

GUILHERME DE ALMEIDA TORRES

AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA CRÍTICA MÁXIMA DO PEIXE INVASOR  
*Micropterus salmoides* ACLIMATADO A DIFERENTES TEMPERATURAS

Curitiba  
2017

GUILHERME DE ALMEIDA TORRES

Avaliação da temperatura crítica máxima do peixe invasor *Micropterus salmoides*  
aclimatado a diferentes temperaturas

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Ciências Biológicas, realizado e apresentado por Guilherme de Almeida Torres ao Departamento de Fisiologia, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, sob a orientação da Profa. Dr<sup>a</sup>. Viviane Prodocimo (Departamento de Fisiologia, UFPR).

Curitiba  
2017

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que de participaram, me aconselharam e dispuseram de seu tempo para me prestar auxílio nas horas de necessidade na realização deste trabalho. Em especial à:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Viviane Prodocimo pela orientação, apoio, repasse de conhecimento, aconselhamento nas atividades acadêmicas e realização dos experimentos;

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Carolina Arruda Freire, pelo conhecimento repassado à mim, que foi de extrema importância e ao exemplo de dedicação que um pesquisador deve possuir;

Aos meus colegas e amigos de laboratório Deivyson Cattine Bozza pelos experimentos de anidrase realizados juntos, Eloísa Pinheiro, Fátima Juliane Ceron, Isis Danniele Cury por todos as risadas e auxílio, Giovanna Cavichiollo, por me auxiliar muito neste trabalho e na realização de experimentos de anidrase carbônica, Leonardo de Paula Rios por ser um mestre em cloreto, lactato e teor hídrico, Natasha Wosnick por todo auxílio, conhecimento e dedicação que me serviram de exemplo e que me auxiliaram incondicionalmente na realização deste trabalho e por fim em especial ao Gustavo Eidi Yamassaki que me auxiliou enormemente na realização dos experimentos e repassou conhecimentos importantíssimos;

Às minhas irmãs que servem como exemplo de como ser um estudante e pesquisador;

Aos meus amigos pelos momentos de descontração nas horas difíceis, em especial Alisson Martins Zito, Doc Bruno Lucca, Eduardo Kais Benato, Eduardo Papi Marques, Emerson Tony Siqueira Santos, Felipe Dingo Cheliga, Leonardo Fressa To e Luiz Fernando Marzani.

Aos meus pais que sempre fizeram o máximo para que eu pudesse realizar esta graduação e pelo amor incondicional.

**Conhecer alguém em uma noite fria de outono,  
Estranho, frio, inesperado,  
Porém,  
O resto dos seus dias podem ser como manhãs ensolaradas de verão.**

**Guilherme Torres**

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	4
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	5
<b>OBJETIVOS</b> .....	8
<b>Objetivo geral</b> .....	8
<b>Objetivo específico</b> .....	8
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	9
<b>RESULTADOS</b> .....	12
Temperatura crítica máxima e temperatura letal máxima.....	12
Glicose.....	13
Lactato .....	14
Teor Hídrico .....	15
Atividade Específica da Anidrase Carbônica Branquial .....	16
<b>DISCUSSÃO</b> .....	18
Temperatura crítica máxima e temperatura letal máxima.....	18
Glicose.....	19
Lactato .....	20
Teor hídrico.....	21
Anidrase carbônica.....	21
<b>CONCLUSÕES</b> .....	22
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	22

## RESUMO

Por serem animais ectotermos, os peixes estão sujeitos às variações de temperatura do meio. Para enfrentar essas variações os animais ectotermos possuem plasticidade fisiológica que buscam a homeostase e os permitem ocorrer em ambientes variados. Pesquisas envolvendo variação de temperatura com animais possuem grande relevância, para que se possa verificar a capacidade de espécies de peixes a se adaptarem a essas mudanças. O *Micropterus salmoides* é um peixe predador de topo de cadeia, oriundo da América do Norte e introduzido no Brasil devido a sua esportividade na pesca. Hoje tem-se registros da ocorrência de *M. salmoides* no Paraná. Exemplares de *M. salmoides* foram coletados no reservatório do Passaúna e verificamos sua temperatura crítica máxima (TCmax), parâmetros fisiológicos como lactato plasmático (LP), glicose sanguínea (GS), teor hídrico muscular (TH), atividade da anidrase carbônica branquial (AAC). Grupos de 6 exemplares juvenis que foram aclimatados por 7 dias à 20°C, 25°C e 33°C, após a aclimação a temperatura da água foi elevada 2°C a cada uma hora, até atingirem a TCmax, seguida da temperatura letal máxima (TLmax). As médias das TCmax obtidas para cada grupo de aclimação foram 36,55±0,13°C, 37,43±0,2°C e 38,35±0,67°C respectivamente. A TLmax do grupo aclimatado à 20°C foi de 37,03±0,34°C, do grupo aclimatado à 25°C 37,78±0,27°C e dos animais aclimatados em 33°C = 38,78±0,65°C. Os peixes aclimatados em 20, 25 e 30°C apresentaram LP= 113,49±16 mg/l, 69,58±8,7 mg/l e 94,12±11,86 mg/l respectivamente. A GS apresentada entre os peixes aclimatados em 20°C foi de 301,5±35,03mg/dl, dos aclimatados em 25°C = 208,5±21,14 mg/dl e dos peixes aclimatados em 33°C= 225,67±35,75 mg/dl. O TH apresentado pelo grupo aclimatado a 20°C foi de 79,59±0,31, dos peixes aclimatados em 25°C o TH= 77,7±0,22 e o grupo aclimatado a 33°C apresentou TH= 77,32±0,28. A AAC dos grupos aclimatados em 20, 25 e 33°C, tiveram valores de 8,64±0,6, 7,82±1,02 e 11,52±0,59 respectivamente. O K dos grupos aclimatados em 20, 25 e 33°C foram respectivamente 0,012±0,00028, 0,01±0,001 e 0,02±0,003. Os valores dos parâmetros sofrem interferência devido ao estresse térmico que os peixes passaram. Por ter maior plasticidade fisiológica que espécies nativas, esta espécie enfrenta grandes variações térmicas e consegue ocorrer em diversos ambientes, pois disponibilizam uma parte de sua energia para contornar as adversidades térmicas, buscando homeostase. Esta plasticidade tem um limite, que é imposto geneticamente a cada espécie e a cada indivíduo.

## INTRODUÇÃO

A introdução de espécies exóticas é um fator de grande influência na biodiversidade (ROCKSTRÖM et al. 2009; VITULE et al., 2009; EISSA e ZAKLI 2011). Peixes são os organismos mais introduzidos em ambientes diferentes no mundo, devido à grande demanda de pesca esportiva, ornamentação e aquicultura (Gozlan et al., 2010). Parâmetros abióticos como temperatura e concentração de oxigênio na água, podem ser barreiras para as espécies de organismos aquáticos em geral, limitando a ocorrência e distribuição descontrolada de espécies exóticas. Com o aumento de temperatura, as espécies invasoras podem ser favorecidas por ter maior plasticidade fisiológica (RAHEL e OLDEN 2008); (GUTIERRE et al., 2016).

Levando-se em consideração que peixes geralmente são animais ectotérmicos e grandes alterações de temperatura podem causar grande desequilíbrio em sua fisiologia pois ao enfrentarem temperaturas diferentes, a fisiologia dos animais tende a sofrer modificações para superar essas novas condições e continuar sobrevivendo. Essas mudanças na temperatura podem alterar taxas metabólicas, alterar demanda por O<sub>2</sub>, o que alteraria a respiração do animal. (SOMERO 2010, BEITINGER e LUTTERSCHMIDT 2011).

