

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA MIDORI HUY

EFEITOS DE SALINIDADE NA MORFOLOGIA DOS ÓRGÃOS DE KÖLLIKER DE
PARALARVAS DE *Octopus vulgaris* (CUVIER, 1797) E COMPARAÇÃO ENTRE
DUAS ESPÉCIES: *Octopus vulgaris* E *Octopus insularis* (LEITE E HAIMOVICI, 2008)

PONTAL DO PARANÁ - PR

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA MIDORI HUY

EFEITOS DE SALINIDADE NA MORFOLOGIA DOS ÓRGÃOS DE KÖLLIKER DE PARALARVAS DE *Octopus vulgaris* (CUVIER, 1797) E COMPARAÇÃO ENTRE DUAS ESPÉCIES: *Octopus vulgaris* E *Octopus insularis* (LEITE E HAIMOVICI, 2008)

Monografia apresentada como requisito à obtenção do título de Bacharel em Oceanografia, no Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Érica Alves González Vidal

PONTAL DO PARANÁ - PR

2013

TERMO DE APROVAÇÃO

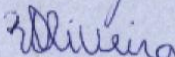
Juliana Midori Huy

“Efeitos de salinidade na morfologia dos Órgãos de Kolliker de paralarvas de *Octopus vulgaris* (Cuvier,1797) e comparação entre duas espécies: *Octopus vulgaris* e *Octopus insularis* (Leite e Haimovici,2008)”

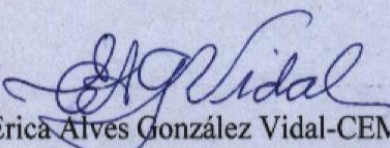
Monografia aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Oceanografia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Marco Fábio Maia Corrêa-CEM/UFPR



MSc. Verônica Maria Oliveira-CEM



Prof.ª Dr.ª Érica Alves González Vidal-CEM/UFPR
Presidente

Pontal do Paraná, 16 de janeiro de 2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE:
UFPR / SIBI - Biblioteca do Centro de Estudos do Mar

H987e Huy, Juliana Midori
Efeitos de salinidade na morfologia dos órgãos de Kölliker de paralarvas de *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) e comparação entre duas espécies: *Octopus vulgaris* e *Octopus insularis* (Leite e Haimovici, 2008). / Juliana Midori Huy. – Pontal do Paraná, 2013.
41f.; 29 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Érica Alves González Vidal.

Monografia (graduação) – Curso de Oceanografia, Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

1. Osmorregulação. 2. Ecologia experimental. 3. Ultraestrutura. Título. II. Vidal, Erica Alves Gonzalez. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 594.56

*O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem
sua própria razão de existir.*

(Albert Einstein)

RESUMO

A classe Cephalopoda é composta por invertebrados com alto grau de desenvolvimento. Os polvos alvos deste estudo, pertencentes à família Octopodidae, apresentam uma estratégia de vida na qual há produção de grande quantidade de ovos de pequeno tamanho e, ao eclodirem, apresentam indivíduos planctônicos que durante um período de sua vida ocuparão um nicho ecológico diferente dos adultos. Nestes indivíduos, denominados paralarvas, é possível verificar a existência de ultraestruturas semelhantes a tufos, denominados Órgãos de Kölliker (OK). Várias hipóteses existem a fim de investigar a funcionalidade destas estruturas, tais como auxílio na flutuabilidade, osmorregulação e mecanismo de defesa contra predadores, as quais se relacionam à sobrevivência durante a fase planctônica. Este trabalho tem como objetivo comparar e descrever a distribuição e diâmetro médio dos OK em paralarvas recém-eclodidas de *Octopus vulgaris* sob diferentes condições de salinidade, bem como comparar a ultraestrutura dos OK em duas espécies que habitam áreas costeiras: *O. vulgaris* e *O. insularis*, fazendo uso de imagens de microscopia eletrônica de varredura. Foram observadas diferenças entre o diâmetro médio dos tufos em *O. insularis* de comprimentos de manto desiguais, assim como diferenças entre diâmetro médio de *O. insularis* e *O. vulgaris* controle. As variações observadas entre o diâmetro dos tufos de paralarvas de *O. vulgaris* sob diferentes condições de salinidade não foram significativas. Por outro lado, a diferença na ocorrência de OK irrompidos na superfície da epiderme é evidente quando comparados os tratamentos de salinidade 20 e 37 com o tratamento controle. A presença de estruturas irrompidas ao longo do corpo dos animais parece estar diretamente relacionada à salinidade do ambiente e à osmorregulação, importante mecanismo fisiológico para sobrevivência em água salgada.

Palavras-chave: Osmorregulação, ecologia experimental, ultraestrutura.

ABSTRACT

The class Cephalopoda consists of invertebrates with a high degree of development. Octopuses target of this study, belongs to the family Octopodidae, have a life strategy of producing large quantities of small sized eggs and a planktonic hatchling that during a period of their life will occupy a different ecological niche from the adults. In these individuals, called paralarvae, it is possible to note ultrastructures like tufts, called Kölliker's Organs (KO). Several hypotheses exist to investigate the functionality of these structures, such as aid in buoyancy, osmoregulation and defense mechanism against predators, all relating its existence to survival in the plankton. This paper aims to describe and compare the distribution and average diameters of Kölliker's Organs in *Octopus vulgaris* under different salinities and compare the KO ultrastructures of two species that inhabit coastal areas: *O. vulgaris* and *O. insularis* making use of images of scanning electron microscopy. Differences were found between the average diameter of the tufts of unequal mantle lengths of *O. insularis*, as well as differences between mean diameter of *O. insularis* and *O. vulgaris* control treatment. Variations between the diameters of the tufts of *O. vulgaris* paralarvae under different salinities conditions did not show meaningful differences. On the other hand, the difference at the occurrence of erupted KO on the surface of epidermis is visible when comparing 20 and 37 salinities treatments with control treatment. The presence of erupted structures along the body of the animals seems to be directly related to salinity and osmoregulation, important physiological mechanism for survival in salt water.

Keywords: Osmoregulation, experimental ecology, ultrastructure

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ÓRGÃO DE KÖLLIKER.
FONTE: BROCCO ET AL., 1974.....3
- FIGURA 2: ESQUEMA DO SISTEMA DE CULTIVO PARA *O. vulgaris*.....7
- FIGURA 3 : ESQUEMA EXPERIMENTAL COM TRÊS RÉPLICAS PARA CADA TRATAMENTO.....8
- FIGURA 4: ESQUEMA DO SISTEMA DE CULTIVO PARA *O. insularis*.....10
- FIGURA 5: A) PARALARVA DE *O. insularis*. B) OK NA REGIÃO SUPERIOR DO MANTO. C) OK NA REGIÃO DA CABEÇA E BRAÇOS.....12
- FIGURA 6: A) PARALARVA DE *O. insularis* COM AGLOMERAÇÃO DE OK NA REGIÃO SUPERIOR DO MANTO B) DETALHE DA AGLOMERAÇÃO DOS OK NO MANTO.....13
- FIGURA 7: A) PARALARVA DE *O. insularis*. B) DISTRIBUIÇÃO HOMOGÊNEA DE OK NA REGIÃO DO MANTO. C) GRANDE QUANTIDADE DE OK PRESENTE NOS BRAÇOS.....14
- FIGURA 8: BOXPLOT DO DIÂMETRO MÉDIO DOS OK EM PARALARVAS DE *O. insularis* DEMONSTRANDO DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE O INDIVÍDUO DE 694 μ M DE CM E AS DEMAIS PARALARVAS.....15
- FIGURA 9: A) PARALARVA DE *O. vulgaris* DE TRATAMENTO CONTROLE. B) DETALHE DA FORMAÇÃO DE “DOBRAS” NA REGIÃO DA CABEÇA E PRESENÇA DE OK. C) PRESENÇA DE OK SOB A EPIDERME, SEM ROMPIMENTO.....18
- FIGURA 10: A) PARALARVA DE *O. vulgaris* COM OK DISTRIBUÍDOS HOMOGENEAMENTE NA REGIÃO DO MANTO. B) DETALHE DA PRESENÇA DE OK SEM ROMPER A EPIDERME. C) TUFO ABERTO NA REGIÃO DO MANTO.....19
- FIGURA 11: A) PARALARVA DE *O. vulgaris* PROVENIENTE DO TRATAMENTO DE SALINIDADE 37, MAIOR PRESENÇA DE OK NO MANTO. B) DETALHE DE TUFOS SEMIABERTOS, FECHADOS E TUFOS SOB A SUPERFÍCIE DA EPIDERME. C) TUFOS NOVOS ROMPENDO A EPIDERME

NA PARTE SUPERIOR DO MANTO.....20

FIGURA 12: A) PARALARVA DE *O. vulgaris* COM ENRUGAMENTO NA REGIÃO DO MANTO E CABEÇA EM PARALARVA DE SALINIDADE 37. B) OK ABAIXO DA SUPERFÍCIE DA EPIDERME.....21

FIGURA 13: PRESENÇA DE TUFOS FECHADOS E SEMIABERTOS NOS BRAÇOS DAS PARALARVAS DE *O. vulgaris*.....22

FIGURA 14: A) PARALARVA DE *O. vulgaris* COM MAIOR CONCENTRAÇÃO DOS ÓRGÃOS NA REGIÃO DO MANTO. B) DETALHE DA DISTRIBUIÇÃO DOS OK.....23

FIGURA 15: PARALARVA DE *O. vulgaris* COM PRESENÇA DE OK EXPOSTOS, COM TUFOS ABERTOS E TUFOS SOB A EPIDERME.....23

FIGURA 16: A) PRESENÇA DE TUFOS ABERTOS NA REGIÃO VENTRAL PRÓXIMA AO SIFÃO EM PARALARVA DE *O. vulgaris* B) DETALHE DOS OK COMPLETAMENTE ABERTOS.....23

FIGURA 17: BOXPLOT DO DIÂMETRO MÉDIO DOS OK DE PARALARVAS DE *O. vulgaris* EM DIFERENTES SALINIDADES, DEMONSTRANDO NÃO HAVER DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS TRATAMENTOS.....25

FIGURA 18: : BOXPLOT DO DIÂMETRO MÉDIO DOS OK EM PARALARVAS DE *O. vulgaris* E *O. insularis* DE SALINIDADE 32, DEMONSTRANDO DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE *O. insularis* E TRATAMENTOS 20 E 37 E MARGINALMENTE SIGNIFICATIVA COM *O. vulgaris* 34.....26

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: NÚMERO AMOSTRAL.....	11
TABELA 2: MEDIDAS DE CM, DIÂMETRO DOS TUFOS, MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DE PARALARVAS DE <i>O. insularis</i>	16
TABELA 3: MEDIDAS DO DIÂMETRO DOS OK EM SALINIDADE 34.....	19
TABELA 4: MEDIDAS DO DIÂMETRO DOS OK EM SALINIDADE 34	21
TABELA 5: MEDIDAS DO DIÂMETRO DOS OK EM SALINIDADE.....	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1 OBJETIVO GERAL	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3 METODOLOGIA	5
3.1 AQUISIÇÃO DAS PARALARVAS	5
3.1.1 <i>Octopus vulgaris</i>	5
3.1.1.1 Delineamento experimental.....	7
3.1.2 <i>Octopus insularis</i>	9
3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	10
3.3 TRATAMENTO DOS DADOS	11
4 RESULTADOS	12
4.1 <i>Octopus insularis</i>	12
4.1.1 Distribuição de OK ao longo da epiderme	12
4.1.2 Relação entre CM e diâmetro dos tufos	14
4.2 <i>Octopus vulgaris</i>	17
4.2.1 Presença e distribuição de OK em paralarvas sob condições normais de salinidade	17
4.2.2 Presença e distribuição de OK em paralarvas sob salinidade 37.....	19
4.2.3 Presença e distribuição de OK em paralarvas sob salinidade 20.....	22
4.3 COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS	25
4.4 COMPARAÇÃO ENTRE ESPÉCIES	25
5 DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÃO	29
7 REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

A classe Cephalopoda é composta por invertebrados com alto grau de desenvolvimento que apresentam cérebro e sistema nervoso bem desenvolvido, olhos com lentes, pupilas e pélcas, além de comportamento complexo e capacidade de aprendizagem (HANLON & MESSENGER, 1996; DE GROOT, 1995). São encontrados em águas marinhas e estuarinas, com ocorrência tanto em regiões tropicais e temperadas, quanto polares (NORMAN, 2003).

