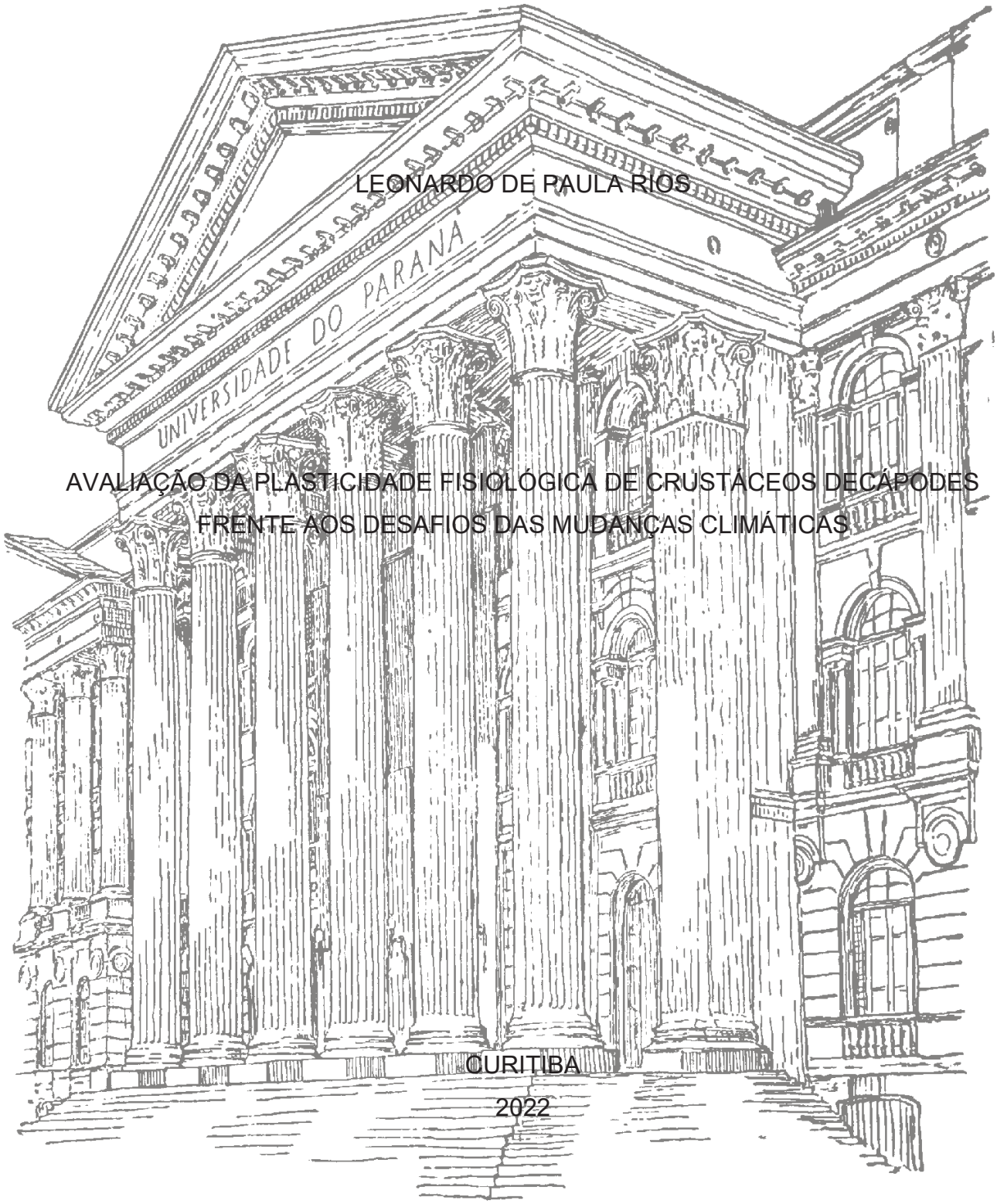
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



LEONARDO DE PAULA RIOS

AVALIAÇÃO DA PLASTICIDADE FISIOLÓGICA DE CRUSTÁCEOS DECÁPODES FRENTE AOS DESAFIOS DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS

CURITIBA

2022

LEONARDO DE PAULA RIOS

AVALIAÇÃO DA PLASTICIDADE FISIOLÓGICA DE CRUSTÁCEOS DECÁPODES FRENTE AOS DESAFIOS DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas - Zoologia.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Arruda de O. Freire

CURITIBA

2022

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Rios, Leonardo de Paula.
Avaliação da plasticidade fisiológica de crustáceos decápodes frente aos desafios das mudanças climáticas. / Leonardo de Paula Rios. – Curitiba, 2022.
144 f. : il.