Condições como temperatura mais alta e conseqüentemente menor concentração de oxigênio dissolvido na água, podem ser ainda mais acentuadas, pois, segundo climatologistas do IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change), a temperatura dos corpos hídricos de água doce pode aumentar em até 3°C, num prazo de aproximadamente 60 anos (IPCC 2013). Como a temperatura influencia a maturação e o tempo de períodos reprodutivos da espécie *Micropterus salmoides* (LORENZONI et al., 2002, BEAMISH et al., 2005), os animais exóticos podem ter tempos e condições abióticas de crescimento e reprodução maiores (KOLAR e LODGE 2000; HELLMAN et al., 2008; EISSA e ZAKI 2011), favorecendo o aumento da população de indivíduos da espécie exótica.

Deve-se levar em consideração que peixes são geralmente enquadrados em zonas térmicas, de acordo com a sua tolerância térmica. Peixes encontrados em águas mais quentes atingem pontos ótimos fisiológicos quando a temperatura do ambiente aquático que se encontram, estão com temperaturas maiores que 28°C, já peixes que comumente são encontrados em águas mais frias, atingem a otimização fisiológica, quando ocorrem em águas com temperaturas menores que 20°C (MAGNUSON et al., 1997).

A espécie estudada é o *Micropterus salmoides*, um peixe predador, conhecido como Largemouth Bass ou Black Bass. O *M. salmoides* é piscívoro de topo de cadeia, oriundo da América do Norte, tendo ocorrência desde o Canadá, passando pelos Estados Unidos e indo até o norte do México (BROWN et al., 2009). Os primeiros registros da espécie estudada ocorrendo no Brasil, são datadas na década de 1922, em Minas Gerais, (Nomura 1984). Segundo PAGE e BURR (1991) o maior comprimento registrado da espécie foi 97 cm, e o peso de aproximadamente 10 kg (IGFA 1991), todos estes exemplares foram capturados na Florida. Por ser um predador de topo de cadeia, o *M. salmoides* pode assumir o papel de outros predadores nos seus novos locais de ocorrência e por não terem predadores naturais, podem assim atingir grande densidade populacional e grandes taxas de crescimento, deste modo competindo com espécies locais (MITTELBAACH et al., 1995; SCHINDLER et al., 1998), assim sendo, realmente pode interferir em comunidades de espécies nativas (VITULE 2009), trazendo grandes prejuízos e até mesmo a extinção de peixes nativos (MAEZONO e MIYASHITA 2003; TRUMPICKAS et al., 2011). Segundo LOWE et al., (2000) o *M. salmoides* está enquadrado como uma das piores espécies de peixe invasoras do mundo.

Pode-se verificar a tolerância térmica dos peixes através do teste de temperatura crítica máxima. A temperatura crítica máxima segundo Hutchinson (1976) pode ser vista como uma média de valores das temperaturas, onde animais perdem a capacidade e reflexos de fuga, que normalmente teriam em condições não extremas. O *M. salmoides* ocorre em temperaturas que vão de 18°C à 23°C nos seus locais de ocorrência na América do Norte (DAVIS e LOCK 1997; LORENZONI et al., 2002; BEAMISH et al., 2005). Existem estudos que demonstram que indivíduos dessa espécie oriundos de Par Pond, Aiken na Carolina do Sul, suportam temperatura crítica máxima (TCmax) de até 35,9°C quando aclimatados em 20°C.

Quando aclimatados em 28°C suportam TC<sub>max</sub> de até 40,1°C (SMITH & SCOTT 1975). Porém indivíduos provenientes de outra população (Inslee's Fish Farm em Connerville, Oklahoma) aclimatados as mesmas temperaturas apresentaram de TC<sub>max</sub> de 35,3° e 37,9°C (CURRIE et al., 1998). As diferenças na TC<sub>max</sub> dessas duas populações podem ser devido à água do rio onde Smith e Scott coletaram seus peixes, por ser contaminada por plutônio e ainda sofrer grande amplitude de temperatura, devido à existência de um reator nuclear (CURRIE et al., 1998). Como visto, populações diferentes estão sofrendo influências diferentes do meio que ocorrem.

A tolerância térmica em peixes dulcícolas é muito estudada em espécies de interesse comercial e aquarofilia como a espécie *Oreochromis niloticus* (Tilápia) muito utilizada comercialmente (RANTIN, 1986), e plati *Xiphoporus maculatus* vendido como peixe ornamental (PRODOCIMO & FREIRE, 2001). Das espécies brasileiras a espécie mais estudada é do Acará (*Geophagus brasiliensis*) (RANTIN, 1980).

A zona de tolerância térmica dos peixes pode ser alterada através da aclimação dos indivíduos, mantendo-os em temperaturas mais elevadas ou menos elevadas, de tal modo que mecanismos fisiológicos e bioquímicos contornem esta condição adversa e possa manter a homeostase (WILMER et al., 2005; PÖRTNER, 2008). Outros estudos que envolvem o teste de temperatura crítica máxima utilizando o *M. salmoides* dos autores Smith & Scott (1975) e R. J. Currie, W. A. Bennett & T. L. Beitinger (1998), mostram que a CT<sub>max</sub> no *M. salmoides* varia de acordo com a região de ocorrência e como as condições abióticas do Brasil diferem das condições onde o *M. salmoides* é oriundo o estudo de tolerância térmica com esta espécie seria válido. Com os estudos de tolerância térmica das populações que aqui ocorrem, pode-se fazer a comparação dessas populações que ocorrem no sul do Brasil, com as populações localizadas em outras partes do mundo. Sendo de grande relevância a obtenção de informações sobre a temperatura crítica e fisiologia de *M. salmoides* introduzidos em um reservatório do Sul Brasil, para possível aplicação dos dados no manejo dessas populações, auxiliando numa futura remediação dos ecossistemas aquáticos do estado, frente à mudanças climáticas.

Como a temperatura influencia a maturação e o tempo de períodos reprodutivos da espécie (LORENZONI et al., 2002, BEAMISH et al., 2005), a desova

dos Black bass ocorre em temperaturas que vão de 18°C a 23°C, período condizente com fim do inverno e começo da primavera (DAVIS e LOCK 1997; LORENZONI et al., 2002; BEAMISH et al., 2005). Segundo Dadzie e Aloo (1990), grandes períodos de tempo com temperaturas elevadas podem favorecer períodos de desova maiores, o que para populações de espécies nativas pode ser desfavorável, tendo em vista que a competição por alimento será maior. Não se pode esquecer de que são peixes de topo de cadeia e que predam espécies nativas que compõem ecossistemas até então equilibrados, e com a não mais existência das espécies nativas pode acarretar em um desequilíbrio nos ecossistemas do sul do Brasil

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Avaliar a influência da aclimação em diferentes temperaturas na temperatura crítica máxima da espécie invasora *Micropterus salmoides*, coletados no reservatório do Passaúna, localizado na região metropolitana de Curitiba-PR.

### **Objetivo específico**

- Determinar a temperatura crítica máxima (TCmax) e a temperatura crítica letal (TLmax) de indivíduos juvenis de *Micropterus salmoides* que ocorrem no reservatório do Passaúna (localizado na região metropolitana de Curitiba);

