de ovos por quilo de fêmea. No capítulo 02 foram desenvolvidos inúmeros estudos quanto à alimentação do *Octopus insularis* em laboratório e em campo, na forma de estudo piloto. Para tanto foi

necessário desenvolver e implantar toda uma estrutura laboratorial para a manutenção dos animais. Após a conclusão do Laboratório de Cultivo de Polvos – LABPOLVO, no Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), inicialmente foram realizados testes de dupla escolha de alimento, sendo analisadas as preferências dos animais por três diferentes tipos de alimento fresco. Em seguida foram realizados testes de cultivo de indivíduos sub-adultos em diferentes temperaturas. Para o experimento em campo foi necessário o desenvolvimento e implantação de estruturas de cultivo – gaiolas flutuantes – implantadas em um braço de mar na região de Porto dos Barcos no município de Itarema, estado do Ceará. Nesse experimento foram testados três diferentes dietas no cultivo de sub-adultos de *Octopus insularis*. Para o capítulo 03 foi inicialmente realizado o cultivo de sub-adultos de exemplares de *Octopus insularis* em laboratório. Posteriormente realizou-se a comparação da atividade de algumas enzimas digestivas de indivíduos cultivados e de indivíduos selvagens. Foram analisadas a atividade de proteases totais ácidas e alcalinas, atividade de tripsina, quimotripsina, leucinoaminopeptidase e amilase nos diversos órgãos do trato digestório dos animais. Posteriormente também foi realizada a análise da atividade de algumas aminopeptidases tanto de indivíduos cultivados quanto de indivíduos selvagens.

REFERÊNCIAS

AGUADO, F.; GARCÍA, B. G. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. **Aquaculture International**. v.10, p.361-377, 2002.

BOYLE, P.; RODHOUSE, P. G. K. **Cephalopods Ecology and Fisheries**, 1ª ed., Oxford: Blackwell Publishing Company, 2005.

CORTEZ, T.; GASTRO, B. G.; GUERRA, A. Feeding dynamics of *Octopus minus* (Molusca: Cephalopoda) in northern Chile waters. **Marine Biology**. v.123,p. 497-503, 1995.

FAO. **El estado mundial de la pesca y acuicultura 2012**. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 251p., 2012.

GARCÍA, J. G.; GONZÁLEZ, L. M. R.; GARCÍA, B. G. Estudio econômico de una explotación de pulpo (*Octopus vulgaris*) en Galicia, mediante la análise de costes. **Revista Aquatic**. v.21, p.24-33, 2004.

IGLESIAS, J.; SÁNCHEZ, F. J.; OTERO, J. J.; MOXICA, C. Cultivo del pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier): situación actual, problemas y perspectivas. In: FORO INTERNACIONAL DE LA CONSERVACIÓN DE PRODUCTOS DE LA PESCA DE GALICIA, 1999, Galicia. **Anais** 1999, p.311-320.

LEITE, T. S.; HAIMOVICI, M. Presente conhecimento da biodiversidade e habitat dos polvos (Cephalopoda: familia *Octopodidae*) de águas rasas das ilhas oceânicas do Nordeste brasileiro. In: ALVES, R. J. V.; CASTRO, J. W. A. (eds) **Ilhas Oceânicas Brasileiras – da Pesquisa ao Manejo**. Ministério do Meio Ambiente (MMA), Brasília. p.199-214, 2006.

LEITE, T. S.; HAIMOVICI, M.; MOLINA, W.; WARNKE, K. Morphological and genetic description of *Octopus insularis* new species (Cephalopoda : Octopodidae), a new cryptic species in the *Octopus vulgaris* complex from the tropical Southwestern Atlantic. **Journal of Molluscan Studies**, v. 74, p. 63–74, 2008.

LEITE, T. S.; HAIMOVICI, M.; MATHER, J. *Octopus insularis* (Octopodidae), evidences of a specialized predator and a time-minimizing hunter. **Marine Biology**. v.156, p.2355-2367, 2009.

NESIS, K. N. **Cephalopods of the world: Squids, Cuttlefishes, Octopuses, and Allies**. New Jersey, T.F.H. Publications, 1987. 351p.

NIXON, Mario; YOUNG, John Zacharry. **The Brains and Lives of Cephalopods**. New York: Oxford University Press, 2003. 392p.

MANGOLD, K. Reproduction. In: Boyle P.R. (ed) **Cephalopod Life Cycles I: Species Accounts**. London, Academic Press Inc., 1983, pp.335–364.

MANGOLD, K. The Octopodidae from the Eastern Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea. In: VOSS, N. A.; VECCHIONE, M.; TOLL R, B. (eds) **Systematics and Biogeography of Cephalopods II**, Smithsonian Contributions to Zoology, Washington, D.C p.521-547, 1998.

SMITH, C. D. Diet of *Octopus vulgaris* in False Bay, South Africa. **Marine Biology**. v.143, p.1127-1133, 2003.

URIARTE, I.; IGLESIAS, J.; DOMINGUES, P.; ROSAS, C.; VIANA, M. T.; NAVARRO, J. C.; SEIXAS, P.; VIDAL, E.; AUSBURGER, A.; PEREDA, S.; GODOY, F.; PASCHKE, K.; FARÍAS, A.; OLIVARES, A.; ZUÑIGA, O. Current status and bottle neck of Octopod aquaculture: The case of American species. **Journal of the World Aquaculture Society**. v.42(6), p.735-752, 2011.

VAZ-PIRES, P.; SEIXAS, P.; BARBOSA, A. Aquaculture potential of the common Octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): a review. **Aquaculture**. v.238, p.221-238, 2004.

VOSS, G. L.; TOLL, R. B. The Systematic and Nomenclatural Status of the Octopodidae described from Western Atlantic Ocean. In: VOSS, N. A.; VECCHIONE M.; TOLL, R. B. (eds) **Systematics and Biogeography of Cephalopods II**, Smithsonian Contributions to Zoology, Washington, D.C p.549-559, 1998.

CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO DA DESOVA E DESCRIÇÃO DE PARALARVAS DO *Octopus insularis*

1.1. Introdução

É de conhecimento geral que cefalópodes são animais de rápido crescimento e que se reproduzem apenas uma vez e morrem. Apesar de seu tamanho adulto atingir quatro ordens de grandeza, os animais não possuem uma grande longevidade, possuindo um ciclo de vida de seis meses, para espécies pequenas, a três anos em espécies grandes. Acredita-se que apenas para espécies que apresentam adultos muito grandes o tempo de vida chegue de cinco a seis anos. As menores espécies podem se reproduzir com uma idade de quatro a cinco meses, embora a maioria das espécies desove com um ou dois anos (Mangold, 1987).

Ainda segundo esse autor, os cefalópodes são gonocóricos, isto é, possuem sexo separado, não existindo hermafroditismos, e semelhante a outros moluscos nunca mudam de sexo. Os ovos variam de tamanho, indo de 1,0mm a 40,0mm de comprimento, sendo todos ricos em vitelo.

Os espermatozoides dos cefalópodes sempre estão embalados em espermatóforos elaborados, produzidos por uma glândula especial no ducto masculino, e são apenas liberados após a transferência da massa espermática para a fêmea. O óvulo é cercado por uma membrana coriônica produzida pelos folículos do ovário (Boletzky, 1987).

Durante o acasalamento os cefalópodes realizam uma série de movimentos que tem por objetivo transmitir o esperma do macho para a fêmea, de forma a garantir a reprodução. Dessa forma a análise do acasalamento tornou-se, na verdade, a análise de como o espermatóforo é transmitido. Cada um dos movimentos que o macho executa durante a cópula é examinado do ponto de vista de como ele contribui para o processo de transferência (Wodinsky, 2008).

Ovos de indivíduos da família Octopodidae são similares com uma capsula no formato de salsicha ou pera, e uma haste de tamanho variado. A maioria das espécies de polvo adere seus ovos no substrato por meio desta haste. Dependendo da espécie, os ovos são fixados individualmente ou a haste é enovelada e os ovos são fixados em forma de cachos ou festões (Hochberg, Nixon e Toll, 1992).

Na maioria das espécies da família Octopodidae, indivíduos adultos são predominantemente bentônicos. Suas formas jovens, recém eclodidas, podem tanto exibir um modo de vida semelhante a de um adulto, rastejando por sobre o substrato, como podem passar um período variado de sua vida como nadadores livres do plâncton, sendo esse modo de vida observado para muitas espécies (Boyle e Rodhouse, 2005). Após um período de evolução esses organismos planctônicos passam por modificações morfológicas e adquirem hábitos bentônicos. Villanueva e Norman (2008) comentam que o grande contraste entre a morfologia e a ecologia da fase planctônica de cefalópodes e a forma dos adultos culmina na terminologia “paralarva”. Esse termo é utilizado para definir o primeiro estágio de crescimento de uma “pós-larva” recém eclodida de cefalópode que é pelágica e habita águas próximas à superfície durante o dia e que possui um modo de vida distintamente diferente de indivíduos mais velhos da mesma espécie (Young e Harman, 1988 apud Villanueva e Norman, 2008)

A dificuldade em identificar as formas jovens de cefalópodes é uma limitação para o progresso nas mais diversas áreas de estudo desses moluscos, pois suas formas jovens ainda são desconhecidas (Ortiz, Edith Ré e Márques, 2006). Esse problema pode ser agravado quando a espécie possui um elevado valor comercial. Sweeney *et al.* (1992) afirmam ser necessário o conhecimento dos estágios iniciais de vida desses animais de forma a se poder realizar um manejo sustentável dos estoques pesqueiros, bem como identificar se as paralarvas apresentam fase de vida lecitotrófica, informação de grande importância no tocante ao desenvolvimento de protocolos de larvicultura (Abrunhosa *et al.*, 2008).

Paralarvas de várias espécies de polvo foram descritas tendo sido constatado que o número e a distribuição dos cromatóforos sobre a pele, braços, sifão, olhos, cabeça, manto e epitélio perivisceral (campo de cromatóforos) são espécie-específicos. Também o número e o tamanho relativo das ventosas nas paralarvas pode ser utilizado para identificação de espécies (Hochberg *et al.*, 1992; Villanueva e Norman, 2008; Ortiz e Edith Ré, 2010).

Leite *et al.*, (2008) afirmam que a fauna bentônica de *Octopus* do Atlântico oeste é uma das menos conhecidas, ao se comparar com outras regiões do Globo. Em 2006 Leite e Haimovici (2006) informaram ter identificado uma espécie de polvo semelhante ao *Octopus vulgaris*, contudo com diferenças significativas, como menor porte e braços mais curtos e robustos, que indicavam ser uma nova espécie. Dessa forma, em 2008 Leite *et al.*, (2008) descreveram uma

nova espécie, o *Octopus insularis*, endêmica das ilhas oceânicas do nordeste do Brasil e de parte da costa nordeste brasileira.

1.2. Objetivos

Realizar a desova de fêmeas de *Octopus insularis* em laboratório, observando as características dessa desova, bem como das paralarvas recém eclodidas, de forma a poder se determinar seu modo de vida inicial e diferencia-las de paralarvas de outras espécies.

1.3. Objetivos Específicos

Têm-se como objetivos específicos desse capítulo os tópicos descritos abaixo:

- Realizar a desova em laboratório de fêmeas de *O. insularis*;
- Descrever paralarvas do *O. insularis* recém eclodidas bem como definir seu modo de vida inicial;
- Realizar a caracterização da desova de fêmeas de *O. insularis*.

1.4. Metodologia

1.4.1. Coleta e transporte de indivíduos

Os reprodutores utilizados nesse experimento foram capturados no litoral do município de Itarema, Estado do Ceará, Brasil, por meio de espinheis de fundo de potes descrito por Sobrino *et al.*(2011), os quais estavam localizados a uma distância de aproximadamente 25 km da costa. Após a captura os animais foram acondicionados em armadilhas individuais, chamadas “canos de transporte” constituídas de cano de PVC de 100mm de diâmetro e altura de 250mm, revestidos por uma rede de abertura de malha de 5mm.

Os animais capturados foram mantidos, durante a viagem até o cais do porto de Itarema, em água marinha (36‰) com aeração constante e adição de oxigênio puro na água. A concentração de oxigênio dissolvido foi sempre superior a saturação, sendo observada uma concentração mínima de 8,5mg/l durante todo o percurso. Para o transporte dos polvos do cais

do porto ao laboratório, foi também utilizada água do mar e aeração constante. Utilizou-se caixa de transporte de 1.000 l de volume nominal, sendo utilizado para o transporte um volume de 350 l.

Esse procedimento foi mantido como padrão para todas as incursões de captura dos animais utilizados nos diversos experimentos de reprodução.

1.4.2. Desova em laboratório, descrição de paralarvas e definição de modo de vida inicial.

Cinco fêmeas foram alojadas individualmente em aquários de vidro de 100 l com refúgios de PVC, sob um sistema de recirculação constante de água (filtros mecânicos e biológicos, como descrito no capítulo 02), sendo a taxa média de renovação de água de cada aquário de 200% por hora. Durante o período de manutenção dos animais em laboratório, as fêmeas foram alimentadas alternadamente com sardinha (*Sardinella spp*) e siri (*Callinectes bocurtis*).

Uma vez ocorrida a desova, esta foi observada diariamente de forma a se poder prever a data da eclosão dos ovos. Ao se verificar a presença de pigmentos nos ovos, transferiu-se a fêmea e seu refúgio para um tanque de fibra de vidro de 500 l, sem recirculação de água, munido apenas com sistema de aeração. Após a eclosão paralarvas foram coletadas para observações em fresco como, descrição de padrão de distribuição e contagem de cromatóforos, bem como morfometria das paralarvas sendo observado: comprimento do manto (ML), largura do manto (MW), comprimento dos braços (AL) e diâmetro do olho (ED). Todas as paralarvas utilizadas nesse trabalho não possuíam saco vitelino externo, isto é, não se tratavam de paralarvas prematuras. Para a descrição das paralarvas, foi utilizada a terminologia e mensurações recomendados por Young *et al.*(1989), Hochberg *et al.* (1992) e Voss e Toll (1998).

Para a observação das paralarvas foi utilizada lupa estereoscópica NIKON SMZ 1500 munida de ocular graduada. As paralarvas foram anestesiadas em água marinha (36‰) a 4°C, de forma a se poder realizar as morfometrias, bem como as observações e contagem de cromatóforos dos animais vivos. Como sugerido por Goto (2005) paralarvas e ovos foram fixados em etanol 99% para observações futuras. Tanto as paralarvas como os ovos foram catalogados na Coleção Malacológica Prof. Henry Ramos Matthews (CMPHRM) da

Universidade Federal do Ceará com as respectivas numerações: paralarvas – nº 3116 ; ovos – nº 3117.

Para determinar se as paralarvas ao eclodirem possuem modo de vida planctônico ou bentônico, foram realizadas observações de seu comportamento nos tanques de eclosão com aeração desligada, para não causar perturbação na água dos tanques.

Após as observações de hábitos de vida das paralarvas forneceu-se aeração suave aos tanques de desova e deixou-se as paralarvas restantes em observação para verificar a existência de fase lecitotrófica.

Durante todo o período de incubação dos ovos, bem como o da observação das paralarvas recém-eclodidas, realizou-se o monitoramento da qualidade da água do cultivo. Foram monitorados diariamente pH (pHmetro Hanna HI-98108), salinidade (refratômetro Soma – SHR10), temperatura e oxigênio dissolvido (oxímetro YSI 550A) e concentração de amônia (kit colorimétrico Labcon Test).

1.4.3. Caracterização da desova

Para a determinação da quantidade de ovos por cachos, foi realizada a coleta de 12 amostras de uma desova de uma fêmea de 323g. As amostras foram coletadas, e com o auxílio de lupa (NIKON SMZ 1500) com ocular graduada, realizou-se a mensuração do comprimento do eixo da haste das amostras e contagem do número de ovos de cada amostra para se determinar a quantidade de ovos/cm de cacho. A determinação do comprimento do cacho levou em conta apenas o comprimento do feixe central de cada amostra.

Para a determinação da fecundidade (quantidade de ovos por desova, e por grama de fêmea), foi utilizado toda a massa de 3 diferentes desovas. Para a obtenção das massas de ovos utilizadas nessa fase experimental, ainda no barco de captura, uma vez identificado um pote contendo uma fêmea e sua respectiva desova, essa foi imediatamente congelada para a realização de análises futuras. Em laboratório, cortou-se o pote ao meio e retirou-se tanto a fêmea quanto a desova para a realização das pesagens. A pesagem das fêmeas e desovas – e suas respectivas amostras para contagem – foram todas feitas com o material ainda congelado. Foram utilizadas 5 amostras de cada uma das 3 desovas para se determinar a quantidade de

ovos por desova e por peso de fêmea bem como se determinar o peso médio dos ovos produzidos. O número de ovos de cada amostra foi determinado com o auxílio de lupa (NIKON SMZ 1500). Realizou-se uma análise de correlação para se determinar a existência ou não de relação entre o peso da fêmea e a quantidade relativa de ovos produzida por elas.

1.5. Resultados

1.5.1. Coleta e transporte de indivíduos

Em todas as incursões de captura de indivíduos, em média realizou-se o transporte de 20 indivíduos por coleta. Desde a estocagem dos indivíduos na caixa de transporte até a chegada ao laboratório teve-se 1 ou 2 indivíduos mortos a cada viagem como visto na Tabela 1.

Os animais capturados apresentavam peso que variava de 300 – 590g sendo transportado de 6,0 kg a 11,6kg de biomassa por viagem, ou seja, 17,1 a 33,1kg/m³.

Tabela 1: Coleta, número de indivíduos transportados, indivíduos mortos, peso médio, biomassa transportada e densidade de estocagem no transporte de exemplares de *O. insularis*.

Coleta	Nº de indivíduos capturados	Mortos	Peso médio (g)	Biomassa (kg)	Densidade de estocagem (kg/m ³)
1	18	1	482	8,7	24,8
2	20	2	300	6,0	17,1
3	21	1	551	11,6	33,1
Média	20	1,3	444,3	8,7	25,0

1.5.2. Desova em laboratório, descrição de paralarvas e definição de modo de vida inicial.

Dia 05 dezembro de 2009 foi verificada a primeira desova em laboratório de uma fêmea da espécie *Octopus insularis* (comprimento do manto – ML = 92 mm).

Em nenhum momento, desde a captura até a morte das fêmeas, ocorreu o contato destas com algum indivíduo macho. A desova ocorreu parceladamente durante 2 a 3 dias quando a fêmea aderiu longos cachos de ovos, inicialmente brancos, com comprimento e largura média de $2,26 \pm 0,04\text{mm}$ e $1,20 \pm 0,003\text{mm}$ respectivamente, no teto do refúgio de PVC (Tabela 2). Após 20 dias da desova inicial os ovos passaram a apresentar uma pigmentação mais escura (Figura 2). Essa pigmentação era referente aos olhos dos embriões em estado mais avançado de desenvolvimento, bem como a presença dos cromatóforos.

Nesse momento a fêmea e seu refúgio foram transferidos para o tanque de eclosão. Após um total de 25 dias de incubação ocorreu a eclosão dos ovos. A eclosão também foi parcelada, ocorrendo durante 2 dias seguidos. Em todos os casos, logo após o final da eclosão dos ovos, a fêmea morreu. Durante todo o período de incubação dos ovos, foi oferecido peixe (*Sardinella spp*) e siri (*Callinectes bocurtis*) às fêmeas como alimento.

Durante os 25 dias de incubação, poucas vezes a fêmea capturou o alimento, mostrando que mesmo durante a incubação, caso este esteja prontamente disponível, ela se alimenta.

A temperatura média da água tanto dos aquários quanto dos tanques de eclosão foi de $26,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, pH $7,2 \pm 0,1$, salinidade 36‰ e amônia tóxica (NH_3^-) esteve sempre abaixo de 0,003 mg/l.

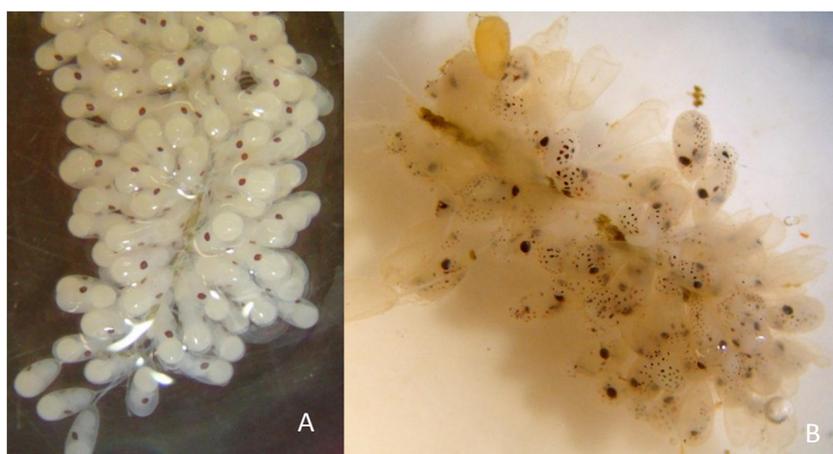


Figura 2: Ovos de *Octopus insularis*. A- estagio inicial; B- data da eclosão.

Ao eclodirem as paralarvas ficaram dispersas por toda a coluna d'água, apresentando um comportamento planctônico. Os animais apresentaram também fototaxia positiva, comportamento esse que facilitou a coleta dos exemplares.

Após a eclosão as paralarvas não foram alimentadas. Dessa forma após 24 horas sem alimentação os animais já apresentavam sinais de fraqueza, e após 48 horas sem alimentação a mortalidade foi total (100%).

Paralarvas recém eclodidas (n=18) com comprimento de manto (ML) de 2,09 mm \pm 0,31 apresentaram as seguintes características:

Braços curtos, iguais, afunilados com comprimento do braço (AL) 0,54 mm \pm 0,062, com extremidades filamentosas e delicadas (Figura 3-D). Apresentam 3 ventosas em uma fileira simples estendendo-se por aproximadamente $\frac{2}{3}$ do comprimento do braço (proximal); terceiro $\frac{1}{3}$ distal apresenta extremidade filamentosa delicada desprovida tanto de ventosas como de cerdas (órgãos) de Kolliker. Braços com 4 cromatóforos escuros de cor marrom alaranjada, sendo um na base do braço e os outros 3 seguindo uma fileira única até o fim de aproximadamente $\frac{2}{3}$ do braço proximal. Cromatóforos diminuem de tamanho conforme se afastam da região da cabeça em direção à extremidade dos braços (*running from proximal to distal tip*). “Web” “subequal” estendendo-se até (aproximadamente) a base da 2ª ventosa de cada braço. Sifão com 11 cromatóforos na região dorsal seguindo a disposição 4+3+4. Base do sifão com 4 cromatóforos, 3 cromatóforos dispersos na região central do sifão, sendo visto em alguns exemplares 4, 4 cromatóforos formando um arco na região distal do sifão. Região dorsal da cabeça com 12 cromatóforos na formação 2+4+4 sendo observados mais 2 grandes cromatóforos sobre os olhos (Figura 3-B e 3-C). Região ventral da cabeça com destaque de apenas 2 grandes cromatóforos dispostos perpendicularmente à linha base do manto. Manto alongado, cônico com comprimento de 2,09mm \pm 0,31. Cromatóforos do manto dorsal presentes na formação 4+5; na margem anterior forma uma linha transversal simples com 4 cromatóforos e na margem posterior localizam-se 5 cromatóforos em forma de arco, contornado a massa visceral; região central do manto dorsal desprovida de cromatóforos superficiais. Manto ventral com grande quantidade de cromatóforos uniformemente distribuídos por todo o manto, sendo observado em média 9 cromatóforos em linhas transversais, tendo um total de aproximadamente 66 cromatóforos. Massa visceral com 9-10 grandes cromatóforos marrons alaranjados tipo “founder” espalhados por toda a superfície dorsal. Olhos com diâmetro médio de 0,30mm \pm 0,037. Presença de iridóforos de cor dourada ao redor dos olhos.

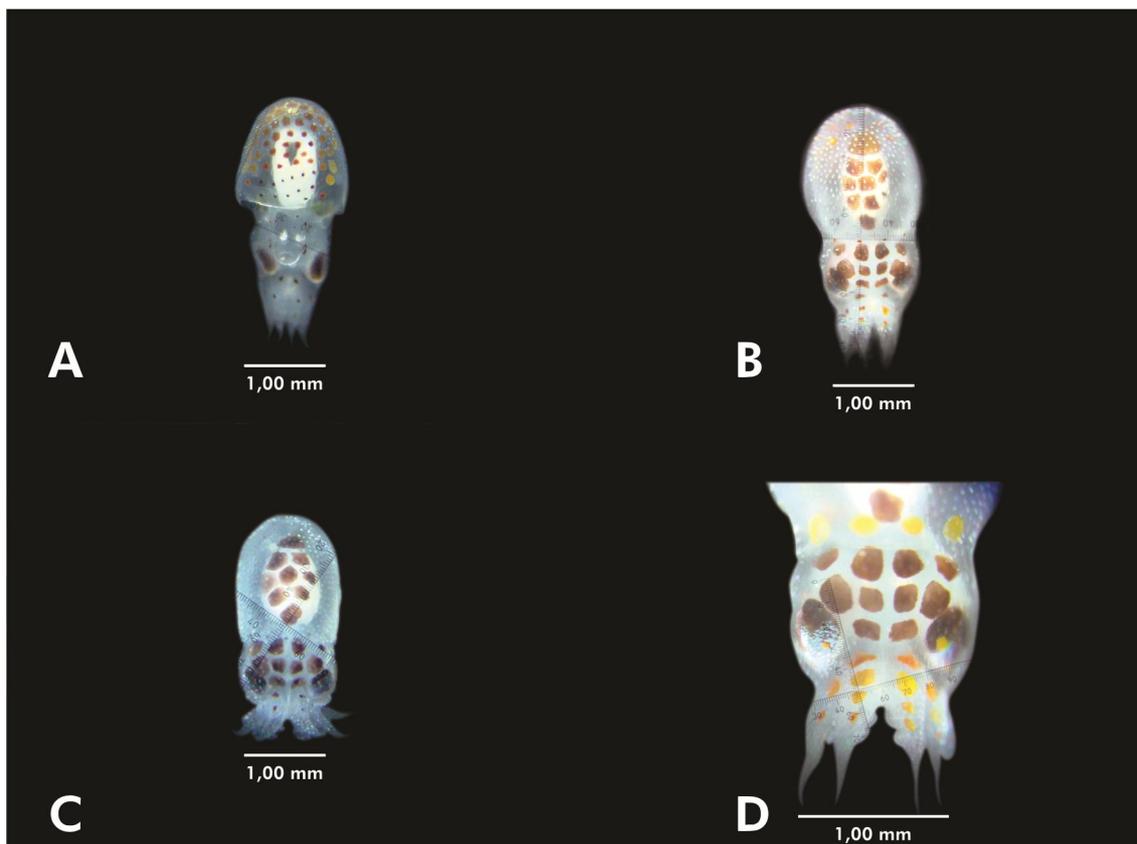


Figura 3: Paralarva de *Octopus insularis*; A- visão ventral; B- vista dorsal 1; C- vista dorsal 2; D- cabeça dorsal com cromatóforos dos braços expandidos

Observado na região ventral do manto (Figura 3-A), acima da massa visceral, a marcante presença de uma estrutura negra triangular, o saco de tinta. Próximo à região da cabeça, logo abaixo do sifão, pode-se observar a presença de dois estatocistos tipo sacular (Figura 3-A).