Orientadora: Carolina Arruda de O. Freire.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Osmorregulação. 2. Metabolismo. 3. Aquecimento global. 4. Oceano - Temperatura. 5. Bioinvasão. 6. Zoologia. I. Título. II. Freire, Carolina Arruda de O. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

CDD (20.ed.) 595.3

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOLOGIA - 40001016008P4

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LEONARDO DE PAULA RIOS** intitulada: **AVALIAÇÃO DA PLASTICIDADE FISIOLÓGICA DE CRUSTÁCEOS DECÁPODES FRENTE AOS DESAFIOS DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS**, sob orientação da Profa. Dra. CAROLINA ARRUDA DE OLIVEIRA FREIRE, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Janeiro de 2022.

Assinatura Eletrônica
02/02/2022 13:41:03.0
CAROLINA ARRUDA DE OLIVEIRA FREIRE
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
02/02/2022 13:34:18.0
MARISA FERNANDES DE CASTILHO
Avaliador Externo (40001016)

Assinatura Eletrônica
08/02/2022 16:27:20.0
TANIA MARCIA COSTA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA)

Assinatura Eletrônica
08/02/2022 13:37:24.0
ENELISE MARCELLE AMADO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA/UFPB)

AGRADECIMENTOS

Antes de escrever os agradecimentos desta tese, eu reli a seção de agradecimentos da minha monografia e da minha dissertação, ambos realizados no Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO). Muita coisa mudou, muitas pessoas chegaram e se foram. Mas invariavelmente, todos os agradecimentos começam da mesma forma: Agradeço a Profª Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire pela oportunidade, orientação, amizade e paciência... nesse primeiro ano de LFCO... nesses mais de três anos de LFCO... e agora nesses mais de oito anos de LFCO. Estava prestes a refazer esse "ritual", não por preguiça ou indiferença, mas porque se tornou algo reconfortante para mim, um símbolo de fechamento de um ciclo e início de outro. Então, pra manter a tradição: Obrigado Carol, pela oportunidade, orientação, amizade e paciência (principalmente). Apesar de todas as dificuldades do meio acadêmico, são pessoas como você que fazem todo esse esforço valer a pena.

À Profª Dra. Viviane Prodocimo pelos conselhos, convivência, colaboração e por ter me ensinado muito durante a minha prática de docência.

Aos meus colegas e amigos de laboratório (antigos e novos): Aline Prado, André Lucas Cuenca, Anieli Maraschi, Daliana Bordin, Deivyson Bozza, Eloísa Pinheiro, Flávia Sampaio, Giovanna C. Castellano, Gustavo Yamasaki, Isis Danniele, Juliane Ceron, Marcos Paulo, Natascha Wosnick, Nicole Stakowian, Renata Daldin, Thiago Occhi. Obrigado a todos pela convivência durante esses oito anos.

A todos os alunos do PGZoo, que durante as tardes intermináveis na sala de alunos, foram companhia, deram sugestões, e principalmente fizeram café (são muitas pessoas e não lembro o nome de todos).

Aos técnicos (a) e secretários (a) do PGFisio: Fábio, Roberto, Hely, Rogério e Débora por tornarem tudo mais acessível e menos burocrático.

À Fabiane Rodrigues, ex-secretária do PGZoo, pela ajuda, suporte e por sempre dedicar um pouco do seu tempo para ouvir os alunos aflitos.

Ao PGZoo pelo suporte aos pedidos feitos, fossem eles burocráticos ou financeiros.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zoologia por terem contribuído com a minha formação e o meu aprendizado.

Às professoras Marisa, Enelise e Tânia por terem aceitado o desafio de fazer parte do meu comitê de acompanhamento da tese. Agradeço enormemente pelas dicas, sugestões e aconselhamentos. Ao Murilo Marochi, por aceitar o meu convite de última hora para ser parte da minha banca defesa.

Ao professor Piero Calosi pela ótima oportunidade de passar um período no seu laboratório aprendendo mais sobre fisiologia e mudanças climáticas; e por demonstrar ser tão humano quanto qualquer um de nós. A todos os integrantes do laboratório MEEP (Marine Eco-Evolutionary Physiology) na Universidade do Quebec at Rimouski (UQAR). Ao técnico Jonathan Coudé pelo suporte em momentos de desespero (aparentemente, ser uma pessoa sensacional é pré requisito para ser técnico/secretário em programas de pós graduação ao redor do mundo). Ao Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP) pela bolsa de estudos e a todos na UQAR que me ajudaram com as questões burocráticas: *Merci !*

Ao Romildo do Rosário e a todos os pescadores do litoral paranaense que ajudaram e fizeram as coletas serem bem sucedidas; à todas as pessoas que ajudaram de alguma forma durante as saídas de campo.

À CAPES pela bolsa concedida durante esses 4,5 anos de Doutorado.

