

THIAGO VINÍCIUS TRENTO OCCHI

Tolerância à variação de salinidade e plasticidade osmorregulatória do siri invasor *Charybdis hellerii* (Crustacea, Portunidae) em comparação com o caranguejo nativo *Menippe nodifrons* (Crustacea, Xanthidae)

Dissertação apresentada como requisito parcial para à obtenção do título de mestre em Ecologia, Área de concentração em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.
Orientadora: Prof^a. Dr.^a Viviane Prodocimo

CURITIBA

2016



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa da dissertação de mestrado, a que se submeteu **Thiago Vinicius Trento Occhi** para fins de adquirir o título de Mestre em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão do candidato.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

Curitiba, 23 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA:

Profª. Dra. Viviane Prodocimo
Orientador e Presidente

Prof. Dr. José Francisco de Oliveira Neto
Membro

Profª. Dra. Flávia Duarte Ferraz Sampaio
Membro

Visto:

Profª. Dra. Isabela Gálarda Varassin
Coordenadora do PPG-ECO



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as bênçãos no meu caminho até aqui.

Aos meu pais Josuéli Occhi e Rosana Ap. Trento Occhi e ao meu irmão César Augusto Trento Occhi por todo o ensinamento, apoio incondicional e conselhos.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Viviane Prodocimo, por ter me dado a oportunidade de trabalho, pela orientação, aprendizado, amizade e paciência.

Aos Professores da Universidade Estadual do Paraná – Campus FAFIPAR, Rafael Metri, Luis Fernando Roveda, José Francisco e em especial para a Cassiana Baptista Metri, por todo ensinamento, amizade, conselhos e ajuda nas coletas e espaço para os experimentos.

Aos colegas do LFCO por todos os conselhos ajuda nos experimentos e análises e ao companheirismo e amizade.

Ao meu grande amigo e colega de Profissão William Thomaz Peçanha, e grande amiga Larissa G. Felix por todo apoio nos momentos e nos momentos de alegria, felicidade e dificuldade, pela amizade, convívio e exemplo de dedicação.

Aos amigos Francisco Grota Neto e Renatto Nits Oliveira pela amizade e parceria durante o mestrado.

Aos meus amigos do Rotaract Club de Curitiba Água Verde e do Rotaract Distrito 4730, pelo companheirismo e aprendizado.

A CAPES pela bolsa de estudos, e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal do Paraná.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	8
OBJETIVOS	19
Objetivo Geral	19
Objetivos específicos	19
HIPÓTESES	20
MATERIAL E MÉTODOS	21
Coleta de dados	21
Experimentos	22
Dosagens da Hemolinfa.	23
Teor Hídrico Muscular	24
Análises Estatísticas	24
RESULTADOS	25
Taxa de sobrevivência	25
Osmolalidade, íons e teor hídrico muscular	27
Comparação entre os tempos de exposição de 24 horas e 10 dias	36
DISCUSSÃO	37
Osmolalidade, íons e teor hídrico muscular	38
CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

TABELA 1 - Tipos de dispersão incluindo diversos modelos biológicos, para espécies aquáticas e terrestre abordando um contexto atual e histórico (Adaptado de Wilson et al., 2009)	10
FIGURA 1 – Exemplar de <i>Charybdis hellerii</i>	16
FIGURA 2 – Exemplares de <i>Menippe nodifrons</i>	17
FIGURA 3 – Percentual de sobrevivência de <i>Charybdis hellerii</i> (A) e <i>Menippe nodifrons</i> (B)	26
FIGURA 4 - Osmolalidade (Osm, mOsm/kg H ₂ O), íons cloreto (Cl ⁻ , mM), sódio (Na ⁺ , mM), potássio (K ⁺ , mM) e magnésio (Mg ⁺⁺ , mM) da hemolinfa, e teor hídrico muscular (%) de <i>Charybdis hellerii</i> (A) e <i>Menippe nodifrons</i> (B), expostos por 24 horas às salinidades de 10, 20, 30, 40 ppm.....	32
FIGURA 5 – Osmolalidade (Osm, mOsm/kg H ₂ O), íons cloreto (Cl ⁻ , mM), sódio (Na ⁺ , mM), potássio (K ⁺ , mM) e magnésio (Mg ⁺⁺ , mM) da hemolinfa, e teor hídrico muscular (%) de <i>Charybdis hellerii</i> (A) e <i>Menippe nodifrons</i> (B) expostos por 10 dias às salinidades de 10, 20, 30, 40 ppm.....	35

RESUMO

Estudos fisiológicos atuam como uma ótima ferramenta para avaliar a respostas dos animais frente às variações ambientais, sua distribuição e potencial invasor em ambientes distintos. O siri não nativo *Charybdis hellerii* foi recentemente registrado no complexo estuarino de Paranaguá (CEP) onde co-ocorre com o caranguejo *Menippe nodifrons*. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a tolerância e plasticidade fisiológica da espécie não nativa *Charybdis hellerii* em comparação com a espécie nativa *Menippe nodifrons* frente a mudanças de salinidade. Os indivíduos foram expostos a experimentos de choque osmótico (salinidades de 10, 20, 30 e 40 ppm) de curto prazo por vinte e quatro horas e de longo prazo por dez dias. Após os experimentos avaliou-se a osmolalidade, íons cloreto, sódio, potássio e magnésio da hemolinfa e teor hídrico do tecido muscular. No experimento de vinte e quatro horas a espécie não nativa apresentou taxa de sobrevivência entre 80-100%. No experimento de dez dias a taxa de sobrevivência foi baixa, não houve sobreviventes nas salinidades de 10 e 20ppm, e nos tratamentos de 30 e 40ppm, o percentual de sobreviventes foi de 40% e 80%, respectivamente. Em ambos os experimentos *C. hellerii* demonstrou características de conformação osmo-iônica e manutenção estável do teor hídrico muscular. A espécie nativa foi mais resistente às variações de salinidade em comparação com a espécie não nativa, com taxas de sobrevivência, entre 20%-100% ao final dos dez dias de experimento. Em ambos os períodos de exposição *M. nodifrons* demonstrou características osmorreguladoras fracas, regulando sua osmolalidade e íons sódio nas salinidades 20ppm e 30ppm e conformando nas salinidades 10ppm e 40ppm após vinte e quatro horas de exposição, e características osmoconformadoras após dez dias. O teor hídrico muscular foi reduzido apenas na salinidade de 40 ppm no experimento de dez dias. A espécie não nativa apresentou menor tolerância as variações de salinidade, sendo assim conclui-se que a capacidade desta espécie para ocupar áreas com salinidades mais diluídas é limitada por sua característica osmorregulatória.

Palavras chave: Ecofisiologia; Ecologia de invasão; Decapoda

ABSTRACT

Ecophysiological studies perform an important role to evaluate the organism's tolerance to environmental variations, distribution and invasiveness capacity. The specie *Charybdis hellerii* (Milne Edwards, 1867) was recently registered at Complexo estuário de Paranaguá (CEP), at where co-occurs with *Menippe nodifrons* (Stimpson, 1859). CEP is constantly under the risk of non-native species introduction. As estuarine region the CEP present a gradient of different salinities, in view of this we evaluated the physiological plasticity of *Charybdis hellerii* in compare to *Menippe nodifrons*. To analysis the physiological plasticity of species in relation with salinity, the specimens was individually exposed to osmotic shock in short (24 hours) and long term (ten days). In both periods of exposure the specimens was submitted to treatments of 10, 20, 30 and 40 ppm. After the exposed period was extracted samples of hemolinf from each animal, and quantified the osmolality, chloride, sodium, potassium, magnesium and water muscle content. The non-native species demonstrated osmoconformer characteristics for almost ions at short term experiment, however on long term exposition *C. hellerii* presented lower index of survivor, with a hundred per cent of mortality, in 10 and 20 ppm treatments after the second day of exposure. The native specie presented characteristics of weak osmoregulator in both periods of exposure, besides that *M. nodifrons* was more resistant than *C. hellerii*, presented high rates of survivor in both periods of exposure. The non-native species had less tolerance to salinity variations, so it is concluded that the ability of this species to occupy areas with more dilute salinity is limited by its osmoregulatory characteristic.

Keywords: Ecophysiology; Ecology invasions; Decapoda.

INTRODUÇÃO

As invasões biológicas vêm sendo mencionadas na ciência desde o século XIX, nos manuscritos de Charles Darwin (1859), Alphonse de Candolle (1855), Joseph Hooker (1844 – 1847) e Charles Lyell (1830 – 1833), entretanto o conceito só começou a ganhar atenção a partir da metade do século XX. Pouco estudadas, as invasões biológicas começaram a despertar o interesse dos pesquisadores após a publicação do livro de Charles S. Elton “A ecologia de Invasões de Animais e Plantas” em 1958 (Richardson e Pysek, 2006; Richardson e Pyšek, 2008).

A definição de invasão biológica pode ser compreendida como a introdução de espécies em ambientes fora do seu potencial natural de alcance, geralmente delimitado por barreiras biogeográficas ou pela própria capacidade de dispersão da espécie (Richard N. Mack *et al.*, 2005; Richardson e Pysek, 2008; Richardson e Pyšek, 2006). Espécies não nativas introduzidas em novos ambientes possuem um notável interesse para estudos ecológicos que envolvem tópicos sobre assembleia de comunidade, a importância da competição e da predação, a complexidade e estabilidade, o papel das espécies chave e a influência da história na estrutura da comunidade nativa (Lodge, 1993).

No ambiente marinho, milhares de organismos (bactérias, pequenos invertebrados, ovos, cistos e larvas de organismos maiores) são transportados e introduzidos através de vetores antrópicos, a descarga da água de lastro de navios é o mais importante desses vetores, devido a constante expansão das rotas de transporte naval que facilitam a propagação de espécies potencialmente invasoras (Ruiz & Carlton, 1997).

Um dos principais fatores que influenciam as mudanças na estrutura das comunidades e ecossistemas, associado a extinção de espécies é o aumento na taxa em que espécies conquistam novos ambientes (Wilcove et al., 1998).