- Avaliar parâmetros fisiológicos (glicose, lactato, anidrase carbônica, fator de condição e teor hídrico muscular) após o teste de temperatura crítica máxima.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Localizado na região metropolitana de Curitiba o reservatório de água do Rio Passaúna, em uma latitude 25° 25' 40 e longitude 49° 16' 23, o reservatório é utilizado para o abastecimento de água de Curitiba e região metropolitana. Os exemplares juvenis do predador *M. salmoides* (média 9,78±0,49cm e 15,13±1,61g) foram coletados no reservatório do Passaúna, com rede de arrasto tipo Fyke (malha de 15mm entre nós e comprimento de 5m x 6m) e transportados em galões de 20 litros, com aeração constante com aerador portátil até o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação, do Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, no campus Politécnico da Universidade Federal do Paraná. No laboratório os animais foram mantidos em aquários estoque de 50 litros, onde foram aclimatados por 7 dias a temperatura ambiente (aproximadamente 24°C) e aeração constante. A alimentação ocorreu de 2 em 2 dias com larva de besouro *Tenebrio (Tenebrio molitor)* coletados na região metropolitana de Curitiba-PR, durante a fase de aclimação até a saciedade. Após o período de aclimação de 7 dias, os animais foram transferidos individualmente para os aquários experimentais de 20 litros em 3 condições de temperatura 20°C, 25°C e 33°C, (n=6 para cada temperatura), a nova aclimação teve um padrão de aumento ou diminuição de temperatura lento (aumento de 2°C por hora ou diminuição de 2°C por hora), para evitar o choque térmico nos animais. A temperatura foi mantida e posteriormente elevada em banho-maria, com 8 termostatos de aquário de marca Hopar e modelo H 606 que possui potência de 300W. Durante o experimento os juvenis de *M. salmoides* foram alimentados de 2 em 2 dias com juvenis de Tilápia (*Tilapia rendalli* e *Oreochromis niloticu*) de aproximadamente 1 grama cada até a saciedade, coletadas com rede do tipo fyke no mesmo reservatório onde os juvenis de *M. salmoides* foram coletados. O experimento consistiu em colocar os peixes em aquários separados individuais de 20 litros. Primeiramente em 33°C, agora já em estado experimental por 7 dias. Após 7 dias de aclimação nas temperaturas experimentais foi realizado o teste de temperatura crítica máxima (TCmax) seguido do teste de temperatura letal máxima (TLmax). A segunda bateria de experimentos ocorreu com a aclimação à 25°C, com um novo grupo de juvenis de *M. salmoides*. Após os 7 dias de aclimação foram realizados os testes de TCmx e TLmax. O mesmo ocorreu para a última bateria de experimentos, no qual um outro grupo de

juvenis de *M. salmeoides* foi aclimatado agora à 20°C por 7 dias também, e após este tempo foram realizados os testes de TCmax e TLmax. Os animais foram medidos e pesados no dia em que foram colocados no experimento (dia 1) para obtenção do peso inicial e tamanho inicial. No último dia (dia 7) de experimento foram pesados e medidos novamente para obtenção do peso final e tamanho final dos animais, logo após foram feitos os testes de temperatura crítica máxima e temperatura letal máxima. Os testes de TCmax e TLmax foram feitos de acordo com o que foi proposto por (BEITINGER et al., 2000) e (PRODOCIMO e FREIRE 2001). De acordo com estes autores a temperatura deve seguir um padrão de elevação de 2°C por hora até que observaremos respostas dos animais, que indicarão a TCmax e a TLmax. A TCmax é definida como a média de temperaturas onde os indivíduos atingiram o ponto crítico, neste estágio os animais não respondem à estímulos mecânicos, ocorre a perda de equilíbrio, desorientação. A TLmax é a temperatura onde ocorre 100% de mortes, onde não nota-se mais o batimento opercular, assim indicando a morte do indivíduo (BEITINGER et al., 2000). Após atingir a temperatura letal, foram retiradas imediatamente amostras de sangue para a dosagem de glicose, logo após a dosagem de glicose foi retirado o plasma através da centrifugação do sangue, para dosagem do lactato. Foram coletadas as brânquias e tecido muscular de todos os exemplares. As amostras de brânquias e músculo foram congeladas em freezer -80°C e o plasma em freezer -20°C.

As amostras de músculo foram utilizadas para medida de teor hídrico (TH). Para determinar o TH das amostras de músculo, cada porção foi pesada em Balança Analítica Bioprecisa (FA2104N, com precisão de 0,0001g). Primeiramente obteve-se o peso úmido, em seguida o material foi desidratado por um tempo de 24h a 60°C. A massa, agora seca, foi pesada, assim obtivemos o valor do peso seco. Por fim chegou-se ao valor do teor hídrico, que consiste na diferença entre peso úmido e peso seco, demonstrada em forma de porcentagem relativa à massa inicial (VEIGA et al., 2016).

As brânquias foram utilizadas para medida da anidrase carbônica, onde o tecido das brânquias foi pesado (média de 0,014±0,0008g) e logo após homogeneizado (sonicador de marca Fisher Scientific, modelo FB 120, com pulso ligado de 4s e amplitude de 50%) em tampão fosfato (10% peso do tecido/volume do tampão). Posteriormente foram centrifugados a 2000xg por 5 minutos a 4°C. O

sobrenadante foi retirado e aliqotado para a análise. Seguindo o protocolo proposto por Vitale e Cols (1999) e descrito por Souza-Bastos e Freire (2009). O protocolo sugere a utilização de manitol (225 mM), sacarose (75 mM), e tris-fosfato (10 mM), mantidos em pH 7,4. Em 50ul de tecido homogenado (sobrenadante aliqotado), é adicionado 7,5ml da solução (tris-fostato+sacarose+manitol) e 1 ml de água deionizada, a 2,5°C e saturada de CO<sub>2</sub>. No mesmo momento da adição da água contendo o gás carbônico deve-se verificar o decaimento do pH durante 20s e com intervalos de 4s. O medidor de pH que foi utilizado possui marca inoLAB, modelo WTW.

O sangue foi usado para dosagem de glicose utilizando o aparelho da marca Accu-Check e modelo Multiclix e consiste na adição de uma gota de sangue em uma fita que é encaixada ao aparelho, que após alguns segundos mostra o valor referente à dosagem do sangue. O lactato foi dosado através de kits Labtest, com leitura em espectrofotômetro com absorbância de 550 nanômetros (Ultrospec 2100 Pro Amersham Pharmacia biotech).

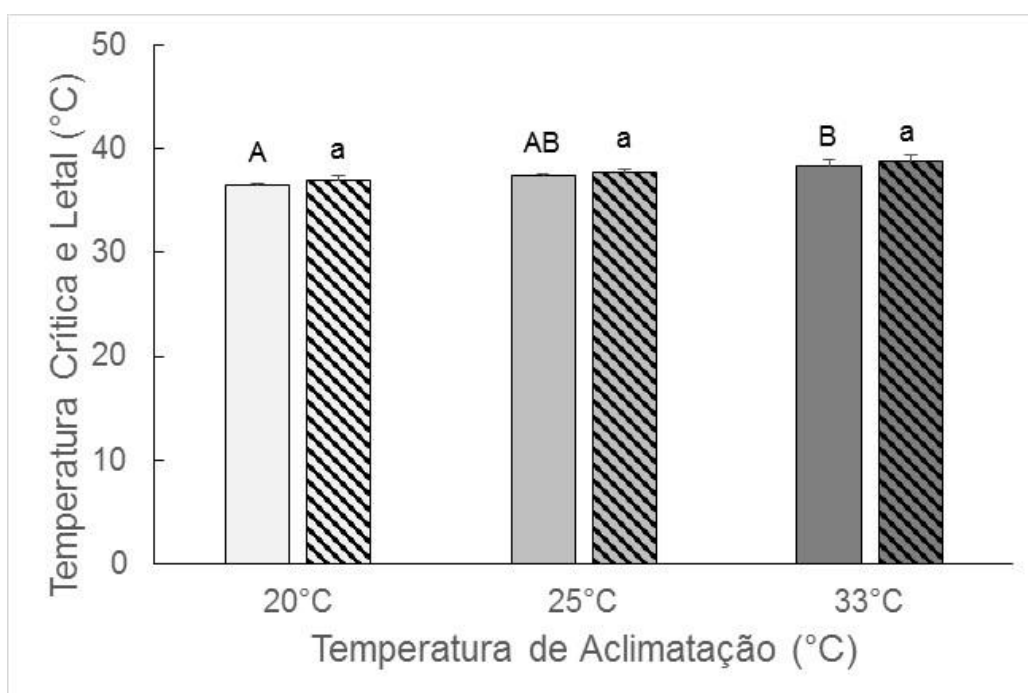
A análise estatística foi feita através do programa Sigma versão 1.1.1, por terem apenas uma variável que é a temperatura os testes estatísticos usados foram Anova de uma via e teste de Kruskal Wallis (o valor de P considerado foi de 0,05).