As medições da morfologia das paralarvas recém-eclodidas do *Octopus insularis* estão descritas na Tabela 2. Devido à semelhança entre o *O. insularis* e o *O. vulgaris*, na Tabela 2 pode-se ver as diferenças marcantes entre as paralarvas dessas espécies, de acordo com Vidal, Fuentes e Silva (2010), Ortiz, Edith Ré e Márquez (2006) e Villanueva (1995). Observa-se também na Tabela 2 as medidas dos ovos do *O. insularis* logo após a desova.

Tabela 2: Morfometria comparativa do *Octopus insularis* comparada com o *Octopus vulgaris* e medição dos ovos do *O. insularis*.

	<i>Octopus insularis</i>			<i>O. vulgaris - Sul do Brasil</i> ¹	<i>O. vulgaris</i> ²
	Recém eclodidas			Recém eclodidas	50 dias (planctônica)
	Média \pm SD	variação	n	Média \pm SD	variação
Comp. manto - ML (mm)	2,09 \pm 0,31	1,64 - 2,81	18	2,1 \pm 0,09	4,9 - 7,5
Largura do manto- MW (mm)	1,43 \pm 0,20	1,13 - 1,88	18	1,28 \pm 0,05	-
Comp. do braço - AL (mm)	0,54 \pm 0,062	0,43 - 0,70	18	-	3,55 - 5,8
Diâmetro do olho - ED (mm)	0,302 \pm 0,037	0,24 - 0,38	18	-	1,30 - 1,80
Ventosas por braço	3,0 \pm 0,0	3	18	3	18 - 26
Comp. ovo - EL (mm)	2,26 \pm 0,04	2,21 - 2,30	20	-	2,70*
Largura do ovo - EW (mm)	1,20 \pm 0,03	1,15 - 1,25	20	-	-

* ELmax - Comprimento máximo de ovo registrado ; (Villanueva, 2008)

1- Vidal, Fuentes e Silva, 2010

2- Ortiz, Edith Ré e Márquez, 2006

1.5.3. Caracterização da desova

Os cachos de ovos possuíam tamanhos variados, contudo apresentaram a mesma quantidade média de ovos por cm. Observou-se que para essa espécie cada centímetro do eixo central do feixe de cacho apresentou em média 390 ± 58 ovos.

A fêmea 01 (323g) produziu uma desova de 54,57g com um total de 83.994 ovos tendo apresentado uma proporção de 260,0 ovos por grama de fêmea. A fêmea 02 (433g) produziu uma desova de 74,35g com um total de 120.284 ovos, tendo apresentado uma proporção de 277,8 ovos por grama de fêmea. A fêmea 03 (528g) produziu uma desova de 101,37 g com um total de 159.536 ovos, tendo apresentado uma proporção de 302,2 ovos por grama de fêmea, como pode ser visto na Tabela 03.

Foi observado também, como visto na tabela 3, que o peso médio dos ovos produzidos foi de $1,58 \pm 0,04$ mg.

Tabela 3: Peso das fêmeas, peso das desovas, total de ovos por desova, peso médio dos ovos e quantidade de ovos por grama de fêmea.

	Amostras			Média	SD
	Fêmea 01	Fêmea 02	Fêmea 03		
Peso da fêmea (g)	323	433	528	428,0	102,6
Peso da desova (g)	54,57	74,35	101,37	-	-
Total de ovos da desova	83.994	120.284	159.536	-	-
Peso médio dos ovos (mg)	1,54	1,62	1,57	1,58	0,04
Quantidade de ovos por grama de fêmea	260,0	277,8	302,2	280,0	21,1

Foi realizada uma análise de correlação entre os pesos das fêmeas e a quantidade relativa de ovos produzidos por cada uma delas em relação ao seu peso, e verificou-se um elevado coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9825$) entre esses dois parâmetros como pode ser observado na figura 4.

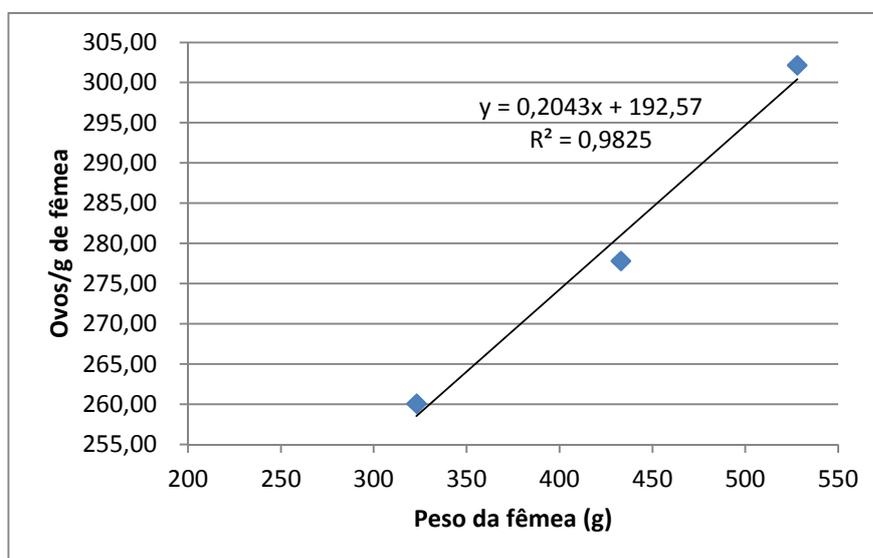


Figura 4: Gráfico de correlação do peso da fêmea com a quantidade de ovos por peso vivo de fêmea

1.6. Discussão

1.6.1. Coleta e transporte de indivíduos

Acredita-se que a obtenção de elevada taxa de sobrevivência nos transportes de indivíduos, 93%, desde a captura em alto mar até a chegada ao laboratório, foi devido ao uso contínuo de oxigênio na água de transporte. A manutenção da concentração de oxigênio sempre acima da saturação ($> 7,8\text{mg/l}$) pode ter provocado um efeito sedativo nos animais transportados, reduzindo o nível de estresse dos mesmos. A utilização de baixas taxas de estocagens, máxima de $33,1\text{ kg/m}^3$, também deve ter colaborado para o sucesso no transporte dos indivíduos, uma vez que Fuentes *et al.* (2005) relata que pode-se utilizar até 165kg/m^3 para transporte de indivíduos de $1,0\text{ kg}$ por até 24 horas.

1.6.2. Desova em laboratório, descrição de paralarvas e definição de modo de vida inicial.

Mesmo não tendo havido nenhum contato de um macho com as fêmeas levadas ao laboratório, ocorreu a desova. Dessa forma pode-se concluir que antes da captura a fêmea já havia copulado e guardado os espermatozoides, como descrito por Wells (1978) e Mangold (1987) que afirmam que um macho pode copular várias vezes com a mesma fêmea, e em muitas espécies de polvo os machos podem copular com fêmeas completamente imaturas, contudo o espermatozoide pode ser guardado por essa fêmea por até 10 meses, sendo o *O. vulgaris* um exemplo de espécie que apresenta essa característica.

Fêmeas prontas para desovar procuram por refúgios como conchas vazias, fendas, tocas ou mesmo objetos manufaturados pelo homem. A postura dos ovos pode ser realizada durante alguns dias, podendo durar algumas semanas, dependendo do número de ovos depositados, forma de eclosão das paralarvas, bem como da temperatura (Mangold, 1987).

A presença de dois estatocistos tipo sacular próximo à região da cabeça, logo abaixo do sifão, confirma a descrição feita Young (1960) para o gênero *Octopus* (Figura 3-A).

As paralarvas do *O. insularis* podem ser identificadas pelo seu padrão único de cromatóforos. As maiores diferenças são encontradas comparando-se o número e distribuição de cromatóforos em diferentes partes do corpo das paralarvas. Dessa forma pode-se diferenciar a paralarva do *O. insularis* da paralarva do *O. vulgaris* pelas características sumarizadas na tabela 4.

Tabela 4: Comparação do número e distribuição de cromatóforos na cabeça – dorsalmente, sifão, manto – dorsalmente e manto – ventralmente de paralarvas do *O. insularis* e do *O. vulgaris*

Parte do corpo	<i>Octopus insularis</i>	<i>O. vulgaris</i> Brasil - Sul ¹
Cabeça – dorsalmente	12 cromatóforos (2+4+4) mais 2 grandes cromatóforos acima dos olhos	De 8 a 10 cromatóforos; 2 ao centro da cabeça entre os olhos, 2 lateralmente na base dos olhos e 4 parcialmente cobertos pela borda do manto
Sifão	11 - 12 cromatóforos (4+3+3) na região dorsal, 4 na base do sifão, 3-4 esparsamente distribuídos na região mediana, 4 cromatóforos formando um arco na região distal	4 - 5 em 2 diferentes padrões; 2 próximos ao orifício, 1 e mais 2 adjacentes ao bordo do manto; ou 2 próximos ao orifício, 1 na região mediana e 2 adjacentes ao bordo do manto
Manto – dorsalmente	De 18 a 20; 4-5 adjacentes ao bordo do manto, 9-10 na massa visceral e 4-5 na capa posterior formando um arco ao redor da massa visceral	De 11 a 16; 3 a 5 adjacentes ao bordo do manto, 6-7 viscerais e 2 na extremidade superior
Manto – ventralmente	66-75; densamente coberta por cromatóforos medianos (9 transversais)	23-28, distribuídos em 5 faixas horizontais

1 - Vidal, Fuentes e Silva, 2010

O fato das paralarvas terem adotado um hábito de vida planctônico em nosso estudo ratifica as afirmações de Hochberg *et al.* (1992) e Huffard *et al.* (2009) que afirmam que ovos de moluscos da família Octopodidae com 1,5 a 5,0 mm de comprimento dão origem a paralarvas planctônicas. Dessa forma, pode-se prever que os estudos para o desenvolvimento da larvicultura dessa espécie deveriam ser bem mais aprofundados, uma vez que Uriarte *et al.* (2011) afirmam que a larvicultura em escala comercial de *Octopus merobenticos* é sempre muito mais problemática que a larvicultura de espécies holobenticas.

Semelhante ao observado com o *Octopus rubescens* as paralarvas do *O. insularis* também apresentaram fototaxia positiva. Segundo Osborn (1995) para a espécie *Octopus rubescens*, espécie que também possui paralarvas planctônicas, esse hábito deve-se ao fato de as fêmeas procurarem refúgios para a deposição de seus ovos. Dessa forma a fototaxia positiva é uma ferramenta que a paralarva utiliza para rapidamente e facilmente encontrar a saída do refúgio e se direcionar para o mar aberto, local de seu desenvolvimento inicial.

Os sinais de fraqueza das paralarvas 24 horas após a eclosão, bem como a mortalidade de 100% dos indivíduos ocorrido 48 horas após a eclosão, podem indicar a não existência de fase lecitotrófica, uma vez que não foi ofertado nenhum alimento aos animais logo após a eclosão. Algumas espécies de polvo como o *Enteroctopus megalocyathus* geram paralarvas que podem passar até 15 dias sem que seja oferecido alimento logo após a eclosão, sem se observar mortalidade expressiva (Ortiz, Edith-Ré e Márquez, 2006).

Segundo Abrunhosa *et al.* (2008), para o sucesso de uma larvicultura a alimentação e o regime alimentar é extremamente importante. A adição de alimento vivo nos tanques de cultivo pode ser prejudicial em caso de espécies lecitotróficas reduzindo drasticamente a sobrevivência dos organismos cultivados. Contudo para o *O. insularis* recomenda-se que em cultivos futuros, o alimento seja disponibilizado de pronto, no momento da eclosão das paralarvas, uma vez que essas aparentemente não apresentem fase de vida lecitotróficas, e que tem uma necessidade imediata de alimento.

É importante ressaltar que durante todos os experimentos procurou-se seguir as recomendações de Moltschaniwskyj *et al.* (2007), que apresentam diretrizes quanto ao bem estar de cefalópodes utilizados em experimentos.

1.6.3. Caracterização da desova.

O tamanho dos ovos bem como o tamanho do corpo de indivíduos adultos apresenta uma significativa variação dentro da família Octopodidae (Sweeney *et al.*, 1992).

O formato dos cachos de ovos do *O. insularis* foram semelhantes aos observados para o *O. vulgaris*, como descrito por Hochberg *et al.* (1992). Segundo Mangold (1983), os festões de ovos do *O. vulgaris* possuem de 90 a 160 ovos/cm, dessa forma os festões de ovos do *O.*

insularis são mais densos que o desta espécie, uma vez que apresentam uma densidade de 390 ovos/cm. Considerando-se que os ovos tanto do *O. insularis* (2,2mm – Tabela 1) quanto do *O. vulgaris* (1,5 a 2,7mm – Mangold, 1983; Hochberg *et al.*, 1992 ; Villanueva e Norman, 2008) são de tamanhos aproximados, pode-se desta forma coligir que os cachos de ovos da espécie em estudo apresenta praticamente o dobro da densidade de ovos por centímetro de haste. Ortiz, Edith-Ré e Márquez (2006) mostraram que para a espécie *Enteroctopus megalocyatus*, espécie que apresenta ovos com comprimento médio de 10,7mm, a densidade de ovos por centímetro de cacho varia de 7,1 a 11,6 ovos/cm de cacho. Para a espécie *Robsonella fontaniana*, que possui ovos com comprimento de 4,3mm, Ortiz e Edith-Ré (2010) mostram que a densidade de ovos variou de 21,8 a 24,2 ovos/cm de cacho. Com base nesses dados podemos concluir que quanto menor o tamanho do ovo maior será a densidade de ovos por cacho.

Mangold (1983) afirma que a quantidade de ovos para fêmeas de *O. vulgaris* varia de 100.000 a 500.000, dependendo do tamanho da fêmea, e que indivíduos maiores produzem mais ovos que indivíduos menores. Essa correlação também foi observada para o *O. insularis*, uma vez que fêmeas menores produziram uma menor quantidade de ovos que fêmeas maiores, tanto absolutamente – quantidade total de ovos – quanto relativamente – quantidade de ovos por grama de fêmea (figura 4).

O supracitado autor comenta também que o tamanho dos ovos é independente do tamanho das fêmeas. Para o *O. insularis* também foi verificada essa característica, uma vez que a variação do peso dos ovos foi muito pequena, 0,04mg (Tabela 3), ou seja, menos de 2,5% de variação.

1.7. Conclusões

- A utilização de baixas densidades de estocagem (máxima de 33,1 kg/m³) somada à utilização de oxigênio na água de transporte, mantendo sempre a concentração de oxigênio dissolvido na água acima da saturação, foi de suma importância para o sucesso do transporte de sub-adultos de *Octopus insularis*;
- A desova em laboratório de fêmeas de *Octopus insularis* não apresentou grande dificuldade, pois uma vez fornecido um ambiente propício foi verificada a desova espontânea;
- As paralarvas recém-eclodidas do *Octopus insularis*, apesar de possuir grande semelhança com as paralarvas recém-eclodidas do *Octopus vulgaris* podem ser facilmente diferenciadas pelo padrão dos cromatóforos observados nas diferentes partes de seus corpos;
- Uma vez definido como planctônico o modo de vida inicial das paralarvas do *Octopus insularis*, bem como a ausência de fase lecitotrófica, fica claro que estudos mais aprofundados quanto à “larvicultura” dessa espécie devem ser desenvolvidos, uma vez que espécies de polvo que possuem fase inicial de vida planctônica, corriqueiramente demandam maior cuidado em seu cultivo, principalmente na transição da fase planctônica para a fase bentônica;
- Diferentemente de alguns organismos aquáticos, indiferente do tamanho da fêmea do *Octopus insularis* não se verifica variação do tamanho dos ovos por elas produzidos, contudo, conforme se eleva o tamanho da fêmea, eleva-se a fecundidade absoluta da mesma.

1.8. Referências

ABRUNHOSA, F. A.; ARRUDA, D. C. B.; SIMITH, D. J. B.; PALMEIRA, C. A. M. The importance of feeding in the larval development of the ghost shrimp *Callichirus major* (Decapoda: Callinassidae). **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.80 (3), p.445-453, 2008.

BOYLE, P.; RODHOUSE, P. G. K. **Cephalopods Ecology and Fisheries**, 1^a ed., Oxford: Blackwell Publishing Company, 2005.

BOLETZKY, S.V. Embryonic phase. In: Boyle, P.R., **Cephalopod Life Cycle Volume II: Comparative Reviews**. London: Academic Press, 1987. 441p.

FUENTES, L.; IGLESIAS, J.; SÁNCHEZ, F. J.; OTERO, J. J.; MOXICA, C.; LAGO, M. J. Métodos de transporte de paralarvas y adultos de pulpo *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797. **Boletín. Instituto español de oceanografía**. v. 21, p.155–162, 2005.

GOTO, T. Examination of different preservatives for *Todarodes pacificus* paralarvae fixed with borax-buffered formalin-seawater solution. **Phuket mar. biol. Cent. Res. Bull.**, v. 66, p. 213-219, 2005.

HOCHBERG, F. G.; NIXON, M.; TOLL, R. B. (1992). Octopoda. In: Sweeney, M.J., Roper, C.F.E., Mangold, K.M., Boletzky, S.V. (eds) **“Larval” and Juvenile Cephalopods: A Manual for Their Identification**. Smithsonian. Contrib. Zool., 513, 213 – 280.

HUFFARD L, C.; GENTRY, B. A.; GENTRY, D. W. Description of the paralarvae of *Wunderpus photogenicus* Hocheberg, Norman & Finn, 2006 (Cephalopoda: Octopodidae). **The Raffles Bulletin of Zoology**, v.57 (1), p. 109–112, 2009.

LEITE, T. S.; HAIMOVICI, M.; MOLINA, W.; WARNKE, K. Morphological and genetic description of *Octopus insularis* new species (Cephalopoda : Octopodidae), a new cryptic species in the *Octopus vulgaris* complex from the tropical Southwestern Atlantic. **Journal of Molluscan Studies**, v. 74, p. 63–74, 2008.

MANGOLD, K. Reproduction. In: Boyle P.R. (ed) **Cephalopod Life Cycles I: Species Accounts**. London, Academic Press Inc., 1983, pp.335–364.

MANGOLD, K. Reproduction. In: Boyle P.R. (ed) **Cephalopod Life Cycles II: Comparative reviews**. London, Academic Press Inc., 1987, pp.157–200.

MOLTSCHANIWSKYJ, N. A.; HALL, K.; LIPINSKI, M. R.; MARIAN, J. E. A. R.; NISHIGUCHI, M.; SAKAI, M.; SHULMAN, D. J.; SINCLAIR, B.; SINN, D. L.; STAUDINGER, M.; VAN GELDEREN, R.; VILLANUEVA, R.; WARNKE, K. Ethical and welfare considerations when using cephalopods as experimental animals. **Rev. Fish Biol. Fisheries**, v.17, p.455-476, 2007.

ORTIZ, N.; EDITH RÉ, M.; MÁRQUEZ, F. First description of eggs, hatchlings and hatchling behavior of *Enteroctopus megalocyathus* (Cephalopoda:Octopodidae). **Journal of Planktonic Research**, v.10, p.881–890, 2006.

ORTIZ, N.; EDITH RÉ, M. The eggs and hatchlings of octopus *Robsonella fontaniana* (Cephalopoda:Octopodidae). **Journal of Marine Biology Association of the United Kingdom**, v.91, p.705-713, 2010.

OSBORN, S. A. **Fecundity and Embryonic development of *Octopus rubescens* berry from Monterey bay, California**. 1995. 100p. Thesis (Master of Science) – The Faculty of Moss Landing Laboratories, San Jose State University, 1995.

SOBRINO, I.; JUAREZ, A.; REY, J.; ROMERO, Z.; BARO, J. Description of the clay pot fishery in the Gulf of Cadiz (SW Spain) for *Octopus vulgaris*: Selectivity and exploitation pattern. **Fisheries Research**, v.108, p.283–290, 2011.

SWEENEY, M. J.; ROPER C. F. E.; MANGOLD, K. M.; BOLETZKY, S. V. (1992) *“Larval” and Juvenile Cephalopods: A Manual for Their Identification*. Washington, DC: Smithsonian Institution Press. [Smithsonian Contributions to Zoology, No. 513].

URIARTE, I.; FARIÁS, A.; PASCHKE, K.; NAVARRO, J. C.; ROSAS, C. Observations on feeding and biochemical characteristics to improve larviculture of *Robsonella fontaniana* (Cephalopoda: Octopodidae). **Aquaculture**, v.315, p.121-124, 2011.

VIDAL, E. A. G.; FUENTES, L.; SILVA, L. B. Defining *Octopus vulgaris* populations: A comparative study of the morphology and chromatophore patter of paralarvae from Northeastern and Southwestern Atlantic. **Fisheries Research**, v.106, p.199-208, 2010.

VILLANUEVA, R. Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatchling to settlement. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.52, p. 2639-2650, 1995.

VILLANUEVA, R.; NORMAN, M. D. Biology of the Planktonic Stages of Benthic Octopuses. **Oceanography and Marine Biology: an annual review**, v.46, p.105-202 2008.

VOSS, G. L. & TOLL, R. B. 1998. The Systematic and Nomenclatural Status of the Octopodinae described from Western Atlantic Ocean. In: **Systematic and Biogeography of Cephalopods, II** (N.A. VOSS, M. VECCHIONE & R.B. TOLL, eds), 549-559. Smithsonian Contributions to Zoology, Washington, D.C.

WEELS, Martin John. **Octopus: Physiology and behavior of an advanced invertebrate**. Great Britain: Halsted Press, 1978. 417 p.

WODINSKY, J. Reversal and transfer of spermatophores by *Octopus vulgaris* and *O. hummelincki*. **Mar. Biol.**, v.155, p.91–103, 2008.

YOUNG, J. Z. The statocysts of *Octopus vulgaris*. **Proceedings of The Royal Society of London - Biological Sciences**, v.152, p.3–29, 1960.

YOUNG, R. E.; HARTMAN, R. F.; HOCHBERG, F. G. Octopodid paralarvae from Hawaiian Water. **The Veliger**, v.32, p.152-165, 1989.

CAPÍTULO 2 - TESTE DE PREDILEÇÃO DE ALIMENTO E CULTIVO EM DIFERENTES TEMPERATURAS E SISTEMAS, DE SUB-ADULTOS DE *Octopus insularis*

2.1. Introdução

Inúmeros fatores bióticos e abióticos são capazes de gerar modificações dramáticas no crescimento de cefalópodes. Dessa forma, devido à grande plasticidade no crescimento, diversos modelos podem ser utilizados para se descrever o crescimento de uma determinada espécie de polvo (Semmens *et al.*, 2004).

Estudos em laboratório, inicialmente utilizando animais de idade determinada, mostram que o crescimento de *Octopus bentônicos* ocorre em duas fases durante o ciclo de vida. A primeira fase é exponencial (peso x idade) tendo uma duração de 4 a 8% do ciclo de vida do animal e a segunda é logarítmica, indo até próximo do final do ciclo de vida. Durante a fase de crescimento logarítmica observa-se um progressivo declínio na curva de crescimento (Forsythe e Van Heukelem, 1987).

Segundo Wells (1978), a diferenciação do sexo em polvos pode ser feita a partir da análise do terceiro braço do lado direito (R3). A estrutura terminal do R3 é desprovida de ventosas e possui um formato côncavo – hectocótilo – especializado para a transferência do espermatóforo, como pode ser visto na figura 5.

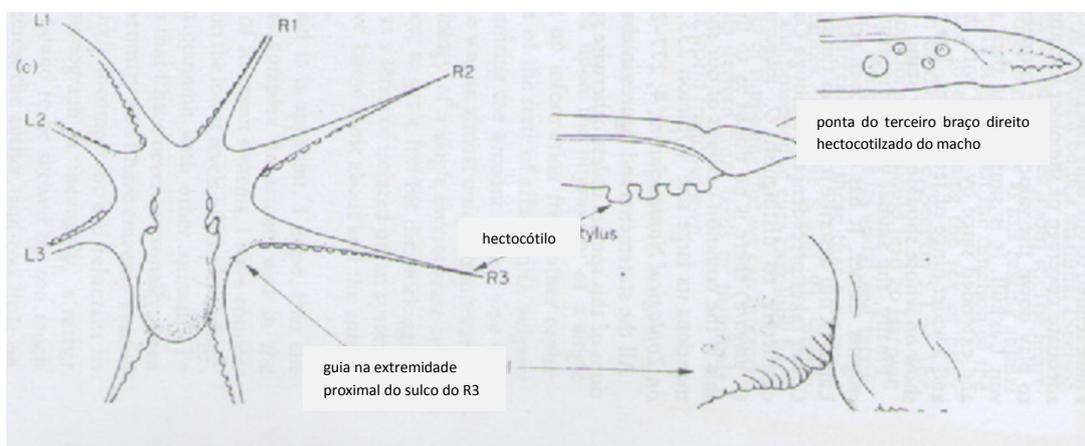


Figura 5: Estrutura do terceiro braço hectocotilizado de indivíduo macho de *O. vulgaris* (adaptado de Wells, 1978)

De acordo com Semmens *et al.* (2004), o antagonismo entre crescimento e reprodução pode ser diferente entre os sexos e essa diferença pode ser vista apenas em uma fase de crescimento menor, com a aproximação da maturidade sexual. Machos da família Octopodidae iniciam a maturidade sexual ao final da fase rápida de crescimento. Reciprocamente fêmeas dessa família atingem a maturidade sexual mais tardiamente durante o seu ciclo de vida, durante a fase de crescimento mais lenta. Dessa forma pode-se explicar o motivo pelo qual fêmeas podem apresentar um maior crescimento na fase adulta e atingir um tamanho maior. Contudo, segundo os mesmos autores, durante o processo reprodutivo o macho compromete no máximo 5% do seu peso corpóreo, enquanto fêmeas chegam a comprometer de 20 a 50% do seu peso corpóreo no processo reprodutivo.