A ordem Octopoda, representada pelos polvos, é caracterizada por organismos que possuem corpo globular saculiforme, concha vestigial, quatro pares de braços e ausência de tentáculos (RUPPERT *et al.*, 2005). A maioria das espécies vive associada ao substrato marinho, enquanto outras são nadadoras livres e vivem na coluna d'água (NORMAN, 2003).

Entre os polvos bentônicos, o polvo comum *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) pertence à família Octopodidae e é considerado um dos invertebrados mais bem estudados. É uma espécie nerítica, cosmopolita de águas tropicais e temperadas, com ocorrência desde a linha de costa até a borda externa da plataforma continental, em profundidades de até 200 m, sendo encontrado em uma variedade de habitats, como rochas, grama e recifes de corais (VAZ-PIRES *et al.*, 2004). Indivíduos adultos podem atingir 25 cm de comprimento do manto e pesar até 8 Kg (HAIMOVICI *et al.*, 2009). Devido à sua ampla distribuição, estudos consideraram durante muito tempo que *Octopus vulgaris* representaria na verdade um complexo de espécies semelhantes que habitam águas temperadas e tropicais (NORMAN, 2003), porém, pesquisas recentes de observações morfológicas e investigações filogenéticas indicam que esta é uma espécie monoespecífica (GUERRA, 2010). Para reprodução, o macho possui um braço modificado contendo o hectocotilo, um órgão em forma de colher, localizado na ponta do terceiro braço, esquerdo ou direito, que transporta os espermatozóides (SWEENEY *et al.*, 1992). Durante a cópula, o hectocotilo é inserido na cavidade do manto da fêmea, onde os espermatozóides são depositados no interior do ducto genital (RUPPERT *et al.*, 2005). Durante a postura, as fêmeas produzem um único aglomerado de ovos contendo de 100 a 500 mil ovos (MANGOLD, 1983). Quando estes estão completamente desenvolvidos, medem aproximadamente 2,7 x

1,1 mm e ao eclodir, as paralarvas medem cerca de 2,9 mm de tamanho total (VILLANUEVA, 1995).

Outra espécie de polvo bentônico é *Octopus insularis* Leite e Haimovici, 2008, cuja ocorrência se dá ao longo da costa nordeste do Brasil, em águas rasas tropicais e no entorno das ilhas oceânicas (LEITE *et al.*, 2008). Apresenta porte médio, com comprimento de manto menor que 120 mm (LEITE *et al.* 2007), chegando a pesar aproximadamente 1300 g, com braços relativamente curtos e robustos e pele rugosa marrom avermelhada (LEITE *et al.*, 2009a). Pode ser encontrado ao longo do ano todo e sua abundância varia de acordo com características físicas do habitat, como profundidade e substrato - rochoso, arenoso, de cascalhos e recifes, não ocorrendo em substrato lamoso (LEITE *et al.*, 2009b). É uma espécie que apresenta alta fecundidade, com a postura de pequenos ovos (LEITE *et al.*, 2007) e por se tratar de uma espécie descrita recentemente, aspectos referentes à sua biologia e ecologia são ainda pouco conhecidos.

Os polvos pertencentes à família Octopodidae apresentam duas estratégias de vida no que se refere à reprodução (BOLETZKY, 1992). Na primeira, a fêmea desova poucos ovos relativamente grandes que, ao eclodirem, produzem indivíduos muito semelhantes aos adultos e ocupam de imediato o hábito de vida bentônico. Na segunda, adotada pelas espécies alvo deste estudo, há produção de grande quantidade de ovos de pequeno tamanho - chegando a centenas de milhares - que ao eclodir apresentam indivíduos planctônicos, que durante um período de sua vida ocuparão um nicho ecológico diferente dos adultos de sua espécie. Esses indivíduos são denominados paralarvas, que significa 'falsa' larva, pois os cefalópodes apresentam desenvolvimento direto, sem metamorfose como larvas de peixe e artrópodes (YOUNG & HARMAN, 1988). Após esse período, há uma transição morfológica, ecológica e comportamental na qual os filhotes passam do modo de vida planctônico para o bentônico (VILLANUEVA & NORMAN, 2008).

De acordo com Villanueva & Norman (2008) as paralarvas de *Octopus* são caracterizadas por braços pobremente desenvolvidos, poucas ventosas, padrão de cromatóforos simplificado e musculatura transparente. Ao longo da cabeça, braços, sifão e principalmente do manto das paralarvas de alguns polvos da subordem Incirrata, é possível verificar a existência de ultraestruturas semelhantes a tufos, denominados Órgão de Kölliker (OK) por terem sido descritos por Kölliker (1844).

Cada órgão é constituído por três componentes estruturais: um folículo ectodérmico de células especializadas, com um citoblasto basal e várias células foliculares laterais, um fascículo extracelular de cerdas canulares – tufo de Kölliker – secretado pelo citoblasto e um grupo de músculos mesodérmicos obliquamente estriados, que provavelmente auxiliam na projeção e retração de cada tufo, assim como na abertura das cerdas canulares (FIGURA 1). Os tufos são desenvolvidos dentro dos folículos epidérmicos durante a embriogênese para mais tarde irromper pela superfície da epiderme (BOLETZKY, 1973; BROCCO *et al.*, 1974).

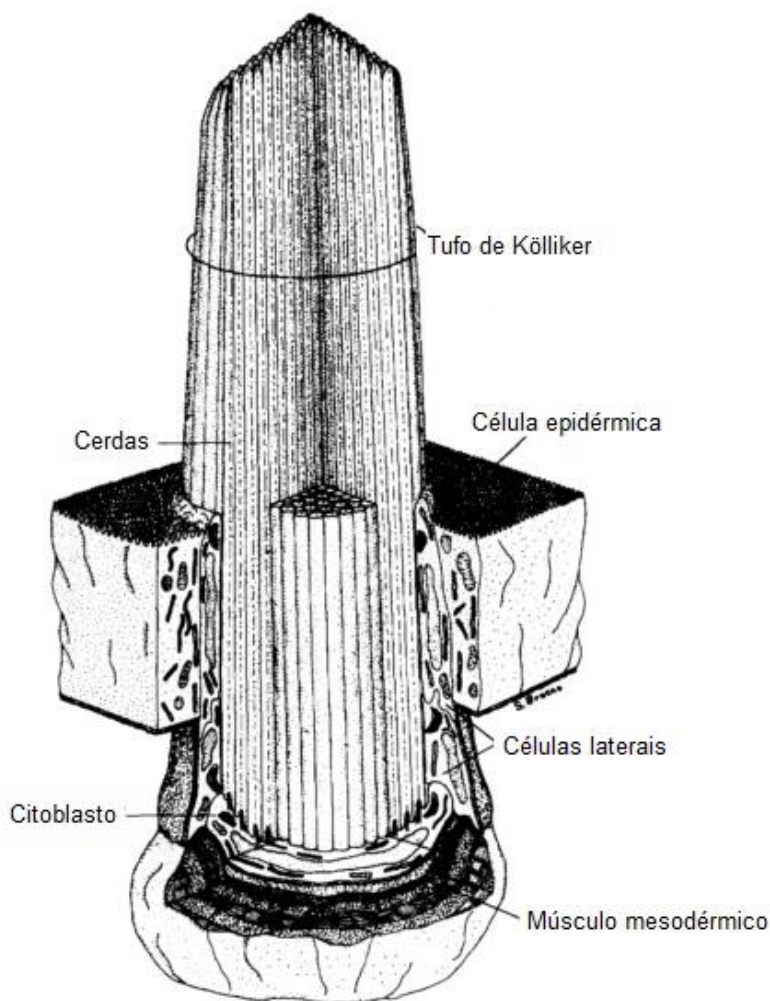


FIGURA 1: Representação esquemática do Órgão de Kölliker. Fonte: Brocco *et al.*, 1974

A função dos OK ainda é desconhecida, porém várias hipóteses já foram propostas. Ao estudar paralarvas de polvos, Naef (1923) propôs que estas estruturas podem auxiliar no modo passivo de transporte planctônico na coluna d'água, assim como servir de base para a formação de estruturas mais complexas presentes na pele de juvenis e adultos. Além disso, como o eixo principal de cada tufo é obliquamente

orientado em relação à superfície da pele, com a parte apical do tufo apontando em direção à região anterior, foi sugerido por Boletzky (1966) e Mangold *et al.* (1971), que esta disposição, juntamente com o movimento de contração de manto por jato-propulsão, ajudaria o animal a se mover em uma única direção e sair da membrana do córion durante a eclosão. Outra hipótese sugere que, devido aos movimentos de expansão e retração dos OK, estas estruturas poderiam aumentar a área da superfície do corpo do animal, auxiliando na flutuação das paralarvas na coluna d'água (BOLETZKY, 1973).

Outra observação intrigante sobre os OK refere-se à capacidade de reflexão das cerdas. Pequenos pontos de iridescência dermal são geralmente observados em algumas partes do corpo das paralarvas, como nas membranas que cobrem os olhos e vísceras, devido à ação de tecidos reflexivos (iridóforos) (VILLANUEVA & NORMAN, 2008). Villanueva (1995) ao observar essa reflexão nas cerdas dos OK sugeriu que os mesmos poderiam funcionar como um mecanismo de camuflagem ideal para a sobrevivência no plâncton. O mesmo autor, em estudo com paralarvas cultivadas desde a eclosão até o assentamento, observou o fato de que a densidade de OK tende a aumentar no período que encobre o final do desenvolvimento embrionário e a vida planctônica. Porém, quando os indivíduos assumem o modo de vida bentônico, Boletzky (1973) notou o desaparecimento destas estruturas.

Mazzini (2010) realizou um estudo comparando a estrutura dos OK presentes em duas espécies de paralarvas planctônicas: *Octopus vulgaris* e *Argonauta nodosa*, que habita águas oceânicas e apresenta modo de vida pelágico. Foram encontradas diferenças no diâmetro dos tufos entre indivíduos de mesma espécie com diferentes idades, assim como diferenças entre as espécies estudadas. De acordo com o autor, a grande abundância de OK em *O. vulgaris* e a diferença entre o diâmetro médio dos tufos entre as espécies podem estar relacionadas à diferença de habitat das espécies.

Da Silva & Vidal (2005) sugeriram que estas estruturas podem estar relacionadas a um mecanismo de osmorregulação. A salinidade é uma variável de grande importância ecológica em áreas costeiras e valiosa para se compreender os padrões anatômicos, fisiológicos e comportamentais dos organismos marinhos (SHMIEGELOW, 2004). A fim de obter mais informações sobre o funcionamento dos OK, este trabalho explora, através de experimentos realizados em laboratório, mudanças relacionadas à morfologia e distribuição dos tufos em paralarvas

submetidas a diferentes condições de salinidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta e a morfologia dos OK de paralarvas de *Octopus vulgaris* sob diferentes condições de salinidade e comparar a morfologia dos órgãos entre duas espécies: *Octopus vulgaris* e *Octopus insularis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a distribuição e diâmetro dos OK em paralarvas de *O. insularis* utilizando imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Comparar a morfologia dos OK de paralarvas de *Octopus vulgaris* recém-eclodidas e submetidas a três condições de salinidades (20, 34 e 37), fazendo uso de MEV.

Comparar o diâmetro médio dos tufo de OK em paralarvas de *Octopus vulgaris* e *Octopus insularis* com imagens de MEV.