## RESULTADOS

### Temperatura crítica máxima e temperatura letal máxima

Os exemplares de *Micropterus salmoides* apresentaram um aumento na temperatura crítica máxima (TCmax) com o aumento da temperatura na aclimação. A TCmax apresentada no grupo aclimatado à 20°C (n=4 pois 2 animais morreram no processo de aclimação) foi de 36,55±0,13°C, no grupo aclimatado em 25°C (n=6) a TCmax foi de 37,43±0,2°C, por fim no grupo aclimatado a 33°C (n=6) a TCmax foi de 38,35±0,67°C. Sendo significativa a diferença entre a temperatura crítica máxima do grupo aclimatado a 20°C se comparada com a temperatura do grupo aclimatado a 33°C.

Os peixes *M. salmoides* não apresentaram diferenças significativas na temperatura letal máxima (TLmax) alcançada. O grupo de peixes aclimatados a 20°C (n=4) alcançou 37,03±0,34°C, para o grupo aclimatado em 25°C a TLmax foi de 37,78±0,27°C, e 38,78±0,65°C para o grupo de *M. salmoides* aclimatado em 33°C.

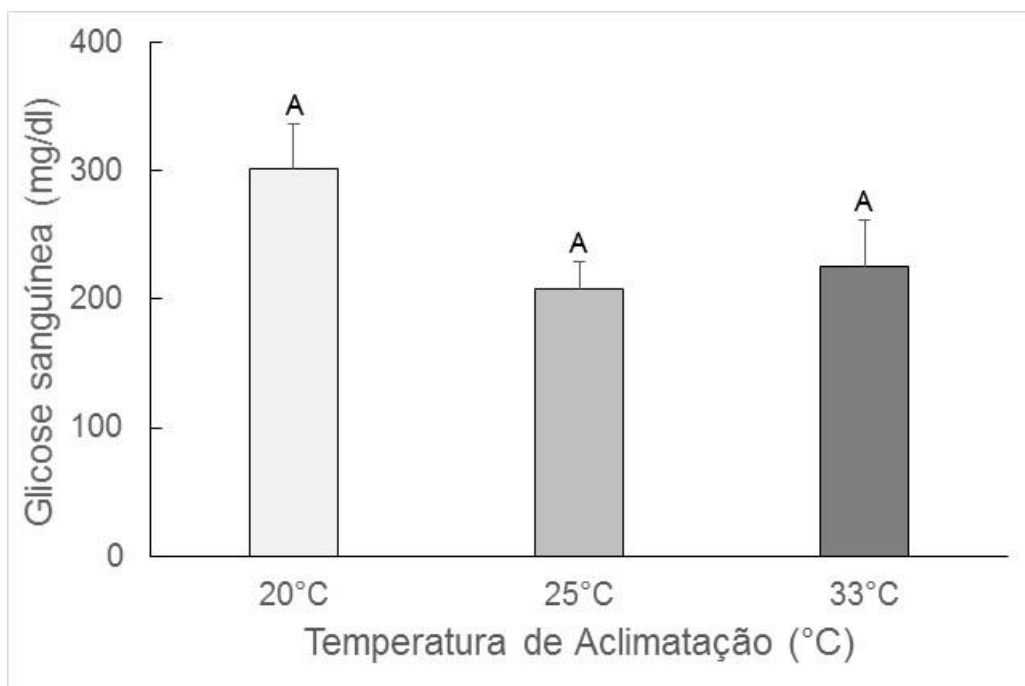


**Figura 1:** As temperaturas críticas máximas (média±erro padrão) (barras com preenchimento liso) e temperaturas letais máximas (média±erro) (barra quadriculadas) de *M. salmoides* aclimatados em diferentes temperaturas 20°C (n=4), 25°C (n=6) e 33°C (n=6). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas de temperatura crítica máxima entre os diferentes grupos de aclimação. Letras minúsculas indicam semelhantes indicam que não houve diferença significativas

de temperatura letal máxima entre os diferentes grupos de aclimação.  $p < 0,05$ .

## Glicose

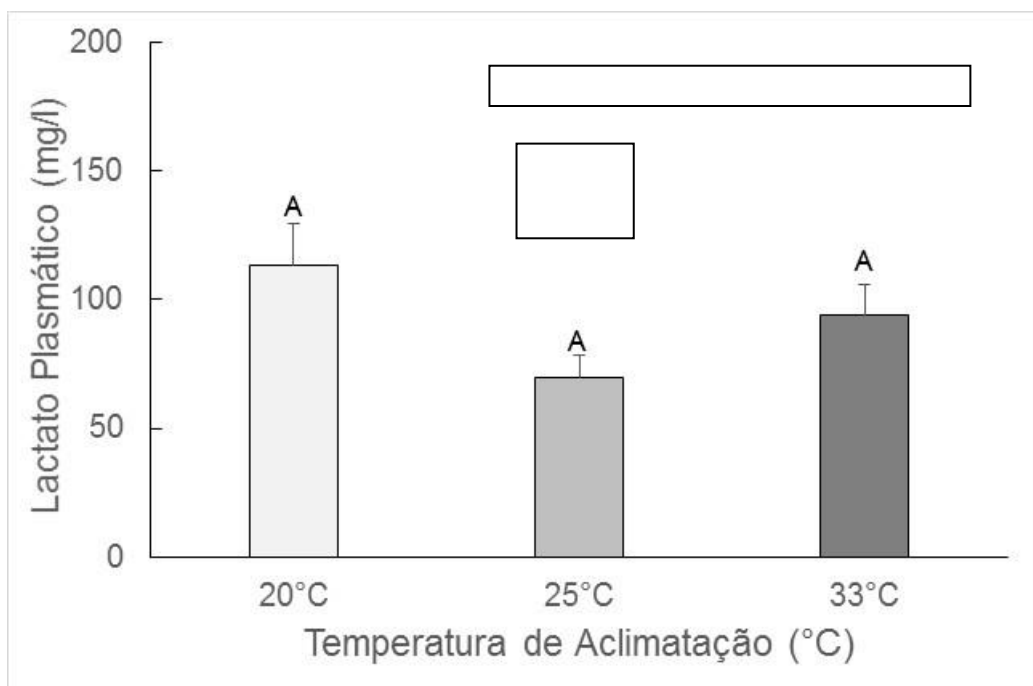
A glicose sanguínea do peixe *Micropterus salmoides* não apresentou diferenças se comparados os grupos aclimatados em diferentes temperaturas (20, 25 e 33°C). Os animais aclimatados a 20°C (n=4), apresentaram média de  $301,5 \pm 35,03$  mg/dl de glicose sanguínea, o grupo aclimatado a 25°C (n=6), obteve média de  $208,5 \pm 21,12$  mg/dl de glicose sanguínea e por fim o grupo aclimatado a 33°C (n=6), possuiu média de  $225,66 \pm 35,74$  mg/dl de glicose no sangue.



**Figura 2:** Glicose sanguínea (média±erro padrão) do peixe *M. salmoides* aclimatados em diferentes temperaturas 20°C (n=4), 25°C (n=6) e 33°C (n=6). Letras iguais indicam que não houve diferenças significativas na glicose sanguínea entre os grupos de aclimação.  $P < 0,05$ .