Contrariando o que dizem Semmens *et al.* (2004), os estudos de Iglesias *et al.* (2000) e García & Giménes (2002) mostram que machos apresentam melhor desempenho de crescimento que fêmeas, ambos cultivados em tanques. Contudo Giménez e García (2002) e Oltra *et al.* (2005) verificaram não existir diferença significativa no cultivo de machos e fêmeas, sendo que o primeiro realizou cultivo em tanques e o segundo em gaiolas flutuantes.

Segundo Wells (1978) e Mangold (1987), uma fêmea pode copular com um macho e guardar o espermatóforo por um período de até 10 meses. Dessa forma, diversos autores que desenvolvem pesquisas com o cultivo de polvo (Castaño, 2002; Rodríguez *et al.*, 2006 ; García e Valverde, 2006 ; Biandolino *et al.*, 2010) optam por realizar seus estudos utilizando apenas indivíduos machos, uma vez que em se utilizando fêmeas, corre-se o risco de esse animal já ter copulado antes de ser levado ao laboratório, ou mesmo para as gaiolas de cultivo em campo, vindo assim a desovar durante os experimentos, influenciando assim, negativamente nos resultados dos cultivos.

A necessidade de se diversificar os produtos oriundos da aquicultura marinha, vem estimulando o desenvolvimento de técnicas de cultivo de novas espécies. O cultivo industrial de polvo ainda está em sua fase inicial de desenvolvimento, estando voltado para o cultivo de sub-adultos, uma vez que não se tem o fornecimento de formas jovens da principal espécie cultivada no mundo, o *Octopus vulgaris* (Biandolino *et al.*, 2010).

Diversos trabalhos mostram o potencial do *O. vulgaris* para a aquicultura devido a sua alta taxa de crescimento, elevado aproveitamento do alimento consumido e devido a possibilidade de se utilizar elevadas densidades de estocagem no cultivo, mesmo se tratando de um animal

territorialista (Iglesias *et al.*, 2000; Castaño, 2002; Socorro *et al.*, 2005; Vaz-Pires *et al.*, 2004; Uriate *et al.*, 2011).

Devido a ocorrência da espécie *Octopus insularis*, anteriormente confundida com o *Octopus vulgaris* (Leite *et al.*, 2008), no Nordeste do Brasil optou-se por investigar a possibilidade de se utilizar essa espécie na aquicultura marinha.

2.2. Objetivos

Neste trabalho foram desenvolvidas estruturas para a realização do cultivo do *Octopus insularis* tanto em laboratório, quanto em campo, sendo investigado preferências alimentares e diferentes temperaturas de cultivo.

2.3. Objetivos Específicos

Têm-se como objetivos específicos desse capítulo os tópicos descritos abaixo:

- Montagem e definição da estrutura ideal do laboratório de cultivo de polvo – LABPOLVO;
- Determinar, a partir de experimento de dupla escolha, o alimento preferencial do *Octopus insularis*;
- Realizar teste de temperatura no cultivo de *Octopus insularis*;
- Realizar o cultivo de *Octopus insularis* em gaiolas sendo avaliadas 3 diferentes dietas.

2.4. Metodologia

2.4.1. Montagem e definição da estrutura ideal do laboratório de cultivo de polvo – LABPOLVO

Estrutura inicial do LABPOLVO

Para a realização dos experimentos foram utilizadas duas baterias de dez aquários de vidro com volume nominal de 100 l e volume útil de 80 l. Os aquários possuíam um sistema de adução superior e drenagem de fundo, primando pela retirada da água de menor qualidade e proporcionando uma melhor circulação de água dentro dos aquários. Todos os aquários possuíam tampas de vidro para evitar a saída dos indivíduos. Posteriormente, as tampas de vidro dos aquários foram substituídas por quadros de madeira e telas de 2.000 μ m (Figura 6).

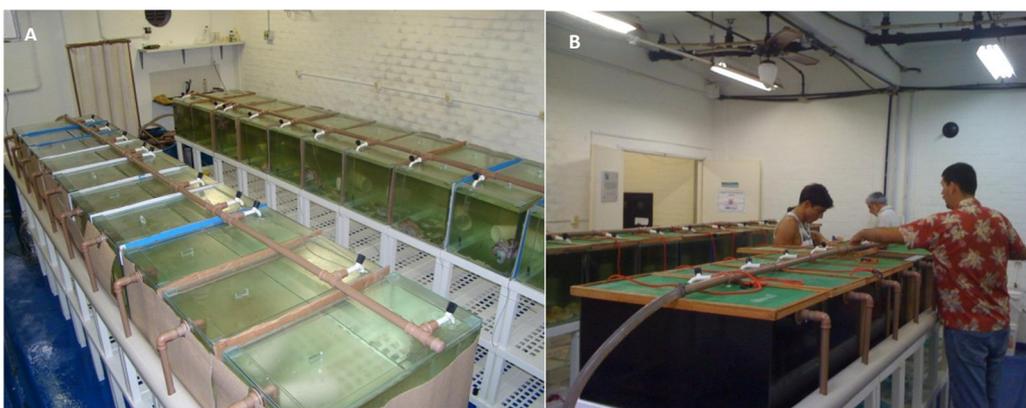


Figura 6: A- Sistema de cultivo com tampas de vidro; B- sistema de cultivo com quadros de madeira e telas de 2.000 μ m.

Lateralmente ao sistema dos 20 aquários dispunha-se de uma caixa d'água de 500 l de fibra de vidro subdividida em 4 espaços amostrais, que possuía a mesma vazão de renovação de água dos aquários, bem como também compartilhava do mesmo sistema de filtragem de água. Para evitar a fuga dos indivíduos foi utilizada sobre a caixa uma rede de abertura de malha de 5 mm fixada no local por ligas de borracha.

Toda a água de drenagem das duas baterias de 10 aquários era coletada por um tubo de PVC de 100mm e direcionada aos filtros descritos abaixo, bem como a água proveniente da caixa d'água adjacente à bateria de aquários (Figura 6).

Filtro primário ascendente:

Filtro construído em bombona plástica de 200 l com cano de PVC de 200mm ao centro, aberto em suas duas extremidades. Nos últimos 25 cm de profundidade do tubo de PVC fez-se inúmeros orifícios de 1,0mm. Para a retenção de sólidos em suspensão foi colocada manta acrílica na extremidade inferior do tubo de PVC de forma a cobrir não apenas a extremidade de tubo, mas também as paredes do tubo que continham os orifícios.

O material filtrante desse filtro foi constituído de conchas de moluscos bivalves (*Crassostrea rhizophorae*) e um saco de algodão contendo 1,0kg de carvão ativado.

Toda a água oriunda de cada bateria de aquários experimentais era direcionada para o tubo de PVC do filtro de forma que a água passava inicialmente pela filtragem da manta acrílica e seguisse o fluxo ascendente sendo feita a segunda etapa de filtragem no leito de conchas. Posteriormente a água fluía pelo saco de algodão contendo carvão ativado, localizado na parte superior do filtro, e era direcionada para o segundo sistema de filtro por meio de 2 tubos de PVC de 60mm e um de 25mm (Figura 7).



Figura 7: Filtro primário ascendente

Filtro secundário de torres:

O filtro secundário de torres era constituído de duas estruturas básicas: caixa d'água de fibra de vidro de 1.000 l e bateria de 8 tubos de PVC 200mm de 2,00m – torres de volatilização de amônia (Figura 8). A caixa d'água tinha como finalidade básica armazenar toda a água que recirculava pelas 8 torres de volatilização de amônia. Por meio de uma bomba centrífuga magnética AQUANT de ¼ CV a água contida na caixa de 1.000 l era circulada pelo sistema de arrefecimento (*chiller*) e era continuamente aspergida sobre a abertura superior de cada um dos 8 tubos de PVC de 200mm. Cada um desses tubos foi preenchido até a altura de 1,70m com algas calcárias mortas do gênero *Lithothamnium* (leito filtrante) e possuíam orifícios em sua região inferior que propiciavam a saída da água neles aspergida, fazendo com que a água contida na caixa de 1.000 l ficasse continuamente circulando pelas torres de volatilização de amônia. Aproximadamente 1/3 da caixa d'água também foi preenchida com algas calcárias do gênero *Lithothamnium* e conchas de *Crassostrea rhizophorae*, de forma a se incrementar a filtragem biológica nesse sistema de filtragem secundária.



Figura 8: Filtro secundário de torres; A – vista lateral; B – vista frontal.

Na base da caixa d'água foram feitas duas tomadas d'água de 60mm para duas bombas centrifugas magnéticas AQUANT de ¼ CV que eram responsáveis, separadamente, pelo aporte de água das duas diferentes baterias de aquários (figura 03 – B). Com a supracitada potencia foi obtida uma troca de água de cada aquário de aproximadamente 200% por hora. Para evitar a entrada de material nas bombas de adução localizadas na base da caixa d'água, utilizou-se na tomada d'água, internamente na caixa de fibra, um filtro mecânico composto de um tambor plástico de 60 l vazado em suas laterais revestido com uma tela de 500µm, evitando-se assim a sucção de material sólido que pudesse comprometer o funcionamento das bombas.

Nova estrutura do LABPOLVO:

Em um segundo momento verificou-se a necessidade de realizar uma drástica mudança na estrutura do laboratório, pois ao se utilizar o sistema de aquários verificou-se que os animais ficavam extremamente estressados, interferindo na sua alimentação, e por consequência em seu crescimento.

Todos os aquários foram substituídos por 4 caixas d'água de fibra de vidro de 500 l de volume nominal, sendo sempre utilizado um volume de aproximadamente 350 l, subdivididas inicialmente em 4 espaços amostrais, e posteriormente em 2 espaços amostrais. Para a realização da subdivisão foi utilizada tela plástica de abertura de malha de 13mm formando um cilindro de tela com 4 subdivisões, tampado ao fundo e na superfície, sendo deixado apenas uma abertura na superfície para o manejo alimentar e biometrias (Figura 9). Para evitar fugas utilizou-se, também, na periferia superior interna de todo o cilindro de tela, uma manta acrílica com uma largura de aproximadamente 15cm. Não foram necessárias modificações quanto ao sistema de filtração.

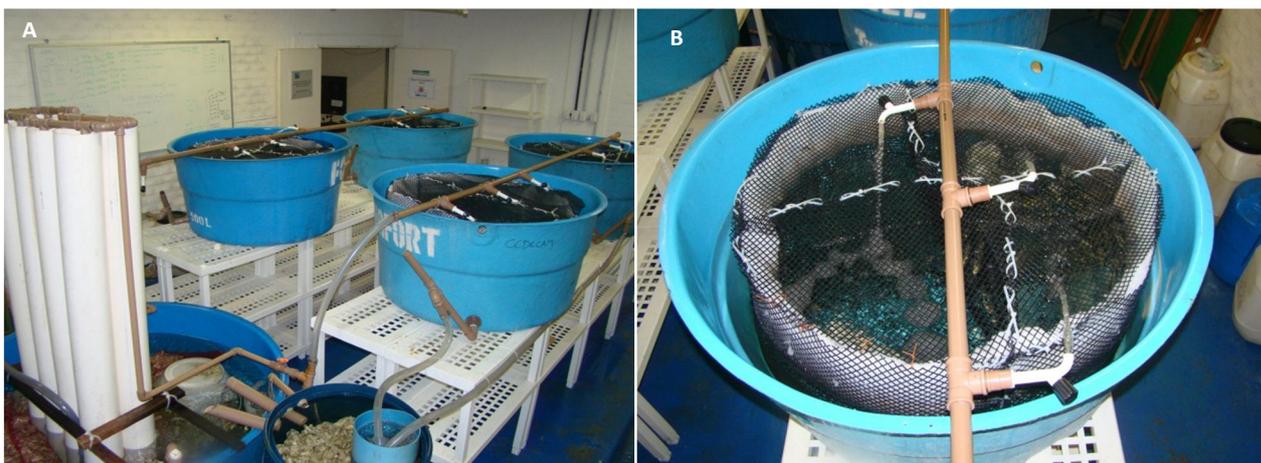


Figura 9: A - Vista geral da nova estrutura do laboratório ; B – Vista superior da caixa de cultivo com quatro espaços amostrais.

2.4.2. Captura e transporte de indivíduos para os diferentes experimentos

Todos os animais utilizados nos experimentos foram capturados por embarcações que realizam a pesca comercial de polvo com potes, como descrito por Sobrino *et al.*(2011), no litoral do município de Itarema – CE, Brasil, em bancos pesqueiros localizados a aproximadamente 25km da costa (Figura 10).



Figura 10: Embarcação utilizada na pesca industrial de polvo.

Os animais ao serem retirados dos potes eram identificados quanto a espécie e sexo, e imediatamente alojados nos recipientes individuais de transporte, canos de PVC de 100mm de diâmetro e altura de 250mm, revestidos por uma rede de abertura de malha de 5mm (Figura 6), os quais foram colocados em um recipiente de 200 l contendo água do mar. Durante todo o percurso dos bancos de pesca até o porto, fez-se uma constante troca de água nesses tanques de 100 l, bem como forneceu-se aeração com oxigênio puro, de forma a garantir uma condição de menor estresse possível aos animais transportados.



Figura 11: Estrutura utilizada para o transporte individual de polvo vivo.

O transporte de Itarema a Fortaleza foi feito em caixa de transporte de 1.000 l contendo aproximadamente 350 l de água. A água utilizada no transporte terrestre foi a mesma utilizada durante o transporte marítimo, sendo também fornecido constante aporte de oxigênio puro durante todo o percurso até a chegada ao laboratório.

Para todos os experimentos de engorda ou escolha de alimento foram sempre utilizados indivíduos macho e com peso variando entre 190 e 450g (média de 320g).

Durante todo o transporte foram monitorados o pH (pHmetro Hanna HI-98108), a temperatura e o oxigênio dissolvido (oxímetro YSI 550A) da água.

Para o transporte dos animais utilizados no experimento de engorda em gaiolas com 3 diferentes tipos de alimento, não foi necessário transporte terrestre, uma vez que as gaiolas experimentais foram povoadas no retorno da atividade de captura, com o auxílio do próprio barco utilizado na pesca dos polvos capturados para esses experimento.

2.4.3. Teste de dupla escolha de alimento

Para teste de dupla escolha de alimento foi desenvolvido uma estrutura em acrílico transparente em forma de “Y”, com base nos trabalhos de Nunes *et al.* (2006) e Nunes *et al.* (2010), onde em cada uma das 2 extremidades superiores do “Y” havia um diferente tipo de alimento, sendo disponibilizado para o animal apenas uma única entrada (Figura 12). As extremidades que continham os alimentos possuíam tampas móveis, fixadas por ligas de borracha, de forma a permitir uma rápida retirada do alimento não escolhido pelo indivíduo, bem como permitia uma mais fácil lavagem de toda a estrutura do “Y”. Cada tampa possuía também 5 orifícios de 1,0cm utilizados para permitir uma mais rápida entrada da água no interior do “Y”, facilitando a submersão da estrutura.

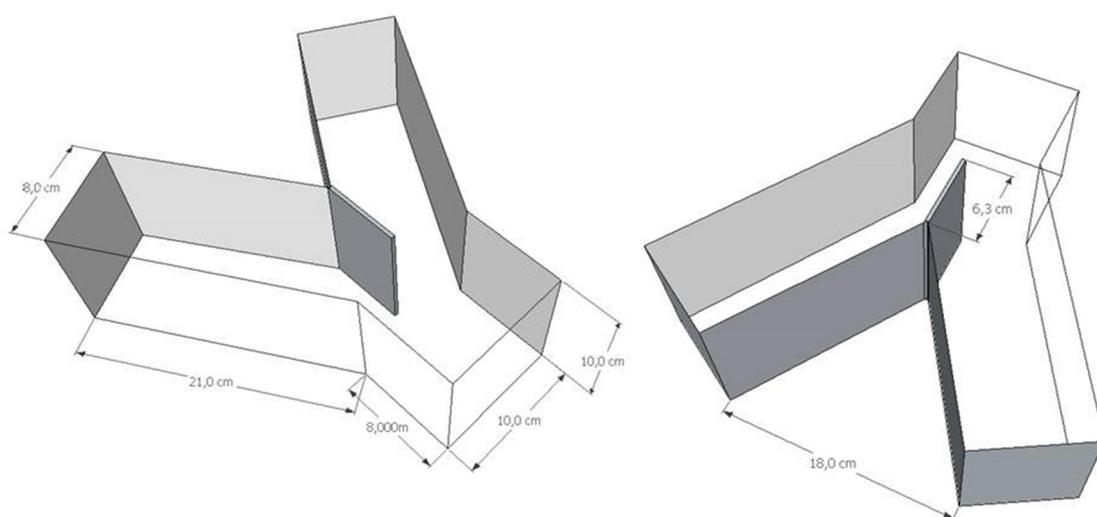


Figura 12: Dimensões do “Y” de acrílico utilizado no teste de dupla escolha de alimento.

Foram testados 3 diferentes tipos de alimento fresco, tomados 2 a 2: siri (*Callinectes bocourti*) versus gastrópode (*Stramonita brasiliensis*), siri versus sardinha (*Sardinella spp*) e sardinha versus gastrópode (Figura 13). Os alimentos, inteiros ou em suas partes, possuíam aproximadamente o mesmo tamanho (Figura 13A e 13C), de forma a se evitar que alimentos maiores tivessem uma maior atratividade visual que alimentos menores.

Todos os alimentos utilizados nesse experimento foram adquiridos frescos ou coletados vivos e imediatamente congelados. Antes de se iniciar cada teste, os alimentos foram descongelados e ofertados em temperatura ambiente.

Antes de se iniciar o teste de dupla escolha de alimento, foi realizada uma adaptação dos animais ao ambiente de laboratório. Nos três primeiros dias após a chegada dos animais, não foi ofertado nenhum tipo de alimento, iniciando-se a alimentação dos polvos apenas com o início do experimento.



Figura 13: Estrutura em “Y” e alimentos utilizados no teste de dupla.

Em cada um dos testes, durante dez dias consecutivos, dez animais foram submetidos ao teste de dupla escolha de alimento. Em cada uma das extremidades superiores do “Y” foi colocado um diferente tipo de alimentos (Figura 13B) e aguardou-se que o animal capturasse o seu alimento preferido. Uma vez capturado um dos alimentos, retirava-se o animal de dentro do “Y” e não se permitia o acesso do mesmo ao outro alimento não selecionado.

O “Y” foi deixado no espaço amostral por um período máximo de 5 minutos. Caso o animal não capturasse nenhum dos dois alimentos disponibilizados, o “Y” era retirado do espaço amostral e se fazia o registro da não captura de alimento.

Ao final de cada teste o “Y” e suas tampas eram lavadas com detergente neutro de forma a não deixar nenhum resíduo de alimento.

Os experimentos foram sempre realizados pelo turno da manhã e não se ofertou nenhum outro tipo de alimento, salvo o alimento capturado pelo animal durante o teste de dupla escolha. Nos casos em que o animal não capturava nenhum alimento, este indivíduo também não recebeu nenhum alimento complementar.

Ao finalizar cada experimento de 10 dias, foi realizada uma nova coleta de animais para o início de novo experimento de dupla escolha.

Durante todo o experimento foi feito o monitoramento diário do pH (pHmetro Hanna HI-98108), salinidade (refratômetro Soma – SHR10), temperatura e oxigênio dissolvido (oxímetro YSI 550A) e concentração de amônia (kit colorimétrico Labcon Test) da água.

Para a análise dos resultados aplicou-se inicialmente o teste do qui-quadrado (χ^2) com a finalidade de identificar se existiu diferença entre as frequências de comer ou não comer o alimento, tomando-se como repetição cada dia de experimento. Posteriormente foi aplicado o mesmo teste para se identificar a ocorrência de diferença entre a frequência de captura de cada alimento em cada um dos experimentos, separadamente, tomando-se como repetição também cada dia em que os animais foram submetidos ao teste.

2.4.4. Cultivo, em laboratório, a 23 e 28°C

Após a definição do melhor alimento para a realização de testes de engorda com o *Octopus insularis* em laboratório, optou-se por definir o siri como alimento padrão para o

teste de crescimento em águas mais frias, comparativamente ao crescimento em águas mais quentes. Dessa forma foi testado o ganho de peso dos animais em condições laboratoriais sendo mantida a temperatura da água em média de 23°C e em média de 28°C.

Para cada uma das diferentes temperaturas, 23°C e 28°C, foi realizado um experimento separado, tendo sido iniciadas as observações com a temperatura de 23°C. Ao final desse experimento foram descartados todos os animais, e realizada nova coleta, para só então iniciar o experimento de crescimento com temperatura média de 28°C. Para ambos os testes foram apenas utilizados indivíduos machos.

Antes de se iniciar o teste de alimentação foi realizada uma adaptação dos animais ao ambiente de laboratório. Nos dois primeiros dias não foi ofertado nenhum tipo de alimento, iniciando-se a alimentação dos animais apenas com o início dos experimentos.

Para esse experimento foi utilizado como alimento siris (*Callinectes bocourti*), os quais foram adquiridos vivos e imediatamente congelados, garantindo o frescor do alimento ofertado. Apenas o cefalotórax dos siris foi utilizado como alimento. A taxa de alimentação utilizada para ambos os experimentos foi de 20% da biomassa cultivada, sendo considerado como base de cálculo da biomassa o peso úmido de cada polvo cultivado, e como peso do alimento ofertado, o peso do cefalotórax congelado (carapaça + carne).

Diariamente se alimentou os animais as 09:00 e se retirou as sobras no dia seguinte as 08:00. Tanto o alimento ofertado quanto as sobras recolhidas foram sempre pesadas. Para a pesagem das sobras, deixou-se o material coletado escorrer em peneiras por 5 minutos para só então ser realizada a pesagem, como recomendado por Domingues *et al.*(2010).

Durante todo o experimento foram realizados monitoramentos diário do pH (pHmetro Hanna HI-98108), da salinidade (refratômetro Soma – SHR10), da temperatura do oxigênio dissolvido (oxímetro YSI 550A), e da concentração de amônia (kit colorimétrico Labcon Test) da água. A coleta dos dados foi feita pela manhã, antes da retirada dos alimentos não consumidos.

Os experimentos tiveram duração de 33 dias tendo sido realizada uma biometria inicial, uma biometria aos 15 dias de cultivo e outra ao final do experimento. Tanto para as biometrias, quanto para a pesagem do alimento ofertado foi utilizada balança digital com precisão de $\pm 1,0g$.

Durante as biometrias, cada indivíduo foi pesado separadamente, tendo-se o cuidado de drenar o máximo de água possível dos animais antes da pesagem. Apesar da dificuldade do manuseio dos animais, optou-se por não utilizar nenhuma forma de sedativo durante o processo de biometria.

Ao final de cada um dos experimentos foram registrados os seguintes indicadores de desempenho zootécnico:

$$\text{Ganho de peso total } (\Delta W) = W_f - W_i ; (\text{g})$$

$$\text{Ganho relativo de peso } (GR) = (\Delta W / W_i) \times 100 (\%)$$

$$\text{Taxa de crescimento específica } (SGR) = 100 \times [(\ln W_f) - (\ln W_i)] / t ; (\%BW/\text{dia})$$

$$\text{Taxa de crescimento absoluto } (AGR) = \Delta W / t ; (\text{g}/\text{dia})$$

$$\text{Fator de conversão alimentar } (FCA) = FI / \Delta W$$

Onde: W_i representa o peso inicial dos indivíduos em gramas, W_f representa o peso final em gramas, BW representa o peso úmido total, t o tempo em dias e FI a quantidade líquida de alimento ingerida por cada indivíduo (peso inicial do alimento subtraído do peso escorrido das sobras).

Para a análise dos resultados foi utilizado o teste “t” de Student considerando uma significância mínima de 5,0% ($\rho = 0,05$), para se verificar se os pesos médios iniciais de ambos os experimentos eram iguais, bem como para se verificar se houve diferença significativa para o ganho médio de peso total, para a taxa média de crescimento absoluto, e para o fator de conversão alimentar médio dos dois tratamentos.

2.4.5. Cultivo em gaiolas com 3 diferentes dietas

Descrição das gaiolas: material e construção

As gaiolas utilizadas nos cultivos dos polvos foram confeccionadas artesanalmente em uma oficina no município de Itarema – Ce, Brasil.

As gaiolas flutuantes possuíam as seguintes medidas: 1,05m de largura, 1,20m de comprimento e 2,00m de altura, dessa forma possuíam um volume total de 2,52m³ e 2,27m³ de volume útil, uma vez que foi deixada uma altura de flutuação de 0,20m (Figura 14A). Foram utilizados na construção da sua armação, canos de aço inox de 20mm soldados com solda inox. Para o revestimento de três gaiolas foram utilizadas telas de aço inox 480 (85% de inox) com abertura de malha circular de 13mm, soldadas com solda inox na armação. Outras duas gaiolas tiveram seus revestimentos feitos com telas plásticas de PVC preto de malha 13mm amarradas nas armações das gaiolas com arame inox 22. No interior de cada gaiola, para os abrigos dos polvos, foram utilizadas conexões de PVC de 150mm em formato “T”. Cada gaiola possuía inicialmente 60 refúgios distribuídos em 12 colunas de conexões (6 + 6), cada uma dessas colunas com 5 conexões. As colunas de conexões foram divididas em dois lados da gaiola por uma tela plástica de PVC de malha 13mm, tendo-se assim dois espaços amostrais por gaiola. Tanto no topo, quanto na base de cada coluna utilizou-se tampões de PVC 150mm (CAP) para fechar as extremidades das conexões, e nas junções das demais conexões foram utilizadas telas de malha 2.000µm, para impedir que os polvos passem de um abrigo para o outro, sem evitar o fluxo contínuo de água por entre elas (adaptado de Chapela *et al.*, 2006 e Rodríguez *et al.*, 2006).