Agradecimentos especiais:

Ao André Lucas Cuenca (2° vez na lista), por simplesmente entender matemática básica e a sua aplicação em protocolos de diluição (e por ser alívio cômico eventual); À Ana Marta Schafaschek por sempre me ouvir (reclamando, na maior parte das vezes), por sempre me ajudar com pedidos ao colegiado, por me acompanhar nas coletas, embora sempre acontecesse algo incomum (Pneu furado? Polvo faminto tentando se enrolar no seu braço? Claro, por que não?) e principalmente por ser amiga acima de tudo; À Nicole Stakowian (2° vez na lista também) por ter se tornado a pessoa mais próxima de uma irmã que eu já tive (nada como estresse pós traumático para unir as pessoas), e claro, por saber o verdadeiro valor de R$ 20,00.

Ao seu Luiz (i*n memoriam*), por sempre ter nos recebido com imensa alegria todas as manhãs e por ter tornado o cardápio do RU melhor do que o de um restaurante três estrelas Michelin.

Aos meus familiares pelo apoio, suporte e ajuda.

Aos meus pais por cederem sua casa, comida e auxílio durante as coletas, pelo incentivo e por sempre estarem lá por mim.

“Nada nunca é igual. Seja um segundo mais tarde ou cem anos depois. Tudo está sempre se agitando e se revolvendo. E as pessoas mudam tanto quanto os oceanos.”

(O Oceano no Fim do Caminho – Neil Gaiman)

RESUMO GERAL

As mudanças climáticas afetam os ecossistemas estuarinos de forma prejudicial. As concentrações de CO_2 aumentam a temperatura média e causam acidificação dos oceanos. Estima-se que eventos climáticos extremos, como ondas de calor, tempestades e inundações aumentem em frequência e intensidade. Isso afetaria a dinâmica dos ecossistemas costeiros, aumentando as chances de ocorrerem fenômenos facilitados pelas mudanças climáticas, como invasões biológicas. Zonas costeiras como o Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP), são caracterizadas pela variação diária de temperatura, pH e salinidade. Essas regiões tendem a intensificar os desafios ambientais aos quais os organismos ali são submetidos, devido às mudanças climáticas em curso e que ainda estão por vir. Conhecer as respostas fisiológicas dos animais a essas mudanças é necessário para determinar como tais fenômenos podem potencialmente afetar a ocorrência, distribuição, abundância, bem-estar e risco de extinção local dessas espécies. Nessa tese foram investigadas as performances fisiológicas de crustáceos decápodes encontrados no CEP diante de desafios compatíveis com os cenários observados e previstos de alterações climáticas. Esses animais já se encontram próximos aos seus limites fisiológicos e podem ser mais suscetíveis a ondas de calor e acidificação do oceano. Nos dois primeiros capítulos avaliou-se a plasticidade fisiológica e eurihalinidade das espécies *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* sob aumento de temperatura (capítulo I) ou acidificação (capítulo II), simultaneamente com redução de salinidade. O terceiro capítulo teve ênfase na comparação entre *Charybdis hellerii* (invasor) e *Menippe nodifrons* (nativo), permitindo discutir a questão invasão versus mudanças climáticas. Os espécimes foram coletados, transportados para a UFPR e mantidos em aquários até a realização dos experimentos de aumento de temperatura ou acidificação em conjunto com hiposalinidade. Ao final dos experimentos, os animais foram crioanestesiados, eutanasiados e foi coletado material para as análises de osmolalidade, cloreto, magnésio, lactato e oxihemocianina (hemolinfa) e teor hídrico (músculo). Também foi analisado consumo de oxigênio, excreção de amônia e valores de pH na água. Ambas as espécies de *Callinectes* toleraram bem a exposição a hiposalinidade, porém em exposição conjunta com aumento de temperatura ou com acidificação, houve aumento na hidratação tecidual, consumo de oxigênio e excreção de amônia para *C. ornatus* (em ambos os capítulos). Isso corrobora a maior eurihalinidade de *C. danae* em relação a *C. ornatus*. No capítulo III, *C. hellerii* e *M. nodifrons* foram afetados pela exposição a hiposalinidade e também houve efeito sinérgico com aumento de temperatura, afetando *C. hellerii* em maior intensidade, representado pelo aumento na hidratação muscular, consumo de oxigênio e excreção de amônia. Nossos resultados sugerem que mesmo espécies relativamente eurialinas/euritérmicas (*C. ornatus*) e invasoras (*C. hellerii*) apresentam dificuldades em manter boas performances osmorregulatórias/metabólicas diante de aumento de temperatura e acidificação, sendo assim igualmente suscetíveis as mudanças climáticas.

Palavras-chave: osmorregulação; metabolismo; aquecimento; acidificação; invasão.