## Lactato

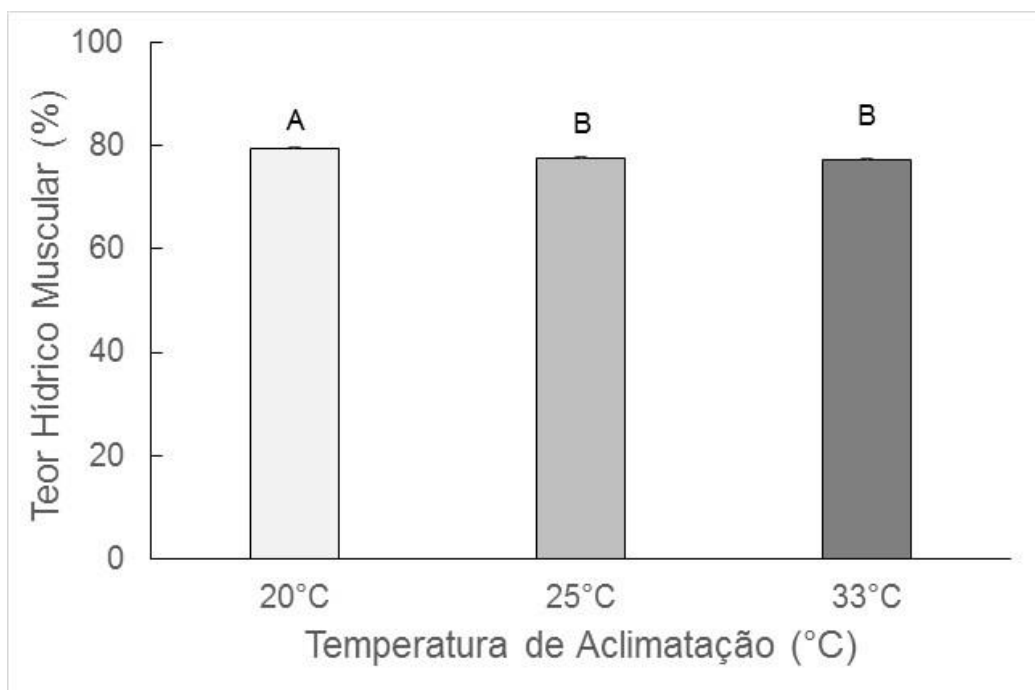
A média dos valores do lactato plasmático da espécie estudada não apresentou diferença significativa entre os grupos aclimatados em diferentes temperaturas. O grupo de peixes aclimatados a 20°C (n=4) foi de 113,5±15,9 mg/l. O grupo aclimatado a 25°C (n=6) apresentou média de 69,59±8,7 mg/l e o grupo aclimatado à 33°C (n=6) apresentou média de lactato plasmático de 94,12±11,86 mg/l.



**Figura 3:** Lactato plasmático (média±erro padrão) do peixe *M. salmoides* aclimatados em diferentes temperaturas 20°C (n=4), 25°C (n=6) e 33°C (n=6). Não houve diferenças significativas no lactato sanguíneo entre os grupos de aclimação. P<0,05.

## Teor Hídrico

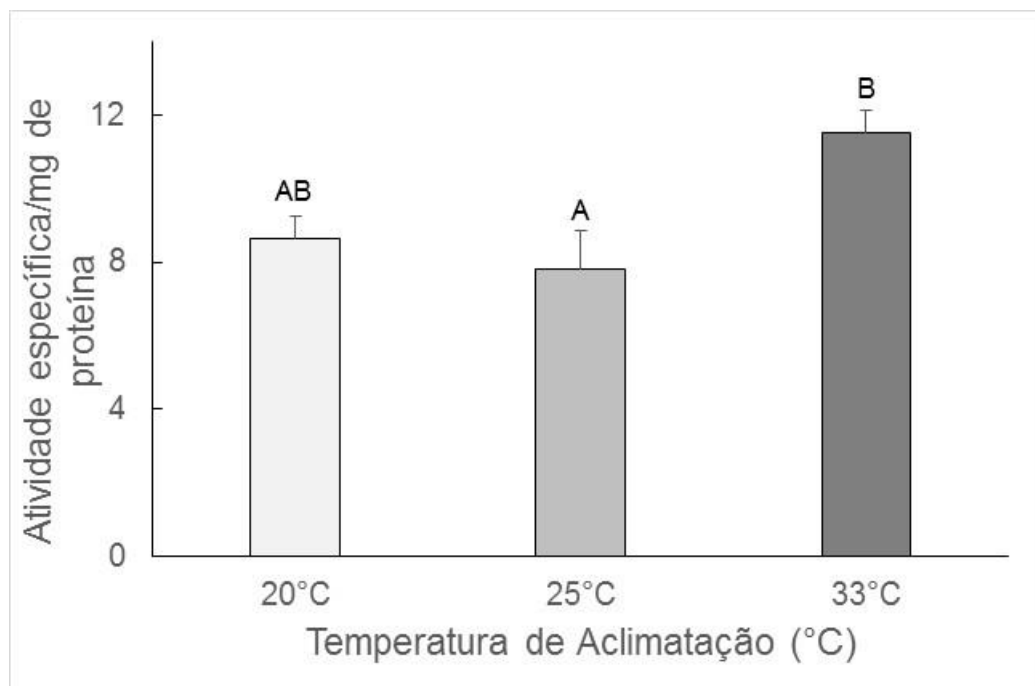
A média dos valores do teor hídrico muscular de *Micropterus salmoides* apresentou valores elevados em grupos aclimatados em temperatura mais baixa (20°C) em comparação aos grupos aclimatados em temperaturas mais altas (25°C e 33°C). Nos peixes aclimatados à 20°C (n=4), o valor do teor hídrico muscular foi de  $79,59 \pm 0,31\%$ , resultado maior do que comparado com os outros grupos, nos quais apresentaram médias dos valores de teor hídrico muscular de  $77,7 \pm 0,22\%$  para o grupo aclimatado a 25°C (n=6) e para o grupo aclimatado a 33°C (n=6) apresentaram  $77,32 \pm 0,28\%$ .



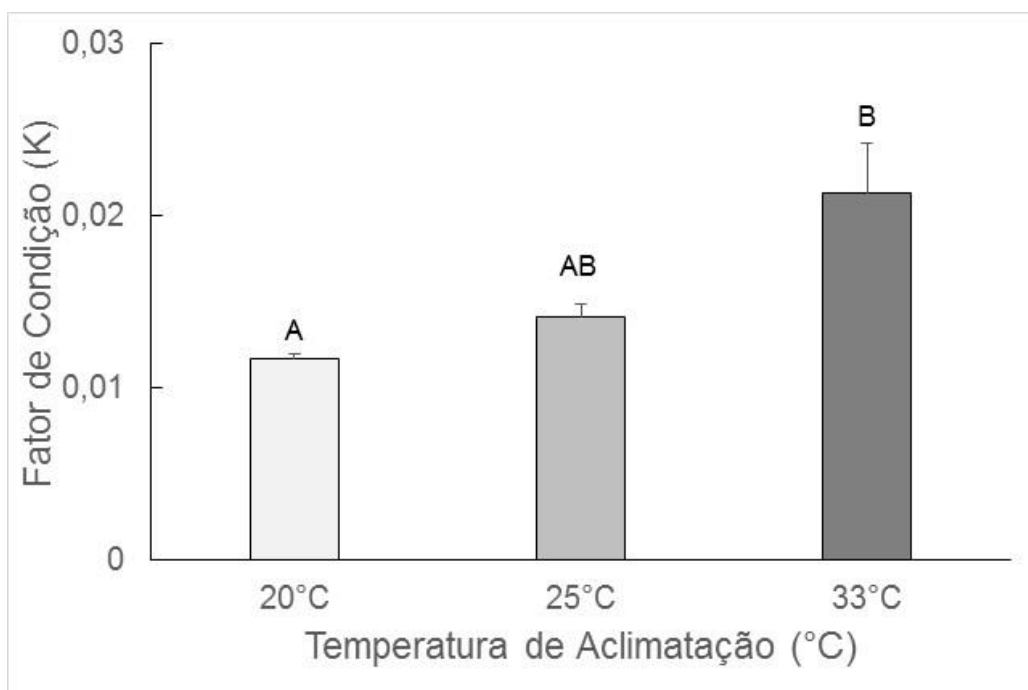
**Figura 4:** O teor hídrico muscular (média±erro padrão) do peixe *M. salmoides* aclimatados em diferentes temperaturas 20°C (n=4), 25°C (n=6) e 33°C (n=6). Letras diferentes indicam que houve diferenças significativas no teor hídrico muscular entre os grupos de aclimação.  $P < 0,05$ .