Figura 14: A – gaiola de 60 refúgios; B – gaiola de 48 refúgios com altura inicial de 2,00 m

Posteriormente o projeto foi alterado, sendo retiradas as duas primeiras linhas de conexões, dessa forma cada gaiola passou a contar com 48 abrigos individuais para os polvos (Figura 14B). Outra alteração foi em relação à altura da gaiola, a qual foi reduzida de 2,00m para 1,70m ficando a mesma com um volume total de 2,14m³ e volume útil 1,89m³, sendo mantida a mesma altura de flutuação, 0,20 m (Figura 15).

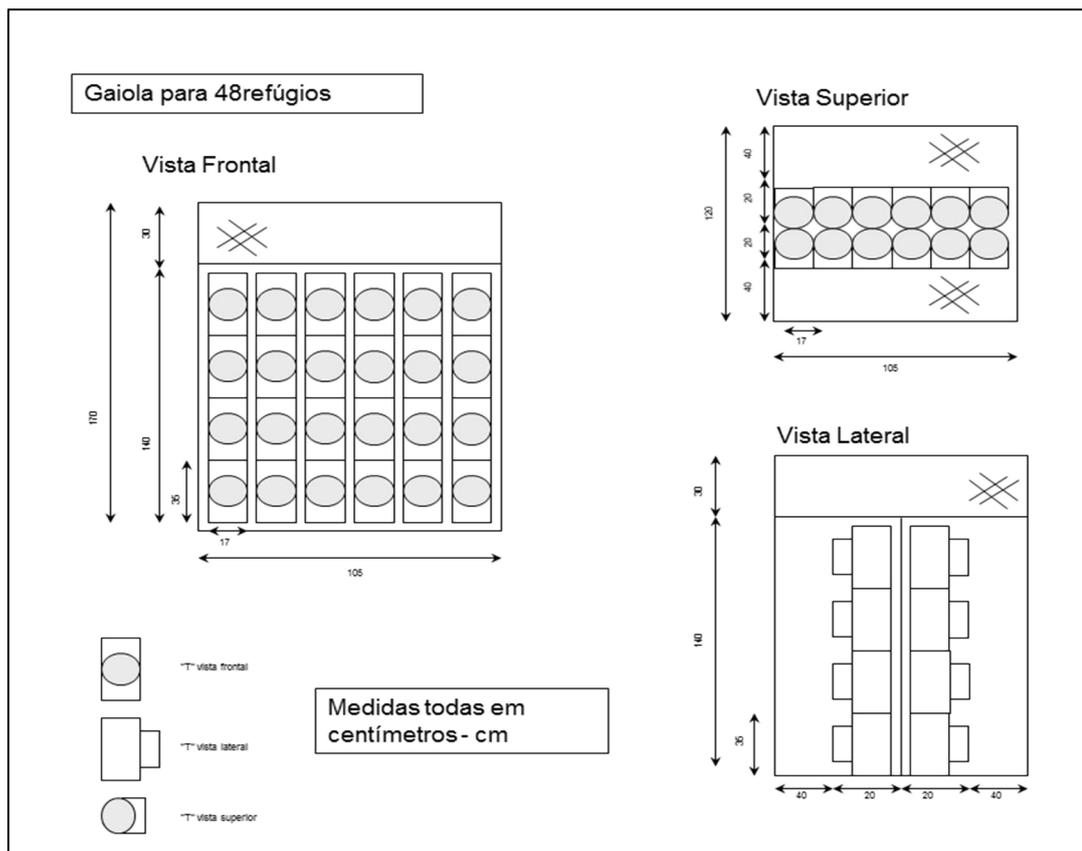


Figura 15: Projeto de gaiola com 48 refúgios, altura 1,70 m e volume útil 1,89 m³.

Na parte superior das gaiolas foram colocadas duas portas (Figura 15) que permitem o acesso individual a cada lado, facilitando assim o manejo e a alimentação dos polvos. Foram utilizados dois flutuadores plásticos de 70 l, colocados na parte superior de cada gaiola e fixados com armações de aço inox soldadas na estrutura. As gaiolas foram fundeadas a uma profundidade média de 3m na maré baixa e 5m na maré alta utilizando-se dois blocos de concreto para cada gaiola. Os blocos possuíam forma de tronco de pirâmide invertida, construídos com cimento e areia grossa, pesando aproximadamente 100kg cada. No centro de

cada um desses blocos foi colocada uma alça onde por elas passam as cordas de nylon de 12mm, que são amarradas nas alças das gaiolas, fazendo com que as mesmas ficassem fixas ao fundo, acompanhando apenas a subida e descida da maré sem sair do local determinado.

Implantação das gaiolas:

Para a implantação das gaiolas no mar foi utilizada uma embarcação de pesca de polvo para o transporte das gaiolas da terra para o local previamente estabelecido. O local exato do fundeio das gaiolas foi marcado com o auxílio de GPS (GARMIN csx 60).

Inicialmente, a primeira gaiola foi implantada em mar aberto – local 01 – ($2^{\circ}53'23.56''S$; $39^{\circ}52'32.58''O$). Posteriormente optou-se por um segundo local mais protegido, dentro de um braço de mar – local 02 – ($2^{\circ}53'48.37''S$; $39^{\circ}52'51.76''O$), como pode ser verificado na figura 16.



Figura 16: Locais utilizados para o cultivo de polvo em gaiolas flutuantes.

Procedimentos experimentais:

As quatro gaiolas foram povoadas no mesmo dia (27/10/2010) com espécimes do sexo masculino. No momento do povoamento todos os exemplares foram pesados em balança digital tipo dinamômetro e contados, de forma a se saber exatamente quantos polvos foram estocados em cada gaiola, o peso individual, bem como a biomassa total contida em cada unidade experimental.

Para o experimento de engorda as gaiolas foram distribuídas em 3 tratamentos. As gaiolas 1.1, 2.2 e 3.1 foram alimentadas apenas com siri – Sr (*Callinectes spp*), as gaiolas 1.2, 2.1 e 4.2 foram alimentadas apenas com peixes de baixo valor comercial – Px (*Sardinella spp* e *Strongylura marina*) triturado, e as gaiolas 3.2 e 4.1 foram alimentadas com 50% de siri e 50% de peixes de baixo valor comercial – Sr + Px.

Utilizou-se uma taxa de alimentação de aproximadamente 20% da biomassa cultivada, sendo considerado como base de cálculo da biomassa o peso úmido de cada polvo cultivado, e como peso do alimento ofertado, o peso do peixe com escamas e vísceras e do siri, o animal inteiro, incluindo suas patas. Todo o alimento utilizado foi adquirido vivo ou fresco, imediatamente separado em porções e congelado, até o momento da oferta aos animais cultivados.

A alimentação foi feita diariamente durante a manhã. No momento da alimentação observou-se o tempo gasto no consumo do alimento. Ao se verificar o consumo do alimento em menos de 5 minutos realizou-se o aumento da quantidade de alimento ofertado. Nos casos em que se verificou um tempo de consumo do alimento superior a 10 minutos, realizou-se a diminuição da quantidade de alimento.

Durante o procedimento de alimentação realizou-se também a verificação da presença de animais mortos, os quais eram retirados das gaiolas.

Semanalmente realizou-se a verificação da salinidade (refratômetro Soma – SHR10) da água de cultivo. Quinzenalmente verificou-se pH (pHmetro Hanna HI-98108), temperatura e oxigênio dissolvido (oxímetro YSI 550A).

O experimento teve duração de 68 dias, e ao final deste foram observados os seguintes indicadores de desempenho zootécnico:

$$\text{Ganho de peso total } (\Delta W) = W_f - W_i ; (\text{g})$$

$$\text{Ganho relativo de peso (GR)} = (\Delta W / W_i) \times 100 (\%)$$

$$\text{Taxa de crescimento específica (SGR)} = 100 \times [(\ln W_f) - (\ln W_i)] / t ; (\%BW/\text{dia})$$

$$\text{Taxa de crescimento absoluto (AGR)} = \Delta W / t ; (\text{g}/\text{dia})$$

$$\text{Fator de conversão alimentar (FCA)} = \Sigma \text{ alimento ofertado} / \Delta W$$

$$\text{Eficiência Alimentar (FE)} = 100 \times (\Delta W / \Sigma \text{ alimento ofertado})$$

$$\text{Sobrevivência (Sb)} = [(N_i - N_f) / N_i] \times 100 ; (\%)$$

Onde: N_i representa o número inicial de indivíduos e N_f representa o número final de indivíduos.

Os sete parâmetros selecionados foram os parâmetros mais amplamente utilizados na análise de crescimento e utilização do alimento em testes de engorda em diferentes espécies de polvo (García e Giménez, 2002; Socorro *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2006; García e Valverde, 2006; Domingues, *et al.*, 2007; Quintana *et al.*, 2008; Valverde *et al.*, 2008; Biandolino *et al.*, 2010 e Prato *et al.*, 2010).

Para a análise estatística os resultados foram submetidos às análises estatísticas ANOVA (Analysis of Variance) e ao teste de Tukey, considerando uma significância mínima de 5,0% ($\rho = 0,05$), conforme a apresentação dos dados. Para isso, foi utilizado o programa BioEstat 5.0.

2.5. Resultados

2.5.1. Montagem e definição da estrutura ideal do laboratório de cultivo de polvo – LABPOLVO

Inicialmente foram utilizadas tampas de vidro sobre os aquários a fim de evitar a saída dos indivíduos. Devido ao grande poder de manipulação do ambiente em que se encontravam alguns exemplares rotineiramente conseguiam escapar dos aquários (Figura 17), retirando as tampas de vidro de proteção, e morriam. Para tentar contornar a situação optou-se por colocar

sacos de areia sobre as tampas de vidro. Diante dessa situação os animais passaram a escapar pela pequena abertura na tampa de vidro por onde entrava a água de renovação dos aquários. Dessa forma, para sanar definitivamente o problema das fugas, foram substituídas todas as tampas de vidro por quadros de madeira com telas de 2.000 μ m. Mesmo com as novas telas fugas ainda foram registradas (Figura 17 – A). Apenas foi possível acabar definitivamente as fugas quando se passou a fixar ligas de borracha sobre cada quadro de madeira, individualmente (Figura 17 – D).

Devido ao alto fluxo de água no sistema de recirculação, bem como a utilização de bombas magnéticas, foi verificada uma elevação da temperatura média da água para 33°C. Nessa temperatura, foi observado um elevado nível de estresse dos animais, caracterizado por: batimentos acelerados do manto indicando uma respiração forçada; falta de apetite; e em seguida uma mortalidade generalizada dos animais, após um período máximo de 3 dias submetidos a essa temperatura. Para a solução desse problema foi implantado um sistema de arrefecimento da água de cultivo (*Chiller*), que posteriormente foi decisivo na realização do experimento de engorda a 23°C.



Figura 17: A – Abertura utilizada pelo animal para fuga; B e C – Indivíduos mortos após fuga; D – Aquários com suas telas e ligas individuais de proteção contra fuga.

Após a realização de experimentos prévios de engorda com o sistema de aquários, e terem sido obtidos resultados desanimadores, como crescimentos negativos com todos os diferentes tipos de alimento, optou-se por seguir as sugestões de pesquisadores da Universidad Politécnica de Valencia – Espanha (Dr. Miguel Cerdá e Andrés López – comunicação pessoal) que afirmaram que o sistema de aquários não era o mais adequado pois conferia maior nível de estresse aos animais. Dessa forma optou-se por realizar uma drástica modificação no sistema de cultivo dos polvos, sendo nesse momento utilizado um sistema composto por caixas de fibra de vidro.

2.5.2. Captura e transporte de indivíduos para os diferentes experimentos

Em todas as incursões de captura de indivíduos, em média, foi realizado o transporte de 33 indivíduos por coleta.

O tempo decorrido da captura do primeiro indivíduo, até a chegada do barco ao porto de Itarema foi de aproximadamente 8 horas. O tempo decorrido da transferência dos animais do barco para a caixa de transporte terrestre, bem como o deslocamento para as instalações do LABPOLVO foi de aproximadamente 4 horas, totalizando um tempo de transporte de aproximadamente 12 horas.

Os animais capturados e encaminhados ao LABPOLVO apresentavam peso que variava de 300 – 500g sendo transportado de 10,1 a 16,6kg de biomassa por viagem, ou seja, 28,8 a 47,5kg/m³ (Tabela 5).

Desde a estocagem dos indivíduos na caixa de transporte até a chegada ao laboratório teve-se uma média de 2 indivíduos mortos a cada viagem.

Tabela 5: Coleta, número de indivíduos transportados, indivíduos mortos, peso médio, biomassa transportada e densidade de estocagem no transporte de exemplares de *O. insularis*.

Coleta	Nº de indivíduos capturados	Mortos	Peso médio (g)	Biomassa (kg)	Densidade de estocagem (kg/m ³)
1	35	1	412	14.4	41.2
2	29	2	457	13.3	37.9
3	32	1	317	10.1	29.0
4	34	3	486	16.5	47.2
5	32	1	315	10.1	28.8
6	33	4	330	10.9	31.1
7	35	2	475	16.6	47.5
Média	32.9	2.0	398.9	13.1	37.5

2.5.3. Teste de dupla escolha de alimento

Gastrópode (GTP) X Peixe (Px):

Inicialmente foi montada a tabela de contingência (Tabela 6) para se determinar se existe diferença entre o animal comer ou não comer algum dos alimentos ofertados, levando em consideração a frequência observada de captura de um dos dois alimentos (comer), ou a não captura de nenhum dos dois alimentos (não comer), adotando-se as seguintes hipóteses:

H0: Não há diferença na frequência de comer ou não comer algum dos alimentos

H1: Existe diferença na frequência de comer ou não comer algum dos alimentos

Tabela 6: Frequência observada e esperada de consumo ou não consumo de um dos dois alimentos (GTP x Px).

Dia	Freq. Observada		Total	Freq. Esperada	
	Comeu	Não Comeu		Comeu	Não Comeu
1	8	2	10	5	5
2	10	0	10	5	5
3	9	1	10	5	5
4	10	0	10	5	5
5	9	1	10	5	5
6	10	0	10	5	5
7	10	0	10	5	5
8	8	2	10	5	5
9	10	0	10	5	5
10	8	2	10	5	5
Total	92	8	100	50	50
%	92%	8%	-	-	-

Para o cálculo do χ^2 e grau de liberdade (GL) utilizou-se as seguintes fórmulas:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{i=n} \frac{(foi - fei)^2}{fe_i}$$

$$GL = (C - 1) \times (L - 1)$$

Onde: *foi* – frequência observada; *fei* – frequência esperada; C – número de colunas de *foi*; L – número de dias (Mendes, 1999).

A partir da tabela de contingência obteve-se um valor de $\chi^2_{\text{calc}} = 73,6$. A partir do valor de GL obteve-se o valor de $\chi^2_{(9; 0,05)} = 16,92$.

Dessa forma foi rejeitado H0 uma vez que $\chi^2_{\text{calc}} > \chi^2_{(9; 0,05)}$, ou seja, houve diferença na frequência em que os animais consomem ou não algum tipo de alimento, sendo a frequência de consumo de algum dos dois alimentos de 92%.

Posteriormente foi montada a tabela de contingência (Tabela 7) para se determinar se existe diferença na frequência de captura de um dos dois alimentos, GTP e peixe, ofertados aos animais, sendo adotadas as seguintes hipóteses:

H0: Não há diferença na frequência de captura dos alimentos ofertados

H1: Existe diferença entre na frequência de captura dos alimentos ofertados

Tabela 7: Frequência observada e esperada de captura de GTP e peixe.

Dia	Freq. Observada		Total	Freq. Esperada	
	GTP	Peixe		GTP	Peixe
1	2	6	8	4,0	4,0
2	5	5	10	5,0	5,0
3	5	4	9	4,5	4,5
4	3	7	10	5,0	5,0
5	2	7	9	4,5	4,5
6	3	7	10	5,0	5,0
7	2	8	10	5,0	5,0
8	2	6	8	4,0	4,0
9	1	9	10	5,0	5,0
10	2	6	8	4,0	4,0
Total	27	65	92	46	46
%	29%	71%	-	-	-

A partir da tabela de contingência obteve-se um valor de $\chi^2_{\text{calc}} = 22,1$. A partir do valor de GL obteve-se o valor de $\chi^2_{(9; 0,05)} = 16,92$.

Dessa forma foi rejeitado H0 uma vez que $\chi^2_{\text{calc}} > \chi^2_{(9; 0,05)}$, ou seja, houve diferença na frequência em que o animal consome peixe frente ao GTP, sendo que houve uma predileção pelo alimento peixe, uma vez que esse teve 71% da frequência de predileção.

Gastrópode (GTP) X Siri (Sr):

Inicialmente foi montada a tabela de contingência (Tabela 8) para se determinar se existe diferença entre o animal comer ou não comer algum dos alimentos ofertados, levando em consideração a frequência observada de captura de um dos dois alimentos (comer), ou a não captura de nenhum dos dois alimentos (não comer), adotando-se as seguintes hipóteses:

H0: Não há diferença na frequência de comer ou não comer algum dos alimentos

H1: Existe diferença na frequência de comer ou não comer algum dos alimentos

Tabela 8: Frequência observada e esperada de consumo ou não consumo de um dos dois alimentos (GTP x Sr).

Dia	Freq. Observada		Total	Freq. Esperada	
	Comeu	Não Comeu		Comeu	Não Comeu
1	10	0	10	5	5
2	9	1	10	5	5
3	10	0	10	5	5
4	10	0	10	5	5
5	8	2	10	5	5
6	9	1	10	5	5
7	8	2	10	5	5
8	9	1	10	5	5
9	8	2	10	5	5
10	7	3	10	5	5
Total	88	12	100	50	50
%	88%	12%	-	-	-

A partir da tabela de contingência obteve-se um valor de $\chi^2_{\text{calc}} = 61,6$. A partir do valor de GL obteve-se o valor de $\chi^2_{(9; 0,05)} = 16,92$.

Dessa forma foi rejeitado H0 uma vez que $\chi^2_{\text{calc}} > \chi^2_{(9; 0,05)}$, ou seja, houve diferença na frequência em que os animais consomem ou não algum tipo de alimento, sendo a frequência de consumo de algum dos dois alimentos de 88%.

Em seguida foi montada a tabela de contingência (Tabela 9) para se determinar se existe diferença na frequência de captura de um dos dois alimentos, GTP e siri, ofertados aos animais, sendo adotadas as seguintes hipóteses:

H0: Não há diferença na frequência de captura dos alimentos ofertados

H1: Existe diferença entre na frequência de captura dos alimentos ofertados

Tabela 9: Frequência observada e esperada de captura de GTP e siri.

Dia	Freq. Observada		Total	Freq. Esperada	
	GTP	Siri		GTP	Siri
1	4	6	10	5,0	5,0
2	1	8	9	4,5	4,5
3	1	9	10	5,0	5,0
4	2	8	10	5,0	5,0
5	2	6	8	4,0	4,0
6	3	6	9	4,5	4,5
7	0	8	8	4,0	4,0
8	2	7	9	4,5	4,5
9	1	7	8	4,0	4,0
10	3	4	7	3,5	3,5
Total	19	69	88	44	44
%	22%	78%	-	-	-

A partir da tabela de contingência obteve-se um valor de $\chi^2_{\text{calc}} = 34,27$. A partir do valor de GL obteve-se o valor de $\chi^2_{(9; 0,05)} = 16,92$.

Dessa forma foi rejeitado H_0 uma vez que $\chi^2_{\text{calc}} > \chi^2_{(9; 0,05)}$, ou seja, houve diferença na frequência em que o animal consome siri frente ao GTP, sendo que houve uma predileção pelo alimento siri, uma vez que esse teve uma frequência de captura de 78%.

Siri (Sr) X Peixe (Px):

Novamente foi montada a tabela de contingência (Tabela 10) para se determinar se existe diferença entre o animal comer ou não comer algum dos alimentos ofertados, levando em consideração a frequência observada de captura de um dos dois alimentos (comer), ou a não captura de nenhum dos dois alimentos (não comer), adotando-se as seguintes hipóteses:

H_0 : Não há diferença na frequência de comer ou não comer algum dos alimentos

H_1 : Existe diferença na frequência de comer ou não comer algum dos alimentos

Tabela 10: Frequência observada e espera de consumo ou não consumo de um dos dois alimentos (Sr x Px).

Dia	Freq. Observada		Total	Freq. Esperada	
	Comeu	Não Comeu		Comeu	Não Comeu
1	8	2	10	5	5
2	9	1	10	5	5
3	8	2	10	5	5
4	9	1	10	5	5
5	8	2	10	5	5
6	4	6	10	5	5
7	8	2	10	5	5
8	5	5	10	5	5
9	4	6	10	5	5
10	9	1	10	5	5
Total	72	28	100	50	50
%	72%	28%	-	-	-

Novamente, a partir da tabela de contingência obteve-se um valor de $\chi^2_{\text{calc}} = 34,40$. A partir do valor de GL obteve-se o valor de $\chi^2_{(9; 0,05)} = 16,92$.

Dessa forma foi rejeitado H0 uma vez que $\chi^2_{\text{calc}} > \chi^2_{(9; 0,05)}$, ou seja, houve diferença na frequência em que os animais consomem ou não algum tipo de alimento, sendo a frequência de consumo de algum dos dois alimentos de 72%.

Seguindo o mesmo procedimento foi montada a tabela de contingência (Tabela 11) para se determinar se existe diferença na frequência de captura de um dos dois alimentos, siri e peixe, ofertados aos animais, adotando-se as seguintes hipóteses:

H0: Não há diferença na frequência de captura dos alimentos ofertados

H1: Existe diferença entre na frequência de captura dos alimentos ofertados

Tabela 11: Frequência observada e esperada de captura de peixe e siri.

Dia	Freq. Observada		Total	Freq. Esperada	
	Peixe	Siri		Peixe	Siri
1	3	5	8	4,0	4,0
2	2	7	9	4,5	4,5
3	4	4	8	4,0	4,0
4	2	7	9	4,5	4,5
5	4	4	8	4,0	4,0
6	1	3	4	2,0	2,0
7	2	6	8	4,0	4,0
8	3	2	5	2,5	2,5
9	1	3	4	2,0	2,0
10	2	7	9	4,5	4,5
Total	24	48	72	36	36
%	33%	67%	-	-	-

A partir da tabela de contingência obteve-se um valor de $\chi^2_{\text{calc}} = 13,03$. A partir do valor de GL obteve-se o valor de $\chi^2_{(9; 0,05)} = 16,92$.

Dessa forma, aceita-se H_0 uma vez que $\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{(9; 0,05)}$, ou seja, não houve diferença na frequência em que o animal consome siri ou peixe, não havendo predileção do animal por nenhum dos dois alimentos, mesmo a frequência de captura do siri tendo sido o dobro, 67%, da frequência de captura do peixe, 33%.

Durante os três testes a qualidade da água manteve-se estável, sendo observado um pH médio de $7,1 \pm 0,3$, temperatura de $26,4 \pm 0,5^\circ\text{C}$, salinidade de $36,4 \pm 0,2$ ‰, oxigênio dissolvido de $6,6 \pm 0,1$ mg/l e a amônia tóxica esteve sempre abaixo 0,003mg/l.

2.5.4. Cultivo, em laboratório, a 23 e 28°C

Para o cultivo dos animais a 23°C foram utilizados 8 animais com peso médio inicial de $316,9 \pm 71,8$ g que ao final de 33 dias de cultivo atingiram um peso final de $470,6 \pm 119,6$ g. Para esse período foi observado um ganho de peso total médio (ΔW) de $153,8 \pm 65,1$ g, um ganho relativo de peso (GR) de $48,3 \pm 15,4\%$, uma taxa de crescimento absoluto (AGR) de $4,7 \pm 2,0$ g/dia e uma taxa de crescimento específica (SGR) de $1,2 \pm 0,3$ % da biomassa por

dia. Em média os indivíduos desse experimento consumiram uma quantidade líquida de alimento (FI) de $796,5 \pm 173,3$ g, dessa forma foi observado um fator de conversão alimentar (FCA) de $5,7 \pm 1,5$.

Para o experimento a 28°C foram utilizados 9 animais com peso médio inicial de $329,8 \pm 86,5$ g que ao final de 33 dias de cultivo atingiram um peso final de $639,6 \pm 114,7$ g. Para esse período foi observado um ΔW médio de $309,8 \pm 78,2$ g, um GR médio de $100,9 \pm 37,1\%$, uma AGR média de $9,4 \pm 2,4$ g/dia e uma SGR média de $2,1 \pm 0,6\%$ da biomassa por dia. Em média os indivíduos desse experimento tiveram um FI de $1.452,1 \pm 184,5$ g, dessa forma foi obtido um FCA de $4,9 \pm 1,0$ para esse tratamento (Tabela 12).

Tabela 12: Peso médio inicial, peso médio final, ganho de peso total médio, ganho relativo de peso médio, taxa de crescimento absoluto, taxa de crescimento específica, quantidade líquida de alimento ingerida e fator de conversão alimentar de indivíduos cultivados.

	Temperaturas		Δ
	23°C	28°C	
Peso médio Inicial (g)	$316,9 \pm 71,8^a$	$329,8 \pm 86,5^a$	-
Peso médio final (g)	$470,6 \pm 119,6^a$	$639,6 \pm 114,7^b$	-
ΔW (g)	$153,8 \pm 65,1^a$	$309,8 \pm 78,2^b$	156
GR (%)	$48,3 \pm 15,4$	$100,9 \pm 37,1$	108,9
AGR (g/dia)	$4,7 \pm 2,0^a$	$9,4 \pm 2,4^b$	4,7
SGR (%BW/dia)	$1,2 \pm 0,3^a$	$2,1 \pm 0,6^b$	-
FI (g)	$796,5 \pm 173,3$	$1.452,1 \pm 184,5$	655,6
FCA	$5,7 \pm 1,5^a$	$4,9 \pm 1,0^a$	-

* Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre os tratamentos

Os pesos iniciais dos animais utilizados nos dois experimentos não apresentaram diferença estatística significativa, contudo o peso final do cultivo a 28°C foi estatisticamente maior que o peso final do cultivo a 23°C . Dessa forma o cultivo a 28°C apresentou ganho de peso total, taxa de crescimento específica e taxa de crescimento absoluto maior que os obtidos com o cultivo a 23°C (Figura 18).