GENERAL ABSTRACT

Climate change has been shown to adversely affect marine and estuarine ecosystems. Concentrations of CO_2 increase the average temperature and cause ocean acidification. Extreme events related to climate change, such as heat waves, are estimated to increase in frequency and intensity. This would greatly affect the dynamics of coastal ecosystems, increasing the chances to occur other phenomena facilitated by climate change, such as biological invasions. Coastal zones such as the Paranaguá Estuarine Complex (PEC), are characterized by daily variation in temperature, pH and salinity. These regions tend to intensify the environmental challenges to which the organisms are submitted there, due to ongoing climate changes that are yet to come. And knowing the physiological responses of animals to these changes is necessary to determine how such phenomena affect the occurrence, distribution, abundance, well-being and risk of local extinction of these species. In this thesis, the physiological performances of decapod crustaceans found in the PEC were investigated in the face of climate change scenarios. The fact that these are close to their physiological limits makes them more susceptible to climate change. In the first two chapters, the physiological plasticity and eurihalinity of *Callinectes danae* and *Callinectes ornatus* were evaluated under increased temperature (chapter I) or acidification (chapter II), simultaneously with reduced salinity. The third chapter focused on the comparison between *Charybdis hellerii* (invasive) and *Menippe nodifrons* (native), allowing us to discuss the issue of invasion x climate change. The specimens were collected, transported to UFPR and kept in aquariums until the experiments occurred. At the end of the experiments, the individuals were cryoanesthetized, euthanized and material collected for the analysis of osmolality, chloride, magnesium, lactate and oxyhemocyanin (hemolymph) and water content (muscle). Oxygen consumption, ammonia excretion and pH values in water were also analyzed. Both *Callinectes* species tolerated exposure to hyposalinity well, but in combination with increased temperature or acidification, there was an increase in tissue hydration, oxygen consumption and ammonia excretion for *C. ornatus* (in both chapters). This corroborates the greater eurihalinity of *C. danae* in relation to *C. ornatus*, the latter being more sensitive to the combination of hyposalinity with heating or acidification. In chapter III, *C. hellerii* and *M. nodifrons* were affected by exposure to hyposalinity and there was a synergistic effect with increase in temperature, affecting *C. hellerii* in greater intensity, represented by the increase in muscle hydration, oxygen consumption and ammonia excretion. Our results allow us to state that even relatively eurihaline/eurythermic (*C. ornatus*) and invasive (*C. hellerii*) species presented difficulties in maintaining good osmoregulatory/metabolic performance in the face of temperature increase and acidification, thus being equally susceptible to climate change.

Key words: osmoregulation; metabolism; warming; acidification; invasion.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Osmolalidade da hemolinfa (A) e teor hídrico muscular (B) de *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* expostos as seguintes temperaturas: 26 °C (controle) e 30 °C, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. n = 6.....36

Figura 2. Concentração de cloreto (A) e concentração de magnésio (B) de *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* expostos as seguintes temperaturas: 26 °C (controle) e 30 °C, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas *: diferença entre a temperatura controle (26 °C) e experimental (30 °C) para cada espécie; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. n = 6.....38

Figura 3. Consumo de oxigênio (A), concentração de lactato (B) e amônia excretada na água de *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* expostos as seguintes temperaturas: 26 °C (controle) e 30 °C, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas *: diferença entre a temperatura controle (26 °C) e experimental (30 °C) para cada espécie; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. n = 6.....41

Figura 4. Valores iniciais e finais de pH na água de *Callinectes danae* (A) e *Callinectes ornatus* (B) expostos as seguintes temperaturas: 26 °C (controle) e 30 °C, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas. ≠: diferença entre os valores iniciais e finais de pH na água; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle em uma mesma temperatura. n = 6.....43

CAPÍTULO II

Figura 1. Osmolalidade da hemolinfa (A) e teor hídrico muscular (B) de *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* expostos aos seguintes valores de pH: 8,0 (controle) e 7,3, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas *: diferença entre pH controle (8,0) e experimental (7,3) para cada espécie; &: diferença entre as

salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. n = 6.....71

Figura 2. Concentração de cloreto (A) e concentração de magnésio (B) de *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* expostos aos seguintes valores de pH: 8,0 (controle) e 7,30, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas *: diferença entre pH controle (8,0) e experimental (7,3) para cada espécie; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. n = 6.....73

Figura 3. Consumo de oxigênio (A) e concentração de lactato (B) de *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* expostos aos seguintes valores de pH: 8,0 (controle) e 7,3, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas *: diferença entre pH controle (8,0) e experimental (7,3) para cada espécie; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. n = 6.....75

Figura 4. Amônia excretada na água (A) e concentração de oxihemocianina (B) de *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* expostos aos seguintes valores de pH: 8,0 (controle) e 7,3, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas *: diferença entre pH controle (8,0) e experimental (7,3) para cada espécie; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. n = 6.....77