### Atividade Específica da Anidrase Carbônica Branquial

A medida da atividade da anidrase carbônica de brânquias de *M. salmoides* apresentou diferença entre os peixes aclimatados em 25°C e 33°C. Para o grupo de aclimação de 20°C (n=4), a média apresentada foi de  $8,64 \pm 0,6$  de atividade da anidrase carbônica. O grupo aclimatado à 25°C (n=6) apresentou uma média de atividade de anidrase carbônica de  $7,82 \pm 1,02$  e o grupo aclimatado à 33°C (n=6), teve média de  $11,52 \pm 0,59$  de atividade.



**Figura 5:** A atividade específica da anidrase carbônica (média ± erro padrão) em brânquias do peixe *M. salmoides* aclimatados em diferentes temperaturas 20°C (n=4), 25°C (n=6) e 33°C (n=6). No eixo Y estão os valores da atividade específica da anidrase carbônica. Letras diferentes indicam que houve diferenças significativas na glicose sanguínea entre os grupos de aclimação.  $P < 0,05$ .



**Figura 6:** Os valores do fator de condição (K), representado do eixo y (média±erro padrão) dos grupos de *M. salmoides* aclimatados em 20°C (n=4), 25°C (n=6) e 33°C (n=6) (eixo x). Letras diferentes indicam que houve diferenças significativas no fator de condição entre os diferentes grupos de aclimação.  $P < 0,05$ .

## DISCUSSÃO

### Temperatura crítica máxima e temperatura letal máxima

Segundo Hutchinson (1976), os animais peilotérmicos ao passarem por variações de temperatura do ambiente, respondem tais variações com mudanças em sua fisiologia, alterando-a para que consigam continuar ocorrendo no ambiente.

A espécie *Micropterus salmoides* aclimatadas em 33°C apresentou uma maior resistência à temperatura crítica máxima alcançada, se comparada com o grupo de peixes da mesma espécie aclimatados a 20°C. Segundo Dietz e Somero (1992) e Somero (2010), a aclimação dos animais em temperaturas mais elevadas pode desencadear a síntese de proteínas que promovem a proteção dos animais quando expostos à temperaturas mais altas, deste modo, fazendo com que os animais possam suportar TCmax mais elevadas, se comparados com animais aclimatados em temperaturas mais baixas. Isso pode ocorrer em animais que possuem plasticidade maior podendo tolerar possíveis mudanças na temperatura do ambiente, como no caso dos muitos peixes invasores.

Existem estudos de temperatura crítica máxima (TCmax) realizados com exemplares de *M. salmoides*, oriundos de Illinois nos Estados Unidos. Nesse estudo os resultados indicaram que animais aclimatados em diferentes temperaturas não possuem diferença na TCmax alcançada (MULHOLLEM et al., 2014). Não foi o que verificamos com o nosso trabalho, realizado com exemplares da mesma espécie de peixe, porém oriundas do reservatório do Passaúna, onde os peixes apresentaram valores de TCmax mais elevados quando aclimatados em temperaturas mais elevadas. Contudo outros trabalhos como o de Smith & Scott (1975) que verificaram a TCmax de *M. salmoides*, provenientes do estado da Carolina do Sul (em Par Pond) suportam temperaturas de até 35,9°C quando são aclimatados em 20°C. Quando aclimatados em 28°C suportam uma temperatura crítica máxima de até 40,1°C. Outros trabalhos foram realizados com a mesma espécie, com populações oriundas da cidade de Connerville no sul do Estado de Oklahoma, quando aclimatados a 20°C apresentaram TCmax de 35,3°C e quando aclimatados a 28°C apresentam TCmax de 37,9°C (CURRIE et al., 1998). Se compararmos nosso trabalho com os trabalhos realizados com os peixes oriundos da Carolina do Sul e de Oklahoma podemos notar que seguem o mesmo padrão, quanto maior a temperatura de aclimação, maior é TCmax suportada. Com valores diferentes, pois são grupos de peixes da mesma espécie mas de populações diferentes e segundo Willmer (2005) que cita que a genética influencia e limita a temperatura crítica

máxima dos animais. Segundo Peck et al., (2009), quanto maior é o tempo em que o aumento da temperatura ocorre, maior será a temperatura crítica que será suportada. Sabendo-se disso, os experimentos realizados neste estudo tiveram um padrão rápido de elevação de temperatura (2°C por hora), de maneira que sejam minimizados os efeitos da aclimação durante a fase de aumento de temperatura, durante o experimento e fazendo com que as respostas fisiológicas dos animais possam condizer com as temperaturas nas quais foram escolhidas para aclimação (20°C, 25°C e 33°C). Essa aclimação durante o experimento é definida como aclimação parcial (HUTCHISON 1961).

### **Glicose**

A glicose sanguínea não apresentou diferença entre os grupos. Segundo Wells (1999), que verificou o estresse devido à hipóxia em trutas (*Oncorhynchus mykiss*) aumentava os níveis de glicose no sangue a medida que os peixes eram submetidos a hipóxia. Os valores de glicose dos indivíduos também aumentavam com maior tempo de exposição à hipóxia. Segundo Thomas e al.,(1999) os níveis de glicose sanguíneas aumentam geralmente quando peixes são expostos a algum fator estressor, que resulta na diminuição de oxigênio. A manipulação de peixes também causa estresse, alterando os níveis de glicose sanguíneos (WELLS 1999). Como os *M. salmoides* foram manipulados pode ter havido um pequeno aumento devido a manipulação, porém a maior causa de os valores de glicose serem alterados foi a exposição a temperaturas elevadas, levando a uma baixa concentração de oxigênio diluído na água, assim causando o estresse animais, desse modo interferindo nos valores finais da glicose apresentados nos peixes deste trabalho. A dieta foi um fator que poderia influenciar nos dados de glicose a serem obtidos, porém todos os animais tiveram o mesmo protocolo enquanto à alimentação, minimizando assim a interferência da dieta nos resultados de glicose deste trabalho.

Em trutas *Oncorhynchus mykiss* a média de glicose verificada foi de 36 mg/dl, o animal estando em seu estado basal, sem nenhum fator de estresse influenciando este fator (GRUTTER 2000). Na espécie *Carassius auratus*, conhecida como Peixe Dourado, os níveis de glicose basais tiveram média de 37,5 mg/dl (SILBERGELD 1974). Em Tambaquis (*Colossoma macropomum*) a média de glicose basal

apresentada foi de 51 mm/dl (BRANDÃO 2004). Em nosso trabalho os valores de glicose apresentados pelos grupos de *M. salmoides* foi de 245 mg/dl, sendo valores maiores que os basais apresentados por outras espécies. Valores de glicose semelhantes foram encontrados em *Tilapia aurea* submetidas a estresse térmico. Os peixes apresentaram glicose com média 225mg/dl (KINDLE & WHITMORE 1986) Segundo Morgan & Iwama (1997), a glicose serve como principal fonte de energia, para suportar fisiologicamente situações desfavoráveis, assim sendo, a glicose é um eficiente indicador de distúrbios fisiológicos.

### **Lactato**

Ao serem submetidos ao teste de temperatura crítica máxima nenhum grupo de aclimatação apresentou diferenças significantes entre os valores de lactato plasmático encontrados. Com o aumento da temperatura dos corpos hídricos, a concentração de oxigênio na água diminui (METZGER et al., 2007) e segundo Portner (2002) em seu trabalho com temperatura crítica, realizado com animais variados, dentre eles invertebrados marinhos e répteis, Portner cita que em temperaturas extremas, a sobrevivência dos animais é mantida através do metabolismo anaeróbico. Assim sendo, a hipóxia do meio, ativa o metabolismo anaeróbico dos animais, que contribuem para que os valores de lactato sofram aumentos significativos. Como o teste de temperatura crítica consiste no aumento gradativo da temperatura dos aquários experimentais (PRODOCIMO e FREIRE 2001), a quantidade de oxigênio da água dos aquários pode ser reduzida, pois com maior temperatura, menor é a concentração de oxigênio na água (METZGER et al., 2007).

