

MARCOS PAULO TRINDADE DA VEIGA

**Comparação da tolerância fisiológica (temperatura e salinidade) entre as cracas
(Crustacea, Cirripedia) *Fistulobalanus citerosum* Henry, 1974 (espécie nativa) e
Amphibalanus reticulatus Utinomi, 1967 (espécie invasora)**

**Curitiba
2009**

MARCOS PAULO TRINDADE DA VEIGA

**Comparação da tolerância fisiológica (temperatura e salinidade) entre as cracas
(Crustacea, Cirripedia) *Fistulobalanus citerosum* Henry, 1974 (espécie nativa) e
Amphibalanus reticulatus Utinomi, 1967 (espécie invasora)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Ciências – Área Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Carolina Arruda de Oliveira Freire

**Curitiba
2009**

Veiga, Marcos Paulo Trindade da

Comparação da tolerância fisiológica (temperatura e salinidade) entre as cracas (Crustacea, Cirripedia) *Fistulobalanus citerosum* Henry, 1974 (espécie nativa) e *Amphibalanus reticulatus* Utinomi, 1967 (espécie invasora).
/Marcos Paulo Trindade da Veiga – Curitiba, 2009.

xi, 68 f.: il 2; 29 cm.

Orientador: Carolina Arruda de Oliveira Freire
Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Termo de aprovação

COMPARAÇÃO DA TOLERÂNCIA FISIOLÓGICA (TEMPERATURA E SALINIDADE) ENTRE AS CRACAS (CIRRIPEDIA, CRUSTACEA), *Fistulobalanus citerosum* HENRY, 1974 (ESPÉCIE NATIVA) E *Amphibalanus reticulatus* UTINONI 1967 (ESPÉCIE INVASORA)

por

Marcos Paulo Trindade da Veiga

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores



Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire - UFPR
Presidente e Orientadora



Dr. Fábio Bettini Pitombo - UFF



Dra. Maria Angélica Haddad - UFPR

Curitiba, 04 de março de 2009.

AGRADECIMENTOS

À Professora Carolina Arruda de Oliveira Freire, a quem eu admiro tanto pela organização e competência, que fez muito mais do que me orientar, apesar de isso não estar no contrato, que me ensinou que ser biólogo é muito mais que gostar da natureza e de ir para campo, me fez tomar gosto pela pesquisa, e fez nascer o ideal de um dia ser um cientista. E pela incomensurável paciência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa de mestrado.

À Vera Maria, secretária da Pós-Graduação em Zoologia, que mesmo antes de eu entrar no curso já quebrava meus galhos.

Ao Professor Fabio B. Pitombo, pela identificação das cracas, e por uma das melhores coletas da minha vida.

À diretoria do Iate Clube de Paranaguá, por permitir que as coletas ocorressem em suas instalações.

Ao Professor Patrício P. Zamora, do Depto. de Química pela utilização do fotômetro, e pela paciência para me ensinar a usar o aparelho.

Aos meus grandes amigos Irvo e Deni, que de professores passaram a fazer parte da minha vida, companheiros de todas as horas.

À Kethynha que é uma pessoa linda e que me incentivou em vários momentos, inclusive para que eu entrasse no mestrado.

À Patê que se revelou uma excelente amiga mesmo em momentos difíceis, sempre direta e verdadeira.

À Tânia por ter me ensinado lições da vida e de mim mesmo que nunca esquecerei.

Aos amigos Túnica e Poliqueta, obrigado pelos conselhos, Tėti pelas comidinhas maravilhosas e Amor pelas pedaladas.

À Rosa e o Veio, que desde a graduação me perseguem, e espero que nunca saiam da minha vida.

Aos meus amigos irmãos Luspi, Allan e Bé que mesmo distantes continuam fiéis.

Aos meus colegas de laboratório, Lú, Fliper, Vivi (agora Prof^a.) e Hugo, por sempre me ajudarem quando precisei, mesmo que fosse pra ir ao bar, ou pra arrumar o Lattes na última hora.

À minha NINA que foi um presente em um momento difícil da vida, que com uma alegria contagiante sempre me faz rir, que me ajudou até a última madrugada desta dissertação, TE AMOOOOOO!!!

E especialmente a minha família, meus irmãos Patricia e Rodrigo, meus filhos amados Felipe e Tatiana os melhores filhos que um pai pode ter, meu pai que lá do céu cuida de mim, e principalmente a minha mãe, que as vezes não sabia direito o que era esse tal de mestrado mas sempre me apoiou.

Tanto tempo, tanto esforço, tanto dinheiro, muitas vezes para se conseguir resultados pequenos quando comparados com as horas investidas. Mas todas as frustrações e todos os esforços monótonos, repetitivos, tornam-se insignificantes diante da alegria pura de descobrir algo novo, e esse prazer pode ser saboreado quase todos os dias, quando se ama as pequenas coisas. Dizer: Nós descobrimos isso: nós conseguimos extrair sentido e ordem da confusão da natureza. Pode haver recompensa maior?

Stephen J. Gould

SUMÁRIO

Agradecimentos	v
Resumo	x
Abstract	xii
Introdução	1
Objetivos	9
Hipótese.....	10
Material e Métodos	11
Local de coleta	11
Obtenção dos animais	12
Manutenção dos animais no laboratório	14
Experimentos de laboratório	14
Primeira Fase.....	15
Segunda Fase.....	16
Obtenção dos fluidos	16
Obtenção dos tecidos.....	17
Teor hídrico das partes moles	18
Dosagens.....	18
Osmolalidade.....	19
Sódio e Cloreto.....	19
Magnésio.....	19
Potássio.....	20
Análise Estatística	20
Resultados	21

FASE I	21
Osmolalidade	21
Cloreto	24
Sódio	27
Magnésio	30
Potássio	33
FASE II	36
Osmolalidade	36
Cloreto	39
Sódio	42
Potássio	45
Teor Hídrico	48
Discussão	51
Conclusão	59
Literatura citada	60

Resumo

A introdução de espécies é um dos fatores que mais causa prejuízo a ecossistemas, ocasionando a perda de biodiversidade em ambientes terrestres e aquáticos, tanto marinhos quanto dulcícolas. Regiões portuárias são muito suscetíveis a este processo, e a Baía de Paranaguá é o exemplo mais próximo. Muitos organismos são frequentemente transportados entre áreas portuárias, incrustados nas embarcações ou suspensos em águas de lastro, e podem se estabelecer em locais nos quais não chegariam naturalmente. Um dos fatores determinantes para seu estabelecimento em estuários, onde frequentemente se localizam os portos, é sua tolerância fisiológica às variações ambientais típicas destes ambientes. O potencial de invasão de uma espécie pode ser parcialmente relacionado a esta tolerância fisiológica, e à de organismos nativos que sejam seus competidores diretos. Para analisar este fenômeno, no presente trabalho foram comparadas as cracas (crustáceos cirripédios) introduzida *Amphibalanus reticulatus* (Utinomi, 1967) e nativa *Fistulobalanus citerosum* (Henry, 1974). Os animais foram coletados no late Clube de Paranaguá, que fica próximo ao Porto de Paranaguá. Substratos foram instalados e posteriormente recolhidos com os animais adultos. Estes foram levados para o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO), do Departamento de Fisiologia da UFPR, onde foram mantidos em condições semelhantes às do local de coleta. As espécies foram expostas a duas modalidades de experimentos em laboratório. Na primeira, o tempo foi fixado em 6h, e as variáveis foram temperatura (10, 20 e 30°C) e salinidade (0, 20 e 40‰). Na segunda, a temperatura foi fixada em 20°C e os parâmetros variáveis foram salinidade (0, 10, 20, 30, 40‰) e tempo (9, 12 e 48h). Após a

exposição às condições experimentais, foram coletados os fluidos internos dos animais para as dosagens da osmolalidade e dos íons cloreto, sódio, magnésio e potássio. Também foram retirados os tecidos moles para a determinação de teor hídrico. Foi detectada diferença entre as espécies, sendo que *Fistulobalanus citerosum* apresentou valores de concentração de fluido mais estáveis, suportando por mais tempo as condições experimentais, e conseguindo sustentar maiores gradientes em relação à água. *Amphibalanus reticulatus* demonstrou ser mais sensível a alterações ambientais, principalmente quando exposto a aumento de salinidade (40‰). Os resultados indicaram que *F. citerosum* é uma espécie que tolera uma maior amplitude de variação ambiental (mais euri-halina e euri-térmica), portanto melhor equipada para resistir a extremos de salinidade e temperatura do que *A. reticulatus*. Embora *A. reticulatus* seja a espécie introduzida, e presumivelmente mais resistente a extremos ambientais, *F. citerosum* apresentou maior tolerância a estas situações. Contudo, estudos adicionais sobre a fisiologia e biologia destas espécies seriam necessários para elucidar quais os mecanismos que fornecem esta vantagem para *F. citerosum*.

Abstract

Species introduction is one of the main factors offering potential harm to biodiversity of terrestrial and aquatic environments. Harbour areas are very susceptible to this process, and Paranaguá Bay is our closest example. Barnacles (Crustacea, Cirripedia), are very frequently transported between harbour areas through ballast water of large ships, and may then establish in places where they would not normally occur. One of the main factors determining their establishment in estuaries, where harbours are frequently located, is their physiological tolerance to abiotic variations typical of these environments. The invasive potential of a species may then be at least partially related to its range of physiological tolerance, and that of their direct native competitors. In order to analyse this phenomenon, the exotic barnacle *Amphibalanus reticulatus* has been compared with the native barnacle *Fistulobalanus ciferrius*, with both species exposed to different combinations of temperature (10, 20, and 30°C) and salinity (0, 20, 40‰). Both species have also been submitted to several salinities (0, 10, 20, 30, 40‰) at 20°C for 9, 12, and 48 h. Barnacles have been obtained from the "late Clube de Paranaguá", located next to Paranaguá Harbour. Artificial substrates have been installed for settling of the larvae, and after their development, substrates with the adults have been taken to the laboratory of Comparative Physiology of Osmoregulation at the Department of Physiology of UFPR, where they have been kept in stock aquaria with intermediate salinity, typical of the estuary (20‰). After exposure to experimental conditions, the internal fluid has been obtained for the assays of osmolality, chloride, sodium, magnesium, and potassium. Water content of the soft tissue of the animal was also determined.

A difference was detected between both species. *F. citerosum* (native species) displayed more stable internal values, enduring longer the environmental challenges, and being able to sustain larger differences with respect to the water. *A. reticulatus* was apparently more sensitive to the challenges presented, mainly when exposed to salinity increase (40‰). Results indicated that *F. citerosum* tolerates a wider range of environmental variation (is more euryhaline and eurythermic), thus is better equipped to handle salinity and temperature challenges than *A. reticulatus*. Although *A. reticulatus* is the exotic species here, it is probable that *F. citerosum* would have a higher invasive potential (from the physiological standpoint). However, additional studies should be conducted on the physiology and biology of these species to clarify the mechanisms that confer this advantage to *F. citerosum*.

INTRODUÇÃO

Estuários são áreas marinhas costeiras salobras que recebem aporte de água doce, caracterizados por grandes variações de salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido, quantidade de nutrientes, marés, correntes marinhas e turbidez (Queiroz *et al.*, 2006). As variações destes fatores são provocadas principalmente pelo movimento das marés. Na maré vazante o ambiente recebe massas de água doce, o que ocasiona a diminuição da salinidade, da temperatura, dentre outros. Na maré enchente massas de água marinhas invadem o local, alterando novamente o ambiente.

Para este estudo foi selecionado o estuário da Baía de Paranaguá, Paraná. Neste, se encontra um dos maiores portos do país, responsável por uma grande movimentação de carga e conseqüentemente de embarcações, originárias de diversas partes do mundo. A Baía de Paranaguá forma, juntamente com as Baías de Antonina, Pinheiros e Laranjeiras, o Complexo Estuarino de Paranaguá, com área de 612 km² (Lana *et al.*, 2001).

Variações constantes do ambiente estuarino selecionam os organismos que ali estão estabelecidos, visto que os mesmos devem tolerar esta grande amplitude na variação dos fatores ambientais destes locais. Dentre as dificuldades causadas por alterações ambientais, duas das mais significativas são a temperatura e a salinidade. Tanto flora quanto fauna devem apresentar mecanismos fisiológicos adequados a esta realidade.

Mesmo com grandes dificuldades para se estabelecer em estuários, uma grande diversidade faunística ocorre nestes ambientes, onde representantes de diversos filos estão presentes. Dentre os filos encontrados em estuários,

destacam-se os crustáceos, com representantes de diversas ordens. E, tanto os crustáceos como os demais animais de origem marinha, que se estabelecem em ambientes como estuários e águas continentais, devem ser capazes de regular seus fluidos corpóreos, lidando com o excesso de água ou carência de sais nestes novos ambientes em relação ao ambiente marinho (Freire *et al.*, 2008a).

Os animais existentes nestes locais convivem com a constante flutuação dos fatores abióticos, e para tanto devem possuir uma série de características que possibilitem sua existência. Um dos mecanismos que propicia a estes animais o equilíbrio fisiológico é a osmorregulação. A osmorregulação é a capacidade dos animais de manter estável a concentração de solutos em seus fluidos (homeostasia osmótica), mesmo diante de mudanças no meio externo (Schmidt-Nielsen, 2002).

A capacidade osmorregulatória é constantemente exigida dos animais nos diversos ambientes aquáticos. Para responder a diferentes condições ambientais os animais possuem basicamente duas estratégias: a osmoconformação e a osmorregulação. No ambiente marinho, que é muito mais estável que os demais ambientes aquáticos, a estratégia básica e mais econômica energeticamente, usada pelos crustáceos e por invertebrados marinhos em geral, é a de osmoconformação. Osmoconformação é a presença de alta permeabilidade osmótica e iônica aliada à ausência de transporte ativo de sal nos epitélios de interface entre o meio externo e o meio interno do animal, gerando ausência de gradientes significativos entre o seu líquido extracelular e o meio externo. Ou seja, se houver variação na salinidade do

meio externo, o meio interno (líquido extracelular) acompanha esta variação (Péqueux, 1995; Schmidt-Nielsen, 2002; Freire *et al.*, 2008a,b).

Crustáceos que ocupam o ambiente dulcícola têm capacidade de osmorregular, sustentando gradientes significativos em relação ao meio externo, água doce (Péqueux, 1995; Freire *et al.*, 2008a,b). Neste caso os animais, através de um órgão especializado (normalmente as brânquias), realizam transporte ativo de íons, mantendo sua homeostase interna iônica e osmótica, propiciando assim um ambiente estável para as suas células. A capacidade osmorregulatória em crustáceos tem sido vastamente investigada por meio da exposição a estresse salino (revisões em Péqueux, 1995; Freire *et al.*, 2008b). O funcionamento de uma complexa maquinaria celular, que envolve transportadores, bombas e cotransportadores de íons, encontrados nas brânquias multifuncionais, permite aos crustáceos sobreviver em uma grande variedade de ambientes (Bromberg *et al.*, 1995; Péqueux, 1995; Augusto *et al.*, 2007; Bianchini *et al.*, 2008; Freire *et al.*, 2008b).

Dentre os crustáceos, o único grupo sésil é o dos cirripédios. Estes possuem larvas que se fixam ao substrato através da glândula de cimento, localizada na base do primeiro par de antenas. A base que une o animal ao substrato pode ser membranosa ou calcária. As placas laterais que envolvem o animal são secretadas por uma parte do próprio exoesqueleto que não sofre muda. O contato do animal com o meio externo é feito através de uma abertura na concha, que fica oposta à base. Esta abertura é protegida pelo opérculo, que é formado por tergos e escudos móveis e pareados (Ruppert & Barnes, 1996; Hickman *et al.*, 2004) (Figura 1).

Freqüentemente encontradas em estuários, as cracas (Cirripédios), são Crustáceos que apresentam algumas peculiaridades, as quais foram determinantes na escolha do grupo para a condução deste trabalho.

Os cirripédios são osmoconformadores. Diante de situações extremas, estes organismos fecham suas “conchas”, o que garante o seu isolamento em relação à água circundante, pelo menos por algum tempo. Experimentos avaliaram o efeito da salinidade sobre o recrutamento e a distribuição das cracas *Tetraclita squamosa* e *T. japonica*. Quando expostas a baixas salinidades (<10‰), as cracas percebem a diluição e, em resposta a ela, fecham suas conchas, mantendo a água mais concentrada em seu interior (Chan *et al.*, 2001).