CAPÍTULO III

Figura 1. Osmolalidade da hemolinfa (A) e teor hídrico muscular (B) de *Charybdis hellerii* e *Menippe nodifrons* expostos as seguintes temperaturas: 26 °C (controle) e 30 °C, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas *: diferença entre a temperatura controle (26 °C) e experimental (30 °C) para cada espécie; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. n = 6.....101

Figura 2. Concentração de cloreto (A) e concentração de magnésio (B) de *Charybdis hellerii* e *Menippe nodifrons* expostos as seguintes temperaturas: 26 °C (controle) e 30 °C, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas *: diferença

entre a temperatura controle (26 °C) e experimental (30 °C) para cada espécie; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. n = 6.....103

Figura 3. Consumo de oxigênio (A), concentração de lactato (B) e amônia excretada (C) de *Charybdis hellerii* e *Menippe nodifrons* expostos as seguintes temperaturas: 26 °C (controle) e 30 °C, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas *: diferença entre a temperatura controle (26 °C) e experimental (30 °C) para cada espécie; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. n = 6.....106

APÊNDICE I

Figura 1. Mortalidade de *Lepstaterias polaris, Asterias rubens*, *Crossaster papposus* e *Solaster endeca* expostos as seguintes temperaturas: 5 °C (controle), 9 °C (aquecimento global) e 13 °C (onda de calor) por 7 dias. n = 104.....140

Figura 2. Massa corporal de *Lepstaterias polaris, Asterias rubens*, *Crossaster papposus* e *Solaster endeca* expostos as seguintes temperaturas: 5 °C (controle), 9 °C (aquecimento global) e 13 °C (onda de calor) por 7 dias. n = 104.....141

Figura 3. Número de viradas de *Lepstaterias polaris, Asterias rubens*, *Crossaster papposus* e *Solaster endeca* expostos as seguintes temperaturas: 5 °C (controle), 9 °C (aquecimento global) e 13 °C (onda de calor) por 7 dias. n = 104.....142

Figura 4. Tempo de início das viradas (em segundos) de *Lepstaterias polaris, Asterias rubens*, *Crossaster papposus* e *Solaster endeca* expostos as seguintes temperaturas: 5 °C (controle), 9 °C (aquecimento global) e 13 °C (onda de calor) por 7 dias. n = 104.....143

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1. Osmolalidade (mOsm/kg.H_2O), teor hídrico (%) e concentrações iônicas de cloreto e magnésio (mM) em *Callinectes danae e Callinectes ornatus* após exposição a diferentes temperaturas (26 °C e 30 °C) e salinidades (35‰, 30‰, 25‰ e 20‰). Os dados foram representados pela média ± erro padrão. N = 6..... 39

TABELA 2. Consumo de oxigênio (µgO_2/g.weight.h), concentração de lactato na hemolinfa (mg/dL), excreção de amônia (µgNH_3/g.weight) e valores iniciais e finais de pH em *Callinectes danae e Callinectes ornatus* após exposição a diferentes temperaturas (26 °C e 30 °C) e salinidades (35‰, 30‰, 25‰ e 20‰). Os dados foram representados pela média ± erro padrão. N = 6.....44

CAPÍTULO II

TABELA 1. Osmolalidade (mOsm/kg.H_2O), teor hídrico (%) e concentrações iônicas de cloreto e magnésio (mM) em *Callinectes danae e Callinectes ornatus* após exposição a diferentes valores de pH (8,00 e 7,30) e salinidades (35‰, 30‰, 25‰ e 20‰). Os dados foram representados pela média ± erro padrão. N = 6.....74

TABELA 2. Consumo de oxigênio (µgO_2/g.weight.h), concentração de lactato na hemolinfa (mg/dL), excreção de amônia (µgNH_3/g.weight) e concentração de oxihemocianina em *Callinectes danae e Callinectes ornatus* após exposição a diferentes valores de pH (8,00 e 7,30) e salinidades (35‰, 30‰, 25‰ e 20‰). Os dados foram representados pela média ± erro padrão. N = 6.....78

CAPÍTULO III

TABELA 1. Osmolalidade (mOsm/kg.H_2O), teor hídrico (%) e concentrações iônicas de cloreto e magnésio (mM) em *Charybdis hellerii e Menippe nodifrons* após exposição a diferentes temperaturas (26 °C e 30 °C) e salinidades (35‰, 30‰, 25‰ e 20‰). Os dados foram representados pela média ± erro padrão. N = 6.....104

TABELA 2. Consumo de oxigênio (µgO_2/g.weight.h), concentração de lactato na hemolinfa (mg/dL), excreção de amônia (µgNH_3/g.weight) em *Charybdis hellerii e Menippe nodifrons* após exposição a diferentes temperaturas (26 °C e 30 °C) e

salinidades (35‰, 30‰, 25‰ e 20‰). Os dados foram representados pela média ± erro padrão. N = 6.....107