3 METODOLOGIA

3.1 AQUISIÇÃO DAS PARALARVAS

3.1.1 *Octopus vulgaris*

Para aquisição de paralarvas, um sistema de cultivo foi construído no Laboratório de Cultivo de Cefalópodes e Ecologia Experimental (LacCef) do Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná. O sistema, do tipo fechado com recirculação de água, consiste na distribuição de água entre dois tanques, sendo um retangular que abrigava a fêmea reprodutora (dimensões 1,6 x 0,4 x 0,3m com volume de 192L) e outro circular (diâmetro de borda 1,22m, 0,95m de diâmetro de fundo e profundidade de 0,50m, 500L de volume), onde ficavam as paralarvas recém-eclodidas em salinidade 34 e 24°C de temperatura da água. As últimas foram então transferidas para tanques cilíndricos de larvicultura com o auxílio de um container de vidro, porém, a amostragem foi realizada diretamente no tanque circular (FIGURA 2). A fim de diminuir as concentrações de amônio (NH_4^+) total e de outros compostos tóxicos nos tanques de cultivo, a água que circula no sistema passou por um filtro biológico, de dimensões 1,8 x 0,6 x 0,3 m, composto por substrato de conchas maceradas, ideal para a fixação de bactérias *Nitrossomonas* (nitrificantes), responsáveis por transformar amônio em nitrito, e bactérias *Nitrobacter*, que transformam o nitrito em nitrato.

No dia 09 de outubro de 2012, uma fêmea madura de aproximadamente 1,5 Kg foi capturada da região do Complexo Estuarino de Paranaguá - Paraná e acomodada no tanque retangular pertencente ao sistema. A postura dos ovos iniciou em 06 de novembro e a eclosão das paralarvas ocorreu entre 19 e 26 de novembro.

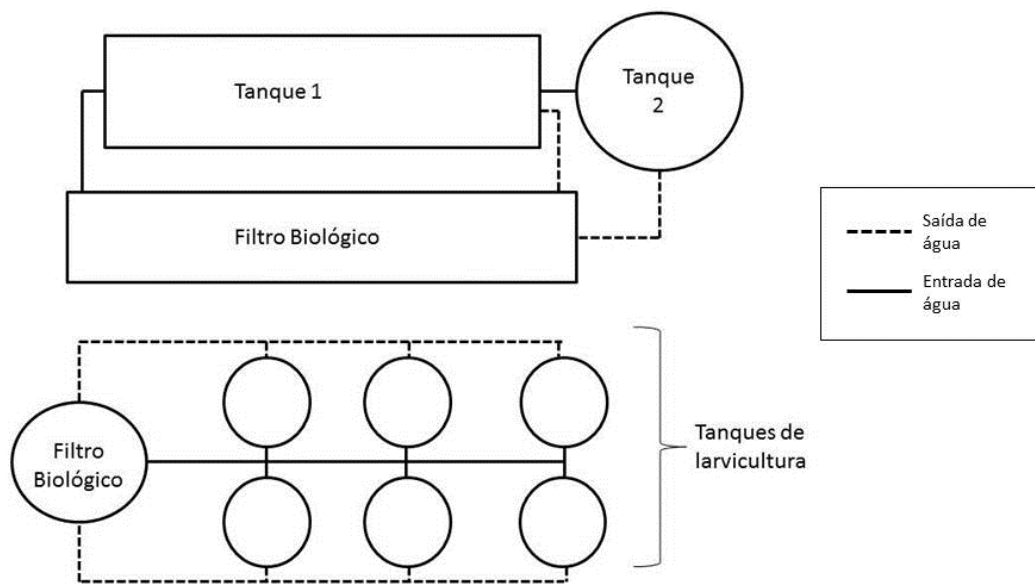


FIGURA 2: Esquema do sistema de cultivo para *O. vulgaris*

3.1.1.1 Delineamento experimental

A fim de verificar o funcionamento e morfologia dos OK de paralarvas de *Octopus vulgaris* sob diferentes condições de salinidades, foi montado um sistema experimental que consistia em seis recipientes de vidro com dimensões de 11 cm de altura, 21 cm de diâmetro superior e 15 cm de diâmetro inferior, com volume de 1,5L. Cada recipiente consistia em uma réplica e cada tratamento de salinidade continha três réplicas (FIGURA 3).



FIGURA 3 : Esquema experimental com três réplicas para cada tratamento

Para cada réplica, 30 paralarvas recém-eclodidas foram coletadas aleatoriamente do tanque circular utilizando uma pipeta plástica de 3 ml, com a ponta cortada para não causar danos aos animais. Estas eram então acomodadas nos recipientes de vidro. A aeração foi colocada no meio do recipiente, dentro de canos de PVC (2 cm de diâmetro e 9 cm de altura) cortados e encapados com uma malha fina, possibilitando a circulação da água sem a presença de bolhas, que podem também danificar a epiderme dos animais.

Três condições foram testadas, um tratamento de salinidade 37, outro de 20 e o controle com salinidade 34. As salinidades 37 e 20 foram escolhidas para melhor observação da resposta funcional dos OK, visto que podem ser consideradas condições extremas, enquanto a salinidade 34 é característica do habitat dessa espécie. A salinidade de 37 foi ajustada com o acréscimo de sal marinho Coralife® em água previamente clorada e neutralizada utilizada no sistema de cultivo. Para a salinidade 20, a água utilizada para o sistema foi diluída com água doce neutralizada com anticloro instantâneo (hipossulfito de sódio, uma gota por litro) até atingir o valor desejado.

Uma hora após as paralarvas terem sido transferidas para o sistema experimental, 15 exemplares de cada réplica foram amostrados aleatoriamente com

uma pipeta plástica de 3 ml e anestesiados com a mesma água utilizada em cada tratamento em temperatura média de 4°C, na qual há diminuição da resposta às perturbações devido à queda do metabolismo da paralarva. Após este procedimento, os indivíduos foram fixados de acordo com a metodologia de KARNOVSKI (1965), ideal para análises de MEV por conservar as ultraestruturas da epiderme. Para o controle, 15 paralarvas foram amostradas diretamente do tanque circular, anestesiadas e fixadas.

3.1.2 *Octopus insularis*

As paralarvas foram obtidas em janeiro de 2012, de uma fêmea, acomodada no sistema de cultivo montado no LacCef para abrigar reprodutores de *Octopus insularis* capturados no Rio Grande do Norte. O sistema consistia em dois tanques retangulares, com dimensões 1,6 x 0,4 x 0,3 m e 0,69 x 0,51 x 0,3 m e um circular com diâmetro superior de 1,22 m, inferior de 0,95 m e 0,58 m de altura, interligados a um filtro biológico de volume 325L (FIGURA 4). Os indivíduos recém eclodidos foram amostrados do tanque retangular maior, onde estava a fêmea provedora, com salinidade 32 e temperatura 26°C. Após a amostragem, as paralarvas foram fotografadas e preservadas.

Para este estudo, foram utilizadas paralarvas previamente fixadas, sem que houvesse a possibilidade de realizar o mesmo trabalho experimental realizado com *O. vulgaris*. Por esse mesmo motivo, a metodologia utilizada para preservar as amostras diferiu entre as duas espécies. Enquanto os indivíduos de *O. vulgaris* foram fixados com uma solução de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% com tampão cacodilato 0,8M, ideal para a preservação de estruturas e análise em MEV, as paralarvas de *O. insularis* foram fixadas diretamente em álcool 70%

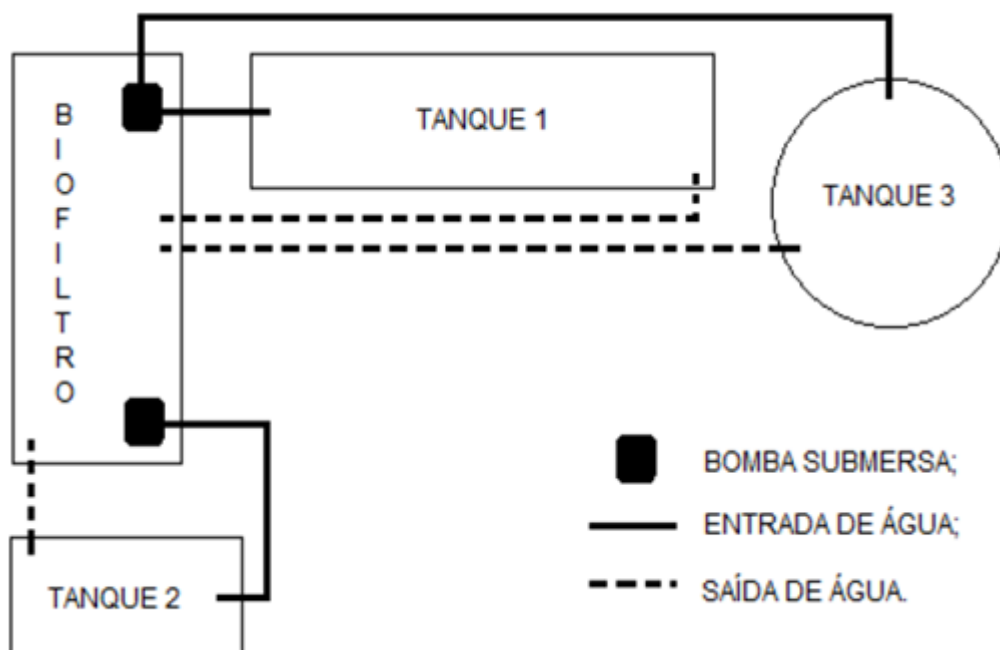


FIGURA 4: Esquema do sistema de cultivo para *O. insularis*. Fonte: Elias, 2012

No total, foram enviadas à MEV cinco paralarvas recém eclodidas de *O. insularis*, porém, devido ao pequeno tamanho dos espécimes, dois foram perdidos durante o processo de ponto crítico.

3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para o processamento em MEV, realizado no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, as amostras de *O. vulgaris* e *O. insularis* passaram por um processo de desidratação em série alcoólica. Cada amostra foi deixada em álcool 70% por um período de 10 minutos, e assim sucessivamente em álcool 80%, 90% e 100%. O Ponto Crítico foi realizado em um equipamento nomeado Bal-Tec CPD 030 e a metalização em um SCD 030 Balzers. As imagens foram obtidas com o microscópio Jeol JSM 6360 LV.

3.3 TRATAMENTO DOS DADOS

Para a análise de diâmetro do tufo de *O. insularis*, medidas de diâmetro de 20 tufos aleatórios e CM (após o processo de ponto crítico e metalização, com o manto já desidratado) de três paralarvas foram obtidas de imagens de MEV. Na análise entre tratamentos de *O. vulgaris*, foram medidos um total de 32 OK de seis paralarvas de cada tratamento (salinidades 37 e 20). Para as paralarvas do tratamento de controle, foi possível medir apenas dez tufos, devido à ausência de OK visíveis (que já romperam a epiderme) (TABELA 1). Em ambas as análises, quando os dados apresentaram os pressupostos para realização de uma análise paramétrica, o teste utilizado foi Análise de Variância (ANOVA); quando não paramétricos, foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis. Apenas a comparação entre *O. vulgaris* tratamento controle e *O. insularis* foi realizada com um teste de Mann-Whitney. A densidade de tufos foi medida através da contagem de estruturas visíveis em uma área de $10^4 \mu\text{m}^2$.

TABELA 1: Número amostral

Espécie	Nº de paralarvas	Nº Total de tufos medidos
<i>O. insularis</i>	3	60
<i>O. vulgaris salinidade 34</i>	3	10
<i>O. vulgaris salinidade 37</i>	6	32
<i>O. vulgaris salinidade 20</i>	6	36

Todas as medições foram realizadas no programa Adobe Photoshop 7.0.1.e as análises estatísticas no programa R 2.15.2.