Recrutamento, desenvolvimento e assentamento de larvas de cracas em função de temperatura, salinidade, e disponibilidade de alimento têm sido estudados no litoral da China (Chan *et al.*, 2001; Thiyagarajan *et al.*, 2003), da Índia (Desai *et al.*, 2006a) e do Japão (Desai & Anil, 2004; Desai *et al.*, 2006b). Efeitos combinados de salinidade e temperatura no desenvolvimento e na fixação de larvas de *Balanus trigonus* foram avaliados e constatou-se que o sucesso do recrutamento é menor no verão, devido às altas temperaturas e baixas salinidades, decorrentes das chuvas abundantes, características locais desta estação (Thiyagarajan *et al.*, 2003). Tolerâncias diferentes a variações térmicas e salinas resultam em diferentes padrões de recrutamento e assentamento em cracas (Caffey, 1985; Chan *et al.*, 2001; Desai *et al.*, 2006).

No presente trabalho as espécies escolhidas como objetos de estudo pertencem à família Amphibalanidae, que agrega grande parte das espécies encontradas em estuários. As espécies de cracas relatadas como abundantes

na Baía de Paranaguá, e que foram alvo da comparação fisiológica neste trabalho são *Fistulobalanus citerosum* (Ordem Balanomorpha, Família Amphibalanidae) (Figura 2A), uma espécie nativa (Young, 1994), e *Amphibalanus reticulatus* (Ordem Balanomorpha, Família Amphibalanidae), uma espécie introduzida (Figura 2B). A família Amphibalanidae passou por análise filogenética, e a espécie exótica *A. reticulatus* foi reenquadrada, passando do gênero *Balanus* para *Amphibalanus* (Pitombo, 2004).

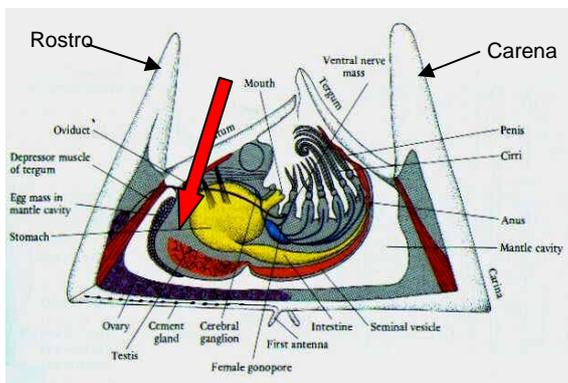


Figura 1. Visão esquemática da anatomia interna de cracas da ordem Thoracica; seta vermelha indicando local de inserção as seringa para a retirada dos fluidos; figura modificada de Darwin, 1854.

A espécie *A. reticulatus* tem distribuição circuntropical (Young, 1998), sendo considerada uma introdução recente na costa brasileira. O primeiro registro da espécie no país foi em Pernambuco (Farrapeira-Assunção, 1990), posteriormente na Bahia (Young, 1998), e no Paraná mais recentemente (Neves, 2006) (Figura 2B).

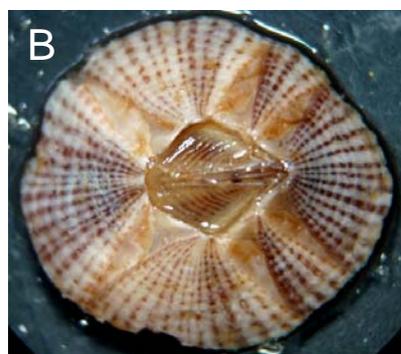


Figura 2. Espécies analisadas *F.citerosum* (A, sp nativa, diâmetro aprox. 25mm), e *A. reticulatus* (B, espécie introduzida, diâmetro aprox. 20mm).

A espécie nativa *Fistulobalanus citerosum* é encontrada em áreas mais internas de estuários, onde há maior influência de águas continentais e, portanto, águas muito diluídas. A espécie apresenta como características externas linhas escuras (entre roxo e marrom) em toda extensão das placas laterais, da base ao ápice, e uma faixa branca facilmente distinguível na extremidade mais próxima da carena (Figuras 1 e 2A).

A espécie introduzida *Amphibalanus reticulatus* é encontrada em estuários, mais frequentemente em áreas externas (próximas ao encontro com o mar), ocorrendo também em regiões costeiras de mar aberto. Externamente, possui marcas de aspecto reticulado devido à presença de linhas verticais escuras “cortadas” por anéis horizontais mais claros. Além disso, possui um escudo com manchas cuneiformes e relevo mais evidente (Fabio Pitombo, comunicação pessoal) (Figura 2B).

As espécies podem ser classificadas em três categorias segundo sua origem: nativas, introduzidas e criptogênicas. Espécies nativas possuem distribuição limitada à região de origem, incluindo espécies endêmicas. Espécies introduzidas ou exóticas são aquelas transportadas, intencionalmente ou não, para locais onde não eram historicamente registradas. Este transporte, em geral, ocorre como resultado de atividades humanas. Quando não há evidências acerca da origem de uma espécie, esta é dita criptogênica. (Carlton, 1985; 1996a).

A navegação, principalmente o transporte de cargas por longas rotas comerciais, constitui um importante vetor para dispersão de espécies aquáticas. Embarcações de grande porte, quando vazias, enchem seus tanques com água para atingir estabilidade, a chamada “água de lastro”. Esta é

posteriormente liberada em locais distantes de sua origem, carreando diversos elementos de fauna e flora. A presença destes organismos introduzidos pode causar perda de habitat para espécies nativas por competição, e pode diminuir a biodiversidade local (Carlton, 1987; 1989; Vermeij, 1991; Ruiz *et al.*, 1997; Cohen & Carlton, 1998; Bax *et al.*, 2001; Hutchings *et al.*, 2002).

Outro importante vetor para a introdução de espécies é a bioincrustação. Nesta, animais são fixados em estruturas flutuantes, como plataformas de petróleo e cascos de embarcações, e transportados para diversas áreas (Fabio Pitombo, comunicação pessoal).

As regiões portuárias são locais que concentram uma grande quantidade de embarcações, sendo assim particularmente suscetíveis à presença de espécies introduzidas. Cerca de 3000 espécies são transportadas diariamente, chegando a dezenas de milhares de espécies diferentes por ano, que podem estabelecer-se nestas áreas (Carlton, 1996b). De fato, foi constatada a presença de fauna marinha introduzida no estuário da Baía de Paranaguá, PR, onde se localiza o Porto de Paranaguá (Neves, 2006).

Neste trabalho, será avaliada a salinidade, pois os animais encontram-se em um estuário, onde este fator abiótico sofre grande variação (Lana *et al.*, 2001; Queiroz *et al.*, 2006). A temperatura também foi escolhida, por desempenhar um papel muito importante no ciclo de vida dos cirripédios. Interfere no desenvolvimento larval, na metamorfose, na reprodução, entre outros (Anil *et al.*, 2001; Desai & Anil, 2004; Desai *et al.*, 2006a,b), influenciando no recrutamento e na abundância de *Balanus balanoides*, fato verificado em estudos de longa duração (Southward, 1967; Herbert *et al.*, 2007). O aumento da temperatura pode alterar a distribuição de bivalves e

cirripédios, favorecendo o recrutamento das cracas (Broitman *et al.*, 2005). A temperatura pode ainda influenciar o ciclo de vida de outros crustáceos (Cailleaud *et al.*, 2007) e de organismos marinhos como os moluscos (Buckley *et al.*, 2001) e cnidários. Nestes últimos, o aquecimento provoca o fenômeno do branqueamento, podendo selecionar espécies mais resistentes (Maynard *et al.*, 2008).

Devido à escassez de literatura a respeito da fisiologia dos Cirripedia de forma geral, e destas espécies em particular, este trabalho busca aumentar a disponibilidade de informações a respeito destes animais, e podendo servir de subsídio para um futuro plano de manejo relacionado a espécies introduzidas na Baía de Paranaguá, PR.

OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivos comparar as respostas fisiológicas das cracas, *Fistulobalanus citerosum* (espécie nativa) e *Amphibalanus reticulatus* (espécie introduzida), diante da exposição dos animais a diversas combinações de salinidade e temperatura; e relacionar os resultados com a capacidade das duas espécies de ocupar substratos consolidados na região estuarina da Baía de Paranaguá.

HIPÓTESE

Este trabalho visa testar a hipótese de que a espécie introduzida *Amphibalanus reticulatus* é mais resistente a estresses osmótico e térmico que *Fistulobalanus citerosum*. *A. reticulatus*, por se tratar de um organismo que foi submetido a condições desfavoráveis durante o transporte do seu ponto de origem até a Baía de Paranaguá, poderia apresentar maior resistência que a espécie nativa quando expostas a condições experimentais extremas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local de coleta

As coletas das cracas foram realizadas nas dependências do late Clube de Paranaguá (ICP) (Figuras 3 e 4), localizado na Rua Benjamin Constant, nº 423, Paranaguá, PR (<www.icpgua.com.br>, 2008), sob as coordenadas geográficas 25° 30' 56" S – 48° 29' 57" W . O ICP é uma associação sem fins lucrativos, fundada em 1952. É constituído de proprietários de embarcações de lazer, que, através do pagamento de uma mensalidade, mantêm o funcionamento da instituição. Encontram-se nas suas dependências embarcações de diversas categorias, como veleiros de pequeno e médio porte, lanchas, escunas, entre outros, tanto atracados quanto dentro da “garagem”, onde os barcos ficam em vagas secas. No local ficam concentradas embarcações de diversos órgãos públicos como Polícia Federal, Bombeiros, Instituto Ambiental do Paraná (IAP), etc (late Clube de Paranaguá, 2008).

Por se tratar de um estuário, o local tem grande variação de temperatura e salinidade, além de outros aspectos. A salinidade varia entre 12‰ e 29‰ no verão, e 20‰ e 34‰ no inverno, e a temperatura oscila entre 23°C a 29°C no verão, e entre 18°C e 25°C no inverno (Lana et al., 2001; Queiroz *et al.*, 2006).

Obtenção dos animais

A obtenção dos animais foi realizada no píer do late Clube de Paranaguá (Figura 4), na Baía de Paranaguá, PR. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO) do Departamento de Fisiologia da UFPR, para verificar a tolerância fisiológica (temperatura e salinidade) e a capacidade de regulação da água tecidual das espécies escolhidas.



Figura 3. Localização aproximada do late Clube de Paranaguá.

Para a obtenção dos animais, garrafas “pet” de 500 ml foram presas a cordas com braçadeiras plásticas e mergulhadas a uma profundidade de aproximadamente 20 cm. O intuito desta prática foi o de fornecer um substrato para o assentamento e desenvolvimento de larvas.



Figura 4. O píer do late Clube de Paranaguá, PR, BR. Visão lateral dos atracadores flutuantes onde foram fixadas as cordas com os substratos.

Foram colocadas 20 garrafas plásticas, sendo que destas, 10 tiveram sua superfície lixada. De cada um dos 2 grupos de 10 garrafas, metade teve sua parte inferior cortada. As garrafas com a base cortada afundavam mais facilmente na coluna d'água e eventualmente permitiam a incrustação na sua face interna. Este material foi escolhido por ser de baixo custo, fácil obtenção, manuseio e transporte. Contudo, com o passar do tempo, notou-se que a quantidade de assentamentos nas garrafas não foi tão grande quanto o esperado. Para tentar sanar este problema, foram utilizados outros tipos de substratos para testar se um número maior de animais assentaria. Então, foram introduzidos pedaços de madeira de 5 x 5 x 1 cm, pedaços de cerâmica de 10 x 10 x 0.5 cm, além de recortes de diversos formatos de garrafas pet de 2 litros. Os materiais apresentaram diferentes graus de incrustação, e todos foram utilizados para as coletas dos animais. Diferentes substratos artificiais são utilizados para avaliar a bioincrustação (O'Connor & Richardson, 1994; Glasby *et al*, 2007).

No transcorrer das coletas, foi observado um grande número de animais fixados nos flutuadores (tambores plásticos) e nas estruturas que os sustentam, que também estavam permanentemente mergulhadas na água. Como se tratavam das mesmas espécies que se fixavam nos substratos introduzidos, e se encontravam sob as mesmas condições, estes animais também foram utilizados nos experimentos de laboratório. Tais animais foram coletados devido a sua abundância e maior facilidade de coleta, sendo mais numerosos que os animais dos substratos introduzidos para o trabalho.

Após a fixação e o desenvolvimento das larvas no substrato, o mesmo foi recolhido, ou no caso dos animais fixados nas estruturas dos flutuadores, estes foram retirados manualmente, e levados para o laboratório.

Manutenção dos animais no laboratório

O período de aclimação foi de cerca de uma semana. Os animais foram mantidos em aquário de vidro de 45 litros, com aeração constante, temperatura de 20°C ($\pm 2^\circ$), com luz natural e fotoperíodo de aproximadamente 13 horas de luz e 11 horas de escuro, pH 7.0, filtragem realizada por filtro biológico e salinidade de 20‰ (média do local de coleta). Os animais eram alimentados a cada três dias com *Artemia salina*, vendida em lojas de aquário.

Experimentos de Laboratório

Os experimentos de laboratório foram realizados em duas fases, sendo que na primeira foi fixado o fator tempo (variando temperatura e salinidade) e na segunda foi fixada a temperatura (variando tempo e salinidade). Todos os procedimentos de coleta, manutenção dos animais e dosagens seguiram exatamente o mesmo protocolo nas duas fases experimentais. As diferenças entre as etapas, em termos de análises realizadas, foram que exclusivamente na primeira fase foi realizada a dosagem do íon magnésio e apenas na segunda fase foi executada a determinação do teor hídrico dos tecidos.

Primeira fase

Com base nos valores já conhecidos de salinidade e temperatura do local de coleta, foram determinados valores que extrapolassem estes limites naturais. Para tanto, os valores de salinidade utilizados nos experimentos foram de 0, 20 e 40‰, e os de temperatura foram de 10, 20 e 30°C. Os valores testados propiciaram a verificação dos limites de tolerância das cracas às condições impostas. Um parâmetro foi mantido constante (salinidade ou temperatura), enquanto 3 níveis diferentes do outro parâmetro foram testados. Tivemos assim 9 situações experimentais. Os experimentos foram realizados em aquários de 3 litros, onde foram colocados seis animais de cada espécie, totalizando 12 animais por aquário. As condições experimentais foram executadas 2 vezes, para aumentar a confiabilidade dos dados. Cada animal foi exposto a apenas uma condição experimental. O diâmetro da base da carapaça dos animais avaliados variou entre 1 e 3 cm. Os experimentos tiveram duração de 6 horas, o que permitiu acompanhamento constante, e simulou o estresse causado pelo ciclo de marés. Este procedimento foi adotado nos experimentos, mesmo tendo-se ciência de que durante o movimento natural das marés as alterações de salinidade são lentas e graduais, e de que existem restrições quanto à comparação do experimento com a realidade encontrada no ambiente.

Segunda fase

A princípio, seria feita somente a caracterização fisiológica da capacidade osmorregulatória de *Fistulobalanus citerosum*, a espécie nativa. Contudo, dada à carência, na literatura, de informações referentes também à espécie introduzida *Amphibalanus reticulatus*, optou-se por fazer os experimentos com as duas espécies.

Para tanto, as cracas foram expostas a experimentos com tempos diferentes de exposição, a uma grande variação de salinidade, procurando-se determinar os limites de tolerância fisiológica dos animais a estas condições. A temperatura escolhida para a realização dos experimentos foi de 20°C, e os animais foram expostos às salinidades de 0, 10, 20, 30 e 40‰. Os experimentos duraram 9, 12 e 48 h. Seguindo uma seqüência temporal mais gradual, talvez o tempo de 24 h devesse estar presente entre os tempos de 12 e 48 h. Contudo, como os resultados de 9 e 12 h foram semelhantes, o intuito do estabelecimento do tempo de 48 h foi o de verificar se haveria diferença em relação ao tempo de 12 h, e se este sinal fosse percebido, então o tempo de 24 h seria testado. Entretanto, como pode ser visto nos resultados, esta situação não se justificou.

Obtenção dos fluidos

Após exposição dos animais às condições experimentais, o fluido foi retirado para as dosagens de íons e osmolalidade. Não foi possível separar a hemolinfa da água contida no interior da concha dos animais. Além disso, as

dosagens de proteínas (kits Labtest, dados não mostrados) realizadas em ambos, resultaram em valores semelhantes. Assim, o termo “fluido” foi adotado para designar a mistura composta por um grande volume de hemolinfa e um pequeno de água do interior da concha. Amostras de fluido foram retiradas utilizando-se seringas de insulina descartáveis de 1ml. A agulha foi inserida na abertura da concha, entre as placas do opérculo, mais especificamente entre os escudos, na altura da inserção do músculo retrator do escudo, buscando alcançar a massa visceral do animal. As amostras, que continham de 100 a 300µl, foram coletadas após seis horas de exposição dos animais às condições experimentais e acondicionadas em tubos “ependorf”. Estes foram identificados e mantidos em freezer à temperatura de -20°C .