As consequências geradas pela colonização de espécies não nativas podem gerar impactos negativos em escala local causando alterações na biota, e em escala global gerando uma tendência à homogeneidade em regiões biogeograficamente diferentes, inevitavelmente levando a perda de biodiversidade (Sax & Gaines, 2003). Apesar da maioria dos autores reportarem que a biodiversidade diminui em todas as escalas espaciais, em alguns casos o impacto em escala sub-global pode ser compensado pelo estabelecimento de espécies não nativas, isto porque a introdução de espécies eleva o índice de diversidade em regiões e/ou locais específicos (Sax et al., 2002; Sax & Gaines, 2003).

De maneira geral o processo de invasão biológica pode ser dividido em três etapas: 1) Dispersão inicial: onde a espécie é transportada para um ambiente fora do seu alcance natural através da intervenção humana; 2) Estabelecimento ou a resistência das populações no novo ambiente; 3) Expansão para novas áreas a partir do novo ambiente (Ficetola, *et al.*, 2009; Puth e Post, 2005; Richardson *et al.*, 2000). Hulme (2006) inclui ainda o impacto da espécie no ambiente novo como a quarta etapa no processo de invasão biológica. De acordo com a teoria unificada para invasões biológicas, para uma espécie se tornar invasora ela precisa ultrapassar filtros ecológicos como as barreiras biogeográficas, além de sobreviver, reproduzir e dispersar para novas áreas a partir da área recém conquistada (Blackburn et al. 2011).

Espécies só conquistam novos ambientes através da dispersão natural, ocorrendo de maneira lenta, geralmente não direcional e raramente cruzando barreiras biogeográficas (Caldwell *et al.*, 2007). Entretanto espécies têm sido constantemente introduzidas em novos ambientes acidentalmente e em sua maioria por intervenção humana (Caldwell *et al.*, 2007). Em geral, as espécies podem ser dispersas através de seis vias (Wilson *et al.*, 2009) (Tabela 1).

Tabela 1: Tipos de dispersão para espécies aquáticas e terrestre abordando um contexto atual e histórico (Adaptado de Wilson *et al.*, 2009). * Dispersão de *Charybdis hellerii* para novos ambientes, *** Dispersão de *Charybdis hellerii* e *Menippe nodifrons* no ambiente de origem. Colocar junto da tabela em paisagem

Tipos de dispersão	Descrição	Exemplos	Frequência	Número de Propágulos	Origem	Destino	Liberação do inimigo
Dispersão natural ***	Mudanças graduais no alcance inicial do organismo, através da colonização de novos ambientes (difusão)	Recolonização pós glaciação, respostas a mudanças no habitat	Contínua	Dependente da abundância	Uma região	Uma região	Não ocorre
Corredor	Uma conexão física ligando habitats	Canal do Panamá e canal de Suéz	Contínua	Muitos	Uma região	Uma região	Pouco Provável
Dispersão em Salto	Dispersão de longas distâncias, porém com uma ligação à região de origem	Propágulos dispersando entre montanhas, ou corpos d'água	Pouco Frequente	Poucos	Algumas regiões	Algumas regiões	Parcial ou temporário
Dispersão de distâncias extremamente longas*	Propágulos dispersando além da sua capacidade de escala temporal e espacial	Dispersão transoceânica e transcontinental.	Apenas uma vez, ou raramente	Poucos	Apenas uma, ou algumas regiões	Apenas uma, ou algumas regiões	Muito Provável
Dispersão em massa	Estabelecimento de uma rota de dispersão, onde vários indivíduos podem se deslocar de diferentes locais, para novos ambientes	Ratos em navios, organismos incrustantes em cascos de navio.	Rara ou frequente	Diversos	Poucas regiões	Muitas regiões	Provável
Cultivo	Propágulos e até mesmo indivíduos adultos transportados e cultivados em novos ambientes (Dispersão direta)	Espécies de interesse agrícola e ornamental.	Podem ser um evento único ou constante	De poucos a muitos	Poucas ou diversas regiões	Muitas regiões	-

A dispersão inicial é considerada uma das fases mais críticas na ecologia de invasões, e conseqüentemente a mais importante do ponto de vista da conservação, pois identificar um não nativo ainda na fase de dispersão inicial aumentam as chances de evitar a proliferação da espécie não nativa (Ficetola *et al.*, 2009; Hulme, 2006; Puth e Post, 2005). A prevenção de introduções é considerada a ferramenta mais efetiva para manejo de espécies não nativas (Ficetola *et al.*, 2009; Hulme, 2006; Lodge *et al.*, 2008; Leung *et al.*, 2002). Entretanto mesmo em locais onde protocolos de prevenção são estritamente seguidos ocorrem introduções de espécies não nativas, exigindo assim uma rápida resposta por parte dos órgãos governamentais e ecólogos para evitar o estabelecimento da espécie no novo ambiente (Ficetola *et al.*, 2009; Hulme, 2006).

Do ponto de vista do estabelecimento das populações em novos ambientes, em alguns casos apesar dos indivíduos estarem aptos a sobreviver e reproduzir a população pode não prosperar devido à taxa negativa de crescimento populacional ($r < 0$). O acompanhamento de vários ciclos reprodutivos da população se faz necessário para confirmar o real estabelecimento da mesma no novo ambiente (Blackburn *et al.*, 2011).

A alta tolerância ao estresse ambiental, tanto natural quanto antrópico de uma espécie é uma das características fundamentais para considerá-la como invasora (Fedorenkova *et al.*, 2013; Karatayev *et al.*, 2009; Leuven e Hendriks, 2011). Sendo assim, a distribuição de uma espécie em diferentes ambientes depende direta ou indiretamente de sua ecologia fisiológica.

A Ecologia Fisiológica ou Ecofisiologia estuda como os animais lidam com diferentes mudanças ambientais e quais estratégias utilizam para evitar ou se adaptar a tais mudanças (WILLMER, Stone e Johnston, 2005).

No ambiente aquático há variação nas concentrações de sais dissolvidos (água salgada, salobra e doce), dessa forma a resposta adaptativa e a tolerância fisiológica dos animais será depende das condições ambientais em que o mesmo está exposto (Gutierre, 2011; Willmer, 2005).

Os organismos aquáticos podem ser divididos em dois grupos de acordo com sua capacidade de osmorregulação, animais como os invertebrados marinhos conformam osmolalidade do líquido extracelular frente as mudanças ambientais (conformadores), ou seja, a concentração dos líquidos extracelulares é alterada conforme a osmolalidade do ambiente, enquanto que outros animais podem manter o líquido extracelular constante em seu organismo (reguladores) mantendo-se até certo ponto, independente às condições externas (Evans, 2009; Gutierre, 2011; Willmer, 2005).

No ambiente marinho as condições de salinidade são praticamente constantes ao longo do seu domínio, sendo assim esses os animais dificilmente adotam estratégia de fuga quando expostos a condições estressantes. Quando os invertebrados marinhos enfrentam a variação de salinidade, seu líquido extracelular permanece em equilíbrio osmótico com o meio (conformando), ou seja a concentração de solutos do líquido extracelular, isosmótica à do meio. (Evans, 2009; Willmer, 2005).

Tais animais que estão constantemente expostos devem essencialmente apresentar alta tolerância à uma ampla variação das condições de salinidade, estes por sua vez são por definição animais eurihalinos (Evans, 2009; Willmer,

2005). Entretanto é importante ressaltar que tanto animais osmoconformadores, quanto osmoreguladores podem ser classificados como eurihalinos (Evans, 2009).

Apesar da maioria dos animais marinhos serem classificados como osmoconformadores, grande parte deles não apresentam ampla plasticidade frente as condições ambientais, ou seja, apresenta pouca tolerância a variação de salinidade ambiental sendo considerados estenoahalinos (Evans, 2009; Péqueux, 1995; Willmer, 2005).

Em ambientes estuarinos os desafios salinos se tornam inevitáveis, nesse caso animais osmoconformadores podem optar pela estratégia de evitar condições estressantes, migrar com o fluxo da maré ao longo do estuário, selar suas conchas ou se esconder em tocas é outra estratégia adotada por animais estuarinos até as condições voltarem a ser favoráveis (Evans, 2009; Willmer, 2005).

Os animais osmorreguladores de água doce ou marinhos estuarinos em situações de maré baixa, quando o habitat encontra-se mais diluído conseguem manter seu líquido extracelular mais concentrado que o ambiente e são caracterizados como reguladores hiper-osmóticos. Alguns animais osmorreguladores conseguem através da secreção, manter seus líquidos extracelulares mais diluídos que o ambiente, estes por sua vez são classificados como reguladores hipo-osmóticos (Evans, 2009; Freire, 2008; Willmer, 2005).

Os crustáceos marinhos em sua maioria apresentam características osmoconformadoras, ou seja, estes animais mantêm sua concentração osmótica interna próxima à do ambiente, sendo assim seu maior desafio é manter as

condições celulares internas, compatíveis com a do ambiente (Foster *et al.*, 2010; Péqueux, 1995).

Entretanto os crustáceos, dentre outras espécies desenvolveram ao longo do processo evolutivo, mecanismos moleculares que garantem um balanço hídrico intracelular adequado para a sobrevivência em ambientes com ampla variação de salinidade (Péqueux, 1995), isto é possível graças a regulação isosmótica intracelular, como observado por Amado (2006), em anêmonas *Actinia bermudenses* e *Bunodosoma caissarum*.

Em contrapartida alguns crustáceos tais como *Maja* sp. e *Cancer paguros* são limitados à ambientes marinhos estáveis, isto devido à permeabilidade elevada em seus tecidos, tornando difícil para as células lidar com as alterações de salinidade no líquido extracelular, ou seja, esses animais quando transferidos para o meio diluído perdem íons inorgânicos e ganham água, levando a morte em algumas horas (Péqueux, 1995).

Nos crustáceos marinhos em geral, os mecanismos hiper-regulatórios são ativados em concentrações de salinidade abaixo de 26 ppm esta plasticidade fisiológica permite que estes organismos possam sobreviver em ambientes com ampla variação de salinidade, tais como os estuários, permitindo que estes indivíduos explorem esse habitat altamente produtivo e muitas vezes menos competitivo (Havird, Santos, & Henry, 2014). Esta capacidade pode ainda fornecer vantagem para espécies de crustáceos não nativas (que são altamente tolerantes a variações de salinidade no ambiente), aumentando as suas possibilidades de se estabelecerem em um novo ambiente.