4 RESULTADOS

4.1 *Octopus insularis*

4.1.1 Distribuição de OK ao longo da epiderme

Todas as paralarvas de *O. insularis* apresentaram OK irrompidos ao longo do corpo, sendo que não foi observada ocorrência de tufos abertos. Na primeira paralarva, de 894 μm de CM, uma grande quantidade pôde ser observada na região dos braços e cabeça, 20 e 13 tufos/ $10^4\mu\text{m}^2$ respectivamente, e na região dorsal do manto (FIGURA 5

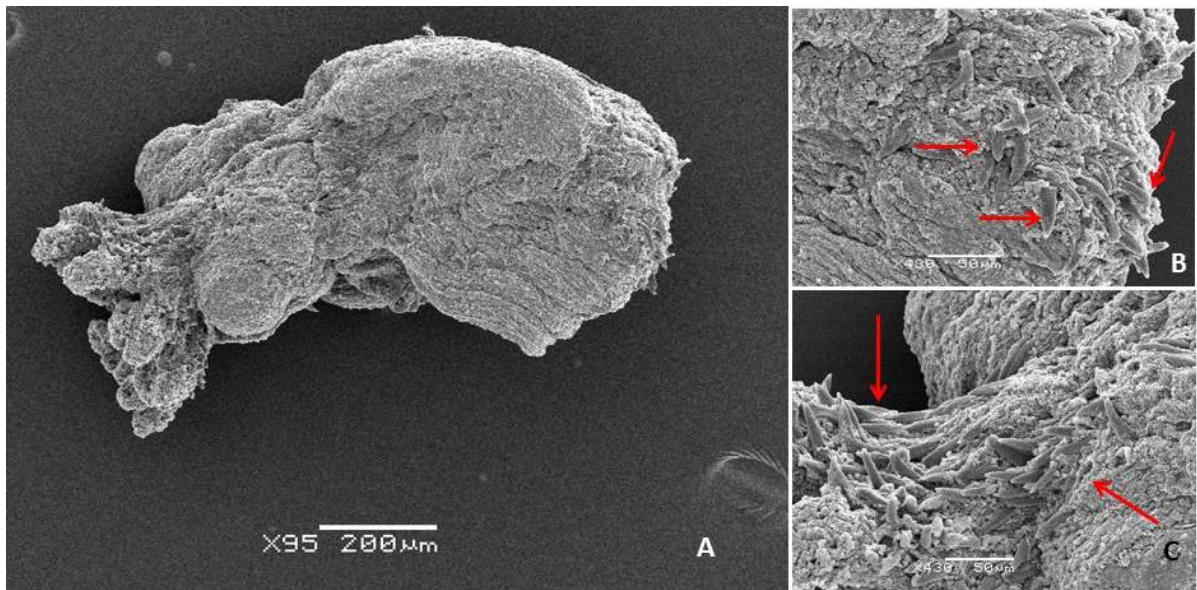


FIGURA 5: A) Paralarva de *O. insularis*. B) OK na região superior do manto. C) OK na região da cabeça e braços.

Na segunda (565 μm de CM) ocorreu grande aglomeração no manto (22 tufos/ $10^4\mu\text{m}^2$) com 2 OK irrompidos na região da cabeça e falta de extrusão de OK nos braços (FIGURA 6).

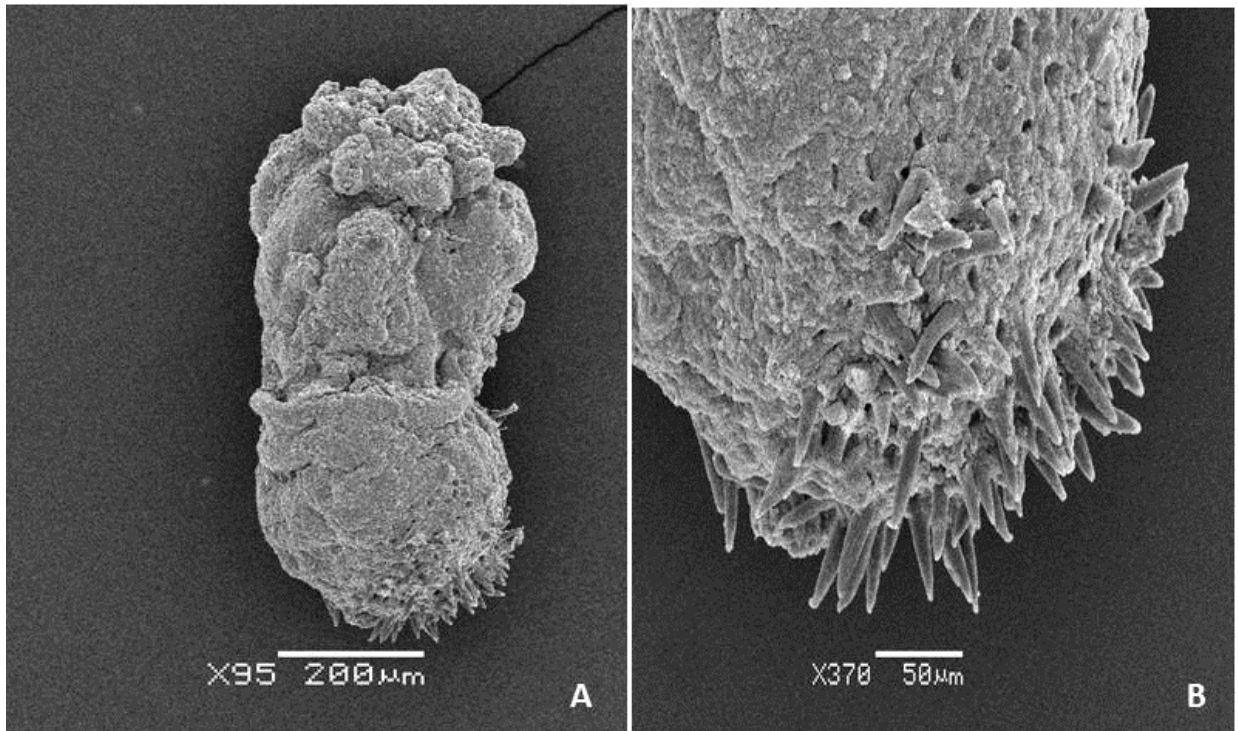


FIGURA 6: A) Paralarva de *O. insularis* com aglomeração de OK na região superior do manto. B) Detalhe da aglomeração dos OK no manto.

Por último, a terceira paralarva (694 μm) apresentou braços com grande quantidade de OK (12 tufos/ $10^4\mu\text{m}^2$) e distribuição homogênea ao longo do manto (FIGURA 7).

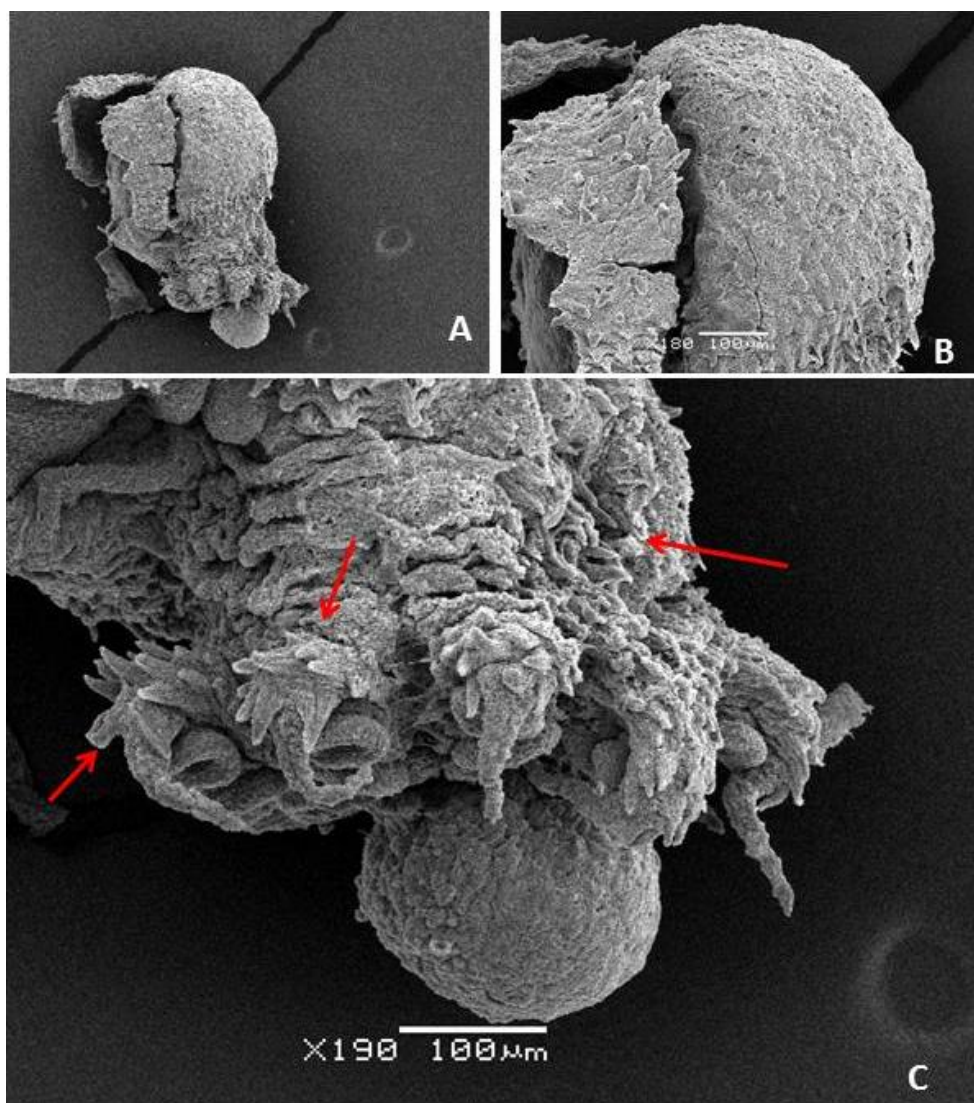


FIGURA 7: A) Paralarva de *O. insularis* com vitelo externo. B) Distribuição homogênea de OK na região do manto. C) Grande quantidade de OK presente nos braços.

4.1.2 Análise de diâmetro dos tufos

A fim de testar a normalidade e homocedasticidade, testes de Shapiro-Wilk

($p > 0,1103$) e Bartlett ($p > 0,8376$) foram aplicados nos dados referentes às medidas de diâmetro dos tufos. Aceitos os pressupostos, o teste de ANOVA demonstrou haver diferença entre os diâmetros dos tufos ($p < 0,00006$). O teste post hoc de Tukey demonstrou que as paralarvas de 894 μm e 565 μm de CM apresentaram médias semelhantes (8,3 e 8,6 μm , respectivamente), porém o indivíduo com CM de 694 μm exibiu diâmetro médio maior (10,1 μm) que as duas outras (FIGURA 8) (TABELA 2).