Obtenção dos tecidos

Após a retirada de fluido, foram coletados os tecidos com o auxílio de uma pinça de ponta fina. Esta foi inserida entre as placas do opérculo e a face interna da parede lateral da concha, ocasionando o rompimento da musculatura que movimenta as placas, e possibilitando a retirada da mesma juntamente com as partes moles do animal. Tais partes se constituem de um conjunto de músculos, tórax, gônadas, vísceras, etc. Assim como os fluidos, os tecidos moles também foram acondicionados em tubos “ependorf” e estes foram identificados e conservados em freezer a -20°C .

Teor hídrico das partes moles

O teor hídrico tecidual constituiu-se de uma ferramenta para avaliar a entrada ou saída de água dos tecidos. Os valores de teor hídrico indicam a capacidade das células de regular a quantidade de água no seu interior, quando expostas a estresse salino.

Dos tecidos moles, foram desprezadas as porções que continham os cirros, os quais são constituídos, em grande parte, pela proteína quitina, e não teriam alteração relevante em seu peso após a desidratação. O restante dos tecidos moles foi pesado em balança analítica com precisão de 0.0001g (Bioprecisa, FA2104N), para a mensuração do peso úmido (Pu). Em seguida o tecido foi desidratado em estufa a 60°C durante 24 horas e então pesado novamente para a obtenção do peso seco (Ps). O teor de hidratação do tecido (Th) pode ser calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Th (\%)} = \frac{(\text{Pu} - \text{Ps})}{\text{Pu}} \times 100$$

Dosagens

As dosagens de osmolalidade foram realizadas no micro-osmômetro de pressão de vapor VAPRO 5520 (Wescor, Logan, EUA), em amostras não diluídas. Os íons sódio e potássio foram dosados por fotometria de chama (fotômetro DIGIMED DM61 V7F) e os íons magnésio e cloreto por colorimetria

(kits comerciais Labtest, leitura em espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pharmacia-biotech), em amostras apropriadamente diluídas em água ultrapura.

Osmolalidade

A osmolalidade é a mensuração da quantidade de partículas osmoticamente ativas, sejam elas íons inorgânicos, ou partículas orgânicas tais como amino-ácidos e açúcares. Variações nos valores medidos de osmolalidade nos fluidos dos animais são indicações de alteração na homeostasia celular.

Sódio e Cloreto

Sódio e cloreto são os íons mais abundantes na água do mar, representando aproximadamente 90% do total encontrado. Constituem também parte equivalente dos fluidos intra e extracelular dos animais. Neste último, alterações das quantidades dos íons em questão podem dar informações acerca da capacidade osmorregulatória dos organismos.

Magnésio

O magnésio é o principal cátion divalente intracelular em termos de concentração, e participa da regulação da atividade de inúmeras enzimas intracelulares. Além disso, está presente em alta concentração na água do mar.

Alterações em suas concentrações podem demonstrar comprometimento das funções celulares.

Potássio

Este íon tem a concentração intracelular muito maior que a extracelular e a ambiental, e o aumento de sua concentração extracelular indica que houve lise celular. Este processo indica que o animal está com suas funções fisiológicas muito prejudicadas, podendo até mesmo ter morrido.

Análise Estatística

Os dados de porcentagem de sobrevivência/tolerância são qualitativos. Os dados de osmolalidade e íons dos fluidos, e de teor hídrico dos tecidos foram avaliados em relação às variações de temperatura e salinidade através de Análise de Variância de duas vias, com teste *post hoc* de Tukey para localizar as diferenças entre as médias ($P < 0,05$). Nos casos de falha nos testes de normalidade e homogeneidade de variância, o teste de Kruskal-Wallis foi realizado.

RESULTADOS

FASE I

Osmolalidade

Efeito da temperatura e comparação entre as espécies

Na salinidade 0‰, a osmolalidade do fluido de *F. citerosum* foi maior em 10°C ($642 \pm 14\text{mM}$) do que em 30°C ($529 \pm 6\text{mM}$). A osmolalidade do fluido de *A. reticulatus* foi estável em todas as temperaturas. *F. citerosum* teve osmolalidade superior à de *A. reticulatus* na temperatura de 10°C ($601 \pm 14\text{mM}$). *F. citerosum* teve osmolalidade inferior à de *A. reticulatus* sob a **temperatura de 30°C ($550 \pm 6\text{mM}$) (Figuras 5 A).**

Na salinidade de 20‰, não foram encontradas diferenças nos valores de osmolalidade, entre os animais da mesma espécie nas diferentes temperaturas testadas, nem entre os animais de espécies diferentes expostos à mesma condição (Figuras 5 B).

Na salinidade 40‰, a osmolalidade do fluido de *F. citerosum* foi menor em 10°C ($681 \pm 84\text{mM}$) quando comparado com 30°C ($840 \pm 43\text{mM}$). A osmolalidade de *A. reticulatus* em 10°C ($790 \pm 50\text{mM}$) foi menor que em 30°C ($1123 \pm 42\text{mM}$). *F. citerosum* teve osmolalidade inferior à de *A. reticulatus* na temperatura de 30°C (Figuras 5 C).

Efeito da salinidade

Na temperatura de 10°C a osmolalidade dos fluidos de *F. citerosum* manteve-se estável em todas as salinidades. A osmolalidade dos fluidos de *A. reticulatus* em 0‰, foi inferior a 40‰. Na temperatura de 20°C, a osmolalidade dos fluidos de *F. citerosum* manteve-se estável em 0‰ e em 20‰, aumentando em 40‰. A osmolalidade dos fluidos de *A. reticulatus* manteve-se estável em todas as salinidades. À temperatura de 30°C, a osmolalidade dos fluidos de *F. citerosum* e de *A. reticulatus* mantiveram-se estáveis em 0‰ e em 20‰, aumentando em 40‰ (Figuras 5).

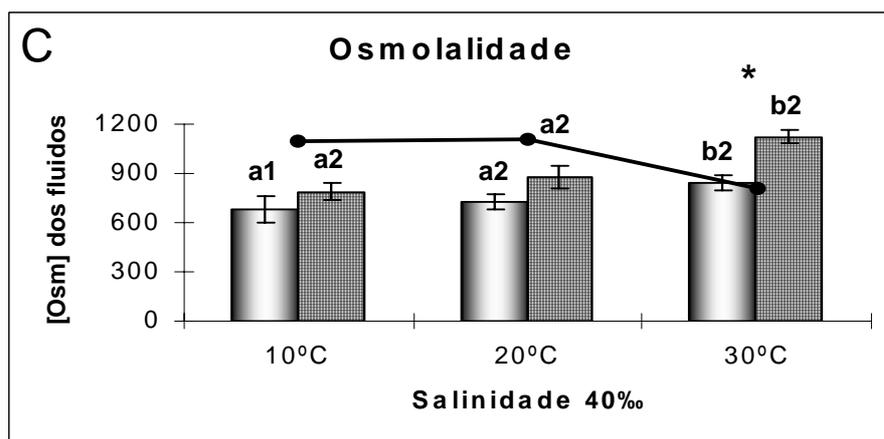
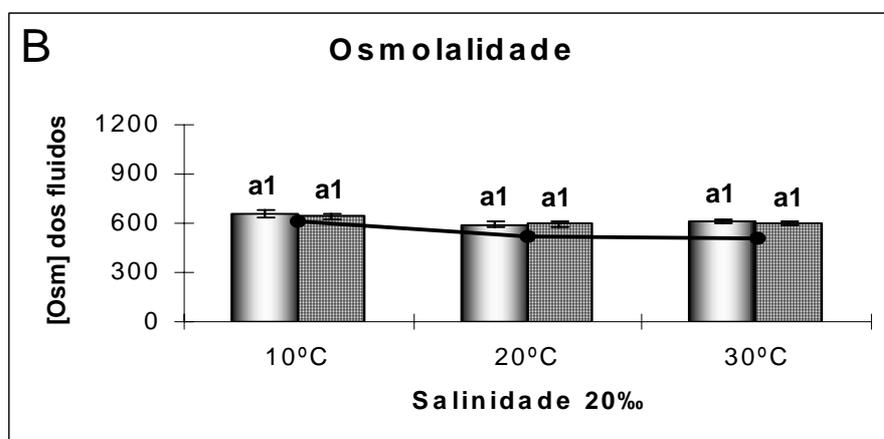
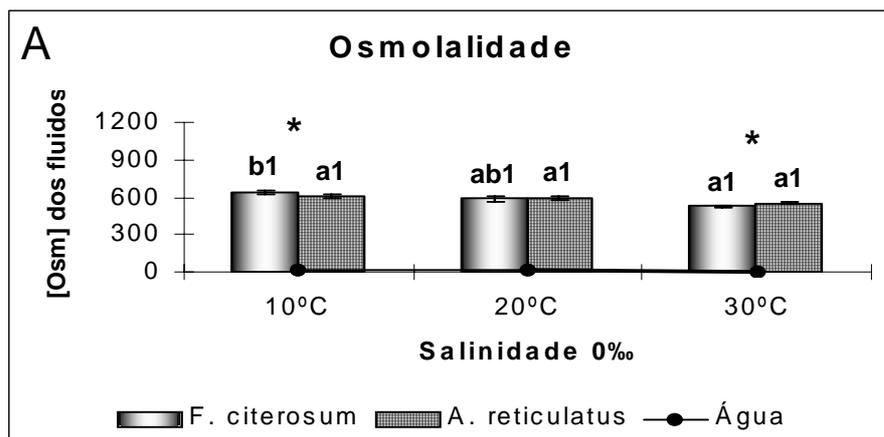


Figura 5. Osmolalidade dos fluidos, barras sombreadas *Fistulobalanus citerosum*, barras quadriculadas *Amphibalanus reticulatus*, nas salinidades 0‰ (A), 20‰ (B) e 40‰ (C); letras minúsculas e números indicam o resultado da análise estatística para cada espécie separadamente. Letras indicam resultados referentes à temperatura (em uma mesma salinidade, mesmo gráfico); números indicam o resultado em relação à salinidade (em uma mesma temperatura, gráficos em seqüência); barras com letras ou números em comum não são significativamente diferentes; asteriscos indicam diferenças significativas entre as espécies submetidas à mesma condição experimental; os pontos pretos representam a osmolalidade medida nas águas experimentais, $P < 0,05$.

Cloreto

Efeito da temperatura e comparação entre as espécies

À salinidade de 0‰, o íon cloreto nos fluidos de *F. citerosum* teve maior concentração em 10°C ($301 \pm 10\text{mM}$), do que em 30°C ($245 \pm 6\text{mM}$). Em *A. reticulatus* o íon cloreto foi estável nas 3 temperaturas. *F. citerosum* teve concentração de sódio maior do que *A. reticulatus* ($271 \pm 7\text{mM}$), em exposição à temperatura de 10°C (Figuras 6 A).

Na salinidade de 20‰, o íon cloreto nos fluidos de *F. citerosum* foi estável em todas as temperaturas. O íon cloreto de *A. reticulatus* em 10°C ($295 \pm 9\text{mM}$) e em 20°C ($314 \pm 12\text{mM}$) foi inferior do que em 30°C ($399 \pm 46\text{mM}$). *F. citerosum* ($329 \pm 8\text{mM}$), teve concentração de cloreto maior que *A. reticulatus* em exposição à temperatura de 10°C (Figuras 6 B).

À salinidade de 40‰, o íon cloreto de *F. citerosum* foi estável em todas as temperaturas. Em *A. reticulatus* as concentrações de cloreto em 10°C ($403 \pm 23\text{mM}$) e 20°C ($380 \pm 20\text{mM}$) foram menores do que em 30°C ($492 \pm 36\text{mM}$). *F. citerosum* ($374 \pm 15\text{mM}$) teve concentração de cloreto inferior que *A. reticulatus*, quando expostos à temperatura de 30°C (Figuras 6 C).

Efeito da salinidade

Na temperatura de 10°C, o íon cloreto dos fluidos de *F. citerosum* manteve-se estável em todas as salinidades. O íon cloreto dos fluidos de *A. reticulatus* em 0‰ foi inferior do que em 40‰. Na temperatura de 20°C, o íon cloreto dos fluidos de *F. citerosum* e de *A. reticulatus* mantiveram-se estáveis em todas as salinidades. À temperatura de 30°C a concentração do íon cloreto dos fluidos de *F. citerosum* e de *A. reticulatus* em 0‰ foram inferiores às concentrações em 20‰, e em 40‰ (Figuras 6).

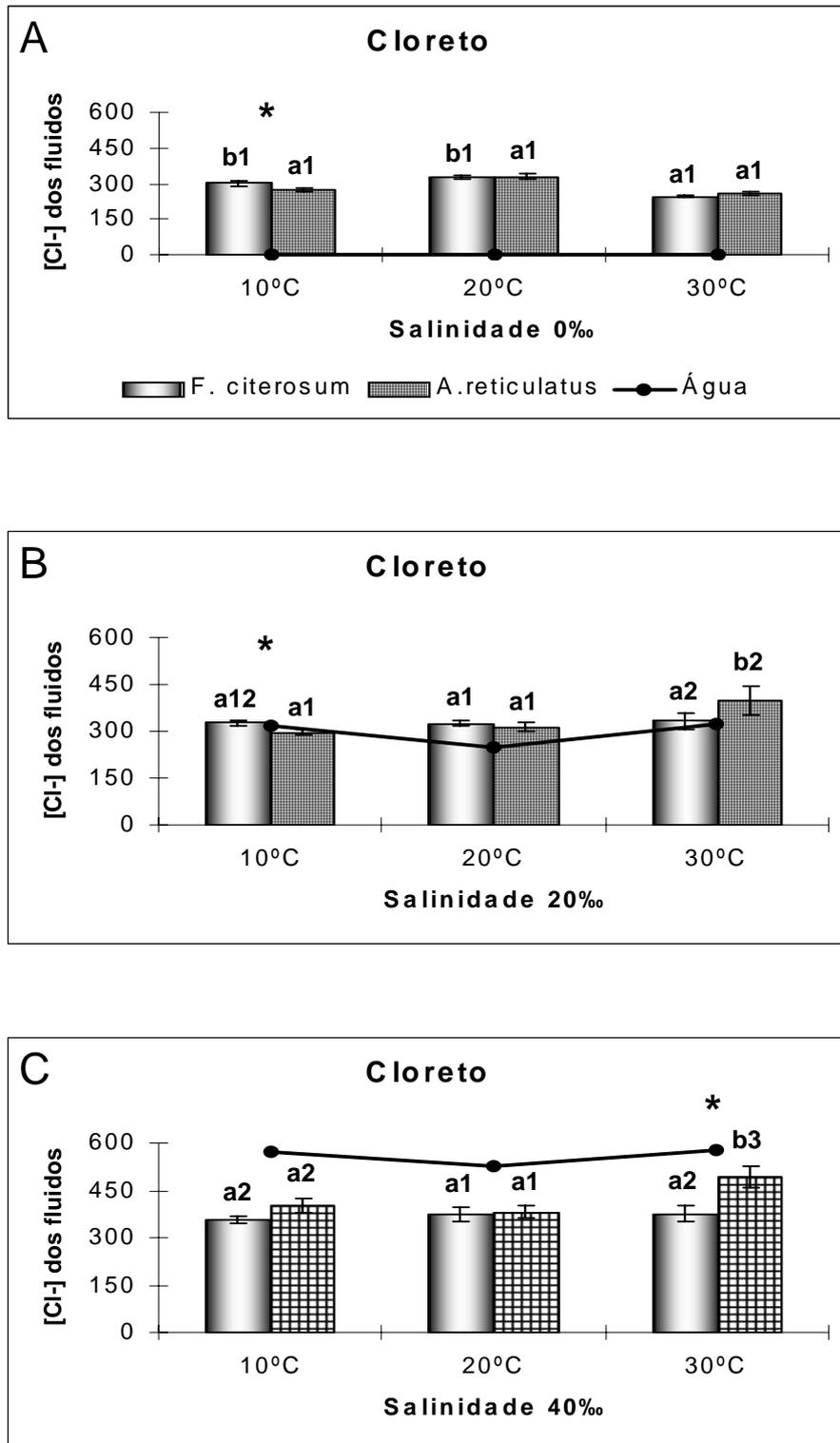


Figura 6. Cloreto dos fluidos, barras sombreadas *Fistulobalanus citerosum*, barras quadriculadas *Amphibalanus reticulatus*, nas salinidades 0‰ (A), 20‰ (B) e 40‰ (C); letras minúsculas e números indicam o resultado da análise estatística para cada espécie separadamente. Letras indicam resultados referentes à temperatura (em uma mesma salinidade, mesmo gráfico); números indicam o resultado em relação à salinidade (em uma mesma temperatura, gráficos em sequência); barras com letras ou números em comum não são significativamente diferentes; asteriscos indicam diferenças significativas entre as espécies submetidas à mesma condição experimental; os pontos pretos representam o cloreto medido nas águas experimentais, $P < 0,05$.