SUMÁRIO

PRÓLOGO **18**

REFERÊNCIAS **22**

CAPÍTULO I – RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE CRUSTÁCEOS CONGÊNERES ACLIMATADOS A PREVISÕES DE ONDAS DE CALOR **25**

RESUMO **26**

ABSTRACT **27**

1 INTRODUÇÃO **28**

2 MATERIAL E MÉTODOS **31**

2.1 OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES, TRANSPORTE E ACLIMATAÇÃO 31

2.2 EXPERIMENTOS 31

2.3 RETIRADA DE AMOSTRAS E PARÂMETROS ANALISADOS 32

2.4 OSMOLALIDADE E TEOR HÍDRICO 32

2.4 CONCENTRAÇÕES DE CLORETO, MAGNÉSIO E LACTATO 33

2.5 CONSUMO DE OXIGÊNIO 33

2.6 AMÔNIA EXCRETADA E VALORES DE PH NA ÁGUA 34

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA 34

3 RESULTADOS **35**

3.1 OSMOLALIDADE DA HEMOLINFA 35

3.2 HIDRATAÇÃO TECIDUAL MUSCULAR 35

3.3 CONCENTRAÇÃO DE CLORETO NA HEMOLINFA 37

3.4 CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO NA HEMOLINFA 37

3.5 CONSUMO DE OXIGÊNIO 39

3.6 CONCENTRAÇÃO DE LACTATO NA HEMOLINFA 39

3.7 AMÔNIA EXCRETADA NA ÁGUA 39

3.8 VALORES INICIAIS E FINAIS DE pH 42

4 DISCUSSÃO 45
4.1 RESPOSTAS OSMORREGULATÓRIAS 46
4.2 RESPOSTAS METABÓLICAS 49
5 CONCLUSÃO 52
REFERÊNCIAS 53
CAPÍTULO II – CAPACIDADE OSMORREGULATÓRIA/METABÓLICA DE DECÁPODES DO GÊNERO *CALLINECTES* SUBMETIDOS A VARIAÇÃO DE SALINIDADE E ACIDIFICAÇÃO 60
RESUMO 61
ABSTRACT 62
1 INTRODUÇÃO 63
2 MATERIAL E MÉTODOS 66
2.1 OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS 66
2.2 EXPERIMENTOS 66
2.3 RETIRADA DE AMOSTRAS E PARÂMETROS ANALISADOS 67
2.4 OSMOLALIDADE E TEOR HÍDRICO 67
2.5 CONCENTRAÇÕES DE CLORETO, MAGNÉSIO E LACTATO 67
2.6 CONSUMO DE OXIGÊNIO 68
2.7 AMÔNIA EXCRETADA E CONCENTRAÇÃO DE OXIHEMOCIANINA 68
2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA 69
3 RESULTADOS 70
3.1 OSMOLALIDADE DA HEMOLINFA 70
3.2 HIDRATAÇÃO TECIDUAL MUSCULAR 70
3.3 CONCENTRAÇÃO DE CLORETO NA HEMOLINFA 72
3.4 CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO NA HEMOLINFA 72
3.5 CONSUMO DE OXIGÊNIO 74
3.6 CONCENTRAÇÃO DE LACTATO NA HEMOLINFA 74
3.7 AMÔNIA EXCRETADA NA ÁGUA 76

3.8 CONCENTRAÇÃO DE OXIHEMOCIANINA....76

4 DISCUSSÃO....79

5 CONCLUSÃO....85

REFERÊNCIAS....86

CAPÍTULO III – PERFORMANCES FISIOLÓGICAS DO INVASOR *CHARYBDIS HELLERI* (DECAPODA: PORTUNIDAE) E DA ESPÉCIE NATIVA *MENIPPE NODIFRONS* (DECAPODA: MENIPPIDAE) EXPOSTOS A DESAFIOS TÉRMICOS/SALINOS....90