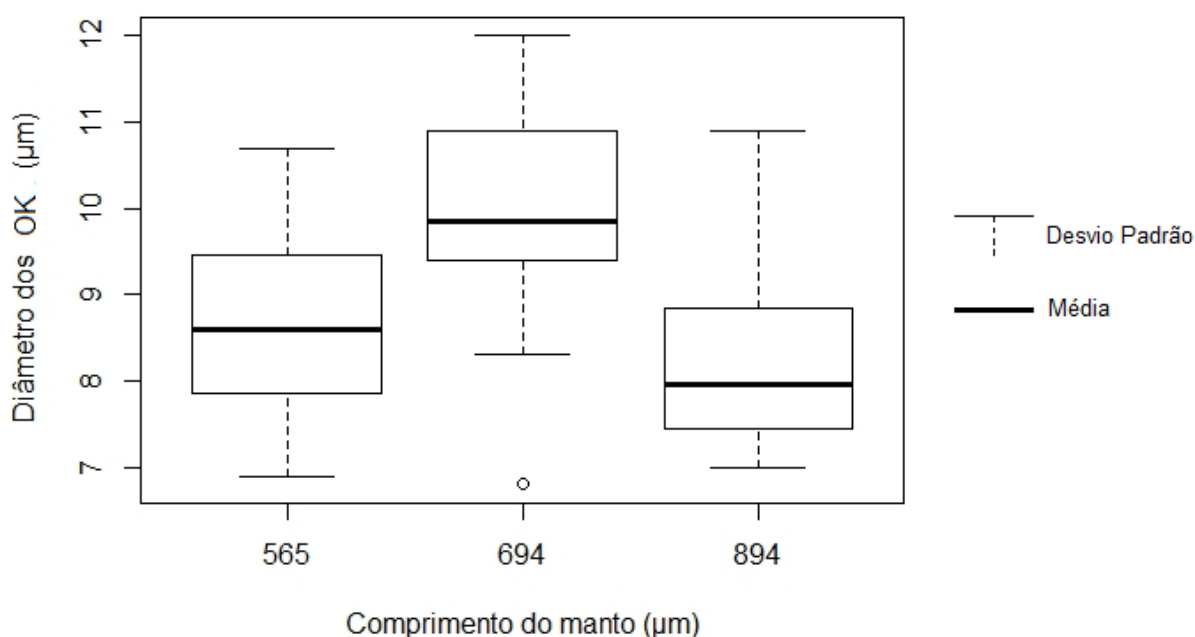


FIGURA 8: Boxplot do diâmetro médio dos OK em paralarvas de *O. insularis* demonstrando diferenças significativas entre o indivíduo de 694 μm de CM e as demais paralarvas

TABELA 2: Medidas de CM, diâmetro dos tufos, médias e desvios padrões de paralarvas de *O. insularis*

CM (μm)	Diâmetro (μm)	Média	Desvio Padrão
894	7,3	8,3 μm	1,15 μm
	7,8		
	10,1		
	10,7		
	7,3		
	7,0		
	7,9		
	7,0		
	7,6		
	8,3		
	7,3		
	8,7		
	9,2		
	8,0		
	7,8		
	8,3		
	8,9		
8,8			
10,9			
7,8			
565	8,9	8,6 μm	1,08 μm
	6,9		
	9,6		
	10,7		
	8,3		
	9,7		
	8,5		
	9,3		
	9,3		
	7,5		
	7,9		
	10,1		
	8,0		
	8,7		
	7,3		
	7,9		
	8,8		
7,2			
7,8			
10,1			
694	9,8	10,1 μm	1,35 μm
	8,3		
	9,4		
	6,8		
	9,9		
	9,8		
	12,0		
	12,0		
	9,8		
	10,9		
	12,0		
	10,3		
	10,9		
	12,0		
	10,9		
	9,4		
	8,9		
8,7			
10,6			
9,4			

4.2 *Octopus vulgaris*.

4.2.1 Presença, distribuição e diâmetro dos OK em paralarvas sob condições normais de salinidade

As paralarvas do tratamento controle, no qual os indivíduos estavam sob condições normais de cultivo, com temperatura de 24°C e salinidade 34 apresentaram poucos OK ao longo do corpo ($2 \text{ tufos}/10^4 \mu\text{m}^2$). Foram analisadas imagens obtidas de quatro paralarvas, sendo que em uma houve ausência de OK visíveis. Em todas houve ocorrência de deformidade na região da cabeça, com aparência de “dobras” (FIGURA 9A, B) e presença de OK ao longo dessa área em três paralarvas, nas quais os tufos eram aparentemente salientes, porém, permaneciam abaixo da epiderme, sem conseguir rompê-la (FIGURA 9C).

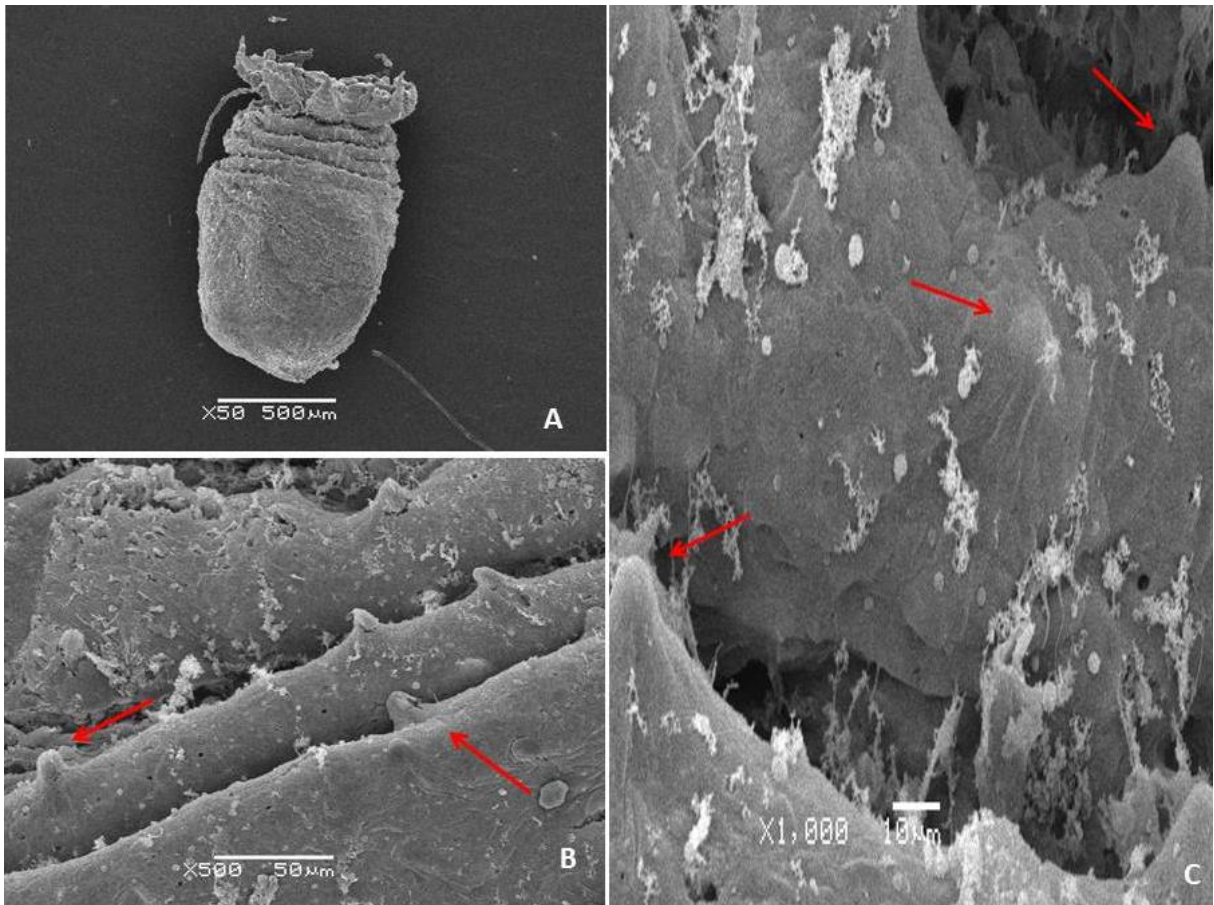


FIGURA 9: A) Paralarva de *O. vulgaris* de tratamento controle. B) Detalhe da formação de “dobras” na região da cabeça e presença de OK. C) Presença de OK sob a epiderme, sem rompimento.

Ao longo do manto, os OK estavam distribuídos homogeneamente, sendo possível identificar sua presença apenas através de marcas sob a superfície da epiderme, com ocorrência de somente um tufo semiaberto entre as amostras (FIGURA 10). As paralarvas de tratamento de salinidade 34 apresentaram 10,4 μm de diâmetro médio dos tufos (TABELA 3).

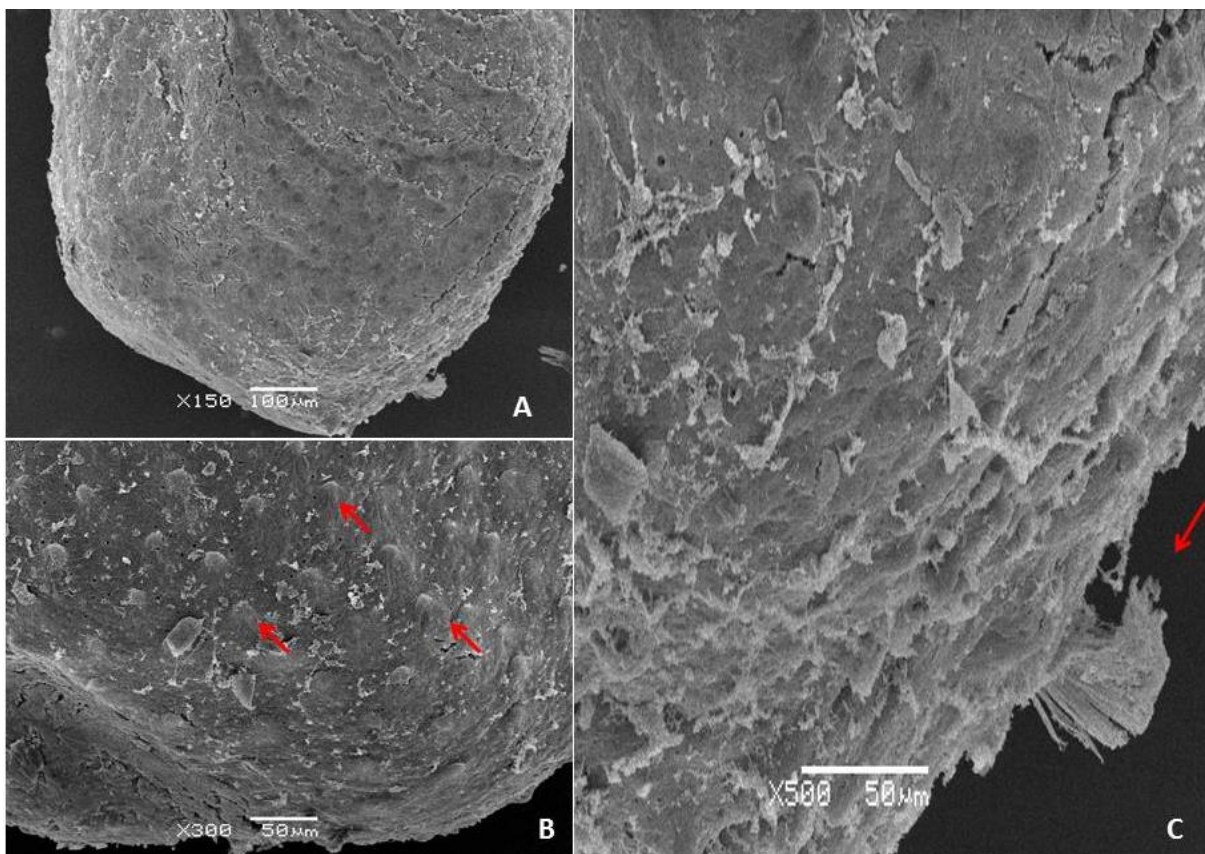


FIGURA 10: A) Paralarva de *O. vulgaris* com OK distribuídos homogeneamente na região do manto. B) Detalhe da presença de OK sem romper a epiderme. C) Tufo aberto na região do manto.

TABELA 3: Medidas do diâmetro dos OK em salinidade 34

Tratamento	Diâmetro (μm)	Média	Desvio Padrão
34	10,9	10,4 μm	1,9 μm
	14,5		
	11,2		
	8,0		
	8,4		
	11,0		
	9,6		
	9,6		
	10,9		

4.2.2 Presença, distribuição e diâmetro dos OK em paralarvas sob salinidade 37

Em todas as seis paralarvas analisadas em salinidade 37, OK ao longo do manto, cabeça e braços puderam ser observados. A maior concentração (8

tufos/ $10^4\mu\text{m}^2$) ocorreu no manto, com tufos aparentes fechados, semiabertos e tufos ainda sob a superfície epitelial ou em processo de rompimento (FIGURA 11).