Sódio

Efeito da temperatura e comparação entre as espécies

Na salinidade de 0‰, o íon sódio nos fluidos de *F. citerosum* foi maior em 10°C ($285 \pm 12\text{mM}$) e 20°C ($268 \pm 12\text{mM}$), do que em 30°C ($216 \pm 5\text{mM}$). A concentração de sódio *A. reticulatus* foi estável em todas as temperaturas. Não houve diferença na concentração de sódio do fluido entre as duas espécies, nas 3 temperaturas testadas (Figuras 7 A).

À salinidade de 20‰, a concentração de sódio foi estável para ambas as espécies nas 3 temperaturas. *F.citerosum* ($293 \pm 7\text{mM}$) teve concentração de sódio superior a *A. reticulatus* ($253 \pm 11\text{mM}$), quando expostos à temperatura de 10°C (Figuras 7 B)

Na salinidade de 40‰, a concentração de sódio nos fluidos de *F. citerosum* à 10°C ($307 \pm 4\text{mM}$), foi inferior à concentração em 20°C ($358 \pm 21\text{mM}$) e 30°C ($358 \pm 15\text{mM}$). *A. reticulatus* apresentou concentração de sódio à 10°C ($333 \pm 17\text{mM}$) e 20°C ($367 \pm 23\text{mM}$), menor que em 30°C ($452 \pm 27\text{mM}$). *F.citerosum* ($358 \pm 15\text{mM}$) teve concentração de sódio menor que *A. reticulatus* ($452 \pm 27\text{mM}$), quando expostos à temperatura de 30°C (Figuras 7 C).

Efeito da salinidade

Na temperatura de 10°C o íon sódio dos fluidos de *F. citerosum* e de *A. reticulatus*, em 0‰ foram inferiores que em 40‰. Na temperatura de 20°C, o íon sódio dos fluidos de *F. citerosum* e de *A. reticulatus* mantiveram-se estáveis em todas as salinidades. À temperatura de 30°C o íon sódio dos fluidos de *F. citerosum* em 0‰ foi inferior a concentração em 20‰, que foi estável em 40‰. O íon sódio dos fluidos de *A. reticulatus* foi estável em 0‰ e 20‰, e teve concentrações superiores em 40‰ (Figuras 7).

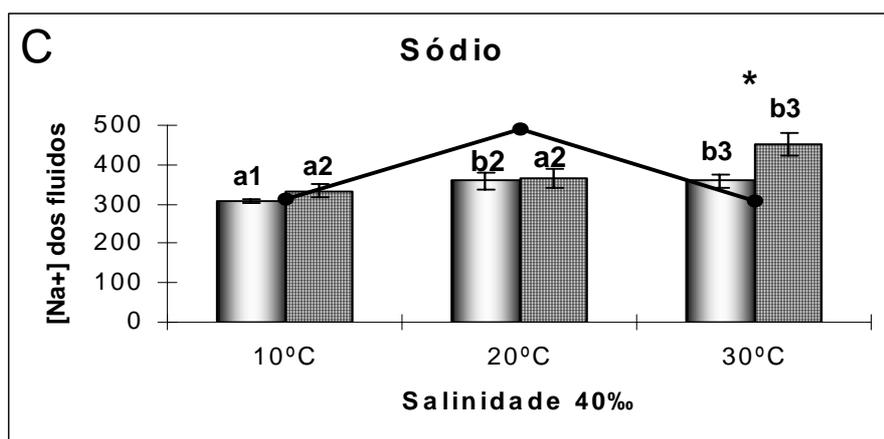
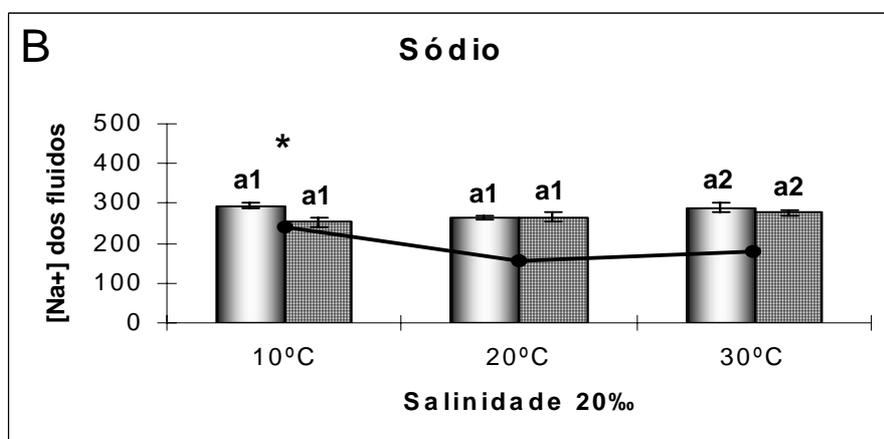
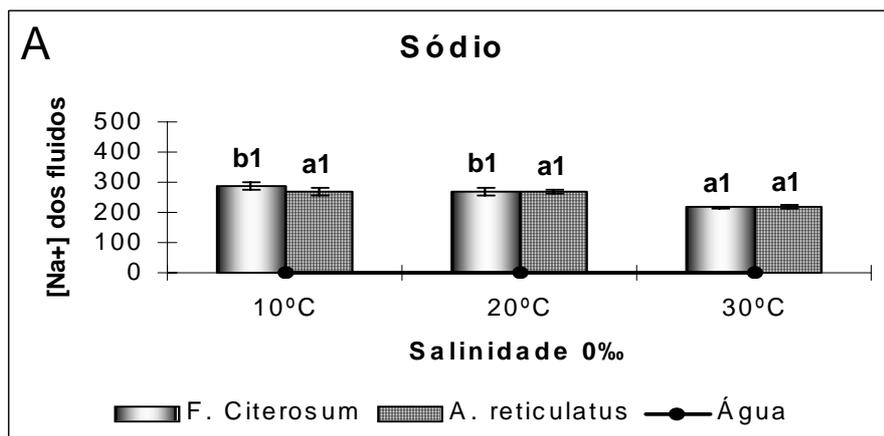


Figura 7. Sódio dos fluidos, barras sombreadas *Fistulobalanus citerosum*, barras quadriculadas *Amphibalanus reticulatus*, nas salinidades 0‰ (A), 20‰ (B) e 40‰ (C); letras minúsculas e números indicam o resultado da análise estatística para cada espécie separadamente. Letras indicam resultados referentes à temperatura (em uma mesma salinidade, mesmo gráfico); números indicam o resultado em relação à salinidade (em uma mesma temperatura, gráficos em sequência); barras com letras ou números em comum não são significativamente diferentes; asteriscos indicam diferenças significativas entre as espécies submetidas à mesma condição experimental; os pontos pretos representam o sódio medido nas águas experimentais, $P < 0,05$.

Magnésio

Efeito da temperatura e comparação entre as espécies

À salinidade de 0‰, o íon magnésio nos fluidos de *F. citerosum* e de *A. reticulatus* não apresentou diferença para a mesma espécie nas diferentes temperaturas, e nem entre as espécies expostas a mesma condição (Figuras 8 A).

Na salinidade de 20‰, o íon magnésio dos fluidos de *F. citerosum* foi maior em 10°C ($26 \pm 1\text{mM}$), do que em 30°C ($20 \pm 1\text{mM}$). *A. reticulatus* não apresentou variação do íon magnésio nas temperaturas testadas. Não houve diferenças entre as espécies expostas à mesma condição (Figuras 8 B).

À salinidade de 40‰, o íon magnésio dos fluidos de *F. citerosum* em 10°C ($28 \pm 1\text{mM}$) foi menor que em 30°C ($38 \pm 2\text{mM}$). Em *A. reticulatus* o íon magnésio em 10°C ($36 \pm 3\text{mM}$) foi menor que em 30°C ($49 \pm 1\text{mM}$). O íon magnésio de *F. citerosum* foi menor que de *A. reticulatus* tanto na temperatura de 10°C quanto em 30°C (Figuras 8 C).

Efeito da salinidade

Na temperatura de 10°C, o íon magnésio dos fluidos de *F. citerosum* manteve-se estável em todas as salinidades. A concentração de magnésio dos fluidos de *A. reticulatus* foi equivalente em 0‰ e em 20‰, e ambas as salinidades foram inferiores a 40‰. Na temperatura de 20°C, o íon magnésio

dos fluidos de *F. citerosum* em 0‰ foi inferior a 40‰. A concentração do íon magnésio dos fluidos de *A. reticulatus* manteve-se estável em 0‰ e 20‰, que foram inferiores a 40‰. À temperatura de 30°C, as concentrações do íon magnésio dos fluidos de *F. citerosum* e de *A. reticulatus* mantiveram-se estáveis em 0‰ e em 20‰, aumentando em 40‰ (Figuras 8).

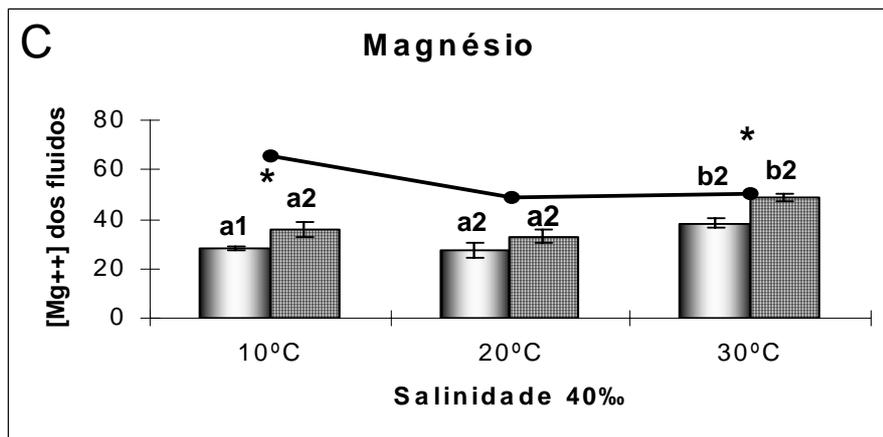
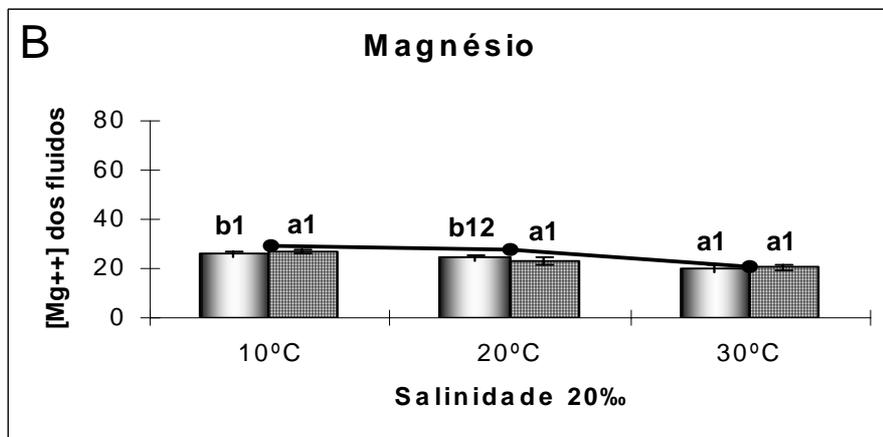
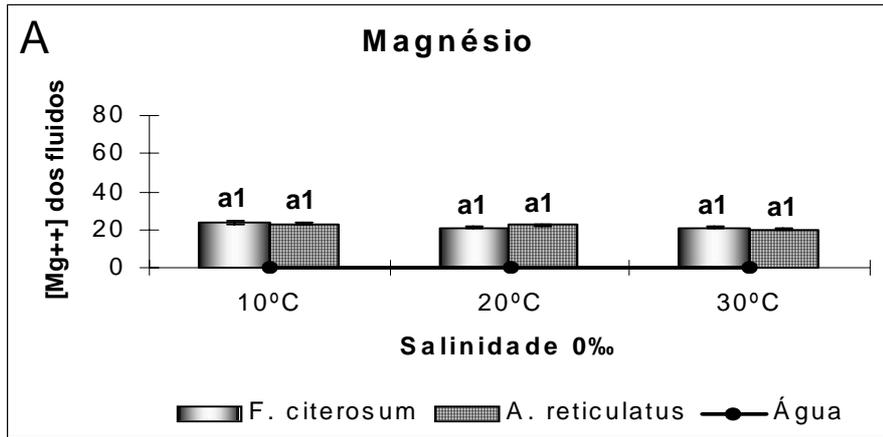


Figura 8. Magnésio dos fluidos, barras sombreadas *Fistulobalanus citerosum*, barras quadriculadas *Amphibalanus reticulatus*, nas salinidades 0‰ (A), 20‰ (B) e 40‰ (C); letras minúsculas e números indicam o resultado da análise estatística para cada espécie separadamente. Letras indicam resultados referentes à temperatura (em uma mesma salinidade, mesmo gráfico); números indicam o resultado em relação à salinidade (em uma mesma temperatura, gráficos em sequência); barras com letras ou números em comum não são significativamente diferentes; asteriscos indicam diferenças significativas entre as espécies submetidas à mesma condição experimental; os pontos pretos representam o magnésio medido nas águas experimentais, $P < 0,05$.

Potássio

Efeito da temperatura e comparação entre as espécies

Na salinidade de 0‰, o íon potássio nos fluidos de *F. citerosum* e de *A. reticulatus*, manteve-se estável em todas as temperaturas. Contudo, houve variação entre as espécies *F. citerosum* ($7,7 \pm 0,3\text{mM}$) e *A. reticulatus* ($8,7 \pm 0,4\text{mM}$), na temperatura de 30°C (Figuras 9 A).

À salinidade de 20‰, o íon potássio nos fluidos de *F. citerosum* foi maior em 10°C ($6,4 \pm 0,2\text{mM}$), do que à 20°C ($7,2 \pm 0,4\text{mM}$). *A. reticulatus* não variou o íon potássio em seus fluidos. Houve diferença entre as espécies *F. citerosum* e *A. reticulatus* ($7,8 \pm 0,2\text{mM}$), a temperatura de 10°C (Figuras 9 B).

Em salinidade de 40‰, o íon potássio nos fluido de *F. citerosum* foi menor em 10°C ($8,2 \pm 0,2\text{mM}$), do que em 20°C ($10,5 \pm 0,6\text{mM}$), que foi menor que em 30°C ($12,3 \pm 0,8\text{mM}$). Em *A. reticulatus* o íon potássio foi estável em 10°C ($10,5 \pm 0,5\text{mM}$) e em 20°C ($10,3 \pm 0,4\text{mM}$), e foram menores que em 30°C ($14,4 \pm 0,8\text{mM}$). Na temperatura de 10°C, o íon potássio em *F. citerosum*, foi menor que em *A. reticulatus*. Em 30°C *F. citerosum* ($12,3 \pm 0,8\text{mM}$) teve concentração de potássio inferior à de *A. reticulatus* (Figuras 9 C).

Efeito da salinidade

Na temperatura de 10°C, o íon potássio dos fluidos de *F. citerosum* manteve-se estável em todas as salinidades. A concentração de potássio dos fluidos de *A. reticulatus* foi equivalente em 0‰ e 40‰, e ambas foram superiores a 20‰. Na temperatura de 20°C, o íon potássio dos fluidos de *F. citerosum* em 0‰ foi superior a 20‰, que foi inferior a 40‰. O íon potássio dos fluidos de *A. reticulatus* manteve-se estável em 0‰ e 20‰, que foram inferiores a 40‰. À temperatura de 30°C, as concentrações do íon potássio dos fluidos de *F. citerosum* e de *A. reticulatus* mantiveram-se estáveis em 0‰ e em 20‰, aumentando em 40‰ (Figuras 9).