A espécie de siri *Charybdis hellerii* (Milne Edwards, 1867) (Decapoda, Brachyura, Portunidae) (Figura 1) é nativo do oeste do oceano Indo-Pacífico, e

a pouco menos de 30 anos surgiram os primeiros indivíduos dessa espécie no Atlântico ocidental, provenientes possivelmente do transporte de larvas via água de lastro de navios (Lemaitre, 1995; Mantelatto e Garcia, 2001). No Brasil o primeiro registro da espécie foi na Bahia, Alagoas e Rio de Janeiro, posteriormente indivíduos de *C. hellerii* foram registrados ao longo de quase toda a costa Brasileira excetuando apenas o estado do Rio Grande do Sul (Mantelatto e Dia, 1999 ; Mantelatto e Garcia, 2001; Musiello-fernandes *et al.*, 2011), recentemente a espécie foi encontrada na Baía de Guaratuba e no Complexo estuarino de Paranaguá, no Paraná. A história de vida de *C. hellerii* possui algumas características que promovem seu estabelecimento em novas regiões, tais como, vida larval relativamente longa (em torno de 44 dias), crescimento rápido, maturação em cerca de um ano, dieta generalista preferencialmente carnívora e capacidade de desova múltipla (Dineen *et al.*, 2001; Musiello-fernandes *et al.*, 2011). Além disso, esta espécie apresenta picos reprodutivos na primavera e no inverno, criando assim uma vantagem reprodutiva quando comparada as espécies de portunídeos nativas do Brasil (Mantelatto e Garcia, 2001; Musiello-Fernandes *et al.*, 2011).



Figura 1 – Exemplar de *Charybdis hellerii*. (Fotografia: Occhi. T.V.T.)

No complexo estuarino de Paranaguá *C. hellerii* co-ocorre com a espécie nativa *Menippe nodifrons* (Decapoda, Brachyura, Xanthidae) (Stimpson, 1859) (Figura 2) (Sant'Anna *et al*, 2012), que apresenta distribuição semelhante aos ambientes recentemente conquistados pelo *Charybdis* ocorrendo da Flórida até a costa Brasileira, e ainda no atlântico oriental de Cabo Verde até angola (Oshiro, 1999).



Figura 2 – Exemplos de *Menippe nodifrons* (Fotografia: Occhi, T.V.T.)

Esta espécie é explorada como recurso pesqueiro nos Estados Unidos, México e Cuba (Bertini e Braga, 2007). No Brasil não é visto como fonte de renda, provavelmente devido ao seu tamanho diminuto quando comparado às espécies comerciais, entretanto é visto como iguaria em algumas regiões litorâneas (Oshiro, 1999).

O conhecimento sobre a biologia, história de vida e importância ecológica de *M. nodifrons*, se limita a alguns estudos sobre seu desenvolvimento juvenil, aspectos reprodutivos (Oshiro, 1999) e recentemente o trabalho de Bertini et al., (2007) abordando crescimento relativo e maturidade sexual da espécie.

Avaliar os processos fisiológicos e osmóticos têm sido de grande valia para elucidar aspectos ecológicos, filogenéticos e biológicos, é utilizada como

ferramenta para esclarecer os padrões de distribuição de espécies, incluindo também espécies potencialmente invasoras (Begon, 2006).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a tolerância à variação de salinidade e plasticidade osmorregulatória do siri não nativo *Charybdis hellerii* em comparação com o caranguejo nativo *Menippe nodifrons* (que co-ocorre no mesmo microhabitat) fazendo inferências ao potencial invasor das espécies e à possível utilização dos estuários como ponte dispersora de espécies.

Objetivos específicos

- Avaliar a tolerância à alterações da salinidade ambiental de *Charybdis hellerii* (não nativa) e *Menippe nodifrons* (nativa);
- Avaliar a regulação da osmolalidade e íons plasmáticos, e o teor hídrico muscular da espécie não nativa e da nativa frente ao estresse osmótico de curto prazo (24 horas) e longo prazo (10 dias);
- Avaliar de forma comparativa as respostas fisiológicas entre as espécies não nativa e nativa para explicar o alto potencial invasor da espécie não nativa e auxiliar na predição de distribuição e conquista de novos ambientes.

HIPÓTESES

H₀: A plasticidade osmorregulatória/fisiológica da espécie não nativa permite a conquista de microhabitats de regiões internas e externas do estuário, gerando grande vantagem competitiva em relação as espécies nativas.

H₁: O sucesso da espécie não nativa para ocupar regiões estuarinas mais externas com salinidades mais altas é independente da ativação de mecanismos osmorregulatórios (plasticidade fisiológica/osmorregulatória).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de dados

Os exemplares de *Charybdis hellerii* (n = 55) e *Menippe nodifrons* (n = 64) foi dada preferência à indivíduos adultos com intuito de evitar a possível variação da tolerância a salinidade entre adultos e jovens, as coletas ocorreram no período de março de 2014 a outubro de 2015, utilizando covos como apetrecho, dispostos no final da tarde e retirados no início da manhã do outro dia, os pontos de coleta foram a Ilha da Banana (25° 40' S-48° 23' O) e na Ilha dos Governadores (25°48'S-48°43' O), ambas situadas no eixo leste-oeste do Complexo estuarino de Paranaguá (CEP), no litoral do Paraná, Brasil. Nas coletas

No CEP pode-se observar um gradiente horizontal de salinidade média variando de 12 a 29 ppm no verão e 20 a 34 ppm no inverno, com gradientes máximos de 0 a 35 ppm no verão e de 3 a 35 ppm no inverno, nos pontos de coleta foi observada variação de salinidade entre 28ppm e 32ppm. A temperatura média da água varia de 23 a 30°C no verão e de 18 a 25°C no inverno (Falkenberg, 2009).

Em cada coleta foram dispostos aproximadamente 20 covos lançados próximos às rochas, geralmente no final da tarde, permanecendo no local de estudo por aproximadamente 16 horas, com intuito de abranger amplamente o ciclo de marés e o período noturno.

Após a coleta os animais foram acondicionados em galões de 20 l com água do local da coleta e sob aeração constante foram encaminhados ao

Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO) do Departamento de Fisiologia da UFPR em Curitiba, ou para o Laboratório de Ecologia Ambiental (LEA) na UNESPAR em Paranaguá para realização dos experimentos de salinidade.

Experimentos

No laboratório os indivíduos foram imediatamente transferidos para um aquário estoque com salinidade controlada (30 ppm, valor próximo ao encontrado nos pontos de coleta), temperatura ambiente de $\sim 20^{\circ}\text{C}$ e aeração constante, por um período de aclimação de três a 7 dias. O período de aclimação variou conforme o comportamento e estado dos animais no aquário estoque, visto que em alguns casos ocorreram morte dos animais na aclimação, sendo assim, os animais só eram expostos aos experimentos após 2 dias sem mortalidade na aclimação. Os animais foram alimentados a cada 48 horas com peixes.

Após o período de aclimação os indivíduos de ambas as espécies foram diretamente transferidos para as salinidades 0, 5, 10, 20, 30 e 40 ppm, e foram expostos por 24 horas e 10 dias. Para os animais submetidos ao experimento de dez dias a alimentação foi mantida a cada 24 h, com exceção do dia anterior ao final do experimento. Os animais foram mantidos em aquários individuais (2 L), com aeração constante e temperatura ambiente (20°C) durante todo o período experimental. No experimento de dez dias, a água dos aquários experimentais foram trocadas parcialmente conforme a qualidade da mesma, visto que a qualidade da água foi variável entre os aquários, as trocas foram realizadas

conforme a necessidade, a fim de evitar o stress dos indivíduos durante o experimento.

Nos experimentos de 24 horas tanto para *C. hellerii* quanto para *M. nodifrons* foram utilizados para cada tratamento entre sete e nove indivíduos, e nos experimentos de 10 dias entre três e sete indivíduos. A variação no número de espécimes nos tratamentos se deve à mortalidade dos animais tanto no transporte quanto na aclimação, muitas vezes restando número ímpar de indivíduos impossibilitando um número exato de réplicas entre os tratamentos.

Após o período de experimento com os animais foram crioanestesiados por imersão em gelo picado por um período de aproximadamente 5 minutos. Em seguida de cada indivíduo foi retirado com auxílio de uma seringa de insulina uma amostra de hemolinfa por punção da membrana artrodial de um pereópodo, que foram armazenadas em freezer – 20° C para posterior análise da osmolalidade, e dos íons cloreto, sódio, potássio e magnésio. Um fragmento muscular de aproximadamente 0,5 g da quela foi retirado de cada animal, armazenado em freezer – 20° C para posterior análise do teor hídrico muscular.

Dosagens da Hemolinfa.

A avaliação da osmolalidade da hemolinfa foi determinada através de Micro Osmômetro de Pressão de Vapor Vapro 5520 (Wescor). As concentrações de sódio e potássio foram determinadas através do método de fotometria de chama (CELM FC-180), com as amostras analisadas sob a diluição de 1/500. As concentrações de cloreto e magnésio foram dosadas por colorimetria em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 PRO Amersham Pharmacia biotech)

utilizando kits comerciais (Labtest, Brasil) com leitura de absorvância em 470 nm (cloreto) e 505 nm (magnésio).

Teor Hídrico Muscular

Para a determinação do teor hídrico, o tecido muscular foi pesado (peso úmido) em tubos pré-pesados e fechados (Balança Bioprecisa 10 FA2104 N, precisão 0,1mg, Brasil), e em seguida foram secos em estufa por 24 horas a 62°C. Os tecidos secos foram pesados novamente (peso seco), e a perda de peso (água) foi expressa como porcentagem do peso úmido inicial da amostra e calculado através da fórmula:

$$\text{Th (\%)} = [(P_u - P_s) / P_u] \times 100$$

Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância de duas vias (Two Way ANOVA) utilizando como fatores a osmolalidade, íons e teor hídrico, a salinidade (10, 20, 30 e 40 ppm) e as espécies (*Charybdis hellerii* e *Mennippe nodifrons*), para comparar a osmolalidade, íons e teor hídrico entre os tempos de exposição dentro da mesma espécie os dados foram submetidos a análise de variância de uma via (One Way ANOVA).