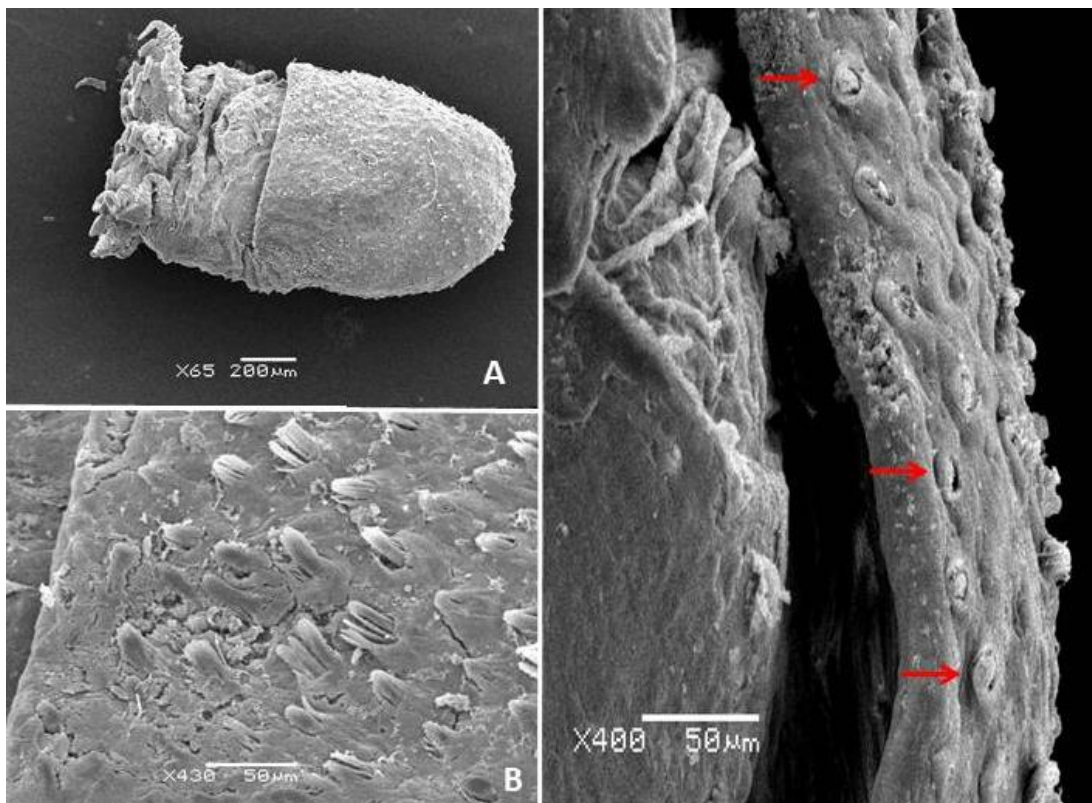


FIGURA 11: A) Paralarva de *O. vulgaris* proveniente do tratamento de salinidade 37, maior presença de OK no manto. B) Detalhe de tufos semiabertos, fechados e tufos sob a epiderme. C) Tufos novos rompendo a epiderme da parte superior do manto.

Em algumas paralarvas de tratamento de salinidade 37, houve a mesma deformidade presente nas condições de controle, com enrugamento da região da cabeça e manto (FIGURA 12A) e presença de OK abaixo da superfície da epiderme (FIGURA 12B). As paralarvas de tratamento de salinidade 37 apresentaram $11,9\ \mu\text{m}$ de diâmetro médio dos tufos (TABELA 4).

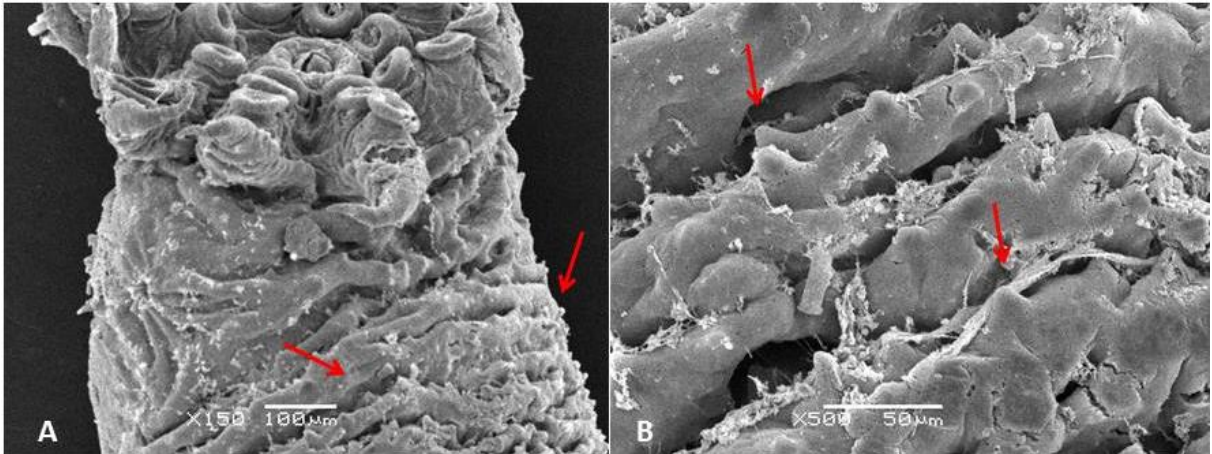


FIGURA 12: A) Paralarva de *O. vulgaris* com enrugamento na região do manto e cabeça em paralarva de salinidade 37. B) OK abaixo da superfície da epiderme.

TABELA 4: Medidas do diâmetro dos OK em salinidade 37

Tratamento	Diâmetro (μm)	Média	Desvio Padrão
37	11,2	11,9 μm	2,6 μm
	7,5		
	9,3		
	10,3		
	11,5		
	14,0		
	16,4		
	15,4		
	11,0		
	13,8		
	11,4		
	11,4		
	9,8		
	8,0		
	14,3		
	14,8		
	12,9		
	10,3		
	11,2		
	14,0		
	8,2		
	13,3		
	9,2		
	11,7		
	8,5		
	14,6		
	8,6		
	13,4		
13,0			
9,8			
17,9			
13,6			

4.2.3 Presença, distribuição e diâmetro dos OK em paralarvas sob salinidade 20

As paralarvas provenientes do tratamento de salinidade 20 apresentaram uma maior densidade de OK visíveis ao longo do corpo ($13 \text{ tufos}/10^4 \mu\text{m}^2$). Na região dos braços, os tufos estavam tanto fechados quanto semiabertos, sem apresentar um padrão de distribuição ao longo da superfície da epiderme (FIGURA 13).

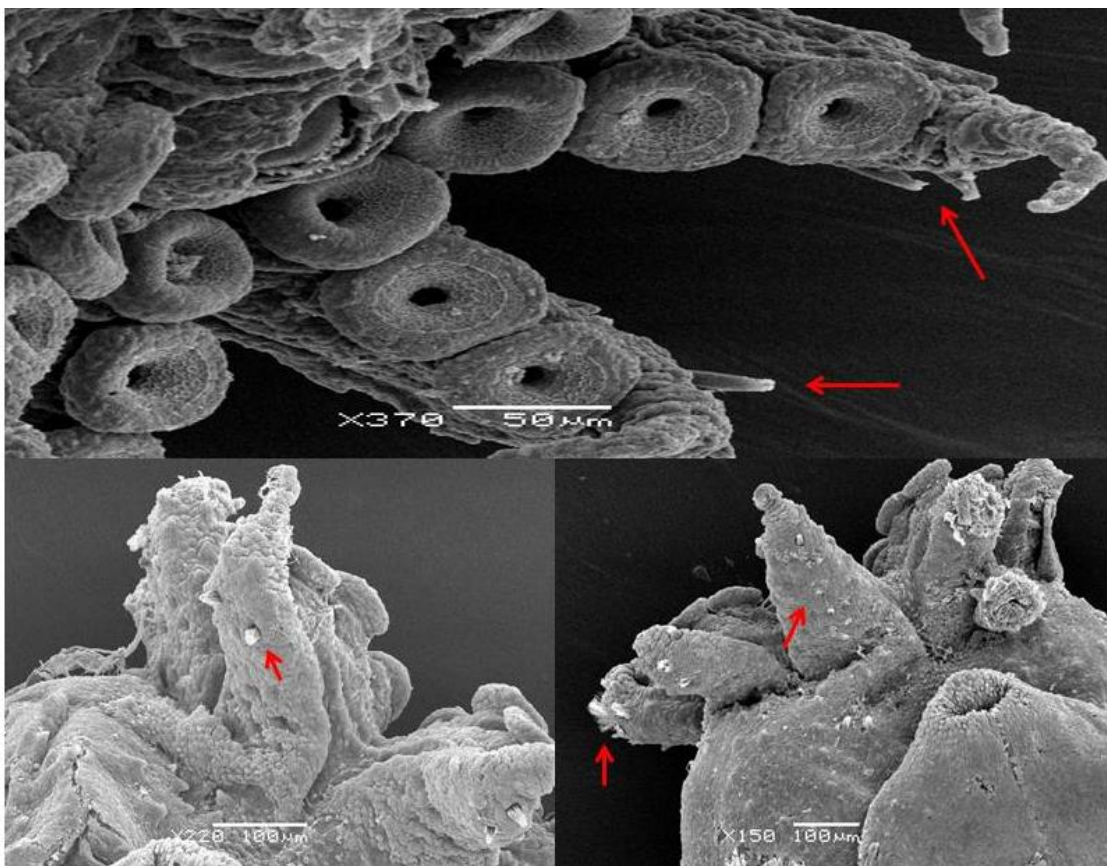


FIGURA 13: Presença de tufos fechados e semiabertos nos braços das paralarvas de *O. vulgaris*

Na região do manto foi encontrada a maior concentração dos órgãos (FIGURA 14A), com distribuição homogênea e equidistante ao longo de toda a superfície, $17 \text{ tufos}/10^4 \mu\text{m}^2$, (FIGURA 14B). Foi possível perceber tanto a presença de OK expostos, que já romperam a epiderme, quanto tufos ainda sob a epiderme, próximos uns aos outros (FIGURA 15).

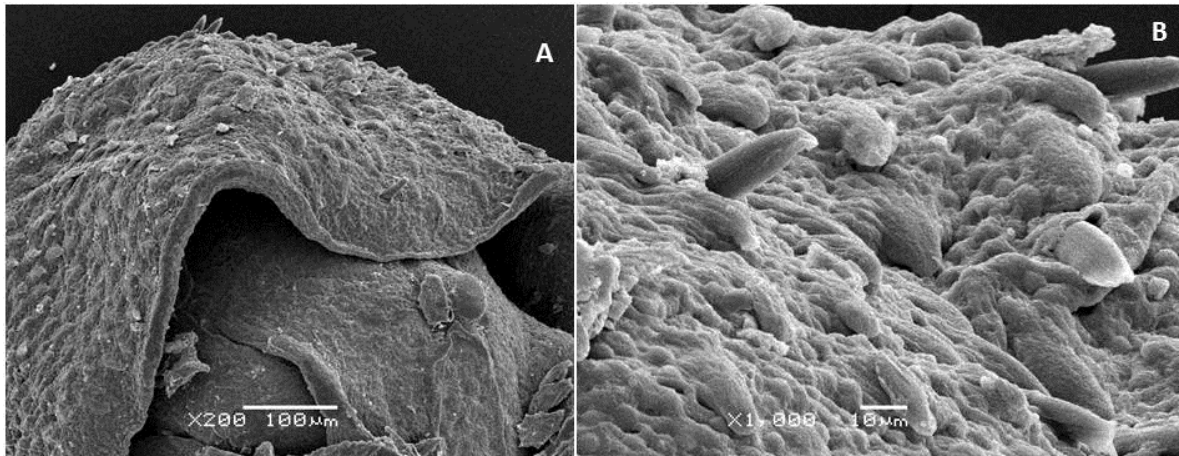


FIGURA 14: A) Paralarva de *O. vulgaris* com maior concentração dos órgãos na região do manto. B) Detalhe da distribuição dos OK.