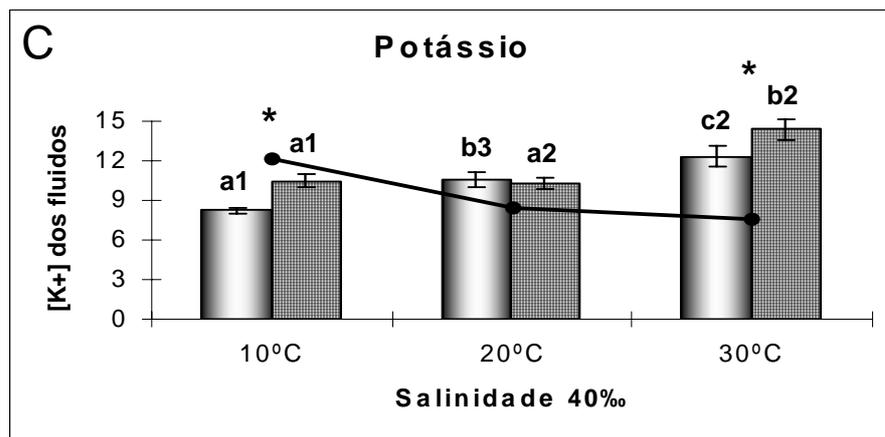
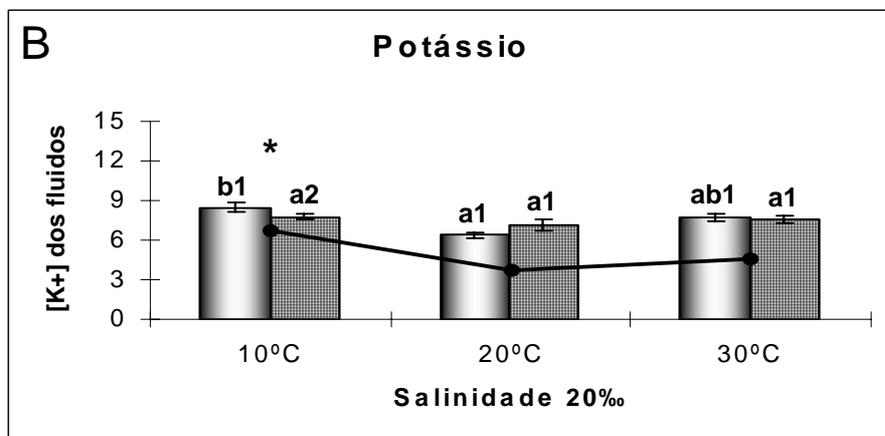
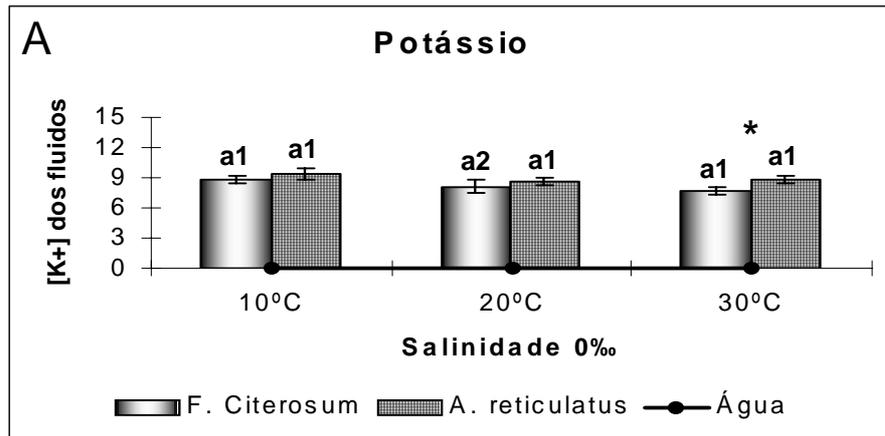


Figura 9. Potássio dos fluidos, barras sombreadas *Fistulobalanus citerosum*, barras quadriculadas *Amphibalanus reticulatus*, nas salinidades 0‰ (A), 20‰ (B) e 40‰ (C); letras minúsculas e números indicam o resultado da análise estatística para cada espécie separadamente. Letras indicam resultados referentes à temperatura (em uma mesma salinidade, mesmo gráfico); números indicam o resultado em relação à salinidade (em uma mesma temperatura, gráficos em sequencia); barras com letras ou números em comum não são significativamente diferentes; asteriscos indicam diferenças significativas entre as espécies submetidas à mesma condição experimental; os pontos pretos representam o potássio medido nas águas experimentais, $P < 0,05$.

FASE II

Osmolalidade

Efeito do tempo e comparação entre as espécies

Na salinidade de 0‰, a osmolalidade nos fluidos de *F. citerosum* foi estável em todos os tempos. A osmolalidade nos fluidos de *A. reticulatus* em 9h ($567 \pm 17\text{mM}$) foi superior a 48h ($437 \pm 11\text{mM}$). *F. citerosum* ($471 \pm 7\text{mM}$) teve valores de osmolalidade superiores a de *A. reticulatus* em experimento de 48h (Figura 10 A).

À salinidade de 10‰, a osmolalidade dos fluidos de *F. citerosum* foi maior em 9h ($409 \pm 38\text{mM}$), do que em 48h ($291 \pm 3\text{mM}$). A osmolalidade do fluido de *A. reticulatus* foi estável em 9h ($456 \pm 35\text{mM}$) e em 12h ($450 \pm 34\text{mM}$), superou o encontrado em 48h ($292 \pm 4\text{mM}$). A osmolalidade dos fluidos de *F. citerosum* e de *A. reticulatus* manteve-se estável em todos os tempos (Figura 10 B).

Na salinidade de 20‰, não houve diferenças nos valores de osmolalidade nos fluidos de *F. citerosum* e de *A. reticulatus*, nos diferentes tempos testados, nem entre as espécies expostas à mesma condição (Figura 10 C).

À salinidade de 30‰, a osmolalidade dos fluidos de *F. citerosum* em 9h ($645 \pm 82\text{mM}$) foi inferior que em 12h ($853 \pm 26\text{mM}$). A osmolalidade dos fluidos de *A. reticulatus* manteve-se estável nos tempos testados. A osmolalidade dos

fluidos de *F. citerosum* e de *A. reticulatus* não foram diferentes em nenhuma das condições experimentais (Figura 10 D).

Na salinidade de 40‰, a osmolalidade dos fluidos de *F. citerosum* em 9h ($735 \pm 70\text{mM}$), foi menor que em 12h ($980 \pm 64\text{mM}$), que foi inferior a de 48h ($1107 \pm 5\text{mM}$). A osmolalidade dos fluidos de *A. reticulatus* foi estável em todas as condições. A osmolalidade dos fluidos de *F. citerosum*, foi superior a de *A. reticulatus* ($989 \pm 40\text{mM}$), no tempo de 9h (Figura 10 E).

Efeito da salinidade

No tempo de 9h, a osmolalidade dos fluidos de *F. citerosum* em 0‰ foi maior que em 10‰, esta foi menor que em 20‰, e superou todos os valores em 40‰. A osmolalidade dos fluidos de *A. reticulatus* foi estável em 0‰ e em 10‰, foi superior em 20‰, novamente foi maior em 30‰, e teve a maior concentração em 40‰. No tempo de 12h, a osmolalidade dos fluidos de *F. citerosum* em 0‰ foi superior a 10‰, que foi menor que em 20‰, e teve valores maiores em 30‰ e ainda maiores em 40‰. A osmolalidade dos fluidos de *A. reticulatus* foi estável em 0‰ e em 10‰, e aumentou a concentração sucessivamente em 20‰, 30‰ e 40‰. Em experimento de 48h, a osmolalidade dos fluidos de *F. citerosum* e de *A. reticulatus* em 0‰ foram superiores à 10‰, e a concentração ambas aumentou sucessivamente em 20‰, 30‰ e 40‰ (Figura 10).

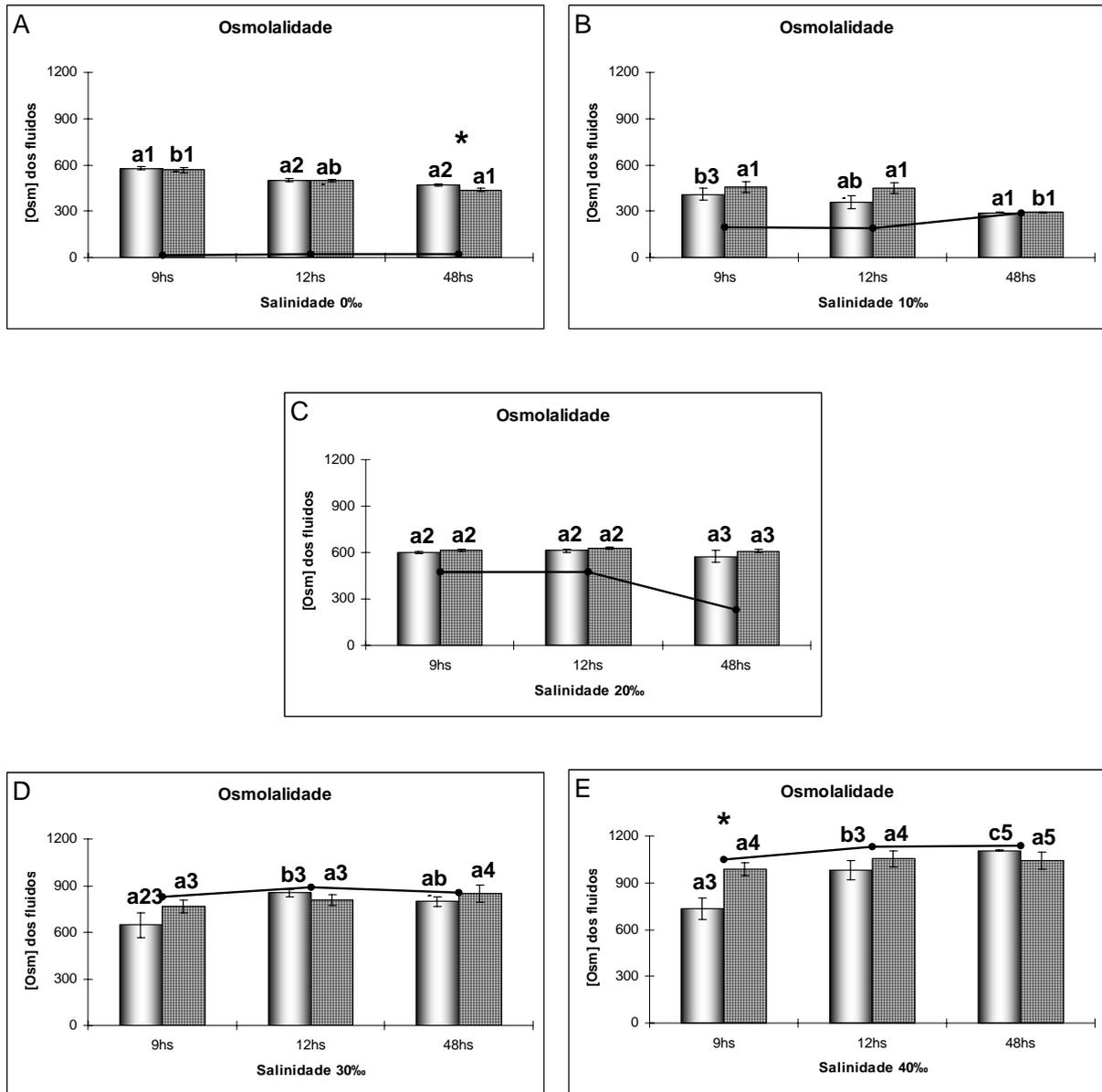


Figura 10. Osmolalidade dos fluidos, barras sombreadas *Fistulobalanus citerosum*, barras quadriculadas *Amphibalanus reticulatus*, nas salinidades 0‰ (A), 10‰ (B), 20‰ (C), 30‰ (D) e 40‰ (E); letras minúsculas e números indicam o resultado da análise estatística para cada espécie separadamente. Letras indicam resultados referentes ao tempo (em uma mesma salinidade, mesmo gráfico); números indicam o resultado em relação à salinidade (em um mesmo tempo, gráficos em seqüência); barras com letras ou números em comum não são significativamente diferentes; asteriscos indicam diferenças significativas entre as espécies submetidas à mesma condição experimental; os pontos pretos representam a osmolalidade medida nas águas experimentais, $P < 0,05$.

Cloreto

Efeito do tempo e comparação entre as espécies

Na salinidade de 0‰, o íon cloreto nos fluidos de *F. citerosum* foi estável em todos os tempos testados. O íon cloreto de *A. reticulatus* em 9h ($279 \pm 9\text{mM}$), teve concentração superior à 48h ($212 \pm 5\text{mM}$). No tempo de 48h o íon cloreto foi maior em *F. citerosum* ($244 \pm 8\text{mM}$) que em *A. reticulatus* (Figura 11 A).

À salinidade de 10‰, o íon cloreto dos fluidos de *F. citerosum* foi maior em 9h ($179 \pm 26\text{mM}$), do que em 12h ($113 \pm 6\text{mM}$). O íon cloreto dos fluidos de *A. reticulatus* em 9h ($199 \pm 22\text{mM}$) foi maior do que em 48h ($127 \pm 5\text{mM}$). *F. citerosum* teve menor concentração do íon cloreto que *A. reticulatus* ($208 \pm 15\text{mM}$) em exposição de 12h (Figura 11 B).

Na salinidade de 20‰, o íon cloreto dos fluidos de *F. citerosum* e *A. reticulatus* não apresentaram variação em nenhum dos tempos de exposição. Contudo o íon cloreto dos fluidos de *F. citerosum* ($310 \pm 6\text{mM}$), foi superior ao de *A. reticulatus* ($289 \pm 4\text{mM}$) no tempo de 48h (Figura 11 C).

À salinidade de 30‰, o íon cloreto dos fluidos de *F. citerosum* em 9h ($337 \pm 31\text{mM}$) foi menor que em 12h ($400 \pm 3\text{mM}$). *A. reticulatus* manteve estabilizado o íon cloreto em seus fluidos em todas as temperaturas. O íon cloreto em *F. citerosum* foi superior a *A. reticulatus* ($382 \pm 6\text{mM}$) na exposição de 12h (Figura 11 D).

Em salinidade de 40‰, o íon cloreto dos fluidos de *F. citerosum* foi menor em 9h ($371 \pm 38\text{mM}$), do que em 12h ($484 \pm 30\text{mM}$). *A. reticulatus*

estabilizou o íon cloreto nos seus fluidos em todos os tempos. O íon cloreto de *F. citerosum* foi inferior ao de *A. reticulatus* ($500 \pm 17\text{mM}$), no tempo de 9h (Figura 11 E).

Efeito da salinidade

Nos tempos de 9h, 12h e 48h, o íon cloreto dos fluidos de *F. citerosum* e de *A. reticulatus* apresentaram as mesmas alterações, com o valores em 0‰ maiores que em 10‰, e o valores aumentando sucessivamente em 20‰, 30‰ e em 40‰ (Figura 11).