Todas as análises foram feitas utilizando o software Sigma Plot® 13.0.

RESULTADOS

Taxa de sobrevivência

Os espécimes de *Charybdis hellerii* apresentaram altos índices de mortalidade ao longo de 10 dias de exposição a diferentes salinidades. Os exemplares expostos a 10 ppm apresentaram 100% de mortalidade durante as primeiras 48 horas. Na salinidade de 20 ppm, 80% dos animais sobreviveram nas primeiras 48 horas, 20% no quarto dia e foi observado 100% de mortalidade no sétimo dia de exposição. No tratamento controle (30 ppm) os espécimes apresentaram 80% de sobrevivência até o terceiro dia de exposição, reduzindo para 60% no quarto dia e ao final de dez dias de experimento 40% dos animais sobreviveram. Quando expostos à salinidade de 40 ppm os indivíduos de *C. hellerii* mantiveram 100% de sobrevivência até o quarto dia de exposição, reduzindo para 80% até o décimo dia de exposição. (Figura 3A).

Cabe ressaltar que foram observados comportamentos de estresse dos animais em todos os tratamentos quando expostos por vários dias, como tentativas de fuga do aquário, permanecer em posição de ataque e batidas frequentes com as quelas na parede do aquário.

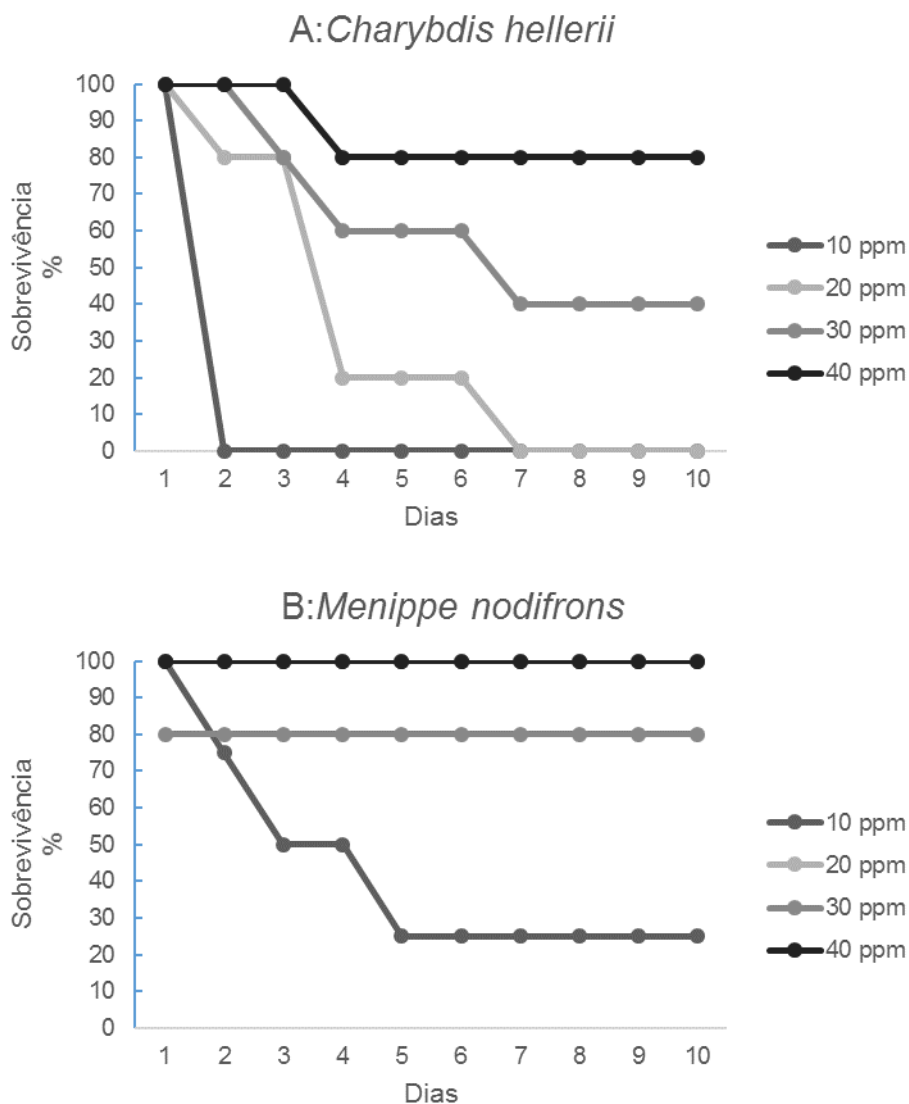


Figura 3 – Percentual de sobrevivência de *Charybdis hellerii* (A) e *Menippe nodifrons* (B) expostos por dez dias aos tratamentos de 10, 20, 30 e 40 ppm (Os dados dos tratamentos de 20ppm e 30ppm se sobrepõem com 80% de sobrevivência).

A espécie nativa *Menippe nodifrons* demonstrou maior resistência aos tratamentos em comparação a espécie não nativa *Charybdis hellerii*. Quando expostos à salinidade de 10 ppm os exemplares de *M. nodifrons* apresentaram taxa de sobrevivência de 75% após 48 horas de experimento, no terceiro dia a taxa de sobrevivência reduziu para 50%, no quinto dia o índice de sobrevivência

diminuiu para 25% e manteve-se até o décimo dia. No tratamento de 20 ppm a taxa de sobrevivência permaneceu em 100% durante todo período de exposição.

No tratamento controle (30 ppm), houve taxa de sobrevivência de 80% nas primeiras 24 horas, mantendo-se estável até o final do experimento. Quando expostos à salinidade de 40 ppm o índice sobrevivência permaneceu em 100% (Figura 3B).

Osmolalidade, íons e teor hídrico muscular

A osmolalidade da hemolinfa de *C. hellerii* demonstrou um padrão de elevação acompanhando a elevação da salinidade (conformação) após 24 horas e 10 dias de exposição.

A osmolalidade da hemolinfa reduziu nos animais expostos por 24 horas a 10ppm (386 mOsm/kg H₂O) quando comparada aos animais expostos a 20ppm (701 mOsm/kg H₂O), ao controle em 30ppm (815 mOsm/kg H₂O) e a 40ppm (1066 mOsm/kg H₂O). Animais expostos a 20ppm apresentaram redução da osmolalidade quando comparado a 30 e 40ppm, e nos expostos a 40ppm a osmolalidade da hemolinfa aumentou (1066 mOsm/kg H₂O) quando comparada os controles em 30ppm (Figura 4A).

Assim como a osmolalidade o íon cloreto demonstrou um padrão conformação com a elevação de salinidade. O tratamento controle (326 mM) apresentou maior concentração de cloreto em relação aos tratamentos de 10ppm (124 mM) e 20ppm (229 mM), entretanto apresentou menores concentrações quando comparado ao tratamento de 40ppm (389 mM).

O sódio também apresentou padrão de conformação com a variação da salinidade.

A concentração de sódio reduziu nos animais expostos a 10ppm (224 mM) quando comparada aos animais expostos ao tratamento controle em 30ppm (360 mM) e a 40ppm (437 mM). Animais expostos a 20ppm (227 Mm) apresentaram redução na concentração de sódio quando comparado ao tratamento de 40ppm (437mM). Nos animais expostos a 40ppm o sódio da hemolinfa aumentou (437mM) quando comparada ao controle em 30ppm (360 mM, porém esse aumento não foi significativo estatisticamente.

As concentrações do íon potássio para espécie não nativa, não demonstrou diferença estatística ($P=0,231$) em ambos os tratamentos de 10ppm (21,2Mm) e 20ppm (25,4mM), estes por sua vez, apresentaram diferença ($P=0,007$ e $P=0,05$, respectivamente) com relação ao tratamento controle. Quando os espécimes foram expostos à concentração de 40ppm (38,7 mM), não foi observada diferença estatística em comparação ao tratamento controle, porém houve aumento d a concentração de potássio em comparação aos animais expostos a 10ppm e 20ppm. Analisando as concentrações de magnésio na hemolinfa de *C. hellerii* pode-se observar que a concentração deste íon tende a aumentar conforme a elevação da salinidade. O tratamento controle (19,0 mM) foi estatisticamente diferente ($P=0,005$) do tratamento de 10ppm (6,9 mM), porém o tratamento de 10ppm não diferiu do tratamento de 20ppm (14,6 mM, $P=0,166$). Ao comparar o tratamento controle com o tratamento de 40ppm (27,03 mM) houve diferença significativa ($P=0,025$) com um aumento na concentração do tratamento de 40ppm em relação ao tratamento controle, entre os tratamentos de 10ppm e 20ppm não foi observada diferença estatística ($P=0,07$).

O teor hídrico muscular de *C. hellerii* após 24 horas de exposição a diferentes salinidades, manteve-se estável, não havendo diferença estatísticas entre os tratamentos (Figura 4A).

Ao analisar as concentrações da hemolinfa de *M. nodifrons* após 24 horas de exposição às diferentes salinidades, pode-se observar um padrão geral de osmorregulador fraco. No controle 30ppm (826 mOsm/kg H₂O) e em 20ppm (794 mOsm/kg H₂O) a osmolalidade permaneceu constante (P=0,265), no entanto em 10ppm (685 mOsm/kg H₂O) observou-se redução da osmolalidade da hemolinfa em comparação ao controle (P<0,001) e em 40ppm (1097 mOsm/kg H₂O, P<0,001) (Figura 4B).

O sódio demonstrou padrão de similar ao da hemolinfa com o tratamento controle (360 mM) diferindo apenas do tratamento de 10ppm (275 mM, P<0,001) e 40ppm (550 mM, P<0,001), enquanto que a comparação do tratamento controle com o tratamento de 20ppm (378 mM) não mostrou diferença (P=0,643).