Peixes respondem ao estresse com o aumento do lactato sanguíneo, mais especificamente quando o aspecto do estressor causar aumento da atividade ou diminuição do oxigênio (THOMAS et al., 1999), sendo assim a hipóxia do meio o fator de maior impacto sobre os valores de lactato plasmático apresentados.

Segundo Wells (1999), que analisou o lactato sanguíneo de trutas imaturas, submetendo-as a condição de estresse através da manipulação e alocação dos peixes para aquários menores. O autor verificou que o lactato sanguíneo sofreu alterações. Todos os indivíduos passaram por certa manipulação durante o experimento, o que pode ter causado estresse, mesmo que mínimo, porém influenciável nos valores de lactato apresentados pelos indivíduos dos experimentos.

## **Teor hídrico**

Ao serem submetidos ao teste de temperatura crítica, *M. salmoides* aclimatados à 20°C apresentaram teor hídrico muscular mais elevado que os animais aclimatados a 25 e 33°C. Segundo Smith (1989), a temperatura pode afetar o crescimento de peixes pelo controle da alimentação, consumo de nutrientes. A temperatura também tem influência na permeabilidade de membranas celulares (Sargeant et al. 1989). Os valores de teor hídrico muscular encontrados na literatura, mostraram que quanto menor for a temperatura em que exemplares de Black Bass e outras espécies de peixes em geral, forem aclimatados, menor é a porcentagem de água na musculatura branca do animal (TIDWELL 2003 e LABUZA 2006). No presente trabalho verificamos que em temperaturas de aclimação menores, o teor hídrico muscular do *M. Salmoides* apresenta valores maiores, ao contrário do que foi relatado na literatura.

## **Anidrase carbônica**

Ao serem submetidos ao teste de temperatura crítica máxima os peixes buscam a homeostase através de mecanismos fisiológicos que contornem o grande aumento de temperatura que enfrentaram. O grupo de *M. salmoides* aclimatados a 25°C, apresentou atividade específica da anidrase carbônica branquial (AAC) menor que o grupo de peixes aclimatados em 33°C.

A enzima Anidrase Carbônica presente nas brânquias e rins dos peixes, está envolvida em uma série de mecanismos fisiológicos. A hidratação do gás carbônico é um desses mecanismos, produzindo íons H<sup>+</sup> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (MAREN 1967). Outros papéis da anidrase carbônica é a excreção de compostos nitrogenados, controle iônico e regulação de PH (MAREN 1967, HENRY 1996). Como os animais da espécie estudada passaram por testes onde a temperatura foi elevada, assim diminuindo a quantidade de oxigênio dissolvido na água (METZGER et al., 2007), deste modo, com o oxigênio baixo, a concentração de CO<sub>2</sub> aumenta, aumentando a acidez da água também, fazendo com que a atividade específica anidrase carbônica seja maior em peixes que estão aclimatados em temperaturas maiores e portanto, possuem menos oxigênio disponível.

## CONCLUSÕES

A espécie de peixe *Micropterus salmoides* apresenta uma elevação em sua temperatura crítica máxima alcançada a medida que é aclimatada em temperaturas mais elevadas ou seja, quanto maior for a temperatura de aclimação, maior é a temperatura crítica máxima suportada pelos peixes da espécie estudada, dentro dos limites impostos geneticamente entre as populações. Se a temperatura dos corpos hídricos aumentar como sugerem as previsões do IPCC, a espécie *M. salmoides* ainda ocorrerá no reservatório do Passaúna. Essa amplitude térmica que os peixes da espécie estudada suportam, se dão através de mudanças fisiológicas que buscam a homeostase frente ao estresse térmico. O aumento da temperatura da água, junto com o estresse térmico, alteram o teor hídrico e a atividade da anidrase carbônica, evidenciando a mudanças fisiológicas para suportar a hipóxia do meio e o estresse térmico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aisse, M.; Gomes, C.; Silva, R. G.; Freitas, C.; Fendrich, R. Qualidade da Água da Bacia Hidrográfica Experimental do Passaúna. Revista Acadêmica PUCPR. Ano 1, nº 1, 1990;

Beamish C. A, Booth A. J, Deacon N. (2005). Age, growth and reproduction of Largemouth bass, *Micropterus salmoides*, in Lake Manyame, Zimbabwe. African Zoology 40: 63–69;

Beitinger, T. L., Bennett, W. A., and McCauley, R. W. (2000). Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature.

Environmental Biology of Fishes 58, 237–275;

Beitinger, T., Lutterschmidt, W. (2011). Measures of Thermal Tolerance. Elsevier Inc. 8 pp;

Brandão, F. R, et al. (2004). Densidade de estocagem de juvenis de tambaqui durante a recria em tanques-rede;

Brown T. G, Runciman B, Pollard S, Grant ADA (2009). Biological synopsis of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2884, Nanaimo, British Columbia;

Currie, R. J., Bennett, W. A. & Beitinger, T. L. (1998). Critical thermal minima and maxima of three freshwater game-fish species acclimated to constant temperatures; Davis JT, Lock JT (1997). Largemouth bass: biology and life history (revision) Southern Regional Aquaculture Center, 200;

Dadzie S, Aloo P. (1990) Reproduction of the North American black bass *Micropterus salmoides* Lacepède in an equatorial lake, Lake Naivasha, Kenya. Aquaculture and Fisheries Management 21: 449–458;

Dietz, T. J., Somero, G. N. (1992). The threshold induction temperature of the 90-kDa heat shock protein is subject to acclimatization in eurythermal goby fishes (genus *Gillichthys*);

Eissa A. E, Zaki M. M (2011). The impact of global climatic changes on the aquatic environment. Proedia Environmental Sciences, 4: 251-259;

Freire, C. A., Amado, E. M., Souza, L. R., Veiga, M. P. T., Vitule, J. R. S., Souza, M. M., and 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 A 149, 435-446;

Froese, R. 2006. Cube law, condition factor and length-weight relationship: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 22: 241-253;

Gozlan R. E, Britton J. R, Cowx I, Copp GH (2010). Current knowledge on non-native freshwater fish introductions. *Journal of Fish Biology* 76:751–786;

Grutter, A. S., & Pankhurst, N. W. (2000). The effects of capture, handling, confinement and ectoparasite load on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish *Hemigymnus melapterus*. *Journal of Fish Biology*, 57(2), 391-401;

Gutierrez, S. M. M. (2011). Ferramentas fisiológicas para avaliação do potencial invasor de peixes dulcícolas;

Hellmann J. J, Byers J. E, Bierwagen B. G, Dukes J. S. (2008). Five potential consequences of climate change for invasive species. *Conservation Biology* 22(3): 534-543;

Henry, P. Raymond (1996). Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism;

Hutchinson, V. E (1961). Critical thermal maxima in salamanders;

Hutchinson, V. E (1976). Factors influencing thermal tolerance of individual organisms. In: Esch, G. W and McFarlane R. W. (eds) *Thermal Ecology II*. U.S National Technical Information Service, Springfield. Pp. 10-26;

IGFA (1991). World record game fishes. International Game Fish Association, Florida, USA;

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2013) *Climate change 2007: the scientific basis*. Cambridge University Press, Oxford, UK;

Jiménez-Valverde, A., Lobo, J. M. (2011). Tolerance limits, animal. In: Simberloff, D., Rejmanek, M. (eds) Encyclopedia of biological invasions. University of California Press, CA, pp 661–663;b