RESUMO....91

ABSTRACT....92

1 INTRODUÇÃO....93

2 MATERIAL E MÉTODOS....96

2.1 OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES, TRANSPORTE E ACLIMATAÇÃO....96

2.2 EXPERIMENTOS....96

2.3 RETIRADA DE AMOSTRAS E PARÂMETROS ANALISADOS....97

2.4 OSMOLALIDADE E TEOR HÍDRICO....97

2.5 CONCENTRAÇÕES DE CLORETO, MAGNÉSIO E LACTATO....98

2.6 CONSUMO DE OXIGÊNIO....98

2.7 EXCREÇÃO DE AMÔNIA NA ÁGUA....98

2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA....99

3 RESULTADOS....100

3.1 OSMOLALIDADE DA HEMOLINFA....100

3.2 HIDRATAÇÃO TECIDUAL MUSCULAR....100

3.3 CONCENTRAÇÃO DE CLORETO NA HEMOLINFA....102

3.4 CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO NA HEMOLINFA....102

3.5 CONSUMO DE OXIGÊNIO....104

3.6 CONCENTRAÇÃO DE LACTATO NA HEMOLINFA....104

3.7 AMÔNIA EXCRETADA NA ÁGUA....104

4 DISCUSSÃO **108**

5 CONCLUSÃO **113**

REFERÊNCIAS **114**

EPÍLOGO **120**

APÊNDICE I – DOUTORADO SANDUÍCHE: ANÁLISE DA FISIOLOGIA TÉRMICA E COMPORTAMENTO DE QUATRO ESPÉCIES DE ESTRELAS-DO-MAR DO ESTUÁRIO DE SAINT LAWRENCE, CANADÁ **121**

1 INTRODUÇÃO **121**

2 MATERIAL E MÉTODOS **122**

2.1 COLETA, TRANSPORTE E MANUTENÇÃO DAS ESPÉCIES 122

2.2 DESENHO EXPERIMENTAL 123

2.3 TESTE DE COMPORTAMENTO E MORTALIDADE 123

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 124

3 RESULTADOS **124**

3.1 MORTALIDADE 124

3.2 ENSAIO COMPORTAMENTAL 125

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO **128**

REFERÊNCIAS **130**

REFERÊNCIAS GERAIS **132**

PRÓLOGO

As mudanças climáticas podem ser definidas como a variação do clima em escala global ou dos climas regionais da Terra ao longo do tempo, afetando o equilíbrio de ecossistemas já estabelecidos. Entre os principais componentes das mudanças climáticas está o aumento da temperatura média do planeta, que tem origem em causas naturais e de forma significativa por ação antrópica, principalmente pela liberação de gases responsáveis pelo efeito estufa. Entre esses gases, está o CO_2, um dos principais responsáveis pela acidificação dos oceanos (IPCC, 2014). A Organização das Nações Unidas (ONU) publica um relatório periódico resumindo os estudos feitos sobre as mudanças climáticas em todo o planeta, o IPCC (Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas). Esses estudos demonstram que a intensidade e frequência de eventos relacionados direta ou indiretamente as mudanças climáticas tende a aumentar durante o próximo século (STILLMAN, 2019; UMMENHOFER; MEEHL, 2017). Entre esses eventos, podemos citar os que ocorrem de forma extrema, como ondas de calor e inundações; e os eventos que ocorrem de maneira gradual, como o aquecimento global, a acidificação de águas oceânicas costeiras, alterações de rotas migratórias, diminuição ou aumento de salinidade em baías e estuários (CALOSI et al., 2017; MADEIRA et al., 2012; VINAGRE et al., 2018).

Desde meados do século XIX, mais especificamente após a revolução industrial, tem sido observada a tendência de aumento da temperatura média do planeta em 0,85±0,20 °C, devido principalmente a liberação de gases responsáveis pelo efeito estufa, como metano e CO_2 (CALDEIRA; WICKETT, 2005; ORR et al., 2005). Evidências apontam que há uma tendência de aumento na velocidade de aquecimento nos últimos 15 anos (IPCC, 2014). Esse aumento só pode ser explicado de forma satisfatória se levarmos em conta a ação antrópica, como industrialização, queimadas, criação em enormes rebanhos, de animais ruminantes (geradores de metano, outro gás de efeito estufa) de grande porte destinados ao consumo humano, uso de combustíveis fosseis, etc, que pode ter interrompido uma tendência natural de resfriamento do planeta observado nos últimos milhares de anos (IPCC, 2014). Dentre as evidências observadas do aquecimento global, está o aumento na temperatura média e umidade atmosférica, ondas de calor mais frequentes e duradouras, retração de geleiras, diminuição da área coberta por neve, migração e consequente invasão

de animais e vegetais oriundos de climas quentes em direção a regiões com clima mais ameno, como os polos (PARMESAN, 2006; PARMESAN; YOHE, 2003).

O aumento ou manutenção de elevadas concentrações de gases do efeito estufa, principalmente o CO_2, aumenta a temperatura, ocasiona elevação dos níveis dos mares e altera propriedades químicas dos oceanos, que são os maiores sequestradores de CO_2 da atmosfera (FEELY; SABINE; FABRY, 2006; ORR et al., 2005). Essa elevada concentração de CO_2 torna as águas mais ácidas do que antes da era industrial, diminui as concentrações de oxigênio e altera as respostas metabólicas de espécies de vários táxons, como corais, moluscos e peixes (KROEKER; MICHELI; GAMBI, 2013; WEATHERDON et al., 2016). A resposta desses organismos a acidificação vai depender de vários fatores, como complexidade biológica, nível taxonômico, plasticidade fisiológica, capacidade adaptativa, história evolutiva, etc (MELZNER et al., 2020; WHITELEY et al., 2018).