O cloreto apresentou um padrão de regulação até o tratamento controle (309 mM), não havendo diferença entre o mesmo e os tratamentos de 10ppm (249 mM, P=0,127), 20 ppm (261 mM, P=0,209) e 40 ppm (388 mM, P=0,068). Entretanto o tratamento de 40ppm foi diferente dos tratamentos de 10ppm (P<0,001) e 20ppm (P<0,001).

Apesar de não apresentar diferença estatística entre os tratamentos o teor hídrico muscular teve uma leve queda no tratamento controle, porém manteve um padrão entre 75% (controle) e 83% (40ppm) dentre os tratamentos.

O Magnésio apresentou um padrão crescente com a salinidade, com o tratamento controle (32 mM) diferindo dos tratamentos de 10ppm (23 mM, P=0,02) e 20ppm (22 mM, P=0,02), porém não demonstrou diferença quando

comparado ao tratamento de 40ppm (38 mM, $P=0,262$). Os tratamentos de 10ppm e 20ppm não apresentaram diferença estatística ($P=0,720$).

O Potássio assim como o cloreto manteve-se praticamente constante até o tratamento controle (13 mM), não apresentando diferença entre os tratamentos de 10ppm (12 mM, $P=0,974$) e 20ppm (12 mM, $P=0,998$), no entanto o tratamento controle diferiu do tratamento de 40ppm (23 mM, $P=0,029$), que por sua vez diferiu dos tratamentos de 10ppm ($P=0,05$) e 20ppm ($P=0,03$).

Quando se comparou as duas espécies nos tratamentos de vinte e quatro horas obteve-se diferença significativa da osmolalidade nos tratamentos de 10ppm ($P<0,001$) e 20 ppm ($P=0,002$), a espécie não nativa apresentou em média levando em consideração todos os tratamentos, menor concentração de osmólitos (744,9 mOsm/kg H₂O) quando comparada a espécie nativa (850,7 mOsm/kg H₂O). Nas concentrações de sódio a diferença entre as espécies foi apenas no tratamento de 40 ppm ($P<0,05$), com *C. hellerii* apresentando em média as menores concentrações (329 mM) quando comparado com a espécie nativa (398 mM). Para o cloreto se obteve diferença apenas no tratamento de 10ppm ($P<0,001$), seguindo o padrão da espécie não nativa apresentar as menores concentrações média (267 mM). O teor hídrico muscular, a diferença ocorreu no tratamento controle ($P=0,014$) e 40ppm ($P=0,039$). Nos íons Potássio obteve-se diferença em todos os tratamentos ao comparar as duas espécies, 10ppm ($P<0,049$), 20ppm ($P<0,001$), 30ppm ($P<0,001$) e 40ppm ($P<0,001$) entretanto a espécie não nativa apresentou em média, maiores concentrações de potássio (29,8 mM) em comparação com a espécie nativa (15,4 mM).

O magnésio assim como o potássio apresentou diferença em todos os tratamentos quando comparados entre as espécies, 10ppm ($P<0,001$), 20ppm

($P < 0,001$), 30 ppm ($P < 0,001$) e 40ppm ($P = 0,002$), *M. nodifrons* apresentou em média os maiores valores (29,2 mM) em com comparação com *C. hellerii* (16,9 mM).

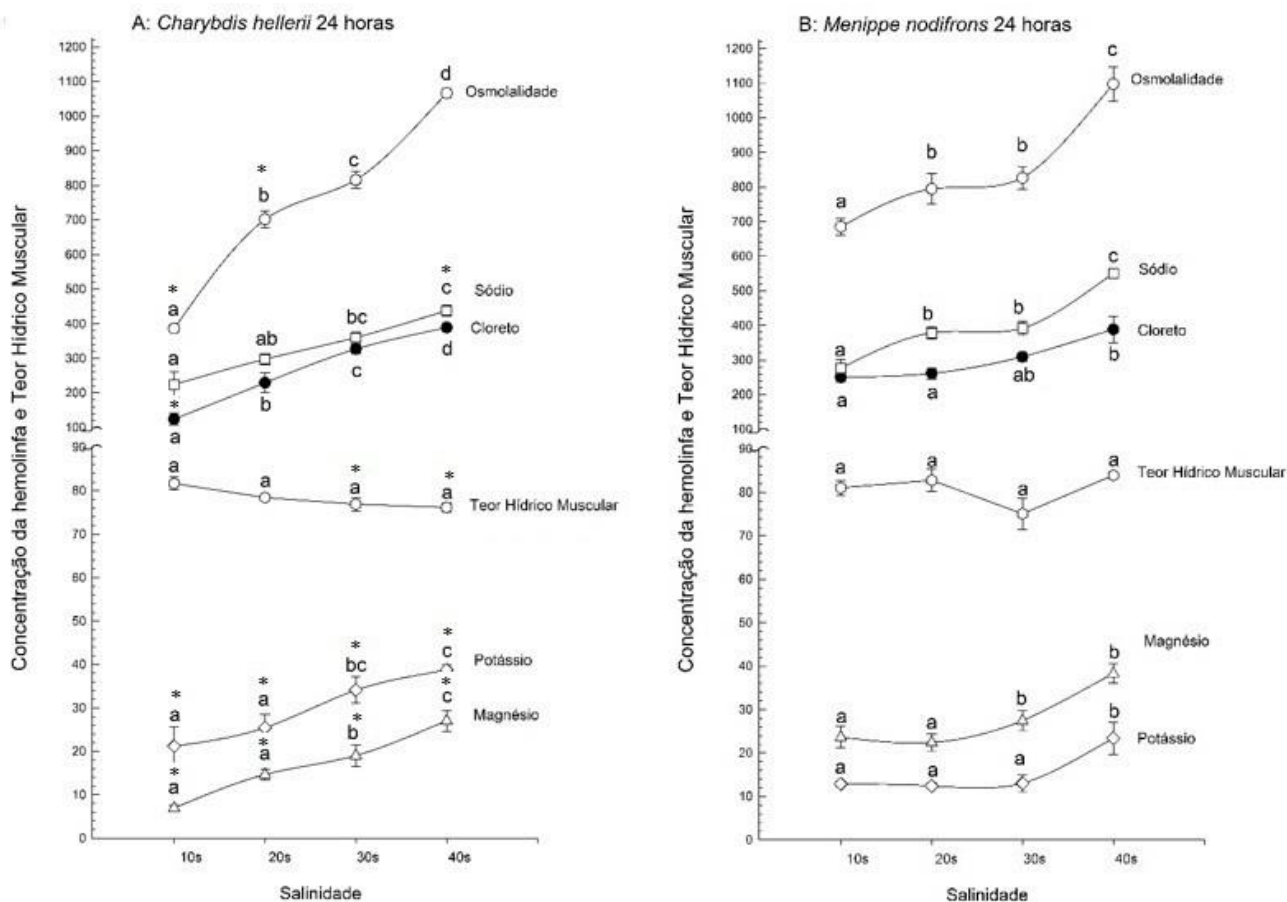


Figura 4 - Osmolalidade (Osm, mOsm/kg H₂O), íons cloreto (Cl⁻, mM), sódio (Na⁺, mM), potássio (K⁺, mM) e magnésio (Mg⁺⁺, mM) da hemolinfa, e teor hídrico muscular (%) de *Charybdis hellerii* (A) e *Menippe nodifrons* (B), expostos por 24 horas às salinidades de 10, 20, 30, 40 ppm. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as salinidades de exposição * indica diferença entre as espécies na mesma salinidade experimental. $\alpha = 0,05$ n = 31.

No tratamento de dez dias a espécie não nativa apresentou baixa taxa de sobrevivência nas salinidades de 10ppm (0%), 20ppm (0%) e 30ppm (40%), entretanto no tratamento de 40ppm manteve uma taxa de 80% do quarto dia até o final do experimento. Devido a isso foi possível analisar apenas o tratamento controle e o tratamento de 40ppm, para os experimentos de dez dias. A

osmolalidade de *C. hellerii* apresentou padrão crescente com a salinidade, com uma diferença significativa ($P < 0,001$) entre o controle (926 mOsm/Kg H₂O) e o tratamento de 40ppm (1238,2 mOsm/Kg H₂O), Assim como a osmolalidade o íon Cloreto um padrão crescente junto a salinidade, apresentando diferença estatística ($P < 0,001$) entre o controle (365 mM) e o tratamento de 40ppm (478 mM).

A concentração de sódio para *C. hellerii* não mostrou diferença entre os tratamentos apesar de demonstrar um leve aumento na concentração entre o tratamento controle (283 mM) e o tratamento de 40ppm (316 mM).

O Teor Hídrico Muscular manteve-se constante entre os tratamentos, entretanto demonstrou uma leve queda entre o tratamento controle (78%) e o tratamento de 40ppm (75%), porém sem diferença estatística ($P = 0,370$)

O magnésio assim como o potássio manteve-se constante quando expostos ao experimento de dez dias.

A espécie nativa quando exposta aos experimentos de 10 dias (Figura 5B) apresentou características osmoconformadores para osmolalidade, com padrão crescente acompanhando a salinidade, houve uma redução da osmolalidade nos tratamentos de 10ppm (614 mOsm/Kg H₂O, $P < 0,001$) e no tratamento de 20ppm (750 mOsm/Kg H₂O, $P < 0,001$) com relação ao tratamento controle (847 mOsm/Kg H₂O), os tratamentos de 10ppm e 20ppm ainda diferiram entre si ($P < 0,001$), assim como do tratamento de 40ppm (1150,0 mOsm/Kg H₂O, $P < 0,001$ e $P < 0,001$, respectivamente. O tratamento de 40ppm diferiu ainda do tratamento controle ($P < 0,001$).

Para o íon sódio foi observado um padrão com características ionoreguladoras, com concentrações crescentes conforme o aumento da

salinidade. O tratamento controle (380 mM) não apresentou diferença dos tratamentos de 10ppm (323 mM, $P=0,493$), 20ppm (355 mM, $P=0,390$) e 40ppm (490 mM, $P=0,139$) porém houve diferença entre o tratamento de 40ppm e os tratamentos de 10ppm ($P=0,003$) e 20ppm ($P=0,007$). É importante ressaltar que houve um baixo índice de sobrevivência dos indivíduos no tratamento controle (Figura 3B), causando uma alta variabilidade dos dados para este tratamento.