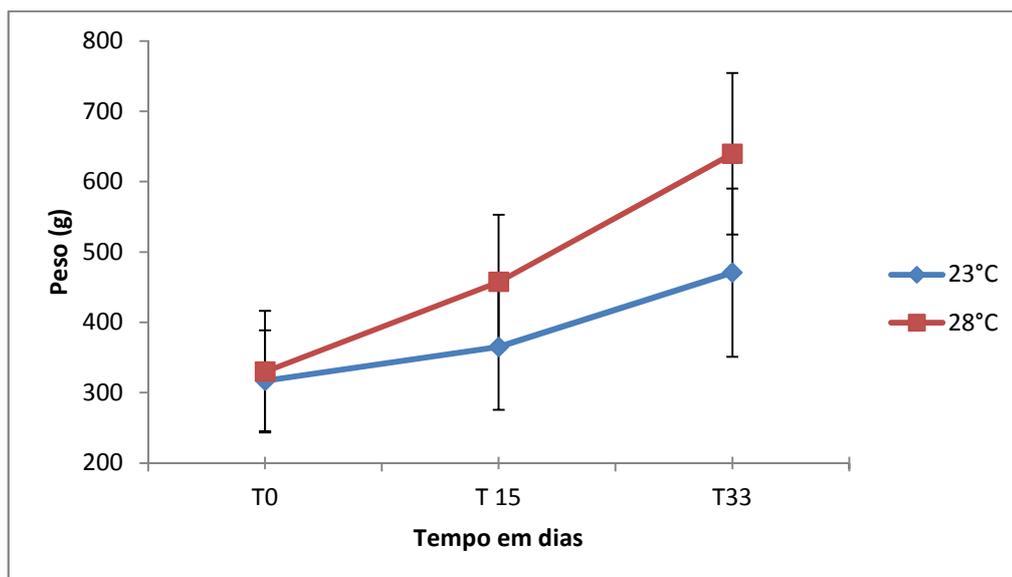


Figura 18: Crescimento de indivíduos cultivados a 23 e 28°C.

Durante o desenvolvimento do experimento a 28°C foi observado que os animais consumiam mais ativamente o alimento ofertado. Ao perceber a presença do tratador no horário da alimentação os animais tornavam-se mais ativos, chegando a se posicionarem na superfície da água, agarrando-se na tela de proteção superior dos tanques. Ao ser ofertado o alimento os animais logo o capturava, inclusive quando eram ofertados dois cefalotórax de siri os polvos capturavam as duas unidades.

Em contrapartida, durante o cultivo a 23°C foi observado que os indivíduos ficaram menos ativos. Muitas vezes, ao se ofertar o alimento, o animal sequer se prontificava a captura-lo. Dessa forma ao final do experimento em temperatura mais elevada verificou-se maior consumo líquido de alimento, no entanto esse maior consumo de alimento não repercutiu negativamente no cultivo. Não foi observada diferença significativa entre o FCA dos animais cultivados a 23 e 28°C, uma vez que, mesmo os animais cultivados a 28°C tendo consumido maior quantidade de alimento, estes converteram de forma eficiente esse alimento em biomassa.

No decorrer de ambos os experimentos a qualidade da água manteve-se estável, sendo observado pH médio de 7,2, salinidade de 36,5‰, oxigênio dissolvido acima de 6,5mg/l e a amônia tóxica abaixo 0,003mg/l.

2.5.5. Cultivo em gaiolas com 3 diferentes dietas

Descrição das gaiolas: material e construção

As gaiolas que possuíam revestimento de tela Inox apresentaram rápida oxidação. Em algumas partes da tela a corrosão foi extremamente forte, não sendo possível a utilização dessa gaiola em um cultivo subsequente sem que se realizasse a substituição das telas.

Quanto às gaiolas com revestimento de tela plástica, obviamente não foi observado oxidação nas telas, contudo foi necessária, no decorrer do cultivo, uma manutenção semanal das mesmas devido à observação de algumas malhas quebradas pela ação de peixes locais como o *Sphoeroides testudineus* – baiacu – (Araújo, 2004 e Szpilman, 2000). Ao se localizar uma malha quebrada, toda a área no entorno foi reforçada com um novo setor de malha costurado sobre a área danificada. Esse procedimento foi feito sem que se retirassem as gaiolas da água, sendo realizado com o auxílio de mascaras de mergulho e snorkel.

Mesmo ambos os revestimentos das gaiolas, inox e plástico, terem apresentado problemas, não foi verificado em nenhum momento fuga de indivíduos durante o experimento.

Considerando-se o peso das gaiolas, percebeu-se que as gaiolas com revestimento inox eram bem mais pesadas que as confeccionadas com revestimento de telas plástica. Dessa forma o manejo de instalação e retirada da água das gaiolas com revestimento plástico foi consideravelmente menos laborioso, ao se comparar com as gaiolas de revestimento inox, uma vez que todo esse trabalho foi exclusivamente feito com o auxílio de pescadores.

Após o lançamento da primeira gaiola no mar, percebeu-se a grande dificuldade no manejo desta, tanto por conta do peso quanto por conta do tamanho da gaiola. Dessa forma optou-se por reduzir o número de refúgios de cada gaiola, bem como a altura da gaiola, de forma que inicialmente as gaiolas possuiriam 60 refúgios cada e 2,00m de altura (Figura 14A e 15) ficando posteriormente com 48 refúgios e 1,70m de altura.

Implantação das gaiolas

Inicialmente uma gaiola com revestimento inox foi fundeada no mar – Local 01 – como visto na figura 16. Essa primeira gaiola fundeada no mar foi o protótipo das outras

gaiolas que lá seriam implantadas. Observou-se a que a gaiola apresentou boa fluabilidade e as poitas foram suficientes para mantê-la no local, uma vez que quatro dias após a implantação da gaiola a mesma se manteve no mesmo lugar.

Infelizmente, devido à ausência de um funcionário constantemente no local, a gaiola foi furtada. Devido à falta de segurança optou-se por implantar as outras quatro gaiolas restantes dentro de um braço de mar, mais próximo ao ponto de apoio da pesquisa (Figura 16 – Local 02).

Teste de engorda com 3 diferentes dietas:

As unidades amostrais alimentadas com siri (Sr) possuíam um peso médio inicial de $572 \pm 85,6\text{g}$ e um total de 34 indivíduos. Esse tratamento apresentou biomassa inicial de 19,42 kg e densidade de estocagem média inicial de $3,4 \pm 0,7\text{kg/m}^3$. Ao final dos 68 dias de cultivo o peso médio dos animais (Wf) foi de $1.495 \pm 246,4\text{g}$. Dessa forma obteve-se ganho de peso total (ΔW) de $923,4 \pm 246,4\text{g}$, ganho relativo de peso (GR) de 161,7%, taxa de crescimento absoluta (AGR) de $13,6 \pm 3,6\text{g/dia}$ e taxa específica de crescimento (SGR) de $1,4 \pm 0,3\%$ da biomassa por dia. Durante os 68 dias de cultivo esse tratamento consumiu o total de 331,9kg de siri, tendo sido despescado 38,86kg de polvo. Desta forma esse tratamento apresentou um fator de conversão alimentar (FCA) de 17,1 e eficiência alimentar de 5,9%. A sobrevivência final média dos animais cultivados com Sr foi $76,5 \pm 5,4\%$.

Os animais alimentados com peixe de baixo valor comercial (Px) possuíam peso médio inicial de $513 \pm 83,7\text{g}$, sendo um total de 40 indivíduos. Nesse tratamento, a biomassa inicial foi de 20,52kg e a densidade de estocagem média inicial foi de $3,6 \pm 0,6\text{kg/m}^3$. Ao final dos 68 dias de cultivo esse tratamento apresentou peso final médio de $1.110 \pm 236,0\text{g}$. Dessa forma obteve-se um ganho de peso total médio de $597 \pm 236,0\text{g}$, um ganho relativo de peso de 116,4%, uma taxa de crescimento absoluta de $8,8 \pm 3,5\text{g/dia}$ e uma taxa específica de crescimento de $1,1 \pm 0,3\%$ da biomassa por dia. Durante os 68 dias de cultivo foram consumidos por esse tratamento um total de 346,0kg de peixe, e foi despescado um total de 25,53kg de polvo. Desta forma esse tratamento apresentou fator de conversão alimentar de 69,1 e eficiência alimentar de 1,4%. A sobrevivência final média dos animais que foram alimentados exclusivamente com peixe foi $57,8 \pm 3,8\%$.

O tratamento que teve como fonte de alimento 50% de siri e 50% de peixe (Sr + Px) apresentou peso médio inicial de $503 \pm 114,0\text{g}$ sendo utilizado 30 indivíduos. Nesse tratamento a biomassa inicial foi $15,08\text{kg}$, sendo a densidade de estocagem média inicial $4,0 \pm 0,2\text{kg/m}^3$. Ao final dos 68 dias de cultivo o peso médio dos animais foi $1.212 \pm 248,7\text{g}$. Dessa forma obteve-se um ganho de peso total de $709,1 \pm 248,7\text{g}$, um ganho relativo de peso de 141,1%, uma taxa de crescimento absoluta de $10,4 \pm 3,7\text{g/dia}$ e uma taxa específica de crescimento de $1,3 \pm 0,3\%$ da biomassa por dia. Durante os 68 dias de cultivo esse tratamento consumiu $277,4\text{kg}$ de uma mistura equitativa de siri e peixe, tendo-se despescado ao todo $20,6\text{kg}$ de polvo. Deste modo esse tratamento apresentou fator de conversão alimentar de 50,3 e eficiência alimentar de 2,0%. A sobrevivência final média desse tratamento foi de $56,7 \pm 3,3\%$, como sumarizado na tabela 13.

Tabela 13: Peso inicial (Wi), peso final (Wf), biomassa inicial e final, densidade de estocagem inicial e final, ganho de peso total (ΔW), ganho relativo de peso (GR), taxa de crescimento absoluta (AGR), taxa de crescimento específica (SGR) total de alimento ofertado, fator de conversão alimentar (FCA), eficiência alimentar (FE) e sobrevivência de animais alimentados exclusivamente com siri, exclusivamente com peixe e com 50% de siri e 50% de peixe.

	Tratamentos		
	Sr	Px	Sr + Px
Wi (g)	$572 \pm 85,6^a$	$513 \pm 86,7^b$	503 ± 114^b
Wf (g)	$1.495 \pm 246,4^a$	$1.110 \pm 236,0^b$	$1.212 \pm 248,7^b$
Biomassa inicial (kg)	19,42	20,52	15,08
Biomassa final (kg)	38,86	25,53	20,60
DE Inicial (kg/m^3)	$3,4 \pm 0,7^a$	$3,6 \pm 0,6^a$	$4,0 \pm 0,2^a$
DE final (kg/m^3)	$5,5 \pm 1,3^a$	$4,5 \pm 0,3^a$	$5,4 \pm 0,8^a$
ΔW (g)	$923,4 \pm 246,4^a$	$597,0 \pm 236,0^b$	$709,1 \pm 248,7^b$
GR (%)	161,7	116,4	141,1
AGR (g/dia)	$13,6 \pm 3,6^a$	$8,8 \pm 3,5^b$	$10,4 \pm 3,7^b$
SGR (%BW/dia)	$1,4 \pm 0,3^a$	$1,1 \pm 0,3^b$	$1,3 \pm 0,3^{ab}$
Σ alimento ofertado (kg)	331,9	346,0	277,4
FCA	17,1	69,1	50,3
FE (%)	5,9	1,4	2,0
Sobrevivência (%)	$76,5 \pm 5,4^a$	$57,8 \pm 3,8^b$	$56,7 \pm 3,3^b$

Mesmo os pesos iniciais dos tratamentos possuem valores bem próximos, foi verificado diferença estatisticamente significativa do Wi do tratamento Sr frente aos outros dois tratamentos.

Ao final do cultivo, o Wf do tratamento Sr também apresentou diferença estatisticamente significativa dos outros dois tratamentos, contudo essa diferença foi bem mais expressiva. Essa diferença pode ser ratificada ao se analisar o ΔW dos 3 tratamentos (Figura 19). Para o tratamento Px o ganho de peso total foi semelhante ao do tratamento Px + Sr e menores que o observado para o tratamento Sr.

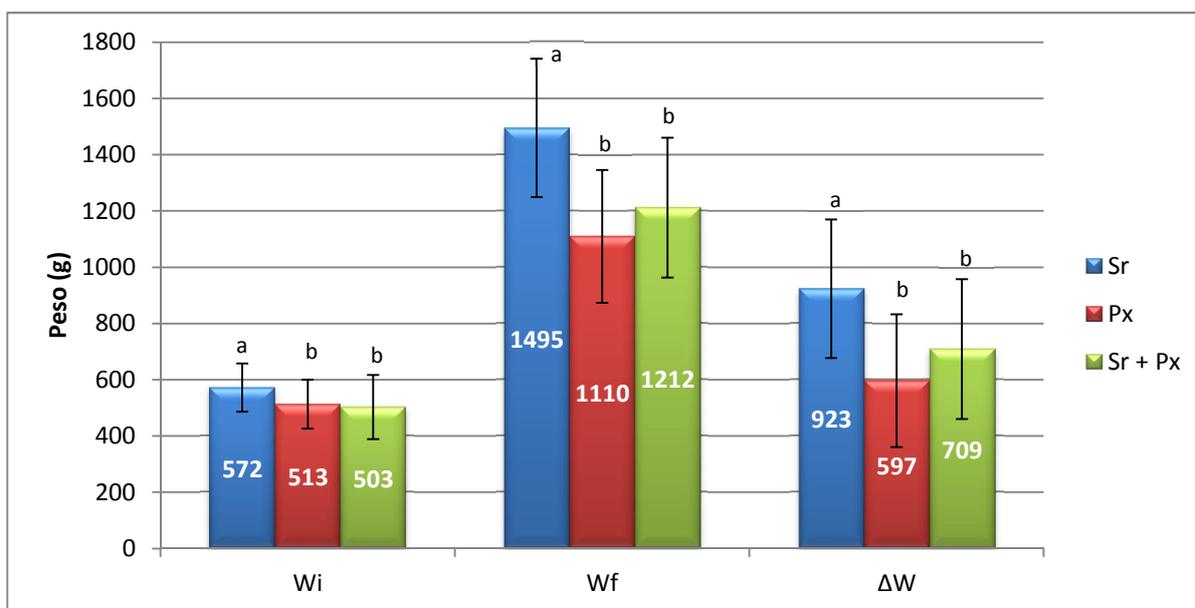


Figura 19: Peso inicial (Wi), peso final (Wf) e ganho total de peso (ΔW) dos tratamentos Sr, Px e SR + Px ; letras iguais implicam em igualdade entre os tratamentos.

Ao considerar o ΔW do tratamento Px como 100%, por este ter sido o menor ΔW dos 3 tratamentos, observa-se que, mesmo o tratamento Sr + Px não apresentando diferença estatisticamente significativa em relação ao Px, esse (Sr + Px) foi 18,76% maior, e o tratamento Sr, além apresentar diferença estatisticamente significativa, foi 54,67% maior que o Px.

A taxa de crescimento absoluta (AGR) seguiu os mesmos padrões dos outros parâmetros analisados. O Tratamento Sr obteve melhor resultado, $13,6 \pm 3,6$ g/dia, que os outros dois tratamentos os quais não diferiram entre si, contudo, ao se analisar a taxa de crescimento específica (SGR) verifica-se que para o tratamento Sr esta foi significativamente maior que a de Px, não diferindo do tratamento Sr + Px. Já o tratamento Px, mesmo tendo apresentado o mais baixo crescimento relativo de biomassa diário, não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento Sr + Px.

2.6. Discussão

2.6.1. Montagem e definição da estrutura ideal do laboratório de cultivo de polvo – LABPOLVO

O fato de os animais se encontrarem em um ambiente com boa qualidade de água e disponibilidade de alimento, como foi observado no LABPOLVO, não os impediu de eventualmente se aventurarem fora dos aquários. Uma vez obtido êxito na saída dos aquários, por questões espaciais os animais não conseguiam retornar ao aquário ou caixas vindo a morrer.

Assim, as modificações estruturais do LABPOLVO, de forma a não mais permitir a fuga dos indivíduos, foram necessárias e bem sucedidas, pois as fugas foram impedidas. Um fato relevante quanto às tentativas de fuga dos animais é que sistematicamente estes tentavam fugir pelo local utilizado pelo tratador para a retirada dos restos de alimento bem como para o fornecimento do novo alimento, mesmo se tratando de uma caixa circular com 360° de escolha como rota de fuga.

Mather (2008) comenta que uma vez que esses animais não são “sociáveis” o seu aprendizado é ambiente-dependente e o fato de possuírem oito braços com ventosas distribuídas por toda a sua região ventral os dá uma excelente ferramenta para exploração. Essa mesma autora informa também que ao ser disponibilizado um novo item em seu ambiente o animal inicialmente realiza um reconhecimento visual para posteriormente explorar com seus braços, e se nenhum novo objeto que seja visualmente atrativo for disponibilizado, tanto dentro como fora do tanque, o animal continua a apresentar uma postura exploratória.

O polvo possui um sistema de locomoção extremamente bem desenvolvido e utiliza os braços e suas múltiplas ventosas para caminhar sobre o substrato. Quando estão “caminhando” a parte distal dos braços fica em contato com o substrato e o animal parece deslizar sobre o assoalho. Esse tipo de movimento permite que um grande número de receptores quimiotáteis presentes nas ventosas e braços detecte o ambiente (Nixon & Young, 2003).

De acordo com Matter (1991), Durante o dia o polvo se utiliza de informações visuais e espaciais para navegar por perto de suas tocas e em suas incursões de captura de alimento.

Experimentos em laboratório mostraram a habilidade de polvos em se orientar. Segundo a mesma autora essa é uma característica de animais que possuem um sistema visual bem desenvolvido.

Uma vez que os polvos deixam o microambiente protegido de seus ovos, encontram situações onde iniciam seu aprendizado a partir de experiências próprias (Boletzky, 1987). A capacidade de aprender e manipular o ambiente a seu favor é relatada por Anderson e Mather (2010). Esses autores relatam a capacidade de polvos aprenderem a abrir frascos com tampa para retirar alimentos. Uma vez que esses animais possuem sistema visual evoluído, bem como conseguem perceber o ambiente através de quimiorreceptores em suas ventosas, somado a uma elevada força observada em seu corpo muscular, eles utilizam essas ferramentas para adaptar o local em que vivem, bem como para mudar de ambiente.

Losordo *et al.*(1999) comentam que o sistema de biofiltro é o sistema mais utilizado para a remoção de nitrogênio amoniacal da água de sistemas de recirculação. Os níveis de amônia na água de cultivo durante todos os experimentos foram sempre muito baixos, mesmo ao se cultivar uma biomassa máxima de 5,76kg de polvo em um volume de 3.000 l de água circulante. A manutenção da qualidade da água somente foi possível devido ao *design* da estrutura de cultivo desenvolvida especificamente para o LABPOLVO, em particular, devido ao sistema de torres de volatilização de amônia (Figura 8).

2.6.2. Captura e transporte de indivíduos para os diferentes experimentos

Semelhante ao observado no Capítulo 01 desse trabalho acredita-se que o uso de oxigênio na água de transporte dos animais, desde a sua captura até a chegada ao local de destino, seja o LABPOLVO, seja a área utilizada para o cultivo em gaiolas, foi decisivo para a baixíssima mortalidade observada, uma vez que a concentração de oxigênio sempre esteve acima da saturação.

Devido a uma maior demanda de indivíduos para os experimentos de escolha de alimento, bem como de crescimento, foi necessário utilizar uma maior densidade de estocagem durante o transporte. Mesmo essa densidade alcançando um valor máximo de 47,5kg/m³, ainda assim a densidade foi muito inferior à recomendada por Fuentes *et al.* (2005) que é de 165kg/m³ para indivíduos de 1,0kg.

2.6.3. Teste de dupla escolha de alimento

Para o teste de dupla escolha de alimento, o controle negativo, isto é, a verificação da eficácia do método utilizado, teve como base a análise da diferença entre capturar algum alimento ou não capturar nenhum alimento. Para todos os 3 testes foi verificado uma forte diferença entre o fato de o animal capturar algum tipo de alimento frente ao fato de o animal não capturar nenhum alimento, demonstrando assim a eficiência do método desenvolvido.

Em todos os estágios de vida, cefalópodes são carnívoros ativos, alimentando-se de crustáceos, moluscos e peixes (Nixon, 1987), necessitando de todas as suas habilidades para capturar suas presas.

Mather e O’Dor (1991) classificam juvenis de *O. vulgaris* como predadores oportunistas inteligentes os quais desenvolveram excelentes técnicas de caça, passaram a perceber as melhores circunstâncias para a captura de suas presas, e desenvolveram a percepção do correto tempo de mudança de suas tocas. Como um oportunista generalista, o *O. vulgaris* tem como presa uma larga variedade de espécies, contudo, por se tratar de um predador especialista ele possui certas presas como preferência (Leite *et al.*, 2009).

Estudos de hábito alimentar de polvos, via de regra, utilizam-se da análise de estômago e intestino de animais capturados, bem como a análise dos restos deixados nas tocas dos animais. Ambos os métodos não são totalmente eficientes, uma vez que ao se realizar a análise de conteúdo estomacal pode-se não encontrar registros do que foi consumido devido a existência de uma pré digestão externa, sendo em muitos casos ingerido apenas o músculo do animal capturado, não sendo observadas estruturas rígidas para uma análise visual. No caso da análise de restos nas tocas dos animais, devido à dinâmica do ambiente marinho, muitas vezes quando o polvo consome animais pequenos, como um camarão, seus restos não são visualizados, por se tratar basicamente de carapaça quitinosa e que facilmente é levada pela correnteza (Smith, 2003), dessa forma a análise das escolhas de alimentação de polvo podem ser complementadas com observações em laboratório, em tempo real.

Velásquez (2010) afirmou que, para o *Octopus vulgaris*, durante todo o desenvolvimento dessa espécie a mesma possui hábito alimentar composto por 80% de crustáceos. Smith (2003) verificou que para a espécie *O. vulgaris*, na África do Sul, animais nativos pequenos – até 300g – tem uma preferência por uma alimentação a base de pequenos

crustáceos (41,8%), grandes crustáceos (20,4%), apresentou uma preferência de 23,4% por moluscos gastrópodes e apenas 5,1% por teleósteos.

Em um dos únicos estudos que envolvem a espécie *Octopus insularis*, Leite *et al.* (2009) relataram que a grande variedade de dietas do *O. insularis*, envolvendo um grande número de presas (n = 48), confirma a flexibilidade de dieta dessa espécie, fato comum a outras espécies de polvo de águas rasas. Esses autores mostraram que a dieta do *O. insularis*, nesse estudo, foi composta de 70% de crustáceos, 17,53% de bivalves, e 12,47% de gastrópodes. Nesse estudo também foram observadas algumas tentativas de captura de teleósteos por alguns indivíduos, contudo sem sucesso. Esses autores sugeriram ainda que o *O. insularis* pode possuir uma forte predileção por pequenos caranguejos (crustáceos braquiúros) uma vez que esse tipo de alimento representou 50% de todas as formas de alimento encontradas nas tocas dos animais estudados, ou que o *O. insularis* tenha desenvolvido técnica eficiente de caça a esses pequenos crustáceos.

Os resultados do teste de dupla escolha de alimento confirmam parte das informações supracitadas, uma vez que foi verificada uma forte preferência dos animais ao siri frente ao gastrópode. Nos testes de dupla escolha de alimento, o peixe foi o alimento preferencial quando comparado ao gastrópode e foi tão procurado quanto o siri. A não existência de ocorrência de teleósteos como alimento no trabalho de Leite *et al.* (2009) pode ter ocorrido, pois no ambiente natural dos animais os teleósteos são presas que apresentam maior dificuldade em serem capturadas, frente aos gastrópodes e crustáceos. Animais do gênero *Octopus* são animais oportunistas (Forsythe e Hanlon, 1997), e sua alimentação, segundo Smith (2003) apresenta grande relação com a abundância do meio em que se encontra o animal. Já no laboratório, uma vez disponibilizado ambos os alimentos, gastrópodes e peixe, com iguais possibilidades de captura, o animal demonstra a sua real predileção.

2.6.4. Cultivo, em laboratório, a 23 e 28°C

Mesmo não tendo sido observada diferença estatisticamente significativa entre a frequência de captura do alimento “siri” e do alimento “peixe” no teste de dupla escolha de alimento, optou-se por utilizar o siri como alimento base tanto por este ter sido numericamente a maior escolha dos indivíduos, tendo sido a opção de escolha em 66,7% das vezes que o animal capturou algum tipo de alimento, bem como por conta que alguns

pesquisadores como Iglesias *et al.*(2000), Vaz-Pires *et al.* (2004), Quintana *et al.*(2008), Valverde *et al.* (2008), Rosas *et al.* (2008) e Delgado *et al.* (2011) terem recomendado a utilização de crustáceos braquiúros como alimento controle em testes de alimentação.

Segundo Delgado *et al.*(2011), a temperatura é uma das principais variáveis que influencia o crescimento e a taxa de ingestão de alimento em *O. vulgaris*. Apesar de não ser muito claro como elevadas temperaturas afetam a fase de maior crescimento, a temperatura irá elevar o crescimento apenas até o limite fisiológico de uma dada espécie (Semmens *et al.*, 2004) contudo, a taxa de alimentação, bem com a taxa de ingestão de alimento podem ser reduzidas conforme se eleva a temperatura, no entanto, ao se ultrapassar a temperatura de conforto térmico dos animais, pode inclusive causar a morte.

Na maioria dos cefalópodes, dentro da faixa normal de temperatura de determinada espécie, em uma dada área específica, temperaturas mais elevadas promovem maiores taxas de crescimento (Boyle e Rodhouse, 2005). Além disso, Forsythe e Hanlon (1988) demonstraram em seus experimentos que elevadas temperaturas utilizadas no cultivo de *Octopus bimaculoides* causaram uma dramática modificação na taxa de crescimento, durante a fase exponencial de crescimento dessa espécie. Dessa forma esses resultados confirmam que a duração das fases de crescimento exponencial e logarítmica, descritas por Forsythe e Van Heukelem (1987), são espécie-específica, sendo que em uma mesma espécie pode variar conforme a temperatura de cultivo.

Mangold e Boletzky (1973) demonstraram que um crescimento mais acelerado utilizando-se temperaturas de cultivo mais altas é resultado de uma maior taxa de ingestão de alimentos. Esses autores verificaram que *O. vulgaris* cultivados a 20°C ingeriram de 40 a 83% dos caranguejos ofertados. Já animais cultivados a 15°C consumiram de 29 a 31% do alimento oferecido e os animais cultivados a 10°C consumiram apenas 12 a 14,5% dos caranguejos ofertados.