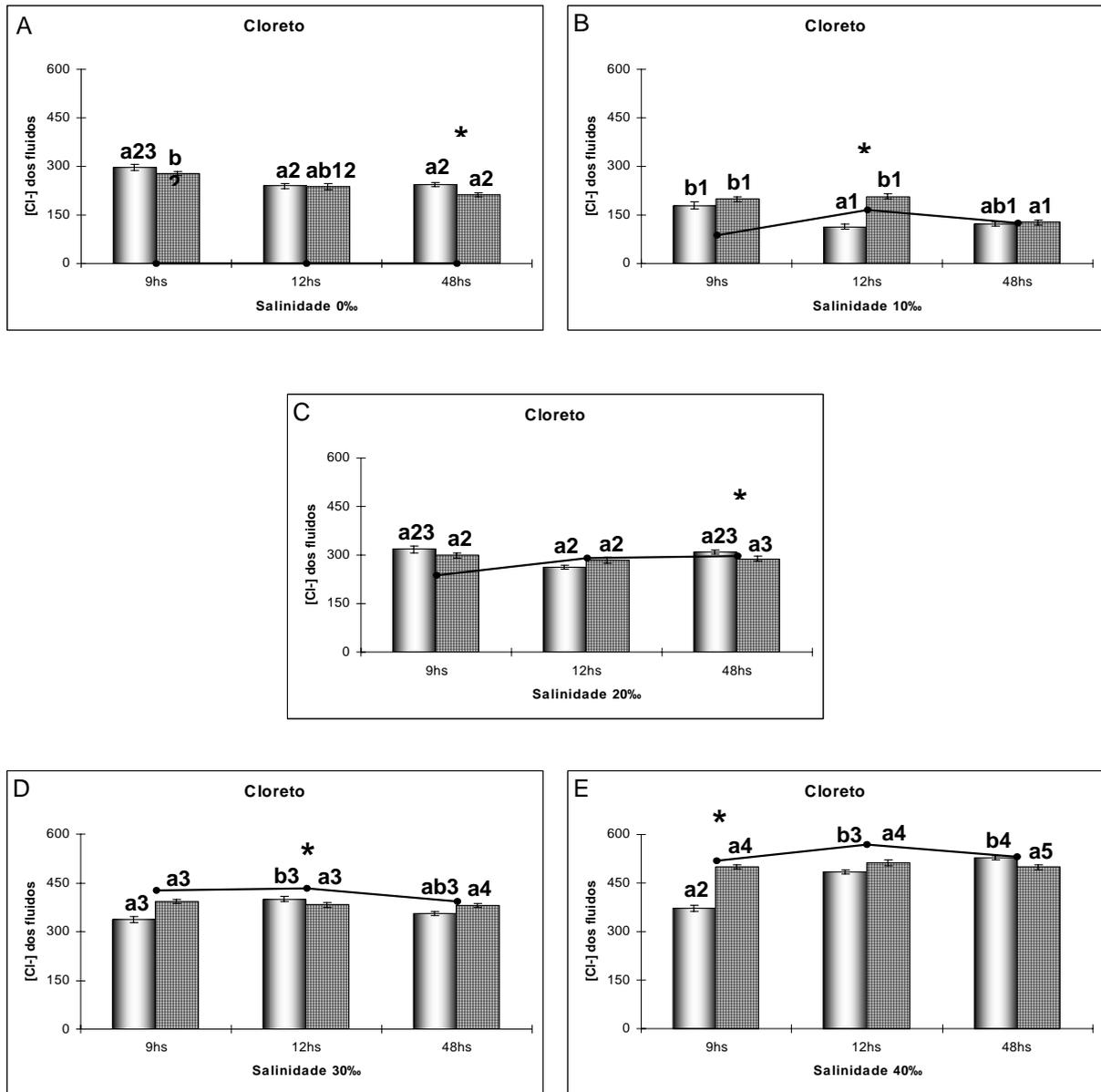


Figura 11. Cloreto dos fluidos, barras sombreadas *Fistulobalanus citerosum*, barras quadriculadas *Amphibalanus reticulatus*, nas salinidades 0‰ (A), 10‰ (B), 20‰ (C), 30‰ (D) e 40‰ (E); letras minúsculas e números indicam o resultado da análise estatística para cada espécie separadamente. Letras indicam resultados referentes ao tempo (em uma mesma salinidade, mesmo gráfico); números indicam o resultado em relação à salinidade (em um mesmo tempo, gráficos em seqüência); barras com letras ou números em comum não são significativamente diferentes; asteriscos indicam diferenças significativas entre as espécies submetidas à mesma condição experimental; os pontos pretos representam o cloreto medido nas águas experimentais, $P < 0,05$.

Sódio

Efeito do tempo e comparação entre as espécies

Na salinidade de 0‰, o íon sódio dos fluidos de *F. citerosum* em 9h ($265 \pm 3\text{mM}$) foi superior que em 12h ($190 \pm 13\text{mM}$) e em 48h ($183 \pm 4\text{mM}$). Para *A. reticulatus* o íon sódio de seus fluidos em 9h ($236 \pm 14\text{mM}$), foi superior a 48h ($161 \pm 5\text{mM}$). O íon sódio nos fluidos de *F. citerosum* ($183 \pm 4\text{mM}$), em 48h foi superior a *A. reticulatus* (Figura 12 A).

À salinidade de 10‰, o íon sódio nos fluidos de *F. citerosum* foi menor em 9h ($192 \pm 21\text{mM}$), do que em 12h ($336 \pm 15\text{mM}$), e este foi maior que em 48h ($113 \pm 1\text{mM}$). Para *A. reticulatus* o íon sódio de seus fluidos em 9h ($199 \pm 18\text{mM}$), foi menor do que em 12h ($371 \pm 12\text{mM}$), que foi superior à 48h ($108 \pm 3\text{mM}$). O íon sódio nos fluidos de *F. citerosum* foi maior que *A. reticulatus* no experimento de 48h (Figura 12 B).

Na salinidade de 20‰, o íon sódio nos fluidos de *F. citerosum* foi maior em 9h ($272 \pm 5\text{mM}$), do que em 12h ($124 \pm 11\text{mM}$), e este menor que em 48h ($194 \pm 32\text{mM}$). *A. reticulatus* apresentou concentração do íon sódio de seus fluidos em 9h ($274 \pm 4\text{mM}$) maior que em 12h ($156 \pm 12\text{mM}$), Não houve diferença interespecifica nos tempos testados (Figura 12 C).

À salinidade de 30‰, não foram constatadas diferenças na concentração do íon sódio nos fluidos dos animais da mesma espécie expostos a diferentes condições experimentais. Assim como não foram encontradas diferenças interespecificas em uma mesma condição (Figura 12 D).

À salinidade de 40‰, o íon sódio nos fluidos de *F. citerosum* em 9h ($291 \pm 30\text{mM}$), foi menor do que em 12h ($413 \pm 32\text{mM}$) que se manteve em 48h ($447 \pm 12\text{mM}$). O íon sódio nos fluidos de *A. reticulatus* manteve suas concentrações estáveis em todos os tempos. Na condição de 9h o íon sódio nos fluidos de *F. citerosum* foi inferior a *A. reticulatus* ($396 \pm 22\text{mM}$)(Figura 12 E).

Efeito da salinidade

No tempo de 9h, o íon sódio nos fluidos de *F. citerosum* exposto à salinidade de 10‰, foi inferior que em 20‰, 30‰ e 40‰, que mantiveram estáveis suas concentrações. O íon sódio nos fluidos de *A. reticulatus* em 10‰, foi inferior à 30‰, e este inferior à 40‰. No experimento de 12h, a concentração do íon sódio nos fluidos de *F. citerosum* manteve-se estável 0‰ e 20‰, aumentou em 30‰, e aumentou novamente em 40‰. O íon sódio nos fluidos de *A. reticulatus* apresentou certa oscilação, com os valores nas diversas salinidades sempre diferentes entre si, com exceção dos valores medidos em 0‰ e 20‰, que não foram diferentes. No tempo de 48h, a concentração do íon sódio nos fluidos de *F. citerosum* em 10‰ foi inferior as demais concentrações, que aumentaram sucessivamente em 20‰, 30‰ e 40‰. O íon sódio nos fluidos de *A. reticulatus* manteve-se estável em 0‰ e 10‰, e aumentou sucessivamente em 20‰, 30‰ e 40‰ (Figura 12).

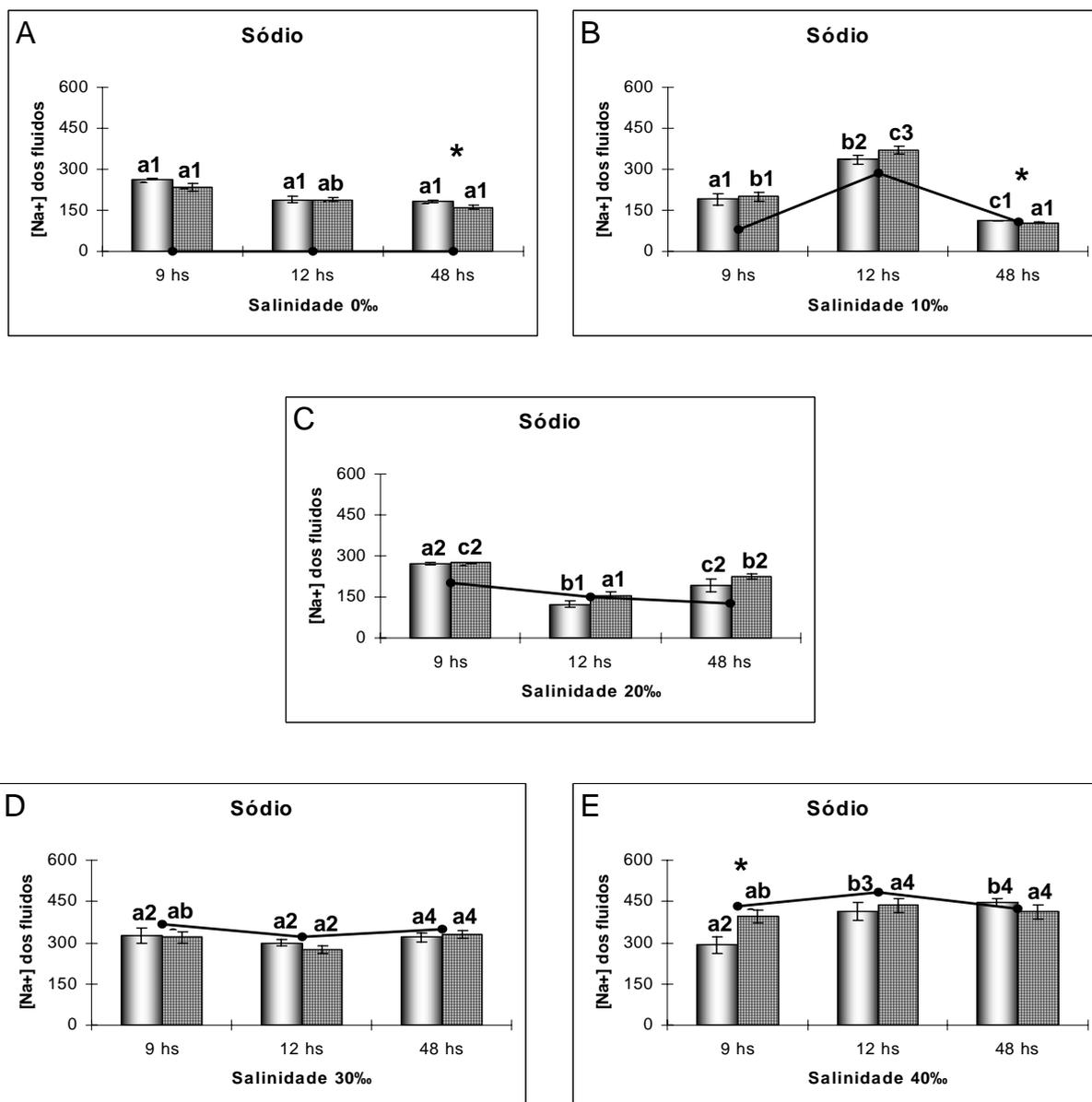


Figura 12. Sódio dos fluidos, barras sombreadas *Fistulobalanus citerosum*, barras quadriculadas *Amphibalanus reticulatus*, nas salinidades 0‰ (A), 10‰ (B), 20‰ (C), 30‰ (D) e 40‰ (E); letras minúsculas e números indicam o resultado da análise estatística para cada espécie separadamente. Letras indicam resultados referentes ao tempo (em uma mesma salinidade, mesmo gráfico); números indicam o resultado em relação à salinidade (em um mesmo tempo, gráficos em seqüência); barras com letras ou números em comum não são significativamente diferentes; asteriscos indicam diferenças significativas entre as espécies submetidas à mesma condição experimental; os pontos pretos representam o sódio medido nas águas experimentais, $P < 0,05$.

Potássio

Efeito do tempo e comparação entre as espécies

À salinidade de 0‰, o íon potássio nos fluidos de *F. citerosum* e de *A. reticulatus* manteve-se estável em todas as condições. O íon potássio nos fluidos de *F. citerosum* ($7,8 \pm 0,4\text{mM}$) foi superior ao de *A. reticulatus* ($9,8 \pm 0,4\text{mM}$), no tempo experimental de 12h (Figura 13 A).

À salinidade de 10‰, o íon potássio dos fluidos de *F. citerosum*, no tempo de 9h ($7,2 \pm 0,9\text{mM}$), foi menor que em 12h ($10,2 \pm 0,4\text{mM}$), que por sua vez foi maior que em 48h ($4,4 \pm 0,2\text{mM}$). O íon potássio dos fluidos de *A. reticulatus* em 9h ($8,4 \pm 0,9\text{mM}$) foi inferior que em 12h ($12,8 \pm 0,6\text{mM}$), que foi superior ao de 48h ($4,7 \pm 0,4\text{mM}$). Na exposição de 12 horas o íon potássio em *F. citerosum* foi menor que em *A. reticulatus* (Figura 13 B).

Na salinidade de 20‰, o íon potássio dos fluidos de *F. citerosum* em 9h ($7,3 \pm 0,1\text{mM}$) foi superior que em 12h ($4,7 \pm 0,3\text{mM}$). O íon potássio dos fluidos de *A. reticulatus* em 9h ($7,9 \pm 0,1\text{mM}$), foi maior que em 12h ($4,9 \pm 0,3\text{mM}$), e voltou a aumentar em 48h ($6,4 \pm 0,8\text{mM}$). No tempo de 9h, o íon potássio dos fluidos de *F. citerosum* foi inferior ao de *A. reticulatus* (Figura 13 C).

Em salinidade de 30‰, o íon potássio dos fluidos de *F. citerosum*, foram estáveis em todos os tempos. O íon potássio dos fluidos de *A. reticulatus* foi estável em 9h ($9,5 \pm 0,4\text{mM}$) e 12h ($8,5 \pm 0,4\text{mM}$), aumentando em 48h ($11,6 \pm 0,8\text{mM}$). Não houve diferença interespecífica para a mesma condição (Figura 13 D).

Na salinidade de 40‰, o íon potássio dos fluidos de *F. citerosum* em 9h ($11,4 \pm 0,4\text{mM}$) foi inferior que em 48h ($13,7 \pm 0,6\text{mM}$). Em *A. reticulatus* o íon potássio de seus fluidos foi estável em todos os tempos. No tempo de 9h o íon potássio dos fluidos de *F. citerosum*, foi inferior ao de *A. reticulatus* ($12,5 \pm 0,2\text{mM}$) (Figura 13 E).

Efeito da salinidade

Em experimentos de 9h, o íon potássio dos fluidos de *F. citerosum* e de *A. reticulatus* tiveram as concentrações estáveis nas salinidades de 0‰, 10‰, 20‰ e 30‰, aumentando os valores do íon em 40‰. Na exposição de 12h, o íon potássio dos fluidos de *F. citerosum* em 0‰ foi mais concentrado que em 20‰, que foi inferior a 40‰. O íon potássio dos fluidos de *A. reticulatus* apresentou em 0‰, valores menores que em 10‰, que foi superior que 20‰, então houve uma sucessão de aumentos, em 30‰ e em 40‰. No tempo de 48h, o íon potássio dos fluidos de *F. citerosum* foi estável nas salinidades de 10‰ e de 30‰, que foram inferiores a 40‰ (Figura 13).