O íon cloreto apresentou um padrão claro de regulação iônica para a espécie nativa, não havendo diferença entre os tratamentos com média de 237, 283, 252 e 267 mM para 10, 20, 30 e 40ppm, respectivamente. O teor hídrico muscular demonstrou um declínio conforme o aumento da salinidade, com o tratamento controle (73%) diferindo apenas do tratamento de 40ppm (72%, $P=0,046$).

Pode-se observar um aumento na concentração de magnésio com relação a salinidade, o tratamento controle (19 mM) não mostrou diferença quando comparado aos demais (10ppm: 12mM, $P= 0,112$; 20ppm: 15mM, $P=0,382$; 40ppm: 21mM, $P=0,442$), entretanto o tratamento de 40ppm diferiu dos tratamentos de 10ppm ($P=0,004$) e 20ppm ($P=0,037$).

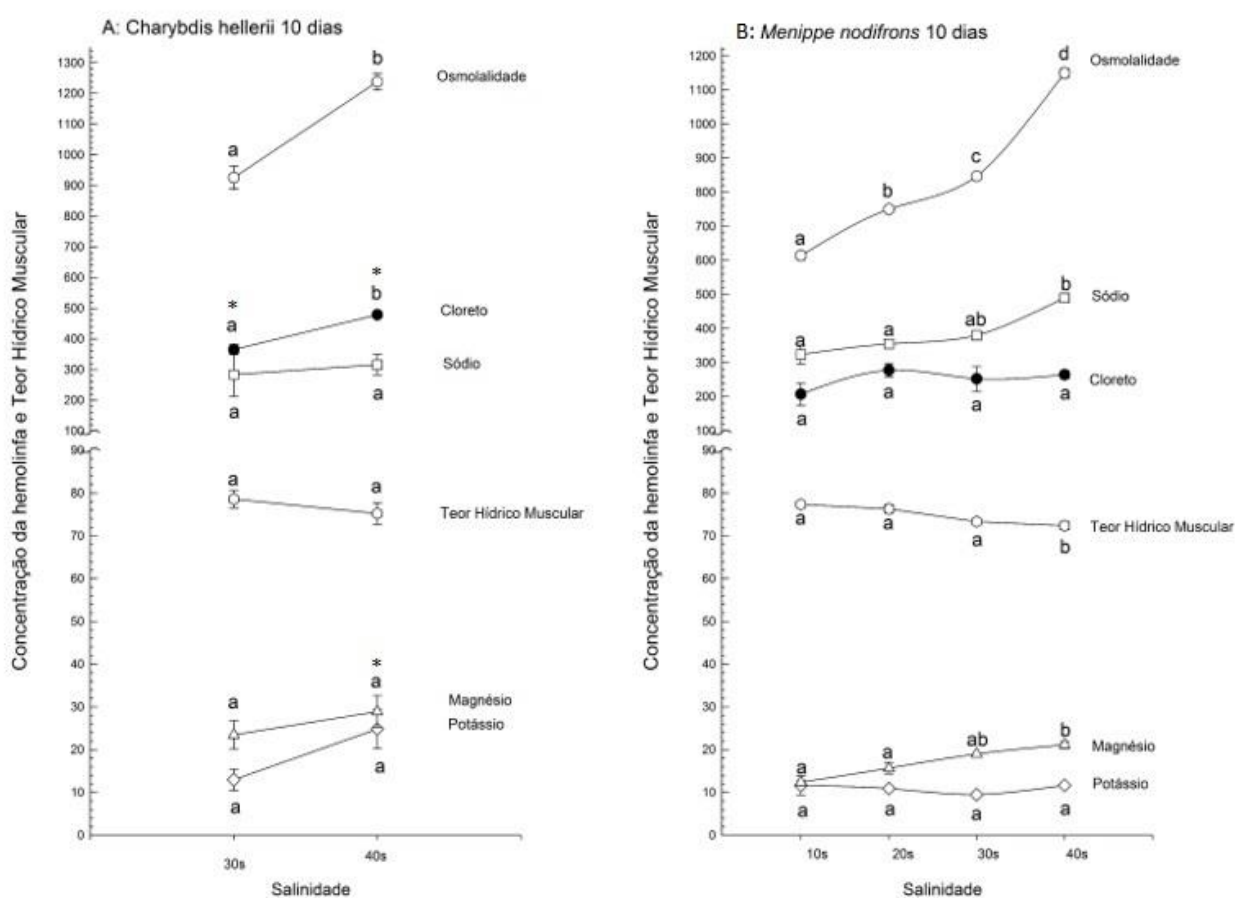
O Potássio demonstrou um padrão de regulação iônica dentre os tratamentos não havendo diferença significativa entre os mesmos.

Na comparação entre as duas espécies nos experimentos de dez dias (Figura 5A) a osmolalidade não demonstrou diferença entre o tratamento controle ($P=0,127$) nem para o tratamento de 40ppm ($P=0,06$), entretanto pode-se observar um aumento da concentração de cloreto tanto para o tratamento controle (365 mM, $P=0,001$) quanto para o tratamento de 40 ppm (478 mM,

$P < 0,001$) com a espécie não nativa apresentando as maiores concentrações para este íon.

Não houve diferença para os demais íons com exceção do magnésio que apresentou maior concentração no tratamento de 40 ppm (28 mM, $P = 0,012$) para a espécie não nativa em comparação com a espécie nativa (21 mM). Também não houve diferença no teor hídrico muscular entre *C. hellerii* e *M. nodifrons*.

Figura 5 - Osmolalidade (Osm, mOsm/kg H₂O), íons cloreto (Cl⁻, mM), sódio (Na⁺, mM),



potássio (K⁺, mM) e magnésio (Mg⁺⁺, mM) da hemolinfa, e teor hídrico muscular (%) de *Charybdis hellerii* (A) e *Menippe nodifrons* (B) expostos por 10 dias às salinidades de 10, 20, 30, 40 ppm. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, e “ * ” indica diferença entre as espécies. $\alpha = 0,05$ n = 15

Comparação entre os tempos de exposição de 24 horas e 10 dias

A espécie não nativa *Charybdis hellerii* apresentou menor concentração de osmólitos no experimento de vinte e quatro horas tanto no tratamento controle (815 mOsm/Kg H₂O, P<0,001) e no tratamento de 40ppm (1066 mOsm/Kg H₂O, P<0,001) quando comparado ao experimento de dez dias (30ppm: 926 mOsm/Kg H₂O; 40ppm 1238 mOsm/Kg H₂O). O mesmo ocorreu para o íon cloreto quando comparado o tratamento controle e o tratamento de 40ppm entre os tempos de exposição.

Para os íons sódio (24 horas: 816 mM; 10 dias: 316 mM, P= <0,001) e potássio (24 horas: 38 mM; 10 dias: 24 Mm, P=0,038) foram observadas menores concentrações ao longo do tempo de exposição, no entanto apenas no tratamento de 40ppm. O magnésio e o teor hídrico muscular não demonstraram diferenças entre os tempos de exposição.

Ao comparar o tempo de exposição para a espécie nativa *Menippe nodifrons*, pode-se observar uma diminuição da osmolalidade ao longo do tempo, porém apenas o tratamento de 10 ppm (P=0,02) mostrou diferença estatística, enquanto que para os íons cloreto, sódio e potássio os tratamentos não diferiram com o tempo de exposição. O íon Magnésio apresentou diminuição ao longo do tempo de exposição nos tratamentos de 10 (P=0,006), 20 (P=0,006) e 40 ppm (p=0,007).

O teor hídrico muscular também demonstrou diminuição ao longo do tempo de exposição entre os tratamentos de 10 (P=0,016), 20 (P<0,001) e 40 ppm (P=0,002).

DISCUSSÃO

Fatores como a salinidade e a temperatura são limitantes para a sobrevivência, taxa de desenvolvimento larval e distribuição de invertebrados marinhos (Kinne, 1971 *apud* Baylon e Suzuki, 2007).

A espécie não nativa *Charybdis hellerii* demonstrou após as primeiras vinte e quatro horas menor resistência aos tratamentos de salinidade quando comparada a espécie nativa *Menippe nodifrons* (Figura 3), chegando a 100% de mortalidade no tratamento de 10 ppm, no final do segundo dia e no tratamento de 20 ppm ao final do sétimo dia, nos tratamentos de 30 e 40 ppm a taxa de mortalidade foi de 60% e 20%, respectivamente. Os exemplares de *C. hellerii* apresentaram comportamento agressivo durante o experimento de dez dias, demonstrando estresse, o que pode ter causado as baixas taxas de sobrevivência. Os indivíduos de *Menippe nodifrons* demonstraram comportamento ameno e pouca agitação durante o período experimental. Apesar da escassez de estudos de sobrevivência para as espécies estudadas, é de conhecimento que em Decapodos a salinidade exerce forte influência na taxa de sobrevivência e desenvolvimento larval (Anger, 2001). Na Florida, Dineen *et al.*, (2001) coletaram espécimes adultos de *C. hellerii* apenas em locais com salinidades acima de 28 ppm, desenvolveram com sucesso 13 larvas dessa espécie em laboratório, mantendo-as em salinidades de 32 ppm e posteriormente quando alcançavam o estágio adulto (12 meses) sob salinidades entre 34 e 36ppm, indicando a preferência da espécie por ambientes mais salinos, mesmo durante o período larval. Para *Menippe mercenaria* a taxa de sobrevivência das larvas é alta em salinidades entre 30‰ e 35 ‰, enquanto

que para salinidades de 10‰ houve mortalidade de todas as larvas, e para 20‰ e 40‰ só sobreviveram até o estágio de megalopa (Ong e Costlow, 1970), indicando a preferência da espécie por ambientes mais salinos, mesmo durante o período larval, sabe-se que durante o período larval os animais podem apresentar diferentes preferências de salinidade, entretanto neste caso as larvas demonstraram preferência à salinidade próxima aos dados observados para os adultos de *M. nodifrons*. Os resultados indicam que *C. hellerii* não é tão tolerante quanto a espécie nativa em ambientes com alta variação de salinidade, ou a exposição em baixas salinidade em um longo período de tempo. Diante disso, pode-se dizer que em a relação à tolerância, principalmente a baixas salinidades *Charybdis hellerii* fica em desvantagem comparado a espécie nativa.