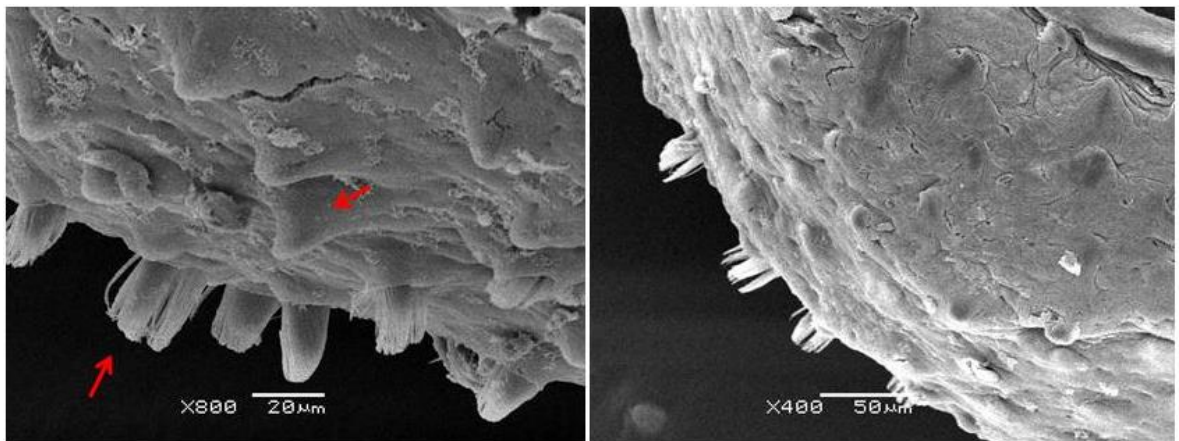


FIGURA 15: Paralarva de *O. vulgaris* com presença de OK expostos, com tufos abertos, e tufos sob a epiderme

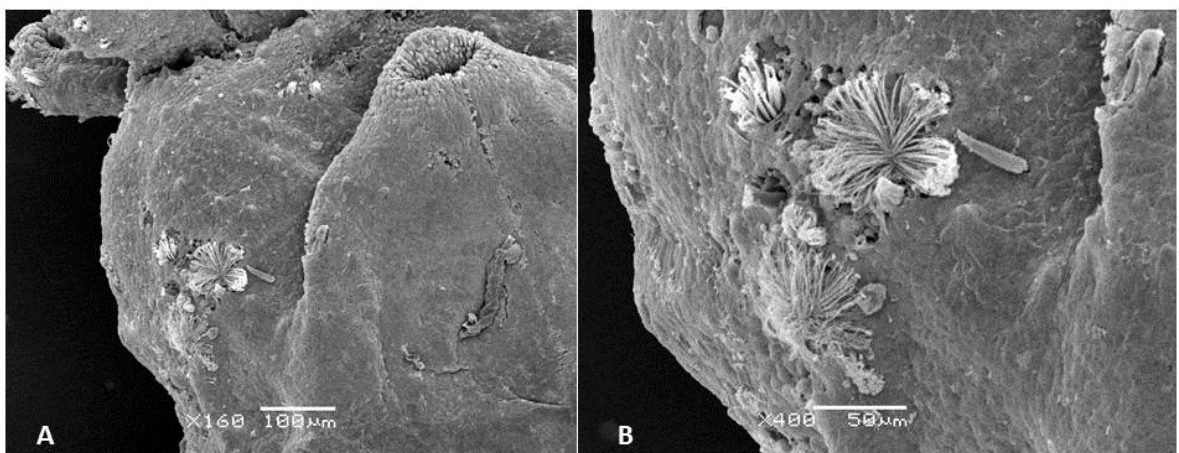


FIGURA 16: A) Presença de tufos abertos na região ventral próxima ao sifão de *O. vulgaris*. B) Detalhe dos OK completamente abertos.

Sob este tratamento, houve maior ocorrência de tufos semiabertos, sendo que uma paralarva apresentou tufos completamente abertos na região ventral, próxima ao sifão (FIGURA 16). As paralarvas neste tratamento de salinidade apresentaram 12,8 μm de diâmetro médio dos tufos (TABELA 5)

TABELA 5: Medidas do diâmetro dos OK em salinidade 20

Tratamento	Diâmetro (μm)	Média	Desvio Padrão
20	9,9	12,8 μm	5,1 μm
	9,5		
	9,1		
	9,5		
	9,5		
	9,6		
	10,2		
	9,0		
	10,9		
	7,1		
	7,6		
	7,6		
	8,3		
	12,8		
	12,7		
	14,8		
	12,2		
	8,9		
	10,0		
	13,3		
	11,3		
	9,3		
	13,3		
	14,9		
	14,9		
	12,9		
	14,9		
	22,5		
	27,8		
	22,0		
17,0			
27,5			
13,5			
13,8			
14,8			
7,8			

4.3 COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS

Testes de normalidade e homocedasticidade, Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente, demonstraram que mesmo após transformação das medidas de diâmetro de tufo em logaritmo, estas confirmaram se tratar de dados não paramétricos ($p < 0,05$). A comparação então foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis, que revelou não existir diferenças entre o diâmetro médio dos diferentes regimes de salinidade ($p < 0,5287$), sendo $11,9 \mu\text{m}$ em salinidade 37, $10,4 \mu\text{m}$ em 34 e $12,8 \mu\text{m}$ em 20. (FIGURA 17).

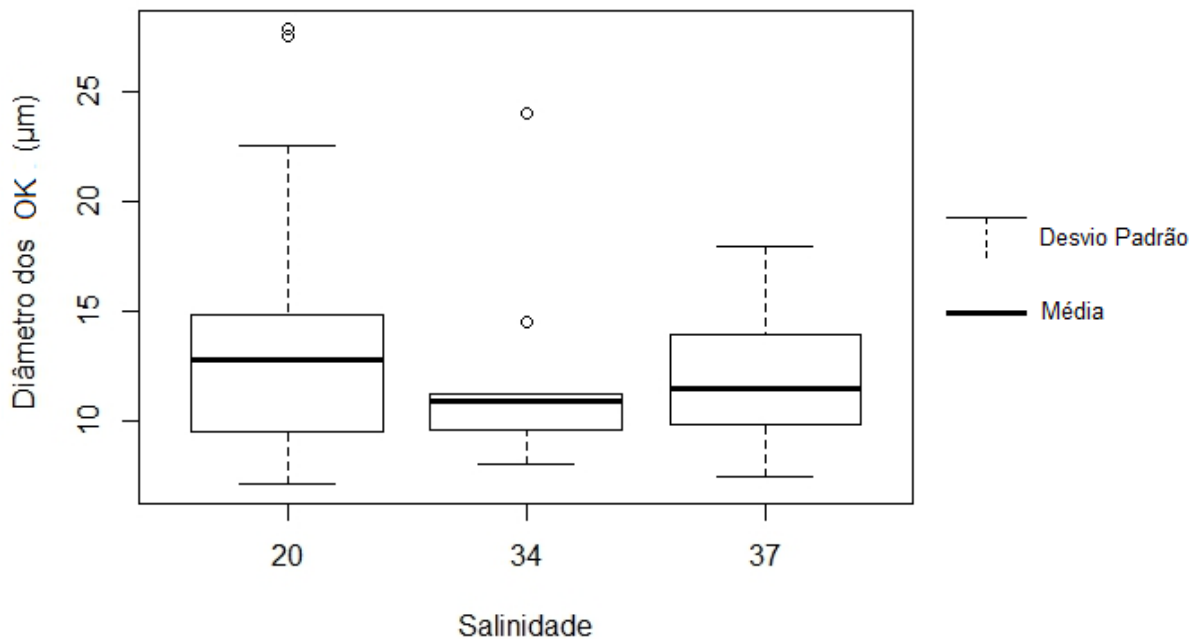


FIGURA 17: Boxplot do diâmetro médio dos OK de paralarvas de *O. vulgaris* em diferentes salinidades, demonstrando não haver diferenças significativas entre os tratamentos.

4.4 COMPARAÇÃO ENTRE ESPÉCIES

Por se tratar de dados não paramétricos, o teste utilizado para comparar o diâmetro de tufo de *O. vulgaris*, incluindo os tratamentos, e *O. insularis* foi o de

Kruskal-Wallis, no qual as diferenças observadas entre as médias foram significativas ($p < 0,00008245$) (FIGURA 18). *O. insularis* apresentou diâmetro médio dos tufos ($8,5 \mu\text{m}$) significativamente menor com relação a *O. vulgaris* de tratamentos 37 e 20 de salinidade ($11,9$ e $12,8 \mu\text{m}$, respectivamente) e marginalmente menor se comparado com *O. vulgaris* controle ($10,4 \mu\text{m}$) (analisado posteriormente pelo teste de Mann-Whitney, apresentou p-valor $< 0,01$).

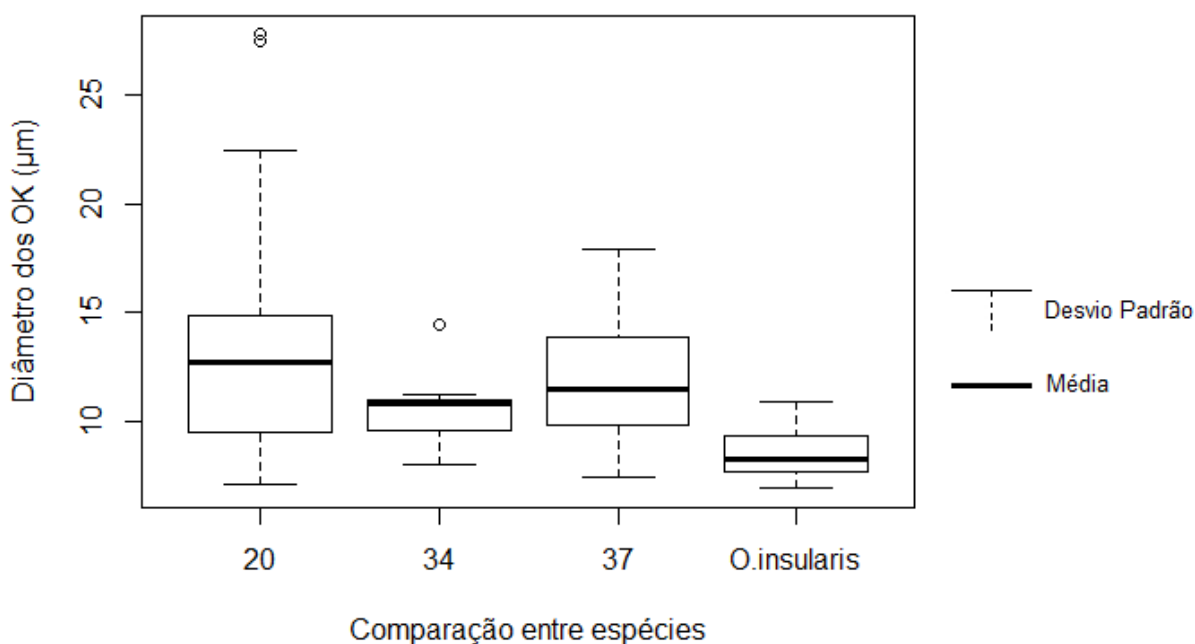


FIGURA 18: : Boxplot do diâmetro médio dos OK em paralarvas de *O. vulgaris* e *O. insularis* de salinidade 32, demonstrando diferenças significativas entre *O. insularis* e tratamentos 20 e 37 e marginalmente significativa com *O. vulgaris* 34.

5 DISCUSSÃO

Com relação à presença, distribuição e morfologia dos OK em paralarvas de *O. vulgaris* submetidas à diferentes condições de salinidade, nota-se uma ocorrência incomum de tufos nos indivíduos do tratamento controle (34). Mazzini (2010) encontrou tufos espalhados ao longo do manto, cabeça, braços e olhos em todas as paralarvas, enquanto neste trabalho, foi possível visualizar apenas a presença dos órgãos ainda abaixo da superfície da epiderme, com alguns tufos aleatórios

irrompidos. As paralarvas de ambos os trabalhos foram obtidos de sistemas de cultivo, com salinidades 34, porém, as temperaturas diferiram, sendo de 21 – 22°C as estudadas por Mazzini (2010) e 24°C as analisadas neste presente estudo.

Boletzky & Hanlon (1983) verificaram que *O. vulgaris* apresenta pouca tolerância a baixas concentrações de sal, sendo que a concentração mínima tolerável é de 27. As paralarvas dos tratamentos de salinidade 37 e 20 apresentaram ampla distribuição de tufos ao longo do manto, sendo que estes estavam tanto semiabertos ou fechados quanto abaixo da superfície epitelial ou em processo de rompimento da epiderme. É possível que tal fato possa representar a necessidade de adição de órgãos irrompidos na interface com o ambiente em resposta à baixa ou alta salinidade.