Neste experimento com *Octopus insularis* foi observado o mesmo padrão anteriormente descrito, uma vez que animais cultivados a 23°C consumiram menor quantidade de alimento (796,5g) comparado aos cultivados a 28°C (1.452,1g). Essa maior ingestão de alimento certamente colaborou com o aumento do crescimento observado nos animais cultivados a 28°C. A essa temperatura, tanto a taxa específica de crescimento – SGR (2,1%) como a taxa de crescimento absoluta – AGR (9,4g/dia) foram praticamente o dobro

das observadas no cultivo a 23°C que foram de 1,2% e 4,7g/dia, havendo ao final do experimento uma variação de 108% entre o ganho relativo de peso (GR) do grupo cultivado a 28°C, frente ao GR do grupo cultivado a 23°C.

Ao se analisar o balanço energético de organismos heterotróficos pode-se dizer de forma genérica que a energia obtida a partir da alimentação (C) é utilizada no crescimento (G), nos processos metabólicos (M) e no conteúdo das excretas (E), resultando na seguinte equação:

$$C = G + M + E$$

Mangold (1983) comenta que o crescimento é afetado por vários fatores e que a temperatura apresenta uma forte influencia na taxa de ingestão de alimento. Esse autor afirma ainda que uma mais alta temperatura resulta em maior taxa de ingestão, contudo eleva também o custo metabólico.

Os animais utilizados no tratamento a 28°C podem ter apresentado um gasto energético maior que os animais do tratamento a 23°C, provavelmente devido ao supracitado custo metabólico. De fato foi observada maior atividade dos animais cultivados em águas mais quentes, contudo mesmo com o suposto gasto metabólico mais elevado, observou-se uma taxa de crescimento mais acentuada pelo grupo cultivado a 28°C.

O fato de se ter obtido um maior custo metabólico ao se utilizar temperaturas mais elevadas não é um fato claro, uma vez que, mesmo se tendo uma maior taxa de alimentação do grupo cultivado a 28°C, não se observou uma elevação do fator de conversão alimentar, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre o FCA do grupo cultivado a 28°C (4,9) e o FCA do grupo cultivado a 23°C (5,7). Mangold e Boletzky (1973) obtiveram o mesmo resultado, não verificando diferença significante no FCA de animais cultivados a 20°C, 15°C e 10°C, mesmo registrando decreção na taxa de ingestão.

A manutenção do FCA em diferentes temperaturas provavelmente é devido ao balanço entre a taxa de ingestão de alimento e o crescimento. Animais mantidos em temperatura mais elevada apresentam metabolismo mais acelerado e consomem maior quantidade de alimento, conseqüentemente apresentam maior crescimento; já animais mantidos em menor temperatura reduzem a velocidade metabólica, gastando menos energia, e consomem menos alimento, contudo apresentam um menor crescimento.

A temperatura influencia também a atividade enzimática no processo digestório. De acordo com Motta (2011), uma elevação na temperatura aumenta a velocidade de reação de algumas enzimas, até que se atinja a temperatura crítica para essa enzima, onde ocorre a sua desnaturação. Miliou *et al.*(2005) verificaram que exemplares de *O. vulgaris* de 50 a 150 gramas cultivados a 25°C apresentaram maior retenção de proteína que indivíduos cultivados em temperaturas inferiores. Esse resultado pode indicar que no experimento a 28°C com *Octopus insularis* pode ter havido uma melhora no processo digestório por conta da elevação da atividade das enzimas proteolíticas, frente ao grupo cultivado a 23°C, contudo estudos mais aprofundados devem ser realizados, lavando-se em conta o aproveitamento do alimento ingerido e a determinação de temperatura ótima das enzimas envolvidas no processo digestório.

Giménez e Garcia (2002) concluíram que a faixa de temperatura de 16 a 21°C seria a mais indicada de forma a se ter um crescimento comercialmente viável para o cultivo do *O. vulgaris*. Para o *Octopus insularis* outros estudos devem ser desenvolvidos para se encontrar a temperatura ideal de cultivo, contudo, a partir dos resultados obtidos, observa-se que cultivos desenvolvidos em temperaturas mais baixas certamente terão custos mais elevados devido ao menor crescimento dos animais cultivados.

2.6.5. Cultivo em gaiolas com 3 diferentes dietas

A estrutura das gaiolas utilizadas no cultivo aparentemente foi adequada à espécie testada, uma vez que durante o processo de alimentação era possível observar os animais saindo de seus refúgios e capturando o alimento ofertado. Rodrigues *et al.*(2006) afirmam, para o *Octopus vulgaris*, que apesar de essa espécie continuar a crescer em cativeiro e em relativas elevadas densidades de estocagem, essa espécie é naturalmente territorialista e necessita de um mínimo espaço para o seu desenvolvimento, dessa forma a presença de abrigos nos sistemas de cultivo utilizados são de suma importância.

Ao utilizar densidade de estocagem inicial de 28kg/m³ e peso inicial de indivíduos de 800g, Socorro *et al.* (2005) observaram para o *O. vulgaris* uma taxa de crescimento específica SGR de 1,65%, uma taxa de crescimento absoluta (AGR) de 28g/dia e um fator de conversão

alimentar (FCA) de 3,75, alimentado os animais com peixes de descarte de cultivo (*Bloops bloops*) a uma temperatura média de 19°C

Oltra *et al.* (2005) realizaram estudos com diferentes tipos de alimento na terminação de *O. vulgaris* em gaiolas flutuantes em região com flutuação de temperatura de 14 a 23°C. Ao utilizarem a proporção de 60% de peixes, 39% de crustáceos (braquiúros) e 1% de moluscos (bivalves) esses autores obtiveram um SGR de 1,79%, um AGR de 30,8g/dia e um FCA de 6,1 ao cultivar indivíduos machos com peso inicial de 719g. Ao modificar a proporção dos alimentos ofertados, passando a utilizar uma maior quantidade de peixes, utilizando na composição da dieta dos animais cultivados 85% de peixes, 14% de crustáceos e 1% de moluscos, os autores verificaram resultados ainda melhores, sendo registrados SGR de 2,1%, AGR de 35g/dia e um FCA 3,9, no cultivo de indivíduos com peso médio inicial de 648g.

Rodríguez *et al.* (2006) também realizaram estudos com a terminação de *O. vulgaris* em gaiolas com diferentes dietas, utilizando apenas indivíduos do sexo masculino. Inicialmente foi testada uma dieta composta por 30% de peixes, 37% de crustáceos (braquiúros) e 33% de moluscos (bivalves). Essa formulação resultou em uma SGR de 0,64%, AGR de 8,7g/dia e um FCA de 9,2 para indivíduos com peso médio inicial de 1.009g cultivados em uma temperatura média de 15,3°C. Ao ser utilizada uma proporção de 54% de peixes, 26% de crustáceos e 20% de moluscos, obteve-se um SGR de 1,54%, AGR de 33,18g/dia e FAC de 3,8, para indivíduos com peso médio inicial 996g cultivados em temperatura média de 16,7°C.

Ao utilizar uma proporção de 68% de peixes, 18% de crustáceos (braquiúros) e 14% de moluscos (bivalves) na dieta de machos do *O. vulgaris* em gaiolas, Chapela *et al.* (2006) verificou que animais com peso médio de 790g atingiram ao final de 75 dias de cultivo um peso médio de 2.340g com uma SGR de 1,34%, AGR de 24g/dia com uma temperatura média de cultivo de 16,5°C, como visto na tabela 14.

Para o cultivo do *Octopus insularis* foi verificado que uma dieta monoespecífica a base de siri apresentou melhor resultado de crescimento que a dieta composta por peixe e siri, contrastando com os resultados obtidos por Oltra *et al.* (2005) e Rodríguez *et al.* (2006) que ao elevar a quantidade de peixe na dieta do *Octopus vulgaris*, verificaram uma elevação tanto na taxa de crescimento específica (SGR) quanto na taxa de crescimento absoluta (AGR).

Tabela 14: Espécie utilizada, estrutura de cultivo, densidade de estocagem inicial, tipo de alimento utilizado, taxa de crescimento absoluta (AGR), taxa de crescimento específica (SGR), fator de conversão alimentar (FCA), eficiência alimentar (FE) e porcentagem da biomassa utilizada na alimentação de polvos cultivados por diferentes pesquisadores.

	Socorro <i>et al.</i> (2005)	Oltra <i>et al.</i> (2005)		Rodríguez <i>et al.</i> (2006)		Chapela <i>et al.</i> (2006)	Neste estudo		
Especie utilizada	<i>Octopus vulgaris</i>	<i>Octopus vulgaris</i>		<i>Octopus vulgaris</i>		<i>Octopus vulgaris</i>	<i>Octopus insularis</i>		
Estrutura de cultivo	Gaiola	Gaiola		gaiola		gaiola	gaiola		
Densidade de estocagem inicial (kg/m ³)	28	10		12,6	11,9	6,7	3,4	3,6	4,0
Tipo de alimento (peixe; crustáceo; molusco) ¹	100;0;0	60;39;1	85;14;1	30;37;33	54;26;20	68;18;14	0;100;0	100;0;0	50;50;0
Peso inicial e final (g)	805 - 3052	723 - 3370	648 - 3384	1009 - 1790	996 - 3982	790 - 2340	572 - 1495	513 - 1110	503 - 1212
Temperatura de cultivo	19°C	14°C - 23°C		14°C - 17°C	13°C - 20°C	16,5°C	25,5°C		
Taxa de crescimento absoluta -AGR (g/dia)	28,00	30,80	35,00	8,7	33,18	24	13,6	8,8	10,4
Taxa de crescimento específico - SGR (%BW/dia)	1,65	1,79	2,10	0,64	1,54	1,34	1,4	1,1	1,3
Fator de conversão alimentar - FCA	3,75	6,10	3,90	9,2	3,8	-	17,1	69,1	50,3
Eficiência alimentar - FE (%)	0,27	0,16	0,26	0,11	0,26	-	0,06	0,01	0,02
Dias de cultivo - DDC	81	86	80	90	91	75	68		
Porcentagem da biomassa utilizada como alimentação	7%	5% - 10%		3% - 9%		5%	20%		

1 - Proporção dos alimentos em %; crustáceos = braquiúros ; moluscos = bivalves

Fham e Isidro (2009) ao realizar em laboratório o cultivo do *O. vulgaris* com uma dieta monoespecífica a base de peixe (*Scomber colias*) verificaram um crescimento dos animais cultivados (SGR máx = 1,04%) inferior ao observado para outros trabalhos que utilizam dietas compostas de peixe e crustáceos. Dessa forma esses resultados confirmam o exposto por Rodríguez *et al.* (2006) que recomenda uma inclusão mínima de 25% de crustáceo na dieta de *O. vulgaris*.

Os elevados valores de FCA e baixos índices de aproveitamento do alimento ofertado (FE) durante o cultivo do *Octopus insularis* frente aos resultados obtidos para o *O. vulgaris* podem ter sido consequência da utilização de uma taxa de alimentação mais elevada (20%) no experimento executado em Itarema-CE, frente ao utilizado para o *O. vulgaris* (3% a 10%). Uma vez que se ofertou uma maior quantidade de alimento, acima da saciedade dos animais, esse excedente não é efetivamente consumido, influenciando negativamente nos resultados tanto do FCA quanto do FE. Mesmo havendo o cuidado de se verificar o tempo de consumo do alimento ofertado durante o cultivo, pode ter sido utilizada uma taxa de alimentação superior ao demandado pelos animais cultivados, contudo esse excedente foi proposital, uma vez que devido ao caráter pioneiro desse estudo e uma total falta de informação quanto ao potencial de crescimento dessa espécie, optou-se por uma alimentação “ad libitum” de forma a não limitar o crescimento dos animais por falta de alimento.

A sobrevivência nos tratamentos Px e Sr + Px certamente influenciou negativamente os resultados de FCA e de FE, principalmente se a mortalidade tiver ocorrido próximo ao final do experimento, pois os animais consomem o alimento, contudo sua biomassa não é computada nos cálculos de FCA e FE.

Aguila *et al.*(2007) consideram que crustáceos (braquiúros) apresentam uma porcentagem de 50% de porção que será efetivamente consumida pelos polvos cultivados. Contudo, Domingues *et al.*(2007) e Biandolino *et al.*(2010) consideram que a fração aproveitável do crustáceo é de 18%. Dessa forma, devido a não padronização da fração efetivamente aproveitável da carne de crustáceos braquiúros, em particular da espécie utilizada nesse experimento (*Callinectes spp*), optou-se por computar como peso de alimento consumido, o peso total do animal ofertado. Dessa forma os valores de FCA dos tratamentos que utilizaram siri como alimento certamente estão sobrestimados, e os valores de FE subestimados. Para os tratamentos que se utilizou peixe como alimento, devido a existência de

estruturas rígidas (escamas e ossos) que não são efetivamente consumidas pelos polvos, observa-se também um FCA elevado e um baixo FE.

Em sistemas de cultivo em laboratórios pode-se, ao final da alimentação dos animais, retirar e pesar as frações não consumidas efetivamente pelos animais, chegando-se a valores de FCA e FE mais realistas. Contudo, em estudos realizados em campo, principalmente em locais de elevada dinâmica hídrica, a coleta dos restos é muito difícil, sendo necessário analisar valores sobrestimados de FCA e subestimados de FE, ao se utilizar alimentos frescos.

O controle da mortalidade é muito difícil devido à dificuldade de acesso aos espaços amostrais de cultivo. Alguns exemplares foram encontrados mortos durante o cultivo, contudo a maioria dos animais mortos ficou dentro da gaiola e em pouco tempo foram decompostos, pois devido à composição corporal do polvo sua decomposição é muito rápida, sendo seus restos carreados pelo constante fluxo de água no interior das gaiolas.

2.7. Conclusões

- A utilização de baixas densidades de estocagem (máxima de 47,5kg/m³) somada à utilização de oxigênio na água de transporte, mantendo sempre uma concentração de oxigênio dissolvido na água acima da saturação, foi de suma importância para o sucesso do transporte de sub-adultos de *Octopus insularis*;
- A metodologia desenvolvida para o teste de dupla escolha de alimento foi bastante eficiente uma vez que se conseguiu verificar fortes tendências de captura de determinados alimentos pelos animais observados;
- Mesmo não havendo diferença estatisticamente significativa entre a frequência de captura de crustáceos frente a frequência de captura de peixes no teste de dupla escolha de alimento, esse resultado confirma que espécies de polvo consomem efetivamente em ambiente natural crustáceos braquiúros, não apenas por uma maior facilidade de captura, comparativamente à captura de teleósteos, mas possivelmente por esse alimento apresentar um maior valor nutricional para o polvo. Em contra partida, a elevada frequência de captura de teleósteos nesse teste demonstra que possivelmente esse alimento não seja consumido mais frequentemente na natureza por conta da maior dificuldade de captura das presas;
- Por se tratar de um animal que habita águas rasa e quentes, ao se analisar o cultivo do *Octopus insularis* em águas mais frias percebeu-se um menor crescimento dos indivíduos frente ao cultivo em águas mais quentes. Dessa forma fica claro que ao se tentar desenvolver o cultivo do *Octopus insularis* deve-se procurar o fazer em águas quentes, pois ao se desenvolver o cultivo em águas mais frias a atividade irá perder competitividade frente ao cultivo desenvolvido em águas quentes, devido à elevação dos custos de produção devido a um maior tempo de cultivo;
- Os resultados de crescimento e sobrevivência mostram ser possível o cultivo do *Octopus insularis* em gaiolas flutuantes. Contudo, mesmo tendo-se obtido resultados animadores de crescimento e sobrevivência, deve-se continuar essa linha de pesquisa, pois ainda se está aquém dos resultados de crescimento e eficiência alimentar obtidos para o *Octopus vulgaris*;

- A dificuldade no manuseio das gaiolas utilizadas no cultivo do *Octopus insularis* mostra que caso se deseje implementar essa atividade como uma atividade industrial, devem ser feitas adaptações nas embarcações utilizadas tanto na implantação das gaiolas nos locais de cultivo, bem como para a retirada das gaiolas da água para a coleta dos animais e manutenção das gaiolas ao final de cada ciclo de produção.

2.8. Refêrencias

ANDERSON, R. C.; MATHER, J. A. It's all in the cues: Octopuses (*Enteroctopus dofleini*) learn to open jars. In: Proceedings of the Third International Symposium Coleoid Cephalopods Through Time, 59, 2010, p.8-13.

ARAUJO, Maria Elisabeth de; TEIXEIRA, Jacinta Maria Castro; OLIVEIRA, Aída Maria Eskinazi de. **Peixes estuarinos marinhos do Nordeste brasileiro**: guia ilustrado. Recife: Edições UFC, 2004. 260p.

BIANDOLINO, F.; PORTACCI, G.; PRATO, E. Influence of natural diet on growth and biochemical composition of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797. **Aquaculture Int.**, v.18, p.1163-1175, 2010.

BOLETZKY, S.; V. Juvenile behavior. In: Boyle, P.R., **Cephalopod Life Cycle Volume II**. Comparative Reviews: London: Academic Press, 1987. 441p.

CASTAÑO, C. M. Experiencias de engorde y cultivo en dos especies de pulpo *Octopus vulgaris* (Cuvier) y *Octopus minus* (Gould). In: I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura, 2002, **Anais**, p.707-719.

CHAPELA, A.; GONZÁLEZ, A. F.; DAWE, E. G.; ROCHA, F. J.; GUERRA, A. Growth of common Octopus (*Octopus vulgaris*) in cages suspended from rafts. **Scientia Marina**. v.70, p.121-129, 2006.

DELGADO, M.; GAIRÍN, J. I.; CARBÓ, R.; AGUILERA, C. Growth of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) in tanks in the Ebro Delta (NE Spain): effects of temperature, salinity and culture density. **Scientia Marina**. v.75, p.53-59, 2011.

DOMINGUES, P. M.; LÓPEZ, N.; MUÑOZ, J. A.; MALDONADO, T.; GAXIOLA, G.; ROSAS, C. Effects of a dry pelleted diet on growth and survival of the Yucatan octopus, *Octopus maya*. **Aquaculture Nutrition**, v.13, p.273-280, 2007.

DOMINGUES, P.; GARCIA, S.; HACHERO-CRUZADO, I.; LOPEZ, N.; ROSAS, C. The use of alternative prey (crayfish, *Procambarus clarki*, and hake, *Merluccius gayi*) to culture *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). **Aquaculture Int.** v.18, p.487-499, 2010.

FORSYTHE, J. W.; VAN HEUKELEM, W. J. Growth. In: Boyle, P.R., **Cephalopod Life Cycle Volume II**. Comparative Reviews: London: Academic Press, 1987. 441p.

FORSYTHE, J. W.; HANLON, R. T. Effect of temperature on laboratory growth, reproduction and life span of *Octopus bimaculoides*. **Marine Biology**. v.98, p.369-379, 1988.

FORSYTHE, J. W.; HANLON, R. T. Foraging and associated behavior by *Octopus cyanea* Gray, 1849 on a coral atoll, French Polynesia. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v.209, p.15-31, 1997.

FUENTES, L.; IGLESIAS, J.; SÁNCHEZ, F. J.; OTERO, J. J.; MOXICA, C.; LAGO, M. J. Métodos de transporte de paralarvas y adultos de pulpo *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797. **Boletín. Instituto español de oceanografía**. v.21, p.155–162, 2005.

GARCÍA, B. G.; GIMÉNEZ, F. A. Influence of diet on on-growing and nutrient utilization in the common octopus *Octopus vulgaris*. **Aquaculture**, v.211, p.171-182, 2002.

GARCÍA, B. G.; VALVERDE, J. Optimal proportions of crabs and fish in diet for common octopus (*Octopus vulgaris*) on-growing. **Aquaculture**, v.253, p.502-511, 2006.

GIMÉNEZ, F. A.; GARCÍA, G. Growth and food intake models in *Octopus vulgaris* Cuvier (1797): influence of body weight, temperature, sex and diet. **Aquaculture International**, v.10, p.361-377, 2002.

IGLESIAS, J.; SÁNCHEZ, F. J.; OTERO, J. J.; MOXICA, C. Culture of Octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier): Present Knowledge, problems and perspectives. **Cahiers Options Méditerranéennes**, v.47, p.313-321, 2000.

LEITE, T. S.; HAIMOVICI, M.; MOLINA, W.; WARNKE, K. Morphological and genetic description of *Octopus insularis* new species (Cephalopoda : Octopodidae), a new cryptic species in the *Octopus vulgaris* complex from the tropical Southwestern Atlantic. **Journal of Molluscan Studies**, v. 74, p. 63–74, 2008.

LEITE, T. S.; HAIMOVICI, M.; MATHER, J. *Octopus insularis* (Octopodidae), evidences of a specialized predator and a time-minimizing hunter. **Marine Biology**. v.156, p.2355-2367, 2009.

LOSORDO, T. M.; MASSER, M. P.; RAKOCY, J. E. Recirculating aquaculture tank production systems: A review of components options. **Southern Regional Aquaculture Center Publications**. v.453, 1999.

MANGOLD, K.; BOLETZKY, S. New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. **Marine Biology**. v.19, p.7-12, 1973.

MANGOLD, K. *Octopus vulgaris*. In: Boyle P.R. (ed) **Cephalopod Life Cycles I: Comparative reviews**. London, Academic Press Inc., 1983. pp.335-364.

MANGOLD, K. Reproduction. In: Boyle P.R. (ed) **Cephalopod Life Cycles II: Comparative reviews**. London, Academic Press Inc., 1987. pp.157-200.

MATHER, J. A. Navigation by spatial memory and use of landmarks in octopuses. **Journal of Comparative Physiology A**. v.168, p.491-497, 1991.

MATHER, J.A.; O'DOR, R. K. Foraging strategies and predation risk shape the natural history of juvenile *Octopus vulgaris*. **Bulletin of Marine Science**. v.49(1-2), p.256-269, 1991.

MATHER, J. A. Cephalopod consciousness: Behavioural evidence. **Consciousness and Cognition**. v.17, p.37-48, 2008.

MENDES, Paulo de Paula. **Estatística aplicada à aquicultura**. Recife: Bagaço, 1999. 265p.

MOTTA, VALTER TEIXEIRA. **Bioquímica**. Rio de Janeiro, editor Científica, 2ªed, p.463, 2011

NIXON, M. Cephalopod diets. In: Boyle, P.R., **Cephalopod Life Cycle Volume II. Comparative Reviews**: London: Academic Press, 1987. 441p.

NIXON, Mario; YOUNG, John Zacharry. **The Brains and Lives of Cephalopods**. New York: Oxford University Press, 2003. 392p.

NUNES, A. J. P.; SÁ, M. V. C.; ADRIOLA-NETO, F. F.; LEMOS, D. Behavioral response to selected feed attractants and stimulants in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.260, 244-254, 2006.

NUNES, A. J. P.; SÁ, M. V. C.; LEMOS, D. White Shrimp Study Compares Commercial Feed Attractants. **Global Aquaculture Advocate**, v.13 (E2), p.44-46, 2010.

OLTRA, R.; ALEMANY, F.; ROIG, M.; MEZQUITA, F. Engorde de pulpo *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 en jaula flotante en la costa mediterránea de Levante. **Bol. Inst. Esp. Oceanogr.**, v.21(1-4), p.187-194, 2005.

PHAM, C. K.; ISIDRO, E. Growth and mortality of common Octopus (*Octopus vulgaris*) fed a monoespecific fish diet. **Journal of Shellfish Research**. v.28(3) p.617-623, 2009.

PRATO, E.; PORTACCI, G. BIANCOLINO, F. Effect of diet on growth performance, feed efficiency and nutritional composition of *Octopus vulgaris*. **Aquaculture**. v.309, p.203-211, 2010.

QUINTANA, D.; DOMINGUES, P.; GARCÍA, S. Effect of two artificial wet diets agglutinated with gelatina on feed and growth performance of common Octopus (*Octopus vulgaris*) sub-adults. **Aquaculture**. v.280, p.161-164, 2008.

RODRÍGUEZ, C.; CARRASCO, J. F.; ARRONTE, J. C.; RODRÍGUEZ, M. Common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) juvenile on-growing in floating cages. **Aquaculture**, v.254, p.293-300, 2006.

ROSAS, C.; TUT, J.; BAEZA, J.; SÁNCHEZ, A.; SOSA, V.; PASCUAL, C.; ARENA, L.; DOMINGUES, P.; CUZON, G. Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. **Aquaculture**. v.275, p.291-297, 2008.

SEMMENS, J. M.; PECL, G. T.; VILLANUEVA, R.; JOUFFRE, D.; SOBRINO, I.; WOOD, J. B.; RIGBY, P.R. Understanding octopus growth: patterns, variability and physiology. **Marine and freshwater research**, v.55, p. 367-377, 2004.

SMITH, C. D. Diet of *Octopus vulgaris* in False Bay, South Africa. **Marine Biology**. v.143, p.1127-1133, 2003.

SOBRINO, I.; JUAREZ, A.; REY, J.; ROMERO, Z.; BARO, J. Description of the clay pot fishery in the Gulf of Cadiz (SW Spain) for *Octopus vulgaris*: Selectivity and exploitation pattern. **Fisheries Research**, v.108, p.283–290, 2011.

SOCORRO, J.; ROO, J.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, A.; GUIRAO, R.; REYES, T.; FERNÁNDEZ-PALACIOS, H.; IZQUIERDO, M. S. Engorde de pulpo *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 em jaulas flotantes alimentado exclusivamente com boga *Boops boops* (L. 1758) de descarte de la acuicultura. **Bol. Inst. Esp. Oceanogr.**, v.21, p.189-184, 2005.

SZPILMAN, Marcelo. **Peixes marinhos do Brasil**: guia prático de identificação. Rio de Janeiro: MAUAD, 2000. 288p.

URIARTE, I.; IGLESIAS, J.; DOMINGUES, P.; ROSAS, C.; VIANA, M. T.; NAVARRO, J. C.; SEIXAS, P.; VIDAL, E.; AUSBURGER, A.; PEREDA, S.; GODOY, F.; PASCHKE, K.; FARÍAS, A.; OLIVARES, A.; ZUÑIGA, O. Current status and bottle neck of Octopod aquaculture: The case of American species. **Journal of the World Aquaculture Society**. v.42(6), p.735-752, 2011.