A plasticidade fisiológica pode atuar como um fator chave na competição entre espécies nativas e não nativas, espécies com baixa tolerância a variações ambientais, tendem a ser excluídas por espécies mais tolerantes através da competição interespecífica (Coccia *et al.*, 2013). No entanto, deve-se levar em conta que espécies não nativas podem adaptar-se aos desafios fisiológicos a longo prazo (Lee *et al.*, 2003), dessa maneira, mesmo o presente estudo apontando a espécie nativa como menos tolerante as variações de salinidade, é de fundamental importância o constante monitoramento ambiental a longo prazo, de forma a auxiliar na predição da ocupação de novos habitats, por parte da espécie invasora.

Osmolalidade, íons e teor hídrico muscular

Decapodos são conhecidos pelo sucesso na conquista de vários habitats, tanto terrestres quanto, aquáticos provendo assim uma alta diversidade ao grupo

(Péqueux, 1995; Freire *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 2010). Isto é possível graças a sua alta capacidade de sobreviver a variações de salinidade, de absorção de sal na água doce e de suportar a exposição ao ar em regiões estuarinas (Péqueux, 1995; Freire *et al.*, 2008).

Os crustáceos marinhos em sua maioria são osmoconformadores, ou seja, sua concentração iônica interna se mantém próxima à do meio (Péqueux, 1995; Kirschner, 2004; Mcnamara e Faria, 2012), assim como, observado para *C. hellerii* no presente estudo, tanto nos experimentos de vinte e quatro horas (Figura 4A), onde a osmolalidade aumentou conforme a concentração de salinidade, quanto para os experimentos de dez dias (Figura 5A). Ao comparar os tempos de exposição dentro da espécie não nativa, a osmolalidade apresentou menores valores tanto para o tratamento controle (24 horas: 815mM; 10 dias: 926mM), quanto para o tratamento de 40ppm (24 horas: 1066mM; 10 dias: 1238mM).

Já para a espécie nativa *Menippe nodifrons* foram observados padrões de osmorregulador fraco nos experimentos de vinte e quatro horas (Figura 4B), onde houve um aumento da osmolalidade do tratamento de 10ppm para o tratamento de 20ppm, seguido por um padrão de regulação entre o tratamento controle e o tratamento de 20ppm, e novamente um aumento da osmolalidade no tratamento de 40ppm (1097mM). Este Padrão observado para a espécie nativa no experimento de vinte quatro horas já era esperado, por se tratar de uma espécie de caranguejo estuarino já adaptada ao ambiente (Evans, 2009; Willmer, Stone e Johnston, 2005). No entanto ao ser exposto por um longo período de tempo no experimento de dez dias *M. nodifrons* apresentou um padrão osmoconformador, apresentando redução da osmolalidade nos

tratamentos de 10ppm e 20ppm em relação ao tratamento controle, já o tratamento de 40ppm apresentou valor maior de osmolalidade quando comparado ao tratamento controle. Entre os tempos de exposição da espécie nativa houve diferença no tratamento de 10ppm (24 horas 685mM; 10 dias: 614mM).

O fato de *Charybdis hellerii* demonstrar tal padrão ionoconformador pode estar relacionado a sua alta permeabilidade, característica comum para crustáceos marinhos (Péqueux 1995; Willmer et al. 2005; McNamara & Faria 2012), e ainda à sua ocorrência em ambientes marinhos mais profundos (~51 metros), onde é observada baixa variação de salinidade (Dineen et al., 2001 Apud Stephenson et al., 1957). Desta forma, mesmo ocorrendo no estuário, esta espécie desempenha características de osmoconformador marinho, assim como *Hepatus pudibundus* (Crustacea, Decapoda), (Amado et al., 2012), *Libinia emarginata* (McGaw et al., 1999), *Maja sp.* e *Cancer paguros* (Péqueux, 1995). Em contrapartida o resultado observado para a espécie nativa também pode ser interpretado levando em consideração sua permeabilidade, entretanto devido a essa espécie apresentar permeabilidade aparente reduzida (Péqueux, 1995).

Apesar de ter apresentado padrão de ionoconformador, *C. hellerii* apresentou baixas concentrações de cloreto no experimento de vinte e quatro horas (10 ppm: 124mM, 20ppm: 229mM, 30ppm: 326mM, 40ppm: 375mM) quando comparado a outros estudos com portunídeos, como *Callinectes danae* e *Callinectes ornatos* (10ppm: 325mM, 35ppm: 482mM, 40ppm: ~500mM) (Rios 2014). Entretanto Foster (2006) analisando *H. pudibundus* observou concentrações de cloreto de aproximadamente 400mM em tratamentos de 35ppm, valores próximos aos encontrados para *C. hellerii* exposto a salinidade

de 40ppm por 24 horas e próximo ao tratamento controle dos organismos expostos a dez dias (aproximadamente 380mM) no presente estudo. Apesar de nos experimentos de vinte e quatro horas *C. hellerii* não apresentar padrões próximos aos portunídeos, nos experimentos de dez dias os dados do presente estudo ficaram mais próximos aos dados observados para o gênero *Callinectes* (Rios, 2014). Este padrão ionoconformador foi observado para os Decapodos *Callinassa californiensis* expostos a água do mar diluída (35‰), *Cancer antenarius* (60‰) e *Emerita analoga* (50‰), e água do mar concentrada (100%), por um período de cinco dias (Freel, 1978).

Os dados do presente estudo corroboram com os encontrados para *Callinassa californiensis*, *Cancer antenarius* e *Emerita análoga* (Freel, 1978), *Chasmagnathus granulatus* (Novo *et al.*, 2005), e para *Callinectes ornatos* expostos a 33ppm (405mM), porém durante um período de quinze dias de exposição (Garçon *et al.*, 2009).

O sódio foi o íon com maior representatividade na hemolinfa de *C.hellerii* juntamente com cloreto, assim como descrito na bibliografia (Evans, 2009; Péqueux, 1995; Willmer, Stone e Johnston, 2005) padrão este observado tanto para os espécimes expostos a vinte e quatro horas, quanto para dez dias.

Os padrões encontrados tanto para sódio quanto para cloreto, podem estar relacionados ao balanço hídrico do extracelular com o meio externo (Evans, 2009; Willmer, Stone e Johnston, 2005). Os resultados encontrados para o íon sódio no presente estudos corroboram com as concentrações observadas para *C. danae* e *C. ornatos* (Rios, 2014), *H. pudibundus* e para *Callinassa californiensis*, *Cancer antenarius* e *Emerita analoga*, expostos a água do mar diluída (25%) e concentrada (100%) (Freel, 1978). O padrão constante para teor

hídrico muscular observado no presente estudo pode ser explicado pela regulação isosmótica intracelular, descrita para organismos osmoconformadores (Freire, et al., 2008; Péqueux 1995).

Para o íon potássio a espécie não nativa manteve o padrão de ionoconformador, assim como para os demais íons, com a concentração crescente conforme o aumento da salinidade, o tratamento de 10ppm (21mM) não mostrou diferença com relação ao tratamento de 20ppm (25mM), porém mostrou diferença em relação ao tratamento controle (34mM) e ao tratamento de 40ppm (38mM), os dois últimos não demonstraram diferença entre si. Os dados de potássio observados no presente estudo foram relativamente altos com os dados encontrados na literatura, para *C. danae* e *C. ornatos* foram observadas concentrações variando entre 7 e 9 mM em salinidades de 10ppm, 9 e 11 mM em salinidades de 35ppm e entre 12 e 15 mM para 40ppm (Rios, 2014). Para *Pachygrapsus crassipes* foi observado concentrações de 6,1mM em 25‰ e 9,9mM em água do mar concentrada, já para *Emerita análoga* foi observada concentração de 8,4mM para água do mar 50‰, para *Callinassa californiensis* expostos a água do mar diluída (35‰) foi observada concentração de 4,7mM e para *Cancer antenarius* (60‰) concentração de 7,7mM (Freel, 1978) diante disso, são necessárias novas análises para confirmar este resultado.

O íon magnésio também apresentou padrão ionoconformador para espécie não nativa, com aumento da concentração crescente com a salinidade, demonstrando um padrão parecido com o observado para potássio, porém com menores concentrações na hemolinfa. O tratamento de 10ppm (6,9mM) não mostrou diferença com relação ao tratamento de 20ppm (14,6mM), porém mostrou diferença em relação ao tratamento controle (19mM), o tratamento de

40ppm (27mM) foi diferente dos demais tratamentos. A variação do íon magnésio nos diferentes tratamentos pode ser explicada pela atividade da glândula antenal em crustáceos, que atua no controle da concentração de magnésio na hemolinfa (Willmer, Stone e Johnston, 2005).

CONCLUSÕES

A espécie não nativa *Charybdis hellerii* apresentou menores taxas de sobrevivência principalmente nas salinidades reduzidas de 10 e 20 ppm, tanto nos experimentos de curto prazo (24 horas), quanto a longo prazo (dez dias) quando comparado a espécie nativa *Menippe nodifrons*, demonstrando assim baixa tolerância a diluição de salinidade observadas em regiões estuarinas mais internas.

No que diz respeito a regulação osmótica e iônica *C. hellerii* apresentou características osmoconformadores e ionoconformadora nos experimentos de longo prazo e curto prazo. *M. nodifrons* apresentou características de osmorregulador fraco no experimento de vinte e quatro horas, e osmoconformador no experimento de longo prazo e onde também apresentou padrões de regulador para a maioria dos íons com exceção do sódio e do magnésio que apresentaram padrões de regulação fraca.