Quando comparados tratamentos e controle, verifica-se uma média de diâmetro de tufos semelhantes, porém ao analisar a distribuição e presença de OK fica evidente o número crescente de tufos que irromperam à superfície devido à mudança de salinidade, corroborando a hipótese sugerida por da Silva & Vidal (2005) de que estas estruturas podem estar relacionadas a um mecanismo de osmorregulação. Além disso, a robustez dos OK pode não exercer tanta importância no que se refere à salinidade, quanto à quantidade espalhada pelo corpo, visto que não há diferença entre os diâmetros.

Apesar das três paralarvas de *O. insularis* submetidas à MEV apresentarem OK, foi possível observar que os tufos não apresentam um padrão de distribuição homogênea ao longo do corpo, com a formação de aglomerações em regiões específicas, em cada indivíduo. Devido ao pequeno número amostral (3 exemplares), não é possível determinar de fato se este padrão é natural da espécie ou é resultante das condições ambientais às quais os indivíduos foram submetidos durante o desenvolvimento embrionário, como por exemplo, a qualidade da água, presença de compostos nitrogenados, circulação dos tanques, temperatura ou salinidade. É importante ressaltar que durante a incubação, o sistema de cultivo sofreu uma infestação de fungos, fazendo com que um grande número de ovos fosse perdido. Por outro lado, este padrão de aglomeração pode ser resultado tanto de um mecanismo de defesa que se mostrou eficiente para a sobrevivência dessas paralarvas, quanto mera coincidência na presença e extrusão dos OK.

A análise de diâmetro médio dos tufos em *O. insularis* mostrou a paralarva de 694 µm apresentou diâmetro médio (10,1 µm) relativamente maior, enquanto as de

565 μm e 894 μm possuem médias semelhantes (8,6 e 8,1 μm , respectivamente). É importante ressaltar que a paralarva de maior diâmetro médio de tufos ainda apresentava vitelo externo, o que indica que este indivíduo teve uma eclosão prematura, ou seja, é mais novo e não possui a mesma idade que as outras duas paralarvas de idade e diâmetro de tufos semelhantes. Assim sendo, a diferença de diâmetro observada pode estar relacionada com a importância dos OK em indivíduos mais novos ou ao padrão cíclico no qual existe a diminuição do diâmetro dos órgãos seguido pelo aumento com o surgimento de novos órgãos, como descrito por Mazzini (2010).

A comparação entre *O. vulgaris* e *O. insularis* sob condições de laboratório mostra uma diferença marginal entre as médias de diâmetro de tufo. É possível que tal fato possa estar relacionado à diferença de temperaturas do que à salinidade propriamente dita. Quando comparadas, as médias dos diâmetros são inversamente proporcionais ao aumento da temperatura, sendo de 9 μm em *O. insularis* mantido a 26°C, 11 μm em *O. vulgaris* mantido a 24° e 13 μm em *O. vulgaris* mantido entre 21-22°C descrito por Mazzini (2010), sendo que todos estes indivíduos são paralarvas recém eclodidas (a paralarva de *O. insularis* que eclodiu precocemente não foi incluída nesta análise devido à diferença de idade). De acordo com Boletzky (1989), a temperatura é um dos principais fatores que influenciam o desenvolvimento dos embriões de cefalópodes, além de influenciar vários aspectos metabólicos, como a taxa de utilização de vitelo (BOUCHAUD, 1991; VIDAL *et al.*, 2002; 2005) e consumo de oxigênio (PARRA *et al.*, 2000). Segundo a hipótese de Forsythe (1993), confirmada através dos estudos de Vidal *et al.* (2002) e (2005) para as paralarvas de lulas, a temperatura exerce grande influência no crescimento dos cefalópodes e das paralarvas em especial, conseqüentemente, a robustez dos tufos pode tanto representar uma resposta de adaptação a condições metabólicas impostas pela temperatura como também um mecanismo que auxilie na termorregulação para crescimento acelerado durante a fase planctônica e conseqüente assentamento, visto que, ao assumir o modo de vida bentônico, existe o desaparecimento gradual dos OK (BOLETZKY, 1973).

É importante salientar que as amostras de paralarvas de *O. insularis* e *O. vulgaris* utilizadas neste estudo não foram preservadas utilizando a mesma metodologia. Enquanto os indivíduos de *O. vulgaris* foram fixados com uma solução

de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% com tampão cacodilato 0,8M, ideal para a preservação de estruturas e análise em MEV, as paralarvas de *O. insularis* foram fixadas diretamente em álcool 70%, o que tornou visível a degradação da superfície da epiderme e pode ter ocasionado a perda de algumas estruturas de OK.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A osmorregulação é um importante mecanismo de sobrevivência para animais marinhos e variações de salinidade podem afetar diretamente a extrusão, distribuição e quantidade dos OK presentes na superfície da epiderme das paralarvas, por outro lado, a robustez dos OK parece estar muito mais relacionada a variações na temperatura da água, parâmetro que demonstra ser de grande importância e deve ser testado em novos experimentos.

A função dos OK ainda permanece obscura, porém, este estudo apresentou dados que abrem caminhos para novos trabalhos experimentais a fim de testar outras importantes variáveis, como temperatura, pH, concentração de oxigênio dissolvido e disponibilidade de nutrientes, que influenciam diretamente na ecologia desses animais em zonas costeiras, e a consequente resposta funcional destas ultraestruturas às modificações no ambiente em que vivem.

Por fim, a ecologia experimental se mostra como uma importante ferramenta de aquisição de conhecimento e compreensão de padrões biológicos antes desconhecidos.

7 REFERÊNCIAS

- BOLETZKY, S.v. Zum Schlüpfen von *Octopus vulgaris* Lam. Verhandlungen der **Naturforschenden Gesellschaft**, v. 77, p. 165-170, 1966.
- BOLETZKY, S.v. Structure and function of the Kölliker organs in young octopods (Mollusca, Cephalopoda). **Zeitschrift für Morphologie der Tiere**, v. 75, p. 315-327, 1973.
- BOLETZKY, S.v.; HANLON, R.T. **A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod molluscs**. **Mem. Natl. Mus. Vic.**, v. 44, p.147-187, 1983
- BOLETZKY, S.v. Recent studies on spawning, embryonic development and hatching in the cephalopoda. **Advances in Marine Biology**, 25, p. 85-115, 1989.
- BOLETZKY, S.v. Evolutionary aspects of development, life style, and reproductive mode in incirrate octopods (Mollusca, Cephalopoda). **Revue Suisse de Zoologie**, v. 99, p. 755-770, 1992.
- BOUCHAUD, O. Energy consumption of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda) during embryonic development, preliminary results. **Bulletin of Marine Science**, v.49, n. 1-2, 1991.
- BROCCO, S.L.; O'CLAIR, R.; CLONEY, R.A. Cephalopod integument: the ultrastructure of Kölliker's organs and their relationship to setae. **Cell and Tissue Research**, v. 151, p. 293-308, 1974.
- DA SILVA, L.B.; VIDAL, E.A.G. **Caracterización histológica de lesiones en los brazos de paralarvas del pulpo común (*Octopus vulgaris*) cultivadas em laboratorio**. In: XI Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar. Viña del Mar, 2005.
- DE GROOT, S.J. Edible Species. In: RUITER, A. **Fish and fisheries products: composition, nutritive properties and stability**. CAB International, United Kingdom, 1995, p. 31-76.

- ELIAS, N.H. **Primeira descrição das paralarvas de *O. insularis* (Leite e Haimovici, 2008) a partir de reprodutores mantidos em laboratório.** 37 f. Trabalho de Graduação (Tecnologia em Aquicultura) – Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná, 2010.
- FORSYTHE, J.W. A working hypothesis of how seasonal temperature change may impact the field growth of young cephalopods. **Recent Advances in Fisheries Biology**, p. 133-143, 1993.
- GUERRA, A.; ROURA, A.; GONZÁLEZ, A.F.; PASCUAL, S.; CHEREL, Y.; PÉREZ-LOSADA, M. Morphological and genetic evidence that *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 inhabits Amsterdam and Saint Paul Islands (southern Indian Ocean). **ICES J. Mar. Sci.**, v. 67, p. 1401-1407, 2010.
- HAIMOVICI, M.; SANTOS, R.A.; FISCHER, L.G. Class Cephalopoda. In: RIOS, E.C. **Compendium of Brazilian Sea Shells**. Rio Grande, RS, 2009, p. 610 – 649.
- HANLON, R. T.; MESSENGER, J. B. **Cephalopod behavior**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.
- KARNOVSKY, M.J. A Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.
- KÖLLIKER, A. **Entwicklungsgeschichte der Cephalopoden**. Zürich: Meyer und Zeller, 1844.
- LEITE, T. S.; HAIMOVICI, M.; MOLINA, W.; WAMKE, K. Morphological and genetic description of *Octopus insularis*, a new cryptic species in the *Octopus vulgaris* complex (Cephalopoda: Octopodidae) from the tropical southwestern Atlantic. **Journal of Molluscan Studies**, v. 74, p. 63–74, 2007.
- 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, 2009a.
- LEITE, T. S.; HAIMOVICI, M.; MATHER, J.; OLIVEIRA, J. E. L. Habitat, distribution, and abundance of the commercial octopus (*Octopus insularis*) in a tropical oceanic island, Brazil: Information for management of an artisanal fishery inside a marine protected area. **Fisheries Research**, v. 98, p. 85–91, 2009b.

- MANGOLD, K.; BOLETZKY, S.v.; FRÖSCH, D. Reproductive biology and embryonic development of *Eledone cirrhosa* (Cephalopoda, Octopoda). **Marine Biology**, v.8, p. 109-117, 1971.
- MANGOLD, K. *Octopus vulgaris*. In: BOYLE, P.R. **Cephalopod Life Cycles, Species Accounts**, v. 1, London: Academic Press, p. 335-364, 1983.
- MAZZINI, F.S. **Comparação morfológica dos Órgãos de Kölliker em paralarvas de *O. vulgaris* e *Argonauta nodosa* (Cephalopoda: Incirrata)**. 39 f. Trabalho de Graduação (Bacharelado em Oceanografia) – Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná, 2010.
- NAEF, A. **Die Cephalopoden**. Monographie 35, Volume I, Parts I and II, Systematik, Fauna e flora del Golfo di Napoli, 1923.
- NORMAN, M. **Cephalopods of the world, a world guide**. Hakenheim: ConchBooks, 2003
- PARRA, G.; VALLANUEVA, R.; YÚFERA, M. Respiration rates in late eggs and early hatchlings of the common Octopus, *Octopus vulgaris*. **J. Mar. Biol. Ass. UK**, v. 80, p. 557-558, 2000.
- RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. 4 ed. São Paulo: Roca, 2005.
- SHMIEGELOW, J.M.M. **O planeta azul: uma introdução às ciências marinhas**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004.
- 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.
- VIDAL, E.A.G.; DIMARCO, F.P.; WORMUTH, J.H.; LEE, P.G. Influence of temperature and food availability on survival, growth and yolk utilization in hatchling squid. **Bulletin of Marine Science**, 71(2), p.915-931, 2002.
- VIDAL, E.A.G.; ROBERTS, M.J.; MARTINS, R.S. Yolk utilization, metabolism and growth in reared *Loligo vulgaris reynaudii* paralarvae. **Aquatic Living Resources**, 18, p.385-393, 2005.

VILLANUEVA, R. Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatching 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 Marine Biol.**: Annu. Rev. v. 46, p. 105-202, 2008.

YOUNG, R.E.; HARMAN, R.F. "Larva", "Paralarva" and "Subadult" in cephalopod terminology. **Malacologia**, v. 29, p. 201-207, 1988.

SWEENEY, M.J.; ROPER, C.F.E.; MANGOLD, K.M.; CLARKE, M.R.; BOLETZKY, S.v. "Larval and Juvenile Cephalopods: A Manual for Their Identification. **Smithsonian Contributions to Zoology** v. 513, p. 282, 1992.