VALVERDE, J. C.; HERNÁNDEZ, M. D.; AGUADO, F.; GARCIA B. G. Growth, feed efficiency and condition of common octopus (*Octopus vulgaris*) fed on two formulated moist diets. **Aquaculture**. v.275, p.266 – 273, 2008.

VAZ-PIRES, P.; SEIXAS, P.; BARBOSA, A. Aquaculture potencial of the common Octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): a review. **Aquaculture**. v.238, p.221-238, 2004.

VELÁSQUES, Mónica Eliana Quintero. **Hábitos alimentarios y estado de madurez macroscópico de las gónadas del pulpo común *Octopus cf. vulgaris* de la región de Santa Marta, caribe colombiano**. 2010. 91p. Monografía (Graduação em Biología) Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá D.C., 2010.

WEELS, Martin John. **Octopus**: Physiology and behavior of an advanced invertebrate. New Fetter Lane, Halsted Press, p.417, 1978.

CAPÍTULO 3 - ASPECTOS DA FISIOLOGIA DIGESTÓRIA DO *Octopus insularis*: DESCRIÇÃO DAS PRINCIPAIS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE ANIMAIS SELVAGENS E COMPARAÇÃO COM ANIMAIS CULTIVADOS

3.1. Introdução

O adequado desenvolvimento de um programa alimentar para a nutrição de cefalópodes é vital para se conseguir uma produção comercial (Rosas *et al.*, 2007). Muitos outros setores da aquicultura que atualmente já possuem um sistema intensivo de cultivo estabelecido com sucesso, como a indústria de cultivo de salmão, relatam que os avanços na compreensão da nutrição de peixes tornou possível o grande desenvolvimento da indústria de produção de peixes voltados para a alimentação (Sinnott, 2002), sendo a produção de rações um dos pontos chave para o desenvolvimento dessa indústria. Dessa forma, para o desenvolvimento de uma ração balanceada para o cultivo de polvos, é necessário que se entenda sua fisiologia digestória (Martínez *et al.*, 2011a).

Semelhante ao *Octopus vulgaris*, o trato digestório do *O. insularis* é constituído de massa bucal, onde pode-se encontrar o bico e a rádula, um par de glândulas salivares anterior (GSA) localizada próximo a massa bucal, um par de glândula salivares posterior (GSP) localizada próxima ao esôfago, um papo (PAP), um estômago muscular (ESTOM), conectado tanto ao ceco pilórico espiralado (CEC) o qual possui uma dupla ligação com uma grande glândula digestória (GD), e com o intestino (INTEST) como pode ser observado na figura 20.

Diversos trabalhos tem demonstrado que existem mudanças no perfil da atividade enzimática digestória de peixes, e outros organismos aquáticos, quando submetidos a mudanças nutricionais e ambientais. Estes estudos tem utilizado a dosagem da atividade das enzimas digestórias para avaliar mudanças na fisiologia digestória do animal testado, correlacionando os resultados encontrados com os obtidos para os parâmetros zootécnicos (Santos *et al.*, *in press*; Aguila *et al.*, 2007; Shyne-Anand *et al.*, 2013).

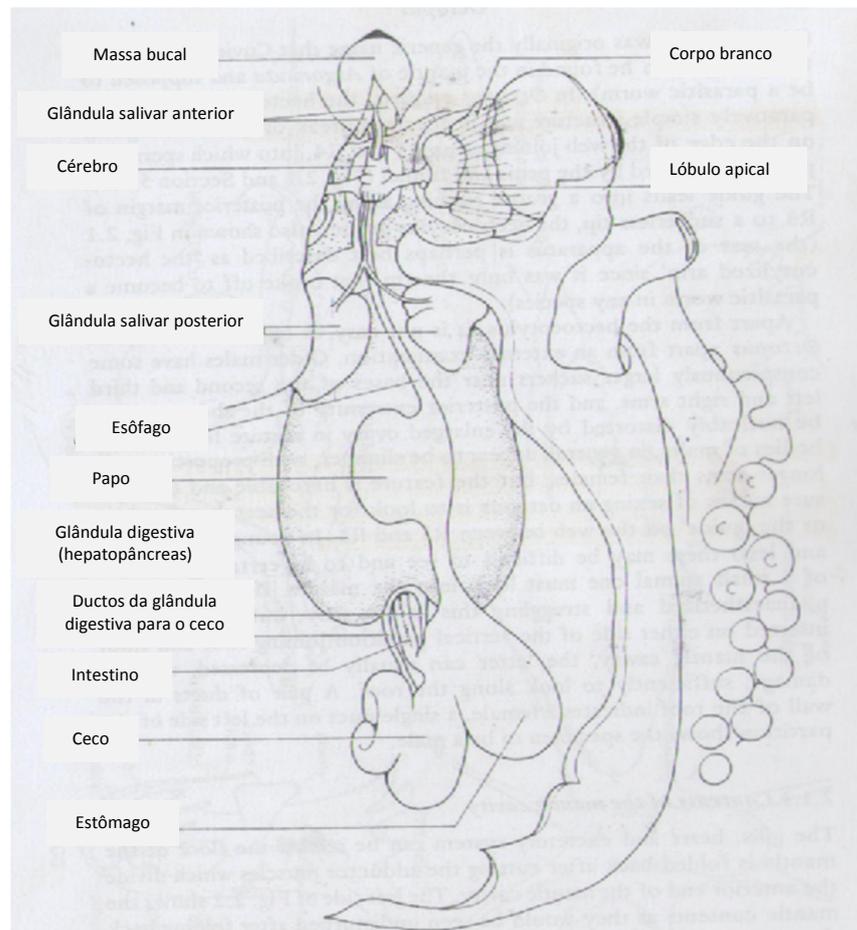


Figura 20: Sistema digestório do *O. vulgaris* (Adaptado de Wells, 1978).

Devido à importância das enzimas digestórias na assimilação de nutrientes, é essencial identificar as principais enzimas digestórias e entender como sua atividade é modificada em alterações fisiológicas. O entendimento da fisiologia digestória fornece pistas sobre as necessidades nutricionais e a ecologia alimentar de uma espécie (Fernandez *et al.*, 2002).

3.2. Objetivos

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade das enzimas digestórias de espécimes de *O. insularis* cultivados comparando-as com as atividades enzimáticas observadas em animais selvagens.

3.3. Objetivos Específicos

Têm-se como objetivos específicos desse capítulo os seguintes:

- Determinação da atividade proteolítica ácida e alcalina em animais selvagens e cultivados de *Octopus insularis*;
- Determinar a atividade de Leucinoaminopeptidase tanto em animais selvagens quanto em animais cultivados de *Octopus insularis*;
- Determinar a atividade de amilase tanto em espécimes selvagens quanto em cultivados de *Octopus insularis*;
- Realizar análise de algumas aminopeptidases em exemplares de *Octopus insularis* selvagens e cultivados e verificar a existência de correlação dessas atividades com a composição do músculo de indivíduos selvagens.

3.4. Metodologia

3.4.1. Captura de animais e sistema de cultivo

Captura de animais:

Os reprodutores utilizados nesse experimento foram capturados no litoral de Itarema – CE, Brasil, por meio de espinheis de fundo de potes, como descrito por Sobrino *et al.*(2011), os quais estavam localizados aproximadamente a 25km da costa. Após a captura os animais foram acondicionados em armadilhas individuais, chamadas “canos de transporte” constituídas de cano de PVC de 100mm de diâmetro e altura de 250mm, revestidos por uma rede de abertura de malha de 5mm.

Os animais capturados foram mantidos, durante a viagem até o cais do porto de Itarema, em água marinha (36‰) com aeração constante. A concentração de oxigênio dissolvido foi sempre superior a saturação, sendo observada uma concentração mínima de 8,5mg/l durante o percurso. Para o transporte do cais do porto para o laboratório, foi também utilizada água do mar e aeração constante. Foi utilizada uma caixa de transporte de 1.000 l de volume nominal, sendo utilizado para o transporte um volume de 350 l.

Sistema de cultivo:

Para cultivar os animais foram utilizadas caixas d’água de fibra de vidro de 500 l de volume nominal, com volume útil de trabalho de aproximadamente 350 l, subdivididas em 2 espaços amostrais. Para a realização da subdivisão foi utilizada tela plástica com abertura de malha de 13mm formando um cilindro de tela com 4 subdivisões, tampado ao fundo e na superfície, deixando apenas uma abertura na superfície para o manejo alimentar e biometrias. Na periferia superior interna de todo o cilindro de tela, foi utilizada uma manta acrílica com uma largura de aproximadamente 15cm para também evitar a fuga dos animais.

Um sistema fechado de recirculação foi utilizado, onde toda a água do sistema (36‰) inicialmente passava por um filtro ascendente de leito de brita e concha de molusco (*Crassostrea rhizophorae*), posteriormente sendo encaminhada para o segundo sistema de filtro, constituído de torres de PVC (200mm) preenchidas com algas calcárias do gênero *Lithothamnium*. A taxa de renovação de água foi sempre mantida em 200% por hora.

O cultivo dos indivíduos foi realizado por um período de 30 dias tendo sido utilizado como alimento siri (*Callinectes bocourti*). Utilizou-se uma taxa de alimentação de 20% da biomassa (peso úmido), sendo realizada uma alimentação ao dia as 09:00 horas.

Utilizou-se um fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, sendo utilizada a iluminação natural da sala e luzes fluorescentes durante o manejo das unidades amostrais.

Durante todo o experimento fez-se o monitoramento diário do pH (pHmetro Hanna HI-98108), salinidade (refratômetro Soma – SHR10), temperatura e oxigênio dissolvido (oxímetro YSI 550A) e concentração de amônia (kit colorimétrico Labcon Test) da água.

3.4.2. Extração enzimática e determinação da concentração de proteína total solúvel

Os animais selvagens ao desembarcar no porto de Itarema foram imediatamente acondicionados em recipiente com água salgada (36%) a uma temperatura aproximada de 5°C, como recomendado por Martínéz *et al.* (2011) e Matinéz *et al.* (2012), para só então ser realizada a dissecação dos animais. Com o auxílio de equipamento cirúrgico todo o trato digestório foi separado na seguinte ordem: massa bucal (BC), glândula salivar anterior (GSA), papo (PP), glândula salivar posterior (GSP), estômago (EST), ceco (CEC), glândula digestória (GD) e intestino (INTEST). Cada órgão foi acondicionado em um tubo com fundo cônico tipo Falcon de 50 ml, o qual foi imediatamente acondicionado em gelo.

Ao final dos 30 dias de cultivo foi realizada a dissecação de 3 indivíduos cultivados. Antes de se realizar a dissecação aplicou-se um jejum de 24 horas aos animais cultivados. Para a obtenção dos órgãos, seguiu-se o mesmo protocolo utilizado para os indivíduos selvagens.

Todos os órgãos colhidos, tanto dos indivíduos selvagens, identificados de A – J, como dos indivíduos cultivados, identificados de I – III, foram conservados em freezer a 20°C até o posterior processamento das amostras.

Nas dependências do Laboratório de Enzimologia – LABENZ da Universidade Federal do Pernambuco – UFPE, os órgãos digestórios de *O. insularis* foram separadamente homogeneizados em solução de água apirogênica (água de injeção) a 5°C contendo NaCl 0,15M, na concentração de 100mg de tecido/ml com exceção da GSA a qual foi

homogeneizada na concentração de 30 mg/ml, segundo protocolo descrito em Bezerra *et al.* (2000; 2001). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 xg a 4°C por 25 minutos e os sobrenadantes (extratos brutos) estocados a -20°C até o momento do seu uso.

A concentração de proteínas totais solúveis em todos os ensaios foi determinada seguindo os procedimentos de Smith (1985) utilizando o kit Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit.

3.4.3. Ensaio enzimáticos

Para a atividade proteolítica alcalina total foi utilizado como substrato azocaseína 1% (p/v), segundo Alencar *et al.* (2003) e Bezerra *et al.* (2005). Todos os ensaios foram realizados na presença de tampão Tris-HCl 10mMpH 8,0. Em microtubos, azocaseína 1% (50µl) preparada em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 foi incubada com extrato bruto (30µl) durante 60 minutos a 25°C. Após a incubação, 240µl de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) foi adicionada a mistura, sendo a mesma incubada novamente durante 15 min. Após esta etapa, a reação foi centrifugada a 8.000 xg por 5 minutos. Em seguida, uma alíquota de 70µl do sobrenadante foi adicionada a 130µl de NaOH 1M em uma microplaca de 96 poços sendo realizada a leitura a 450nm em espectrofotômetro leitor de microplacas (Bio-RadX-Mark Microplate Spectrophotometer). Ensaio controle foram realizados substituindo-se o extrato bruto por NaCl 0,15M na mistura da reação. Para essa atividade enzimática analisou-se GSP, CEC, GD e INT tanto de animais selvagens quanto de cultivados. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi considerada como sendo a quantidade de enzima, na reação, capaz de promover uma mudança de 0,001 na absorbância a 450nm por minuto de reação.

A atividade proteolítica total ácida foi realizada utilizando-se hemoglobina 2% (p/v) preparada em tampão glicina-HCl 0,05M pH 2,0 como substrato. O ensaio foi realizado a partir da incubação de uma mistura contendo 100 µl de substrato adicionado a 50µl de extrato bruto e 350µl de tampão glicina-HCl 0,01M pH 2,0 durante 30 minutos a 37°C. Após a incubação, foi adicionado à mistura 500 µl de TCA 10% (p/v) e a reação foi incubada durante 15 minutos. Após esta etapa, a solução foi centrifugada a 8.000 xg durante 10 minutos a 4°C coletado o sobrenadante o qual a absorbância final foi avaliada a 280nm em espectrofotômetro (Bio-Rad Smart Spec 3000, USA). Ensaio controle foram realizados substituindo-se o extrato bruto por solução de NaCl 0,15M na mistura da reação. Para essa

atividade analisou-se separadamente a GD tanto de animais selvagens quanto de cultivados. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de promover uma alteração de 0,001 na absorvância por miligrama de proteína e por minuto de reação.

A atividade de tripsina foi avaliada utilizando BapNA 8mM (N α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilina) e Tosyl-Pro-Arg-p-Nan 1,5mM (N-Tosylglycyl-L-prolyl-L-arginine 4-nitroanilide). Para as atividades de quimotripsina e leucinoaminopeptidase foi utilizado os substratos SApNA 8mM (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilina) e LeupNan 8mM (Leucino-p-nitroanilina) como substratos, respectivamente. Os ensaios foram realizados em microplaca de 96 poços onde foi incubada, durante 60 minutos a 25°C, uma mistura contendo 30 μ l do extrato bruto adicionado a 30 μ l do substrato e 140 μ l de tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0, sendo realizadas leituras durante o período de incubação no comprimento de onda de 405nm a cada 5 minutos. Para a atividade de tripsina utilizou-se a GSP e GD, para a atividade de quimotripsina utilizou-se a GSP e INT e para a leucinoaminopeptidase utilizou-se a GSA, GSP e CEC. Para todas as atividades mencionadas foram analisados separadamente tanto os animais selvagens quanto os animais cultivados. Uma unidade de atividade enzimática foi determinada como sendo a quantidade de enzima capaz de promover a liberação de 1 μ mol de nitroanilina por minuto, por miligrama de proteína na reação.

A atividade de amilase foi quantificada de acordo com Bernfeld (1955) utilizando amido (2%) como substrato. 20 μ l de extrato bruto foram incubados com 125 μ l de solução de amido e 125 μ l de tampão fosfato 10 mM pH 8,0 contendo 15mM de NaCl a uma temperatura de 25°C. Após 10 minutos de incubação a 37°C, 30 μ l dessa mistura foram adicionados a 300 μ l de 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNSA) e mantido em água fervente (100°C) por 10 minutos de forma a parar a reação. Para o branco do substrato, a alíquota referente ao substrato foi substituída por tampão fosfato 10mM pH 8,0. Utilizaram-se alíquotas de 200 μ l em uma microplaca de 96 poços sendo realizada a leitura a 570nm em espectrofotômetro leitor de microplacas (Bio-Rad X-Mark Microplate Spectrophotometer). Para essa atividade analisou-se separadamente a GSA, GSP, CEC, GD e INT separadamente tanto dos animais selvagens quanto dos animais cultivados. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1,0mg de maltose por miligrama de proteína por minuto de reação.

Para a determinação da atividade de aminopeptidases, 9 substratos específicos β -naftilamida foram utilizados (alanina, arginina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, prolina, serina e tirosina). O ensaio foi realizado em microtubos, a 37°C. O substrato (40 μ l) foi incubado com 40 μ l de água destilada, 40 μ l de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0 e 480 μ l de tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,0. Após a incubação, à reação foi adicionado 200 μ l de reagente Garnet preparado em tampão acetato de sódio 0,2M, pH 4,2, contendo Tween 10% (v/v). Posteriormente 200 μ l da mistura foram transferidos para uma microplaca de 96 poços. A absorbância foi lida a 525nm com um leitor de microplacas (Bio-Rad X-Mark Microplate Spectrophotometer). Para todos os 9 substratos utilizou-se a GSA, GSP, CEC e GD tanto de animais selvagens quanto de cultivados. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 1 μ mol de β -naftilamida por minuto e por miligrama de proteína.

3.4.4. Análise de regressão de atividade de algumas aminopeptidases da GSP de animais selvagens e a composição do músculo de animais selvagens

Após a determinação das atividades das aminopetidases realizou-se análise de correlação entre as atividades de histidina, tirosina, prolina, serina, alanina, leucina e arginina observadas na GSP de animais selvagens com a composição (aminograma) do musculo de animais selvagens.

Para a análise da em aminoácidos de animais selvagens, uma amostra composta de musculo de 4 indivíduos de peso semelhante foi enviado para o laboratório LABTEC – Laboratório de Análises Químicas LTDA. As análises foram realizadas por cromatografia líquida (HPLC).

3.5. Resultados

A atividade enzimática proteolítica total (alcalina e ácida) nos extratos dos diversos órgãos digestórios de *O. insularis* foi avaliada utilizando azocaseína 1% (p/v) e hemoglobina 2% (p/v) estão apresentadas nas tabelas 15 e 16. Em ambos os grupos (Selvagem e Cultivado), atividade proteolítica alcalina total foi observada nos extratos brutos de GSP, GD,

ceco e intestino, sendo GSP o órgão que apresentou a maior atividade proteolítica. Foi observada também uma redução significativa na atividade proteolítica alcalina total do extrato bruto da GSP no grupo cultivado quando comparado com o selvagem. Apenas o extrato bruto da GD apresentou atividade proteolítica ácida quando hemoglobina 2% (p/v; pH 2,5) foi utilizada e não houve diferença entre os grupos selvagem e cultivado.

Tabela 15: Atividade proteolítica alcalina total (U/mg), utilizando azocaseína 1% (p/v), na glândula salivar posterior (GSP), glândula digestiva (GD), ceco (CEC) e intestino (INTEST) de indivíduos selvagens e cultivados.

	GSP*	CEC	GD	INTEST
Selvagem	0,487 ± 0,150	0,048 ± 0,016	0,043 ± 0,005	0,125 ± 0,005
Cultivado	0,241 ± 0,027	0,055 ± 0,019	0,034 ± 0,004	0,117 ± 0,016

* - Valores estatisticamente diferentes entre selvagens e cultivados

Tabela 16: Atividade proteolítica ácida total (U/mg), utilizando hemoglobina 2% (p/v), na glândula digestiva (GD) de animais selvagens e cultivados.

	GD
Selvagem	0,607 ± 0,117
Cultivado	0,881 ± 0,215

Em ambos os grupos, a maior atividade de tripsina foi observada na GSP (Tabela 17), entretanto pôde-se observar menor atividade em GD. O grupo cultivado apresentou diminuição na atividade de tripsina tanto na GSP quanto na GD, sendo essa diminuição mais expressiva na GD.

Tabela 17: Atividade de tripsina (U/mg), utilizando Tosyl-Pro-Arg-p-Nan 1,5mM, na glândula digestiva (GD) e glândula salivar posterior (GSP) de animais selvagens e cultivados.

	GD*	GSP*
Selvagem	1,82 ± 0,06	5,96 ± 1,10
Cultivado	0,31 ± 0,08	3,61 ± 0,61

* - Valores estatisticamente diferentes entre selvagens e cultivados

Quanto a quimotripsina, foi observada atividade somente em GSP e INTEST em ambos os grupos, sendo GSP o órgão com maior atividade no grupo cultivado enquanto o intestino foi o órgão com maior atividade no grupo selvagem. Nos dois órgãos (GSP e intestino) pôde-se observar uma redução significativa na atividade de quimotripsina do grupo cultivado quando comparado com o grupo selvagem (Tabela 18).

Tabela 18: Atividade de quimotripsina (U/mg), utilizando SApNA 8mM, na glândula salivar posterior (GSP) e intestino (INTEST) de indivíduos selvagens e cultivados.

	GSP*	INTEST*
Selvagem	1,08 ± 0,02	1,64 ± 0,28
Cultivado	0,75 ± 0,02	0,57 ± 0,02

*** - Valores estatisticamente diferentes entre selvagens e cultivados**

Para a leucinoaminopeptidase foi observada atividade tanto da GSA, quanto na GSP e CEC, sendo observada no CEC a maior atividade (Tabela 19). Para todos os órgãos foi observada maior atividade nos indivíduos selvagens frente aos indivíduos cultivados, no entanto no CEC a elevação foi muito maior chegando a mais de 500%, quando Leu-p-Nan foi utilizado como substrato.

Tabela 19: Atividade de Leucinopeptidase (U/mg), utilizando LeupNan 8mM, na glândula salivar anterior (GSA), glândula salivar posterior (GSP) e ceco (CEC) de indivíduos selvagens e cultivados .

	GSA*	GSP*	CEC*
Selvagem	0,57 ± 0,13	0,43 ± 0,005	2,38 ± 0,33
Cultivado	0,28 ± 0,064	0,14 ± 0,014	0,45 ± 0,16

*** - Valores estatisticamente diferentes entre selvagens e cultivados**

A atividade de outras aminopeptidases foi avaliada utilizando substratos β-naftilamida e encontra-se apresentada na tabela 20. Foi observada atividade de aminopeptidases nos órgãos: GSA, GSP e GD, sendo a GSA o órgão que apresentou as maiores atividades.

Tabela 20: Atividade de aminopeptidases utilizando-se substratos específicos β -naftilamida para alanina, arginina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, prolina, serina e tirosina, em glândula salivar posterior (GSP), glândula digestiva (GD) e glândula salivar anterior (GSA) de animais do grupo selvagem e cultivado.

	GSP		GD		GSA	
	Selvagem	Cultivado	Selvagem	Cultivado	Selvagem	Cultivado
Alanina	0,064 \pm 0,008*	0,027 \pm 0,006*	0,081 \pm 0,016*	0,034 \pm 0,010*	0,717 \pm 0,031 *	0,612 \pm 0,066*
Arginina	0,077 \pm 0,016	0,051 \pm 0,007	0,046 \pm 0,005*	0,014 \pm 0,007*	0,262 \pm 0,005*	0,229 \pm 0,013*
Glicina	-	-	-	-	0,106 \pm 0,004*	0,051 \pm 0,018*
Histidina	0,022 \pm 0,007	0,029 \pm 0,006	-	-	0,120 \pm 0,013*	0,081 \pm 0,004*
Isoleucina	-	-	-	-	-	-
Leucina	0,056 \pm 0,006*	0,037 \pm 0,002*	0,041 \pm 0,001	0,040 \pm 0,012	0,078 \pm 0,011	0,071 \pm 0,003
Prolina	0,040 \pm 0,016*	0,008 \pm 0,004*	-	-	0,038 \pm 0,001*	0,008 \pm 0,004*
Serina	0,035 \pm 0,009*	0,020 \pm 0,001*	-	-	0,147 \pm 0,017*	0,094 \pm 0,016*
Tirosina	0,029 \pm 0,004	0,025 \pm 0,011	0,041 \pm 0,013	0,017 \pm 0,007	0,097 \pm 0,013	0,106 \pm 0,006

*- Valores estatisticamente diferentes entre o grupo selvagem e o cultivado em cada órgão.

Além da atividade, houve variação quanto às aminopeptidases presentes no extrato bruto de cada órgão, sendo GSA e GSP os órgãos que apresentaram maior variedade de aminopeptidases. Pôde-se observar redução nas atividades de muitas aminopeptidases testadas no grupo cultivado quando comparadas ao grupo selvagem. Uma forte correlação positiva ($R^2 = 0,9784$) foi observada entre a atividade das aminopeptidases da GSP e a composição do músculo no grupo selvagem, como observado na figura 21. As aminopeptidases que apresentaram as maiores atividades foram histidina, tirosina, prolina, serina, leucina e arginina (ANEXO A).

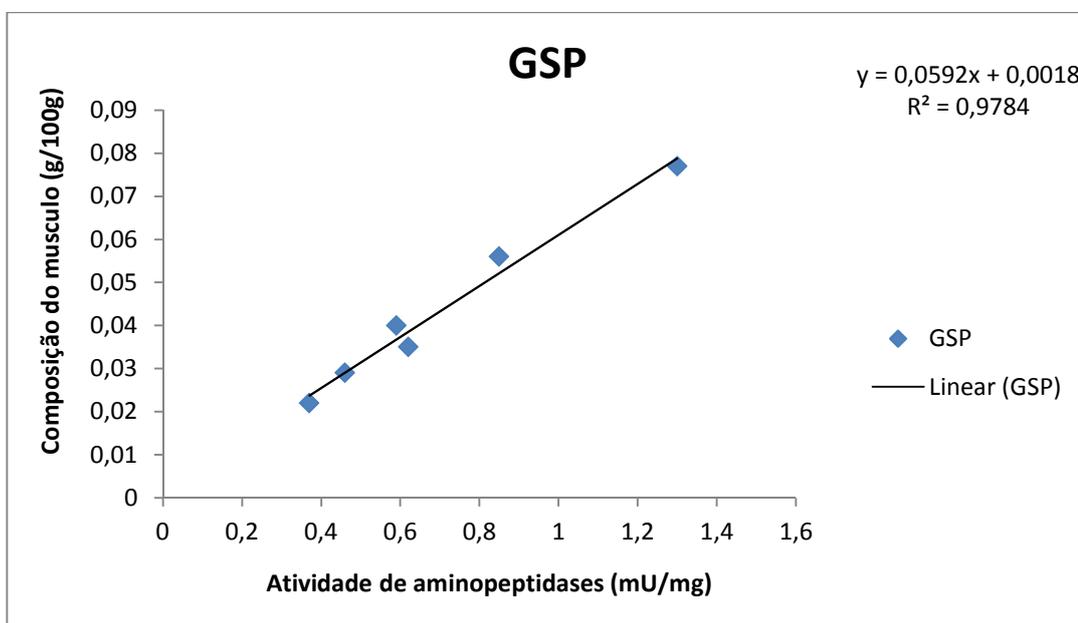


Figura 21: Correlação da concentração dos aminoácidos histidina, tirosina, prolina, serina, leucina e arginina no músculo do *O. insularis* e a atividade observada na GSP

A atividade amilolítica foi avaliada utilizando amido 2% (p/v) como substrato sendo os resultados apresentados na tabela 21. A atividade amilolítica foi registrada ao longo de praticamente todo o trato digestório do *O. insularis* ocorrendo nos órgãos: GSA, GSP, CEC, GD e no INTEST, sendo maior neste último. O grupo selvagem apresentou atividades bem mais elevadas quando comparado ao grupo cultivado (Tabela 21).