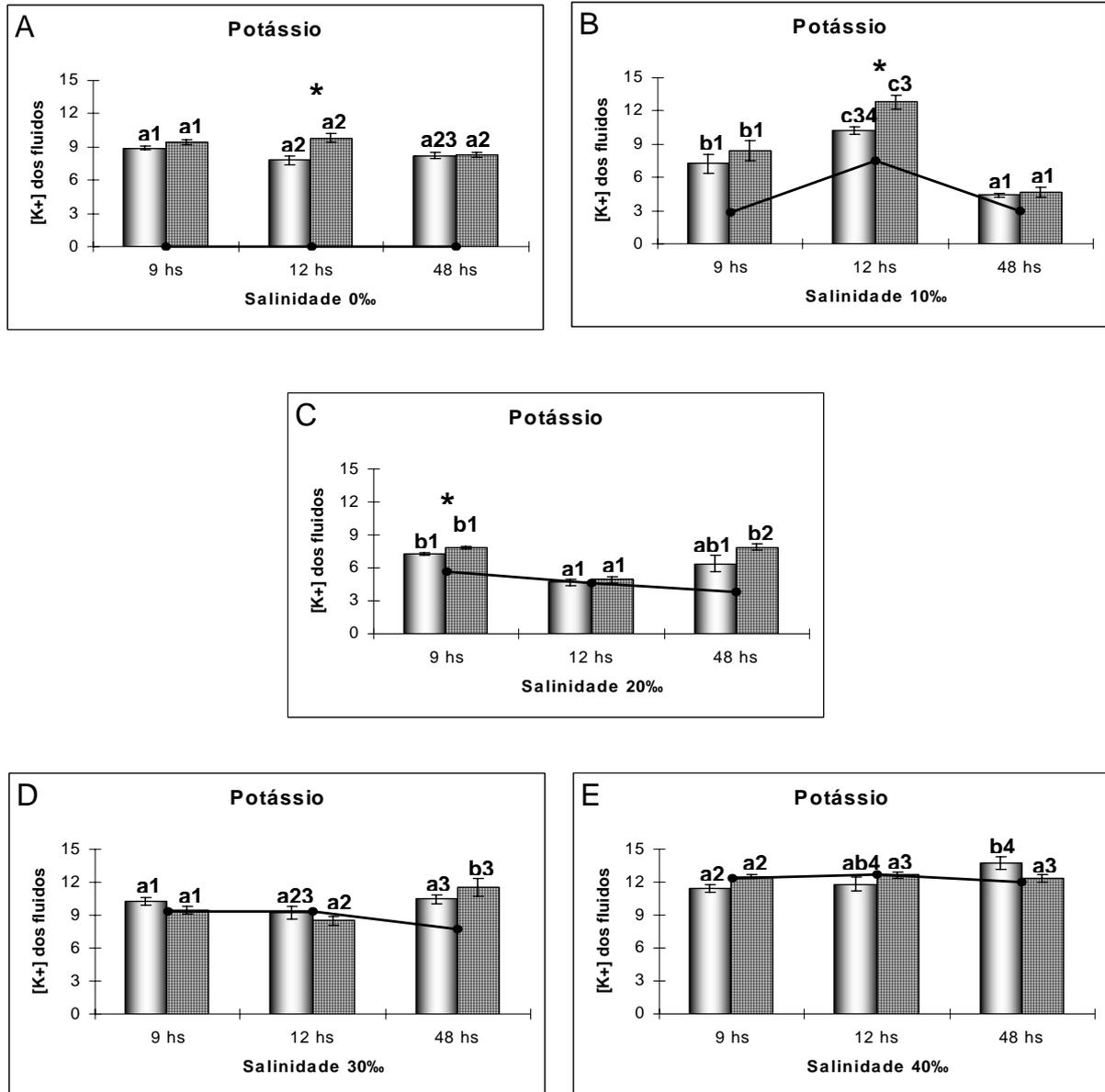


Figura 13. Potássio dos fluidos, barras sombreadas *Fistulobalanus citerosum*, barras quadriculadas *Amphibalanus reticulatus*, nas salinidades 0‰ (A), 10‰ (B), 20‰ (C), 30‰ (D) e 40‰ (E); letras minúsculas e números indicam o resultado da análise estatística para cada espécie separadamente. Letras indicam resultados referentes ao tempo (em uma mesma salinidade, mesmo gráfico); números indicam o resultado em relação à salinidade (em um mesmo tempo, gráficos em seqüência); barras com letras ou números em comum não são significativamente diferentes; asteriscos indicam diferenças significativas entre as espécies submetidas à mesma condição experimental; os pontos pretos representam o potássio medido nas águas experimentais, $P < 0,05$.

Teor hídrico

Efeito do tempo e comparação entre as espécies

Nas salinidades de 0‰, 10‰ e 20‰, o teor hídrico dos tecidos de *F. citerosum* e de *A. reticulatus*, manteve estável seu valor em todas as condições experimentais. Também não houve diferenças interespecificas para os animais expostos às mesmas condições (Figs. 14 A, B e C).

Na salinidade de 30‰, o teor hídrico dos tecidos de *F. citerosum* foi maior em 9h ($77,8 \pm 1,2\text{mM}$), do que em 12h ($72,5 \pm 1,5\text{mM}$). O teor hídrico dos tecidos de *A. reticulatus* em 9h ($77,8 \pm 1\text{mM}$) foi superior a 12h ($72,2 \pm 1,7\text{mM}$). Não houve diferença interespecifica nos animais expostos às mesmas condições experimentais (Figura 14 D).

Na salinidade de 40‰, o teor hídrico dos tecidos de *F. citerosum* foi superior em 9h ($77,2 \pm 1,3\text{mM}$), aos valores estáveis em 12h ($72,4 \pm 2,7\text{mM}$) e 48h ($77,2 \pm 1,3\text{mM}$). O teor hídrico dos tecidos de *A. reticulatus* manteve-se estável em todos os tempos. *F. citerosum* teve o teor hídrico dos tecidos maior que *A. reticulatus* no experimento de 9h (Figura 14 E).

Efeito da salinidade

No tempo de 9h, o teor hídrico dos tecidos de *F. citerosum* foi estável em todas as salinidades testadas. O teor hídrico dos tecidos de *A. reticulatus* em 0‰ foi superior a 40‰. No tempo de 12h, o teor hídrico dos

tecidos de *F. citerosum* foi estável em 0‰, 10‰ e 20‰, sendo inferior, porém estável em 30‰ e 40‰. O teor hídrico dos tecidos de *A. reticulatus* foi estável em 10‰ e 20‰, sendo inferior, contudo estável em 30‰ e 40‰ (Figura 14).

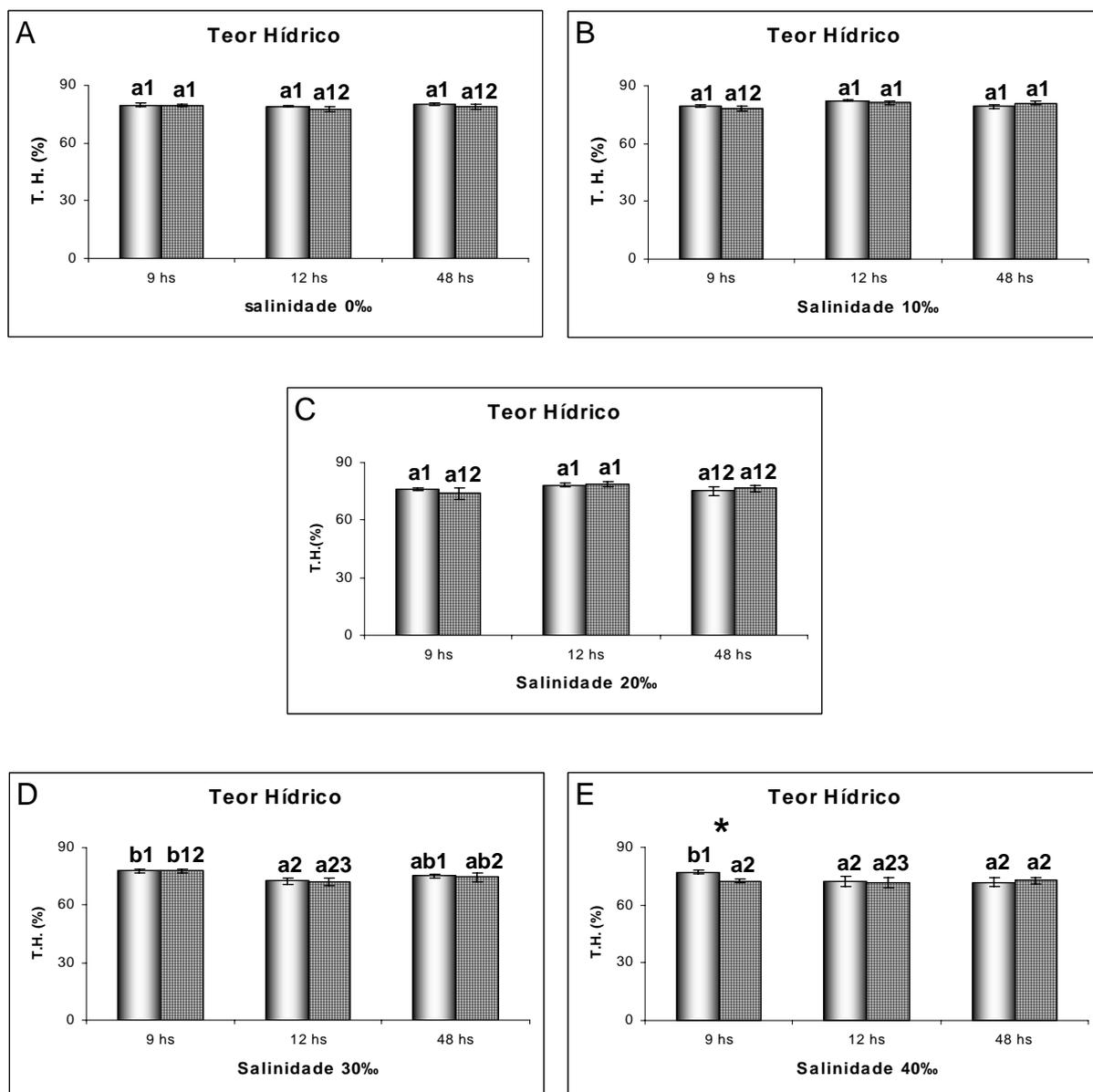


Figura 14. Teor Hídrico dos tecidos, barras sombreadas *Fistulobalanus citerosum*, barras quadriculadas *Amphibalanus reticulatus*, nas salinidades 0‰ (A), 10‰ (B), 20‰ (C), 30‰ (D) e 40‰ (E); letras minúsculas e números indicam o resultado da análise estatística para cada espécie separadamente. Letras indicam resultados referentes ao tempo (em uma mesma salinidade, mesmo gráfico); números indicam o resultado em relação à salinidade (em um mesmo tempo, gráficos em seqüência); barras com letras ou números em comum não são significativamente diferentes; asteriscos indicam diferenças significativas entre as espécies submetidas à mesma condição experimental, $P < 0,05$.

DISCUSSÃO

Na Baía de Paranaguá, mais especificamente nas dependências do late Clube de Paranaguá, são encontradas as duas espécies utilizadas neste trabalho: *Fistulobalanus citerosum*, a espécie nativa, e *Amphibalanus reticulatus*, a espécie introduzida. Estas são as espécies de craca mais abundantes na região de infralitoral, no local de coleta. Por estarem presentes no mesmo ambiente, acredita-se que ambas tenham capacidades semelhantes de resistir às grandes alterações ambientais, impostas pela dinâmica encontrada em um estuário, onde existe uma grande variação de salinidade, temperatura, luminosidade, oferta de alimento, pH, etc. Para se estabelecer em um habitat, os organismos devem estar adaptados às características físicas do ambiente. Para tanto apresentam mecanismos fisiológicos ou comportamentais (Buckley *et al.*, 2001).

Para verificar possíveis diferenças fisiológicas entre estas espécies, indivíduos de ambas foram expostos a diversas condições experimentais, com diferentes combinações de temperatura e salinidade. Os resultados das dosagens de osmolalidade e íons sódio e cloreto de *F. citerosum* e de *A. reticulatus* se mostraram dentro do esperado. Os dois principais íons, cloreto e sódio, apresentaram concentrações com valores próximos e, juntos, compõe aproximadamente o valor da osmolalidade, como ocorre para líquidos extracelulares e água do mar (Schmidt-Nielsen, 2002).

Foi observado que *Fistulobalanus citerosum* manteve seus fluidos mais estáveis do que *Amphibalanus reticulatus*, na grande maioria das situações. Este resultado pode indicar que *F. citerosum* possui uma maior impermeabilidade (fechando-se mais rapidamente quando em água muito diluída ou muito concentrada), suportando com maior eficiência as alterações ambientais e mantendo a homeostasia de seu meio interno com eficiência superior à da espécie introduzida *A. reticulatus*.

Porém, em virtude da pequena diferença entre os resultados das duas espécies, surgiram as perguntas: Este resultado se confirmaria caso os animais fossem expostos a experimentos com maior duração? As diferenças ficariam exacerbadas? A partir destas questões surgiu a idéia de se fazer uma segunda fase de experimentos. Nesta fase os experimentos tiveram a temperatura fixada em 20°C, que é um valor próximo da média encontrada no local de coleta, e os tempos testados foram 9, 12 e 48 horas, às salinidades de 0, 10, 20, 30 e 40‰.

O aumento do tempo nos experimentos da segunda fase ocorreu em função de uma característica morfológica do grupo que altera todas as suas respostas fisiológicas. A presença da carapaça ou concha fornece às cracas uma eficiente proteção contra predadores e um isolamento entre animal e ambiente por muito tempo. Algo semelhante a isso é encontrado em moluscos bivalves e alguns gastrópodos. Na segunda fase dos experimentos, os resultados das dosagens da osmolalidade e dos íons cloreto, sódio e potássio e a determinação do teor hídrico dos tecidos corroboraram com o resultado mostrado na primeira fase de experimentos, novamente demonstrando que *F. citerosum* tem uma maior resistência às condições experimentais.

A determinação do teor hídrico dos tecidos dos animais apresentou, para todas as situações, médias muito próximas. Este resultado pode ser explicado pelo fato de ambas as espécies terem morfologias muito semelhantes, com eficiente isolamento em relação ao meio externo promovido pela concha. Os valores de hidratação dos tecidos foram bastante próximos aos encontrados por Howard e colaboradores (1986) e por Amado (2006), ambos referentes a anêmonas do mar (cnidários).

A concha, que protege o animal e permite que este se isole da água quando esta não lhe apresenta condições favoráveis, impôs muitos desafios para a execução deste trabalho. As dificuldades de se trabalhar com estes animais começam pela sua adesão ao substrato e aos animais a seu redor, dificultando a individualização do animal. Em seguida, houve dificuldade na retirada dos fluidos. Inicialmente a intenção era a de retirar a água retida pelo fechamento da concha, e posteriormente a hemolinfa. Contudo, não foi possível distinguir estes dois fluidos, mesmo com dosagem de proteínas (dados não mostrados), pela baixa concentração protéica na sua hemolinfa, e pela potencial presença de matéria orgânica e proteínas na água retida pela concha. Ao se inserir a seringa na concha, não era possível ter certeza absoluta de que a hemolinfa retirada não estava misturada com o líquido retido na concha. Para evitar esta situação, a seringa era posicionada de modo a retirar a hemolinfa dos tecidos do animal. Porém como este procedimento ocorreu dentro da concha, com o animal vivo, é possível que este "fluido" retirado contenha traços de água da concha. Por esta razão a mistura em questão foi denominada "fluido", e não hemolinfa. Entretanto esta situação

ocorreu de forma sistemática em todas as retiradas de fluidos. Outro grande problema inerente ao trabalho de fisiologia das cracas reside na dificuldade de determinar com exatidão se o animal está em situação crítica, ou até morto em função do experimento, ou mesmo naturalmente. Isto se deve ao fato de o animal estar encerrado na concha, o que impossibilita a avaliação de suas reações. Estas situações podem ser deduzidas a partir das dosagens dos íons e da osmolalidade. Quando os animais apresentam valores muito altos, principalmente do íon potássio (íon mais abundante no meio intracelular do que no extracelular), supõe-se que tenha ocorrido lise celular, e, portanto, o animal encontra-se morto ou muito debilitado. Mesmo assim estes valores foram todos considerados como resultados válidos. Levando-se em conta este aspecto, *F. citerosum* teve uma porcentagem de sobrevivência superior à de *A. reticulatus* na salinidade de 40‰, que se mostrou letal ou crítica principalmente para a espécie introduzida.

Um resultado importante, encontrado a partir dos experimentos da Fase II, foi o de que os fluidos tiveram valores de concentração superiores em animais expostos a salinidade de 0‰ do que nas cracas expostas a salinidade de 10‰, o que pode parecer um paradoxo. Contudo, quando as cracas são expostas à salinidade 0‰, imediatamente se fecham, evitando sua diluição interna. Quando em 10‰, as cracas têm sua atividade normal, uma vez que esta é uma salinidade normal no estuário, e seu fluido interno termina se igualando à água externa.

Em observações de substratos artificiais fixos (placas de granito), a ocupação relativa das espécies de craca foi de aproximadamente 60% para *F. citerosum*, e de aproximadamente 40% para *A. reticulatus* (Leonardo

Cangussu, dados não publicados). Este fato pode ser explicado pela baixa capacidade reprodutiva da espécie, ou pela sua introdução recente neste ambiente, o que não foi objetivo de avaliação neste estudo.

Na Baía de Sepetiba, estado do Rio de Janeiro, foi constatada uma restrição de *A. reticulatus* a substratos artificiais, sendo a espécie com maior frequência neste tipo de substrato (Silva *et al.*, 2007). Também na Baía de Sepetiba e em Angra dos Reis, foi constatada a presença de *A. reticulatus* em substrato natural (Dr. Fábio B. Pitombo, comunicação pessoal). Na Baía de Paranaguá o trabalho realizado somente avaliou a fixação dos animais em substratos artificiais (cascos de embarcações, colunas de concreto e fibra de vidro) (Neves, 2006; Neves & Rocha, 2008). A baixa ocupação de *A. reticulatus* em todos os substratos observados em Paranaguá pode ser em função da não existência de um biofilme propício para o seu assentamento larval (Thiyagarajan *et al.*, 1999). Como o presente trabalho não verificou a ocupação em áreas naturais, não está claro o padrão de distribuição da espécie na Baía de Paranaguá.