Kindle K. R & Whitmore D. H. (1986). Biochemical indicators of thermal stress in *Tilapia aurea*;

Kolar C. S. & Lodge D. M. (2000). Freshwater Nonindigenous Species: Interactions With Other Global Changes;

Labuza T. P, Kaanane A., Chen J. Y. (2006). Effect of Temperature on the Moisture Sorption Isotherms and Water Activity Shift of Two Dehydrated;

Le Cren, E.D. (1951). The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition factor in the perch (*Perca fluviatilis*). Journal of animal ecology, 20:201-219;

Lorenzoni M, Dörr A. J. M, Erra R., Giovinazzo G., Mearelli M., Selvi S. (2002). Growth and reproduction of Largemouth bass (*Micropterus salmoides*, Lacepède, 1802) in lake Trazimeno (Umbria, Italy). *Fisheries Research*, 56: 89-95;

Lowe S., Browne M, Boudjelas S., De Poorter M. (2000). 100 of the world's worst invasive alien species A selection from the global invasive species database. Published by The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN)

Maezono Y., Miyashita T. (2003). Community-level impacts induced by introduced largemouth bass and bluegill in farm ponds in Japan. *Biological Conservation* 109:111-121;

Magnuson, J. J., et al. 1997. Potential effects of climate changes on aquatic ecosystems: Laurentian Great Lakes and Precambrian Shield region. *Hydrological*

Processes 11:825–871;

Maren T. H. (1967) Carbonic anhydrase: chemistry, physiology and inhibition. *Physiol Rev* 47: 595-781;

Metzger, R., Sartoris, F. J., Langenbuch M., and Pörtner, H. O. (2007). Influence of elevated CO<sub>2</sub> concentrations on thermal tolerance of the edible crab *Cancer pagurus*. *J. Therm. Biol.* 32: 144–151;

Milligan C. L. and Girard S. S. (1993). Lactate metabolism in Rainbow Trout;

Mittelbach G. G., Turner A. M., Hall D. J., Rettig J. E., Osenberg C. W. (1995). Perturbation and resilience: a long-term whole-lake study of predator extinction and reintroduction. *Ecology* 76:2347-2360;

Mora C., Maya M. F. (2006). Effect of the rate of temperature increase of the dynamic method on the heat tolerance of fishes. *Journal of Thermal Biology* 31:337-341;

Morgan J.D., Iwama G. K. (1997). Measurements of stressed states in the field. In: Iwama, G.K.; Pickering, A.D.; Sumpter R, J.P.; Schreck, C.B. (Ed.). *Fish stress and health in aquaculture*;

Mulhollem J. J, Suski C. D, Wahl D. H. (2014). Response of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) from different thermal environments to increased water temperature;

Nelson J. S. (2006). *Fishes of the world*. John Wiley and Sons, Inc. New York. 4th edition. 601 pp. ISBN: 0-471-25031-7;

Nomura H. (1984). Nomes científicos dos peixes e seus correspondentes nomes vulgares. In H. Nomura (ed.). *Dicionário dos peixes do Brasil*. Editerra, Brasília, Brasil: 27-63;

Page L. M, Burr B. M (1991). A field guide to freshwater fishes of North America north of Mexico. Houghton Mifflin Company, Boston, 432p;

Prodocimo V., Freire C. A. (2001). Critical thermal maxima and minima of the platyfish *Xiphoporus maculatus* Gunther (Poecillidae, Cyprinodontiformes) – a tropical species of ornamental freshwater fish. *Revista Brasileira de Zoologia*. 18:97-106;

Peck L.S, Clark M, Morley M, Massey A, Rossetti H. (2009). Animal temperature limits and ecological relevance: effects of size, activity and rates of change. *Funct. Ecol.* 23:248–56;

Pope, K. L. & Kruse, C. G. (2001). Assessment of fish condition data. Pp. 51-56, In: C. Guy & M. Brown (eds.). *Statistical analyses of freshwater fisheries data*. American Fisheries Society Publication, North Bethesda, MD. 74p;

Pörtner, H. O. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132(4), 739-761;

Pörtner H. O., Mark F. C., Bock C. (2004). Oxygen limited thermal tolerance in fish? Answers obtained by nuclear magnetic resonance techniques. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 14: 243–260;

Pörtner H. O., Bock C., Lannig G., Lucassen M., Mark F. C., Sartoris F. J. (2008). Cod and climate in a latitudinal cline: physiological analyses of climate effects in marine fishes. *Clim. Res.* 37:253-270;

Rahel F. J., Olden J. D.† (2008). Assessing the effects of climate change on aquatic invasive species;

Rantin F. T., Fernandes M. N. (1986). Lethal temperature of *Oreochromis niloticus* (Pisces – Cichlidae). *Revista brasileira de biologia*. 46:589-595;

Rantin F. T. (1980). Temperaturas letais do Acará *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824 – Pisces, Cichlidae). *Fisiologia Animal*. 4:9-33;

Rockström J., Steffen W., Noone K., Persson Å., Chapin F. S., Lambin E. F., Lenton T. M., Scheffer. M., Folke C., Schellnhuber H. J., Nykvist B., Wit C. A., Hughes T., van der Leeuw S., Rodhe H., Sörlin S., Snyder P. K., Costanza R., Svedin U., Falkenmark M., Karlberg L., Corell R. W., Fabry V.J., Hansen J., Walker B., Liverman D., Richardson K., Crutzen P., Foley J. A. (2009). A safe operating space for humanity. *Nature* 461:472- 475;

Sargent, J, R. J. Henderson, and D. R. Tocher. 1989. The lipids. Pages 153-218 in J. E. Halver, editor. *Fish nutrition*. Academic Press, New York, New York, USA;

Schindler D. W. (1998). A dim future for boreal waters and landscapes. *BioScience* 48: 157-163;

Silbergeld, E. K. (1974). Blood glucose: a sensitive indicator of environmental stress in fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 11(1), 20-25;

Smith, M. H., Scott, S. L. (1975). Thermal tolerance and biochemical polymorphism of immature largemouth bass *Micropterus salmoides* lacepede;

Smith, L. S. 1989. Digestive functions in teleost fishes. Pages 331-421 in J. E. Halver. editor. *Fish nutrition*. Academic Press, New York, New York, USA;

Somero, G. N. (2010). The physiology of climate change: How potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers”. *Journal of Experimental Biology* 213:912–920;

Tidwell J. H., Coyle S. D., Bright L. A., Vanarum A., and Yasharian D. (2003). Effect of Water Temperature on Growth, Survival, and Biochemical Composition of Largemouth Bass *Micropterus salmoides*;

Thomas P., Pankhurst M., Bremner H. A. (1999). The effect of stress and exercise on post-morte biochemistry of Atlantic salmon and rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 54, 1177-1196;

Trumpickas J., Mandrack N. E., Ricciardi A. (2011) Nearshore fish assemblages associated with introduced predatory fishes in lakes. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 21:338-347;

Veiga M. P. T., Gutierrez, S. M. M., Castellano, G. C., Freire, C. A. (2016). Tolerance of high and low salinity in the intertidal gastropod *Stramonita brasiliensis* (Muricidae): behaviour and maintenance of tissue water content;

Vitule J. R. S. (2009). Introdução de peixes em ecossistemas continentais brasileiros: revisão, comentários e sugestões de ações contra o inimigo quase invisível. *Neotropical Biology and Conservation* 4:111-122;

Vitule J. R. S., Freire C. A., Simberloff D. (2009). Introduction of non-native freshwater fish can certainly be bad. *Fish and Fisheries* 10:98-108;

Wells R. M. G., Pankhurst N. W. (1999). Evaluation of Simple Instruments for the Measurement of Blood Glucose and Lactate, and Plasma Protein as Stress Indicators in Fish;

Willmer, P., Stone, G., Johnston, I. (2005). *Environmental physiology of animals*. Second edition. Blackwell Science, Oxford, U.K. 754 p.