Tabela 21: Atividade de amilase (mg maltose/min/mg de proteína), utilizando amido (2%), em glândula salivar anterior (GSA), glândula salivar posterior (GSP), ceco (CEC), glândula digestiva (GD) e intestino (INTEST), de animais selvagens e cultivados.

	GSA*	GSP*	CEC*	GD*	INTEST*
Selvagem	32,83 ± 1,93	35,51 ± 2,29	91,24 ± 29,42	78,2 ± 17,54	171,67 ± 10,87
Cultivado	18,80 ± 3,95	9,62 ± 0,93	35,94 ± 6,70	26,92 ± 0,97	26,47 ± 11,7

* - Valores estatisticamente diferentes entre selvagens e cultivados

3.6. Discussão

Em cefalópodes, enzimas proteolíticas, amilolíticas e lipolíticas existem em diferentes tecidos do trato digestório. Suas atividades variam de acordo com o tecido e o estágio da digestão. Apesar das atividades enzimáticas serem encontradas praticamente em todo o lúmen do trato digestório, apenas alguns órgãos apresentam essa atividade a nível epitelial. Não se verifica a secreção de enzimas pelo epitélio do esôfago e estômago, sendo o alimento digerido nesses órgãos por enzimas de outras fontes, como a glândula salivar anterior (GSA) e glândula salivar posterior (GSP) (Boucaud-Camou e Rodoni-Boucher, 1983).

Pesquisadores avaliando outras espécies de polvo, como o *Octopus maya*, tem observado atividade de peptidases alcalinas em glândula digestória (GD) e glândula salivar posterior (GSP) (Martínez *et al.*, 2011b). Entretanto, apesar de ser uma espécie do mesmo gênero, esta atividade não ocorreu em *O. insularis* utilizando os substratos testados. Nesta espécie o órgão que apresentou maior atividade proteolítica alcalina foi a glândula salivar posterior e não a glândula digestiva. Boucaud-Camou e Rodoni-Boucher (1983) relatam que atividade proteolítica ácida também foi encontrada na glândula digestiva de *O. vulgaris*, o qual apesar de ser uma espécie fenoticamente semelhante ao *O. insularis*, recentemente foi classificada, geneticamente e taxonomicamente, como espécies distintas (Leite *et al.*, 2008).

Martínez *et al.* (2011) observaram uma faixa ácida de pH ótimo para a atividade proteolítica do extrato bruto da glândula digestória (GD) de *O. maya*, apesar de também ser observado atividade de tripsina e quimotripsina no extrato. No presente trabalho também foi observada atividade proteolítica total ácida e de tripsina na glândula digestiva GD de *O. insularis*. Como não foi observada atividade proteolítica total alcalina significativa pode-se

sugerir para *O. insularis* que a atividade proteolítica ácida da glândula digestiva (GD) apresenta origem intracelular e mostra o importante papel da glândula digestiva (GD) neste tipo de digestão. De acordo com Martínez *et al.* (2011) a forte inibição (75%) da atividade proteolítica ácida da glândula digestiva (GD) de *O. maya* por pepstatina A, indica a possibilidade de enzimas lisossomais como as catepsinas serem as responsáveis pela atividade proteolítica ácida observada no órgão dessa espécie.

Alguns estudos com diversos animais aquáticos, inclusive com polvos (Hernández-Santoyo *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 2005; Rosas *et al.*, 2008; Marcuschiet *et al.*, 2010; Quintana *et al.*, 2011), utilizaram como substrato para análise de atividade triptica o Benzoil-Arginina-p-nitroanilida (BAPNA). Entretanto, os extratos dos órgãos do trato digestório de *O. insularis* não apresentaram atividade enzimática na presença deste substrato. A maior atividade de tripsina observada na glândula salivar posterior (GSP) pode estar relacionada não só a digestão da proteína da dieta, como também no seu conhecido papel chave na ativação de zimogênios no processo digestório (Sanioto, 2008; Motta 2011). Também se pode observar através deste e de outros resultados que essa glândula apresenta alto conteúdo de enzimas proteolíticas, comparada aos outros órgãos digestórios, demonstrando seu papel fundamental para a digestão de *O. insularis*. Além disso, a presença de exo e endo peptidases no mesmo compartimento do trato digestório é uma importante vantagem adaptativa, pois torna a digestão mais eficiente (Buarque *et al.*, 2009), uma vez que havendo a ação de endopeptidases ocorrerá a liberação de um maior número de substratos disponíveis para a atuação das exopeptidases, acelerando assim o processo digestório.

A glândula salivar posterior aparentemente possui um papel chave no processo digestório. Boucaud-Camou e Rodoni-Boucher (1983) relatam que as enzimas responsáveis pela pré-digestão externa podem ser oriundas da glândula salivar posterior. Esses autores relatam ainda a existência de um grande conjunto de enzimas, particularmente as proteolíticas, na glândula salivar posterior de animais do gênero *Octopus*. Grisley e Boyle (1987) demonstraram a grande importância da saliva, oriunda da glândula salivar posterior, no processo de soltura da carne da carapaça de crustáceos, e correlacionaram essa atividade com as peptidases presentes na saliva.

Semelhante ao observado para as atividades de quimotripsina, a atividade de leucino aminopeptidase foi mais elevada no grupo selvagem. A elevada atividade no ceco dessa peptidase, principalmente em indivíduos selvagens, pode estar relacionada com a diferente

alimentação desses animais em seu meio natural. Segundo Boucaud-Camou e Rodoni-Boucher (1983) o ceco é o principal órgão de absorção de aminoácidos.

Estudos sobre enzimas digestórias de organismos aquáticos tem demonstrado que a atividade de amilase está relacionada à dieta natural das espécies, onde herbívoros e onívoros apresentam alta atividade quando comparados aos carnívoros (Castro *et al.*, 2012). Em cefalópodes a atividade de amilase pode ser observada em quase todas as localidades em que ocorre atividade proteolítica: lúmen do intestino (gut), glândula salivar anterior e glândula salivar posterior (em sepias), glândula digestiva (em sepias e eledone), CEC e extratos de tecido (ex.: muscular). Nenhuma atividade foi relatada no esôfago cuticulado e no epitélio estomacal. Atividade de hialuronidase, amilase e celulase já foram reportadas na GSP de animais do gênero *Octopus*. Em sepias a atividade amilolítica foi histoquimicamente localizada no lúmen dos túbulos e nas células tipo “boules”, principalmente na região distal e medial das células. Também foi observada a presença de atividade celulolítica na GD de animais do gênero *Octopus* (Boucaud-Camou e Rodoni-Boucher, 1983). Segundo Weels (1978), apesar de serem animais estritamente carnívoros, atividade de celulase já foram reportadas na GD de cefalópodes. Visto que a proteína é um dos ingredientes mais onerosos na formulação de dietas, o fato de *O. insularis* ter apresentado atividade amilolítica amplamente distribuída no trato digestório, indica que ele possivelmente pode aproveitar carboidratos da dieta como fonte de energia, desviando assim a maior parte da proteína da dieta para o seu crescimento muscular.

Foi observado que na maioria dos aminoácidos testados para a atividade de aminopeptidases, houve maior atividade no grupo selvagem. Novamente a alteração na atividade enzimática pode estar relacionada com uma dieta diferenciada aplicada ao grupo cultivado frente à dieta do grupo selvagem.

As maiores atividades de aminopeptidases observadas na GSA, indicam que este órgão tem papel fundamental na digestão dos peptídeos oriundos da etapa inicial do processo digestório onde atua a GSP. Além disso, analisando a atividade de aminopeptidases nos camarões *Farfantepenaeus paulensis* e *Farfantepenaeus subtilis*, Buarque *et al.* (2009, 2010) observaram correlação positiva entre atividade de aminopeptidases para aminoácidos limitantes e o requerimento destes aminoácidos em dietas para camarões. Desta forma, os autores demonstraram a importância destes resultados para o estabelecimento de diretrizes a respeito dos requerimentos nutricionais de uma determinada espécie. A correlação positiva observada entre a atividade de aminopeptidases e a composição de aminoácidos no músculo

de *O. insularis* selvagens sugere que possivelmente existe relação entre a atividade dessas enzimas e a incorporação de amino ácidos no músculo por essa espécie, reforçando assim o papel da eficiência na digestão de nutrientes no crescimento muscular, principalmente quando os animais estão em fase de desenvolvimento.

O grupo cultivado apresentou atividades proteolíticas menores quando comparado ao grupo selvagem. Os resultados do capítulo 02 mostram que o alimento siri teve boa aceitação durante os testes de engorda, resultando em uma taxa de crescimento absoluta (AGR) de 9,4 g/dia e uma taxa específica de crescimento (SGR) de 2,1 %/dia ao ser utilizado temperatura de cultivo de 28°C. Dessa forma esse alimento, que não é o alimento comumente consumido por animais selvagens, devido a sua composição, pode ter influenciado a síntese de enzimas digestórias no grupo cultivado.

De acordo com Van Wormhoudt *et al.* (1980) as enzimas digestórias podem ter sua síntese influenciada tanto pelo crescimento do animal, quanto por mudanças na dieta ou manejo, buscando adaptações para otimizar o processo digestório, e assim assimilar de forma mais eficiente os nutrientes. Estes fatos são sustentados por trabalhos com organismos aquáticos. Aguilla *et al.* (2007) observaram que o polvo *O. maya* apresentou rápida resposta da fisiologia digestória as alterações da dieta. Santos *et al.* (in press) evidenciou mudanças consideráveis no perfil de peptidases, quando expôs a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* a diferentes dietas. Usando zimograma como ferramenta, a adaptação das peptidases da tilápia do Nilo a dietas distintas fornecidas foi evidenciada, tanto aumentando como diminuindo a atividade dessas enzimas. Uma vez que a síntese de enzimas é um processo oneroso para a célula, o animal tende a adaptar o conteúdo das enzimas digestórias, modulando a síntese de cada enzima de acordo com a sua especificidade e especialidade, visando assim o melhor aproveitamento dos nutrientes de cada dieta específica.

3.7. Conclusões

- A análise das atividades enzimáticas em todo o trato digestório do *Octopus insularis* mostram que se trata de uma espécie extremamente especializada em seu processo digestório de forma a conseguir um grande aproveitamento do alimento consumido. A presença de endo e exopeptidases no mesmo órgão digestório demonstra confirma a grande eficiência digestória dessa espécie;
- Notadamente a glândula salivar anterior (GSA) e a glândula salivar posterior (GSP) apresentam atividade elevada na obtenção de aminoácidos a partir de peptídeos maiores;
- Ao se determinar a correlação entre a composição do musculo do *Octopus insularis* com a atividade de certas aminopeptidases pode-se inferir que esses aminoácidos apresentam grande importância na dieta desta espécie;
- A variação da atividade das enzimas digestórias entre animais selvagens e cultivados certamente foi devido à modificação da dieta utilizada;
- A atividade de amilase, tanto em animais selvagens quanto em animais cultivados dá subsídio para o desenvolvimento de inúmeras outras pesquisas, pois mesmo se tratando de um animal estritamente carnívoro existe a possibilidade de se realizar a inclusão de carboidratos na dieta do *Octopus insularis*, de modo a se conseguir uma dieta de menor custo no futuro;
- Pesquisas adicionais devem ser conduzidas também quanto às atividades de lipases, uma vez que o conhecimento da atividade dessas enzimas digestórias possui também um papel fundamental para uma futura elaboração de ração para o desenvolvimento do cultivo industrial do *Octopus insularis*.

3.8. Referências

AGUILA, J.; CUZON, G.; PASCUAL, C.; DOMINGUES, P. M.; GAXIOLA, G.; SÁNCHEZ, A.; MALDONADO, T.; ROSAS, C. The effect of hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss and Solis) diet: Digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. **Aquaculture**.v.273, p.641-655, 2007.

ALENCAR, R. B.; BIONDI, M. M.; PAIVA, P. M. G.; VIEIRA, V. L. A.; CARVALHO JUNIOR, L. B.; BEZERRA, R. S. Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, p. 279-284, 2003.

BERNFELD, P. Amylases, α and β . IN: COLOWICK, S. P. & KAPLAN, N. O. (Eds.) **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, 1955.

BEZERRA, R.S.; SANTOS, J. F.; LINO, M. A. S.; VIEIRA, V. L. A.; CARVALHO JUNIOR, L. B. Characterization of stomach and pyloric caeca proteinases of tambaqui (*Colossomamacropomum*). **Journal of Food Biochemistry**.v.24, 189-199, 2000.

BEZERRA, R. S.; SANTOS, J. F.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, M. T. S.; COELHO. L. C. B. B.; VIEIRA, V. L. A.; CARVALHO JR, L.B. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossomamacropomum*). **Journal of Food Biochemistry**.v.25, p.199-210, 2001.

BEZERRA, R. S.; LINS, E. J. F.; ALENCAR, R. B.; PAIVA, P. M. G.; CHAVES, M. E. C.; COELHO, L. C. B. B.; CARVALHO JR, L. B. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromisniloticus*). **Process Biochemistry**.v.40,p.1829-1834, 2005.

BOUCAUD-CAMOU, E.; BOUCHER-RODONI, R. Feeding and Digestion in Cephalopods. In: Wilbur, K. L. & Saleuddin, A. S. M. **The Molluska**.v.5 Physiology Part 2: London: Academic Press, 1983. 500p.

GRISLEY, M. S.; BOYLE, P. R. Biossay and proteolytic activity of digestive enzymes from octopus saliva. **Comp. Biochem. Physiol.** v.88(B), p.1117-1123, 1987.

BUARQUE, D. S.; CASTRO, P. F.; SANTOS, F. M. S.; LEMOS, D.; CARVALHO JÚNIOR, L. B.; BEZERRA, R. S. Digestive peptidases in the midgut gland of pink shrimp *Farfantepenaeuspaulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaidae). **Aquaculture Research**.v.40, p.861-870, 2009.

BUARQUE, D. S.; CASTRO, P. F.; SANTOS, F. M. S.; AMARAL, I. P. G.; OLIVEIRA, S. M.; ALVES, K. B.; CARVALHO JUNIOR, L. B.; BEZERRA, R. S. Digestive proteinases and peptidases in the hepatopancreas of the southern shrimp (*Farfantepenaeus subtilis*) in two sub-adult stages. **Aquaculture Nutrition**.v.16, p.359-368, 2010.

CASTRO, P. F.; FREITAS JÚNIOR, A. C. V.; SANTANA, W. M.; COSTA, H. M. S.; CARVALHO JÚNIOR, L. B. BEZERRA, R. S. Comparative study of amylases from the midgut gland of three species of penaeid shrimp. **Journal of Crustacean Biology**.v.32(4), p.607-613, 2012.

FERNÁNDEZ GIMENEZ, A. V.; GARCÍA-CARREÑO, F. L.; NAVARRETE DEL TORO, M.A; FENUCCI, J. L. Digestive proteinases of *Artemia longinaria* (Decapoda, Penaeidae) and relationship with molting. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**. v.132, p.593-598, 2002.

FU, X.; XUE, C.; MIAO, B.; LI, Z.; GAO, X.; YANG, W. Characterization of proteases from the digestive tract of sea cucumber (*Stichopus japonicus*): High alkaline proteases activity. **Aquaculture**.v.246, p.321-329, 2005.

HERNÁNDEZ-SANTOYO, A.; HERNÁNDEZ-ARANA, A.; ARREGUÍN-ESPINOSA, R.; RODRÍGUES-ROMERO, A. Purification and characterization of several digestive proteases from the blue abalone, *Haliotis fulgens*. **Aquaculture**.v.159, p.203-216, 1998.

LEITE, T. S.; HAIMOVICI, M.; MOLINA, W.; WARNKE, K. Morphological and genetic description of *Octopus insularis* new species (Cephalopoda : Octopodidae), a new cryptic species in the *Octopus vulgaris* complex from the tropical Southwestern Atlantic. **Journal of Molluscan Studies**, v. 74, p. 63–74, 2008.

MARCUSCHI, M.; ESPÓSITO, T. S.; MACHADO, M. F. M.; HIRATA, I. Y.; MACHADO, M. F. M.; SILVA, M. V.; CARVALHO JÚNIOR, L. B.; OLIVEIRA, V.; BEZERRA, R. S. Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the amazonian fish tambaqui (*Colossomacropomum*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**.v.396, p.667-673, 2010.

MATINÉZ, R.; LÓPEZ-RIPOLL, E.; AVILA-POVEDA, O. H.; SANTOS-RICALDE, R.; MASCARÓ, M.; ROSAS, C. Cytological ontogeny of the digestive gland in post-hatching *Octopus maya*, and cytological background of digestion in juveniles. **Aquatic Biology**.v.11, p.249-261, 2011a.

MARTÍNEZ, R.; SÁNTOS, R.; ÁLVAREZ, A.; CUZÓN, G.; ARENA, L.; MASCARÓ, M.; PASCUAL, C.; ROSAS, C. Partial characterization of hepatopancreatic and extracellular digestive proteases of wild and cultivated *Octopus maya*. **Aquaculture International**, v. 19, p. 445-457, 2011b.

MARTINÉZ, R.; SANTOS, R.; MASCARÓ, M.; CANSECO, L.; CAAMAL-MONSREAL, C.; ROSAS, C. Digestive dynamics during chyme formation of *Octopus maya* (Mollusca, Cephalopoda). **Aquaculture Research**. v.43, 1119-1126, 2012.

MOTTA, VALTER TEIXEIRA. **Bioquímica**. Rio de Janeiro, editor Científica, 2ªed, p.463, 2011

QUINTANA, D.; ROSAS, C.; MORENO-VILLEGAS, E. Relationship between nutritional and rearing parameters of *Octopus maya* juveniles fed with different rations of crab paste. **Aquaculture Nutrition**.v.17, p.379-388, 2011.

ROSAS, C.; CUZON, G.; PASCUAL, C.; GAXIOLA, G.; CHAY, D.; LÓPEZ, N.; MALDONADO, T.; DOMINGUES, P. M. Energy balance of *Octopus maya* fed crab or an artificial diet. **Marine Biology**.v.152, p.371-381, 2007.

ROSAS, C.; TUT, J.; BAEZA, J.; SÁNCHEZ, A.; SOSA, V.; PASCUAL, C.; ARENA, L.; DOMINGUES, P. CUZON, G. effect of tipe of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. **Aquaculture**. v.275, p.291-297, 2008.

SANIOTO, S. M. L. Fisiologia do sistema digestório. In: Aires, Margarida de Melo, **Fisiologia**. São Paulo, Guanabara Koogan, 3ªed, p.1232, 2008.

SANTOS, J. F.; CASTRO, P. F.; LEAL, A. L. G.; FREITAS JUNIOR, A. C. V.; LEMOS, D.; CARVALHO JUNIOR, L. B.; BEZERRA, R.S. Digestive enzyme activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) submitted to different dietary levels of shrimp protein hydrolysate. **Aquaculture International**. *In press*. DOI 10.1007/s10499-012-9589-2

SHYNE ANAND, P. S.; KOHLI, M. P. S.; DAM ROY, S.; SUNDARAY, J. K.; KUMAR, S.; SINHA, A.; PAILAN, G. H.; SUKHAN, M. K. Effect of dietary supplementation of periphyton on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. **Aquaculture**.v.392, 59-68, 2013.

SINNOTT, R. Fish farming and the feed companies. In: Stead, S. M.; Laird, L., **Handbook of Salmon Farming**. Chichester: Springer, 2002. 502p.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**.v.150(1), p.76-85, 1985.

SOBRINO, I.; JUAREZ, A.; REY, J.; ROMERO, Z.; BARO, J. Description of the clay pot fishery in the Gulf of Cadiz (SW Spain) for *Octopus vulgaris*: Selectivity and exploitation pattern. **FisheriesResearch**, v.108, p.283–290, 2011.

VAN WORMHOUDT, A.; CECCALDI, J.H.; MARTIN, B.J. Adaptation de la teneur en enzymes digestives de l'hepatopancreas de *Palaemon serratus* (CrustaceaDecapoda) a la composition d'aliments experimentaux. **Aquaculture**. v.21, p.63–78, 1980.

WEELS, Martin John. **Octopus**: Physiology and behavior of an advanced invertebrate. New Fetter Lane, Halsted Press, p.417, 1978.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa tese teve como foco principal o levantamento holístico de dados quanto à espécie *Octopus insularis*, espécie essa endêmica do nordeste do Brasil. A descrição de formas jovens dessa espécie faz parte da elevação do conhecimento não apenas do *Octopus insularis*, mas da biota marinha como um todo. O conhecimento quanto à quantidade de ovos gerado por fêmeas de *Octopus insularis* e sua densidade de ovos por unidade de comprimento certamente auxiliarão estudos futuros caso venha-se a desenvolver métodos de reprodução e larvicultura dessa espécie em cativeiro.

Para o desenvolvimento da aquicultura do *Octopus insularis* faz-se necessário o mínimo de informações como potencial de crescimento, hábitos alimentares, eficiência alimentar, possibilidade do uso de sistemas intensivos de cultivo, dentre outras.

Uma vez conjecturada a possibilidade da aquicultura do *Octopus insularis* devido ao crescimento satisfatório obtido em ensaios laboratoriais e em campo, logo se imagina o desenvolvimento de um alimento balanceado visando à redução de custos na produção, bem como a melhoria nos índices de crescimento e incorporação do alimento. O conhecimento das enzimas utilizadas no processo digestório tais com a tripsina, quimotripsina, proteases totais ácidas e alcalinas, bem como as aminopeptidases, é fundamental para o desenvolvimento de rações para qualquer espécie animal. Dessa forma, os resultados desse trabalho são de suma importância, pois, além de não se disponibilizar de muitas informações dessa natureza para cefalópodes em geral, nada se tem para essa espécie – *Octopus insularis*. Deste modo, essas informações dão subsídios para estudos futuros voltados para o desenvolvimento de rações específicas para a espécie estudada.

**ANEXO A – AMINOGRAMA DE AMOSTRA COMPOSTA DO MUSCULO DE 4
EXEMPLARES DE *Octopus insularis***



LABTEC - LABORATÓRIO DE ANÁLISES QUÍMICAS LTDA.
 Rua José Agostinho, 450 - Remanso Campineiro, Hortolândia - SP - CEP: 13184-510
 Telefone: (19) 3897-6412 / 3227-9994 / 3729-4445
 e-mail: labtec@labtecanalises.com.br Visite nosso site: www.labtecanalises.com.br

RELATÓRIO DE ANÁLISE N° 834204-1

Cliente: ASSOC. CIENTIFICA DE ESTUDOS AGRAR.-ACEG	Código do Cliente: 1621/23006
Endereço: AV. MISTER HULL N°2977 BLOCO 847 BAIRRO: CAMPOS DO PICI	
Cidade: FORTALEZA - CE	CEP: 60356-000
CNPJ: 04.404.093/0001-70	IE:
Fone: (85) 3366-9736	Fax:
Contato: DAVID ARAUJO BORGES	

Amostra: POLVO MUSCULO

Número da Amostra: 0834204

Data de Recebimento
da Amostra: 23/12/2009

Data de Realização
do ensaio: 29/12/2009

Data de Emissão
do relatório: 15/01/2010

Análise	Método	Incerteza	Resultado	Especificação
PROTEINA BRUTA (g/100g)			15,470	-----
NITROG NAO PROTEICO (g/100g)	KJELDAHL		0,220	-----
LÍPIDEOS TOTAIS (g/100g)	GRAVIMETRICO		0,350	-----
UMIDADE (g/100g)	A.O.C.S.		84,050	-----
MATERIA MINERAL (g/100g)	A.O.C.S.		1,610	-----
ALANINA (g/100g)	HPLC		0,730	-----
ARGININA (g/100g)	HPLC		1,300	-----
ACIDO ASPARTICO (g/100g)	HPLC		1,320	-----
GLICINA (g/100g)	HPLC		0,940	-----
ISOLEUCINA (g/100g)	HPLC		0,540	-----
LEUCINA (g/100g)	HPLC		0,850	-----
ACIDO GLUTAMICO (g/100g)	HPLC		1,930	-----
LISINA (A.A) (g/100g)	HPLC		1,320	-----
CISTINA (g/100g)	HPLC		0,420	-----
METIONINA (g/100g)	HPLC		0,360	-----
FENILALANINA (g/100g)	HPLC		0,440	-----
TIROSINA (g/100g)	HPLC		0,460	-----
TREONINA (g/100g)	HPLC		0,570	-----
TRIPTOFANO (g/100g)	HPLC		0,070	-----
PROLINA (g/100g)	HPLC		0,590	-----
VALINA (g/100g)	HPLC		0,500	-----
HISTIDINA (g/100g)	HPLC		0,370	-----
SERINA (g/100g)	HPLC		0,620	-----
.				
.				
.				
.				
.				
.				
.				

Comentários
Laboratório:

ANALISE REALIZADA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA (HPLC).
 MÉTODO DESENVOLVIDO "IN HOUSE"
 RESULTADO EXPRESSO EM AMINOÁCIDOS TOTAIS

Rosimeire L. Santos Silva
 Analista de Laboratório
 CRQ - IV Região: 04442431

Paulo Rogério Ferro
 Responsável Técnico
 CRF-SP 32126

Os Resultados referem-se exclusivamente à amostra recebida pelo Laboratório. Este relatório só de ser reproduzido por completo. Reprodução de parte requer aprovação escrita do LabTec.