Tanto cirripédios como equinodermos são grupos exclusivamente marinhos. Porém, diferente dos cirripédios, os equinodermos possuem apenas uma espécie estuarina registrada, *Ophiophragmus filograneus* (Talbot & Lawrence, 2002). Por outro lado, existem diversos cirripédios estuarinos (Davenport & Irwin, 2003; Thiyagarajan *et al.*, 2003; Desai *et al.*, 2006 a; Farrapeira, 2008; Pérez-Losada *et al.*, 2008).

A relevância da temperatura e da salinidade para o metabolismo da craca *Balanus trigonus* foi confirmada em experimento realizado em Hong Kong, o que corrobora a argumentação que norteia este trabalho. Para os

animais de Hong Kong foi demonstrada a importância da combinação de salinidade e temperatura na dispersão, no desenvolvimento e na adesão de larvas das cracas, sendo que altas temperaturas e baixas salinidades afetam negativamente estes processos (Thiyagarajan *et al.*, 2003). Esta informação também pode auxiliar na compreensão da menor abundância de *A. reticulatus* em relação a *F. citerosum* no local de estudo, diferentemente do que ocorre na Baía de Sepetiba (Silva *et al.*, 2007).

A maioria dos indivíduos da espécie *A. reticulatus* coletados em Paranaguá, estavam fixados sobre outros animais (coespecíficos, *F. citerosum*, ou moluscos bivalves). Assim, mais uma diferença é encontrada em relação aos resultados de Silva e colaboradores (2007), onde os animais estavam diretamente fixados sobre o substrato artificial.

Outro aspecto que pode estar determinando a baixa concentração de indivíduos de *A. reticulatus* na Baía de Paranaguá é a possibilidade de a maioria das larvas que se fixam na Baía não ser oriunda de navios que aportam no Porto de Paranaguá. Então estas larvas podem estar vindo de outros estuários, onde animais adultos se reproduzem e exportam suas larvas, através de correntes marinhas, para outros locais (Pineda, 2000; Jessopp & McAllen, 2008). Outro fator que pode prejudicar a capacidade de assentamento de larvas de *A. reticulatus* no late Clube de Paranaguá são as variações de salinidade, como constatado para *Sesarma curacaoense* na Jamaica (Anguer, 2000), e este fator pode obviamente ter relevância sobre a densidade dos adultos.

A espécie nativa *F. citerosum* adapta-se bem às condições ambientais do estuário, assim como também foi verificado para o caranguejo *Neohelice*

granulata, outro crustáceo estuarino com grande capacidade de adaptação às variações de um estuário (Bianchini, 2008).

Apesar de se tratarem de espécies da mesma família (Amphibalanidae), a distribuição das espécies é diferenciada no ambiente. *A. reticulatus* é encontrado mais frequentemente em água mais salina, e *F. citerosum* em água estuarina mais diluída. Quando as cracas são expostas a condições de baixa salinidade, elas fecham firme e rapidamente suas placas operculares, passando a manter seu metabolismo apenas com a água que ficou retida no interior da carapaça. Esta situação resulta em uma condição de hipóxia, para a qual as espécies estudadas podem diferir entre si em termos de tolerância. Esta diferença pode constituir um fator que possibilita que *F. citerosum* mantenha melhor a sua homeostasia interna, em relação a *A. reticulatus*. Do mesmo modo, foram relatadas diferenças na capacidade de manutenção de metabolismo para as cracas *Chthamalus stellatus*, *Semibalanus balanoides* e *Elminius modestus*, quando expostas à situação de hipóxia (Davenport, 2003).

Os resultados obtidos nas dosagens de osmolalidade e dos íons (Na, Cl, Mg e K), mostraram que *F. citerosum* apresenta uma maior estabilidade na concentração de seus fluidos, diferente de *A. reticulatus* que, com um tempo menor de exposição (9 h) ao maior valor de salinidade (40‰) já apresenta seus fluidos igualados ao meio. Em paralelo, observou-se que após 9 h o grau de hidratação dos tecidos de *F. citerosum* ainda é maior do que o de *A. reticulatus*. A espécie introduzida já apresentava conformação com a água 40‰ e redução da hidratação dos seus tecidos. Após 12 e 48 h as duas espécies já não se diferenciam.

A maior estabilidade dos valores medidos no fluido de *F. citerosum* indica que esta espécie provavelmente possua um conjunto de características morfofisiológicas que a capacita a enfrentar desafios ambientais com maior sucesso do que *A. reticulatus*. Este fato também pode estar relacionado à baixa densidade de *A. reticulatus*, que pode ter encontrado, no estuário da Baía de Paranaguá, a região limítrofe de sua distribuição.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados alcançados na comparação fisiológica realizada entre os animais da espécie nativa *Fistulobalanus citerosum*, e da espécie introduzida *Amphibalanus reticulatus*, coletadas na Baía de Paranaguá, PR próximo da foz do Rio Itiberê. Que foram expostas a diferentes combinações de temperatura e salinidade, pode-se afirmar que a espécie nativa *F. citerosum* apresenta uma maior tolerância fisiológica quando exposta a condições extremas. A espécie introduzida *A. reticulatus* apresenta uma menor ocupação no ambiente pesquisado, o que pode ser explicado em parte pela sua menor plasticidade fisiológica, que pode estar vinculada a outros fatores ambientais e ecológicos, não enfocados neste trabalho.

Esta diferença na resposta fisiológica das cracas pode ser relacionada a sua distribuição. *F. citerosum* apresenta distribuição restrita a áreas estuarinas, onde existe uma grande flutuação ambiental, característica intrínseca destes ambientes, que seleciona os organismos. Diferentemente, *A. reticulatus* está distribuído em regiões abertas com maior influência da água do mar, e conseqüentemente mais estáveis, o que exige menor capacidade para responder a oscilações ambientais, significando que os espécimes encontrados na Baía de Paranaguá estão no limite de sua distribuição.

LITERATURA CITADA

- Amado, E.M., 2006. Adaptação de anêmonas do mar a variação de salinidade – evidências de mecanismos regulatórios. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da UFPR.
- Anil, A.C., Desai, D., Khandeparker, L., 2001. Larval development and metamorphosis in *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia; Thoracica): significance of food concentration, temperature and nucleic acids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 263: 125-141.
- Anger, K., Charmantier, G., 2000. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in a mangrove crab, *Sesarma curacaoense* (Decapoda: Grapsidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 251: 265-274.
- Augusto, A., Greene, L.J., Laure, H.J., McNamara, J.C., 2007. Adaptative shifts in osmoregulatory strategy and the invasion of freshwater by brachyuram crabs: Evidence from *Dilocarcinus pagei* (Trichodactylidae). *Journal of Experimental Zoology*, 307A: 688-698.
- Bax, N., Carlton, J.T., Mathews-Amos, A., Haedrich, R.L., Howarth, F.G., Purcell, J.E., Rieser, A., Gray, A., 2001. The control of biological invasions in the world's oceans. *Conservation Biology*, 15 (5): 1234-1246.
- Bianchini, A., Lauer, M.M., Nery, L.E.M., Colares, E.P., Monserrat, J.M., Santos Filho, E.A., 2008. Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during salinity acclimation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 151: 423-436.

- Broitman, B.R., Blanchette, C.A., Gaines, S.D., 2005. Recruitment of intertidal invertebrates and oceanographic variability at Santa Cruz Island, California. *Limnology and Oceanographic*, 50 (5): 375-381.
- Bromberg, E., Santos, E.A., Bianchini, A., 1995. Osmotic and ionic regulation in *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae) during hyposmotic stress. *Nauplius, Rio Grande*, 3: 83-99.
- Brusca, R.C., Brusca, G.J., 2007. *Invertebrados*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2 ed, pp 562-564.
- Buckley, B.A., Owen, M., Hofmann, G.E., 2001. Adjusting the thermostat: the threshold induction temperature for the heat-shock response in intertidal mussels (genus *Mytilus*) changes as a function of thermal history. *The Journal of Experimental Biology*, 204: 3571-3579.
- Caffey, H.M., 1985. Spatial and temporal variation in settlement and recruitment of intertidal barnacles. *Ecological Monographs*, 55 (3): 313-332.
- Cailleaud, K., Maillet, G., Budzinski, H., Souissi, S., Forget-Leray, J., 2007. Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 147: 841-849.
- Carlton, J.T., 1985. Transoceanic and inter-oceanic dispersal of coastal marine organism: the biology of ballast water. *Oceanography and Marine Biology, An Annual Review*, 23: 313-371.
- Carlton, J.T., 1987. Patterns of transoceanic marine biological invasions in the Pacific Ocean. *Bulletin of Marine Science*, 41: 452-465.

- Carlton, J.T., 1989. Man's role in changing the face of the ocean: biological invasions and implications for conservation of near-shore environments. *Conservation Biology*, 3: 265-275.
- Carlton, J.T., 1996a. Biological invasions and cryptogenic species. *Ecology*, 77: 1653-1655.
- Carlton, J.T., 1996b. Pattern, process, and prediction in marine invasion ecology. *Biological Conservation*, 78: 97-106.
- Chan, B.K.K., Morritt, D., Williams, G.A., 2001. The effect of salinity and recruitment on the distribution of *Tetraclita squamosa* and *Tetraclita japonica* (Cirripedia; Balanomorpha) in Hong Kong. *Marine Biology*, 138: 999-1009.
- Cohen, N.A., Carlton, J.T., 1998. Accelerating invasions rate in a highly invaded estuary. *Science*, 279: 555-558.
- Davenport, J., Irwin, S., 2003. Hypoxic life of intertidal acorn barnacles. *Marine Biology*, 143: 555-563.
- Desai, D.V., Anil, A.C., 2004. The impact of food type, temperature and starvation on larval development of *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia: Thoracica). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 306: 113-137.
- Desai, D.V., Anil, A.C., Venkat, K., 2006a. Reproduction in *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia: Thoracica): influence of temperature and food concentration. *Marine Biology*, 149: 1431-1441.
- Desai, D., Khandeparker, L., Shirayama, Y., 2006b. Larval development and metamorphosis of *Balanus albicostatus* (Cirripedia: Thoracica);

- implications of temperature, food concentration and energetics. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 86: 335-343.
- Farrapeira-Assunção, C.M., 1990. Ocorrência de *Chiroma (Striatobalanus) amarillis* Darwin, 1854 e de *Balanus reticulatus* Utimoni, 1967 (Cirripédia, Balanomorpha) no Estado de Pernambuco. XVII Congresso Brasileiro de Zoologia, Abstracts, Londrina.
- Farrapeira, C.M.R., 2008. Cirripedia Balanomorpha del estuario del Rio Paripe (Isla de Itamaracá, Pernambuco, Brasil). *Biota Neotropica*, 8 (3): 31-39.
- Freire, C.A., Cavassin, F., Rodrigues, E.N., Torres, A.H., McNamara, J.C., 2003. Adaptative patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 136: 771-778.
- Freire, C.A., Amado, E.M., Souza, L.R., Veiga, M.P.T., Vitule, J.R.S., Souza, M.M., Prodocimo, V., 2008a. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 149: 435-446.
- Freire, C.A., Onken, H., McNamara, J.C., 2008b. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 151: 272-304.
- Glasby, T.M., Connel, S.D., Holloway, M. G., Hewitt, C.L., 2007. Nonindigenous biota on artificial structures: could habitat creation facilitates biological invasions? *Marine Biology*, 151: 887-895.
- Herbert, R.J.H., Southward, A.J., Shearer, M., Hawkins, S.J., 2007. Influence of recruitment and temperature on distribution of intertidal barnacles in the

- English Channel. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 87 (2): 487-499.
- Hickman, C.P., Roberts, L., Larson, A., 2004. Princípios Integrados de Zoologia. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp 380-381.
- Howard, C.L., Swank, P., Kasschau, M.R., 1986. Environmental and seasonal influences of the free amino acid pool of the sea anemone *Bunodosoma cavernata* (Bosc) under natural conditions. Comparative Biochemistry Physiology, Part A, 87: 319-325.
- Hutchings, P.A., Hilliard, R.W., Coles, S.L., 2002. Species introductions and potential for marine pest invasions into tropical marine communities, with special reference to the Indo-Pacific. Pacific Science, 56: 223-233.
- late Clube de Paranaguá, 2008. (Internet). Data de acesso: 26/10/2008. Disponível em: <http://www.icpgua.com.br>
- Jessopp, M.J., McAllen, R.J., 2008. Go with the flow: tidal import and export of larvae from semi-enclosed bays. Hydrobiologia, 606: 81-92.
- Lana, P.C., Marone, E., Lopes, R.M., Machado, E.C., 2001. The subtropical estuarine complex of Paranaguá Bay, Brazil. Ecological Studies, 144: 131-145.
- Maynard, J.A., Anthony, K.R.N., Marshall, P.A., Masiri, I., 2008. Major bleaching events can lead to increased thermal tolerance in corals. Marine Biology, 155: 173-182.
- Neves, C.S., 2006. Bioinvasão mediada por embarcações na Baía de Paranaguá, PR e suas implicações para a conservação. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

- Neves, C.S., Rocha, R.M., 2008. Introduced and cryptogenic species and their management in Paranaguá Bay, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51 (3): 623-633.
- O'Connor, N.J., Richardson, D.L., 1994. Comparative attachment of barnacle cyprids (*Balanus amphitrite* Darwin, 1854; *B. improvisus* Darwin, 1854; & *B. eburneus* Gould, 1841) to polystyrene and glass substrata. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 183(2): 213-225.
- Péqueux, A., 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 15, 1-60.
- Pérez-Losada, M., Harp, M., Høeg, J.T., Achituv, Y., Jones, D., Watanabe, H., Crandall, K.A., 2008. The tempo and mode of barnacle evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 328-346.
- Pineda, J., 2000. Linking larval settlement to larval transport: assumptions, potentials, and pitfalls. *Oceanography of the Eastern Pacific*, 1: 84-105.
- Pitombo, F.B., 2004. Phylogenetic analysis of the Balanidae (Cirripedia, Balanomorpha). *Zoologica Scripta*, 33 (3): 261-276.
- Queiroz, G.M.N., Spach, H.L., Sobolewski-Morelos, M., Santos, L.O., Schwarz Junior, R., 2006. Caracterização da ictiofauna demersal de duas áreas do Complexo Estuarino de Paranaguá, Paraná, Brasil. *Biociências, Porto Alegre*, 14 (2): 112-124.
- Ruiz, G.M., Carlton, J.T., Grosholz, E.D., Hines, A.H., 1997. Global invasions of marine and estuarine habitats by non-indigenous species: mechanisms, extent, and consequences. *American Zoologist*, 37: 621-632.
- Ruppert, E.E., Barnes, R.D., 1996. *Zoologia dos invertebrados*. Editora Roca, São Paulo, pp 749-752.

- Schmidt-Nielsen, K., 2002. Fisiologia animal – Adaptação e meio ambiente. Editora Santos, São Paulo, pp 301-313.
- Silva, J.S.V., Junqueira, A.O.R., Fernandes, F.C., 2007. Espécies exóticas e criptogênicas do macrozoobentos do substrato consolidado da Baía de Sepetiba. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil. Minas Gerais.
- Southward, A.J., 1967. Recent changes in abundance of intertidal barnacles in south-west England: A possible effect of climatic deterioration. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 47 (1): 81-95.
- Talbot, T.D., Lawrence, J.M., 2002. The effect of salinity on respiration, excretion, regeneration and production in *Ophiophragmus filograneus* (Echinodermata: Ophiuroidea). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 275, 1- 14;
- Thiyagarajan, V., Murthy, P.S., Nancharaiah, Y.V., Venugopalan, V.P., Nair, K.V.K., Subraboniam, T., 1999. Influence of biofilms on the larval settlement of *Balanus reticulatus* Utinomi (Cirripedia: Crustacea). Biofilm Journal, 4(1): 1-6.
- Thiyagarajan, V., Harder, T., Qian, P.Y., 2003. Combined effects of temperature and salinity on larval development and attachment of the subtidal barnacle *Balanus trigonus* Darwin. Journal of Experimental Marine Biological and Ecology, 287: 223-236.
- Vermeij, G.J., 1991. When biotas meet: understanding biotic interchange. Science, 253: 1099-1104.
- Young, P.S., 1989. Establishment of an Indo-Pacific barnacle (Cirripedia, Thoracica) in Brazil. Crustaceana, 56 (2): 212-214.

Young, P.S., 1994. Superfamily Balanoidea leach (Cirripedia, Balanomorpha) from the brazilian coast. Boletim do Museu Nacional, Nova Série, Rio de Janeiro, 356: 19-23.

Young, P.S., 1998. Maxillopoda. Thecostraca. In: Catalogue of Crustacea from Brazil. Young, P.S. (ed.) Rio de Janeiro: Museu Nacional, (Série Livros 7), pp 263-285.