Com base nos resultados do presente estudo aceita-se a hipótese alternativa: O sucesso da espécie não nativa para ocupar regiões estuarinas mais externas com salinidades mais altas é independente da ativação de mecanismos osmorregulatórios (plasticidade fisiológica/osmorregulatória). Porém é importante ressaltar que como já visto em alguns casos de invasão biológica, as espécies não nativas podem apresentar abundância relativamente baixa por um longo período de tempo, com posterior aumento da abundância, gerando impactos consideráveis na dinâmica ecológica da região, sendo assim é de suma importância o monitoramento contínuo da espécie não nativa, assim

como a elaboração de um plano de gestão para espécie no complexo estuarino de Paranaguá.

REFERÊNCIAS

AMADO, E. M. Adaptação de anêmonas do mar a variação de salinidade – evidências de mecanismos regulatórios. Adaptação de anêmonas do mar a variação de salinidade – evidências de mecanismos regulatórios. p. 1–65, 2006.

Begon, M.; Townsend, C. R.; Harper, J. L. (2007). *Ecologia de Indivíduos e Ecossistemas*. 4ªed, Artmed, Porto Alegre.

BLACKBURN, Tim M. PYSEK, P. BACHER, S. CARLTON, J. T. DUNCAN A. P. JAROSÍK, V. WILSON J. R. U. RICHARDSON, D. M. A proposed unified framework for biological invasions. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 26, n. 7, p. 333-339, 2011.

Bertini, G., Braga, A. A., Fransozo, A., Corrêa, M. D. O. D. A., & Freire, F. A. D. M. (2007). Relative growth and sexual maturity of the stone crab *Menippe nodifrons* Stimpson, 1859 (Brachyura, Xanthoidea) in southeastern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 50(2), 259-267.

CALDWELL, M. M; HELDMAIER, G.; JACKSON, R. **Biological Invasions**. V. 193, Springer, Berlin.

COCCIA, C. CALOSSI, P. BOYERO, L. GREEN, A. J. BILTON, D. T. Does ecophysiology determine invasion success? A comparison between the invasive boatman *Trichocorixa verticalis verticalis* and the native *Sigara lateralis* (Hemiptera, Corixidae) in South-West Spain. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e63105, jan. 2013.

DINEEN, J. F. ; CLARK, P. F. ; HINES, A. H. ; REED, S. A. ; WALTON, H. P. Life history , larval description , and natural history of *Charybdis hellerii* (Decapoda , Brachyura , Portunidae), an invasive crab in the western Atlantic. **Journal of Crustacean Biology**, 21(3):774-805. 2001. Published

EVANS, David H. (Ed.). **Osmotic and ionic regulation: cells and animals**. CRC Press, 2008.

FALKENBERG, A. V. Estudo da Dispersão, Mistura e Qualidade da Água do Complexo Estuarino de Paranaguá com Uso de Modelagem Numérica. n. October, p. 160, 2009.

Fedorenkova, A., Vonk, J. A., Breure, A. M., Hendriks, A. J., & Leuven, R. S. (2013). Tolerance of native and non-native fish species to chemical stress: a case study for the River Rhine. **Aquatic Invasions**, 8(2), 231-241.

FICETOLA, G. F.; THUILLER, W.; PADOA-SCHIOPPA, E. From introduction to the establishment of alien species: bioclimatic differences between presence and reproduction localities in the slider turtle. **Diversity and Distributions**, v. 15, n. 1, p. 108–116, jan. 2009.

Foster, C., Amado, E. M., Souza, M. M., & Freire, C. A. (2010). Do osmoregulators have lower capacity of muscle water regulation than osmoconformers? A study on decapod crustaceans. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, 313(2), 80-94.

FREEL, B. Y. R. W. PATTERNS OF WATER AND SOLUTE REGULATION IN THE MUSCLE FIBRES OF OSMO- CONFORMING MARINE DECAPOD CRUSTACEANS. 1978.

Freire, C. A., Amado, E. M., Souza, L. R., Veiga, M. P., Vitule, J. R., Souza, M. M., & Prodocimo, V. (2008). Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 149(4), 435-446.

FREIRE, C. A; ONKEN, H.; MCNAMARA, J. C. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 151, n. 3, p. 272–304, nov. 2008.

Garçon, D. P., Masui, D. C., Mantelatto, F. L., Furriel, R. P., McNamara, J. C., & Leone, F. A. (2009). Hemolymph ionic regulation and adjustments in gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity during salinity acclimation in the swimming crab *Callinectes ornatus* (Decapoda, Brachyura). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 154(1), 44-55.

GUTIERRE, S. M. M. Ferramentas fisiológicas para avaliação do potencial invasor de peixes dulcícolas. **Dissertação de mestrado**, Programa de Pós Graduação e Ecologia e Conservação, UFPR, Curitiba, PR, 2011.

HAVIRD, Justin C.; SANTOS, Scott R.; HENRY, Raymond P. Osmoregulation in the Hawaiian anchialine shrimp *Halocaridina rubra* (Crustacea: Atyidae): expression of ion transporters, mitochondria-rich cell proliferation and hemolymph osmolality during salinity transfers. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 13, p. 2309-2320, 2014.

HULME, P. E. Beyond control: Wider implications for the management of biological invasions. **Journal of Applied Ecology**, v. 43, n. 5, p. 835–847, 2006.

Karatayev, A. Y., Burlakova, L. E., Padilla, D. K., Mastitsky, S. E., & Olenin, S. (2009). Invaders are not a random selection of species. **Biological Invasions**, 11(9).

KELLER, R. P.; FRANG, K.; LODGE, D. M. Preventing the Spread of Invasive Species: Economic Benefits of Intervention Guided by Ecological Predictions. **Conservation Biology**, v. 22, n. 1, p. 80–88, 2008.

LEMAITRE, R. *Charybdis hellerii* (Milne Edwards , 1867), a nonindigenous portunid crab (Crustacea : Decapoda : Brachyura) discovered in the Indian River lagoon system of Florida. v. 108, n. December, p. 643–648, 1995.

LEUVEN, R. S. E. W. et al. Differences in sensitivity of native and exotic fish species to changes in river temperature. **Current Zoology**, v. 57, n. 6, p. 852-862, 2011.

Leung, B., Lodge, D. M., Finnoff, D., Shogren, J. F., Lewis, M. A., & Lamberti, G. (2002). An ounce of prevention or a pound of cure: bioeconomic risk analysis of invasive species. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, 269(1508), 2407-2413

LODGE, David M. Biological invasions: lessons for ecology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 8, n. 4, p. 133-137, 1993.

MANTELATOO, F. L. M. ; DIAS, L. L. Extension of known distribution of *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) (DECAPODA, PORTUNIDAE) along the Western tropical south atlantic. **Notes and News, Crustaceana**, 72(6), 1999.

MANTELATTO, F. L. M.; GARCIA, R. B. Biological aspects of the nonindigenous portunid crab *charybdis hellerii* in the western tropical south atlantic. **Bulletin of Marine Science**, v. 68, n. 3, p. 469–477, 2001.

MCMAMARA, J. C.; FARIA, S. C. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: A review. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 182, n. 8, p. 997–1014, 2012.

MUSIELLO-FERNANDES, J.; VILAR, C. C.; ROSA, D. M. Ocorrência da espécie exótica *Charybdis hellerii* Milne Edwards , 1867 (Crustacea , Portunidae) no litoral do Espírito Santo The occurrence of the exotic species *Charybdis hellerii* Milne Edwards , 1867 (Crustacea , Portunidae) at the. v. 1867, p. 35–37, 2011.

OSHIRO, Lidia Miyako Yoshii. Aspectos reprodutivos do caranguejo guaia, *Menippe nodifrons* Stimpson (Crustacea, Decapoda, Xanthidae) da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 3, p. 827-834, 1999.

PÉQUEUX, A. Osmotic Regulation in Crustaceans. **Journal of Crustacean Biology**, v. 1, n. 15, p. 1–60, 1995.

PUTH, L. M.; POST, D. M. Studying invasion: have we missed the boat? **Ecology Letters**, v. 8, n. 7, p. 715–721, 2005.

MACK, R. N., SIMBERLOFF, D., M. LONSDALE, W., EVANS, H., CLOUT, M., BAZZAZ, F. A. (2000). Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. **Ecological applications**, 10(3), 689-710..

RICHARDSON, D. M., PYŠEK, P., REJMÁNEK, M., BARBOUR, M. G., PANETTA, F. D., WEST, C. J. (2000). Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. **Diversity and distributions**, 6(2), 93-107.

RICHARDSON, D. M.; PYSEK, P. Fifty years of invasion ecology – the legacy of Charles Elton. **Diversity and Distributions**, v. 14, p. 161–168, 2008.

RICHARDSON, D. M.; PYŠEK, P. Plant invasions: merging the concepts of species invasiveness and community invasibility. **Progress in Physical Geography**, v. 30, n. 3, p. 409–431, 2006.

RUIZ, G. M., CARLTON, J. T., GROSHOLZ, E. D., & HINES, A. H. "Global invasions of marine and estuarine habitats by non-indigenous species: mechanisms, extent, and consequences." **American Zoologist** 37.6 (1997): 621-632.

SANT'ANNA, Bruno Sampaio et al. Relative abundance and population biology of the non-indigenous crab *Charybdis hellerii* (Crustacea: Brachyura: Portunidae) in a southwestern Atlantic estuary-bay complex. **Aquatic Invasions**, p. 347-356, 2012.

SAX, Dov F.; GAINES, Steven D.; BROWN, James H. Species invasions exceed extinctions on islands worldwide: a comparative study of plants and birds. **The American Naturalist**, v. 160, n. 6, p. 766-783, 2002.

SAX, D. F.; GAINES, Steven D. Species diversity: from global decreases to local increases. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 11, p. 561-566, 2003.

WILCOVE, D. S., ROTHSTEIN, D., DUBOW, J., PHILLIPS, A., & LOSOS, E. (1998). Quantifying threats to imperiled species in the United States. **BioScience**, 48(8), 607-615.

WILLMER, P.; STONE, G.; JOHNSTON, I. A. **Environmental physiology of animals**. Second ed. [s.l.] Blackwell Publishing, 2005.

WILSON, J. R., DORMONTT, E. E., PRENTIS, P. J., LOWE, A. J., RICHARDSON, D. M. (2009). Something in the way you move: dispersal pathways affect invasion success. **Trends in Ecology & Evolution**, 24(3), 136-144.