Além das alterações na temperatura e acidificação, há indícios de que as mudanças climáticas também estejam alterando a dinâmica na salinidade de estuários, baías e regiões costeiras. Essas alterações são complexas e as vezes aparentemente contraditórias, como a variação de salinidade a curto prazo devido a eventos extremos. Por exemplo, ondas de calor causam evaporação momentânea e aumentam a salinidade, ou grandes inundações causadas por tempestades diminuem a salinidade de forma súbita (VALIELA et al., 2012; WACKER; HARZSCH, 2021). A longo prazo, há uma tendência de diminuição de salinidade, devido principalmente ao degelo de regiões polares e mudanças nos regimes de chuvas em decorrência de alterações no padrão da umidade atmosférica (IPCC, 2014).

As mudanças climáticas também podem ter efeitos indiretos, alterando a dinâmica de ecossistemas aquáticos através da facilitação do processo de invasão de espécies exóticas, e pode ser um dos fatores responsáveis pelo estabelecimento ou não de uma população de organismos invasores (DUKES; MOONEY, 1999; WALTHER et al., 2009). O processo de aquecimento global pode diminuir a cobertura de gelo em regiões como o Ártico e liberar rotas migratórias até então indisponíveis para as espécies invasoras, assim como ondas de calor podem dizimar populações locais, abrindo espaço para a ocupação desse nicho por espécies invasoras (OCCHIPINTI-AMBROGI; GALIL, 2010; REID et al., 2007). Além disso, a atuação antrópica é um fator preponderante no processo de facilitação das invasões

biológicas. É bem conhecido a disseminação de espécies aquáticas invasoras através de cultivos que permitem o escape de indivíduos, aquarismo irresponsável, alterações da geografia local, como construção de canais e barragens, além do transporte internacional realizado por embarcações (RAHEL; OLDEN, 2008). Embora as mudanças climáticas possam ser associadas em certo grau ao processo de invasão, pouco se sabe como processos como aquecimento, acidificação e mudança nos regimes de salinidades impactam a dinâmica entre espécies nativas e invasoras.

De acordo com a Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima, o quinto relatório de avaliação do IPCC sugere a possibilidade de que o aquecimento global possa ultrapassar muito a faixa de 2°C até 2100, o que poderia ter consequências catastróficas para a estabilidade dos ecossistemas, e consequentemente, influenciando negativamente as atividades humanas (IPCC, 2014). Ainda durante o quinto relatório de avaliação do IPCC foram divulgadas quatro projeções de modelos globais de clima (RCPs) que analisam vários cenários de emissão de gases e a estimativa de aumento de temperatura de cada um deles até 2100. Os RCPs foram chamados de RCP 2.6, 4.5, 6.0 e 8.5. Destas projeções, o RCP 6.0 prevê que a temperatura global aumente por volta de 4 °C até 2100 se a velocidade de emissão dos gases do efeito estufa continuar no mesmo ritmo que se encontra atualmente, causando danos aos ecossistemas atingidos que podem ser irreversíveis (IPCC, 2014).

Dentre os ecossistemas afetados pelas mudanças climáticas, as águas costeiras tendem a ser fortemente impactadas. Essas regiões são caracterizadas pela sua dinâmica variável de condições abióticas, enormes disponibilidades de recursos e forte interações ecológicas entre os seus habitantes, sejam eles residentes ou passageiros (BYRNE; PRZESLAWSKI, 2013; QUEIROZ et al., 2006). O sistema costeiro representa uma interface oceano-continente, o que o torna vulnerável aos principais fatores que representam as mudanças climáticas, como ondas de calor, acidificação, alterações de salinidade, invasões biológicas e aumento do nível dos oceanos (DUKES; MOONEY, 1999; HEWITT; ELLIS; THRUSH, 2016). Como parte do sistema costeiro, estão os sistemas estuarinos, entre eles, o Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP), localizado no litoral paranaense. O CEP é um importante sistema dinâmico onde ocorre manguezais preservados, áreas de proteção ambiental, pesca (artesanal e comercial), atividades portuárias e densa concentração urbana, além da

presença de muitas espécies de invertebrados marinhos/estuarinos, como crustáceos decápodes (PICHLER et al., 2015).

Um dos táxons de crustáceos mais representativos do CEP são as espécies da família Portunidae, composta pelos chamados siris, decápodes braquiúros que possuem grande relevância econômica e ecológica para a região. Os siris possuem uma série de adaptações morfológicas ajustadas para o ambiente aquático, como o último par do pereiópodo em formato de remo, uma série de dentes na lateral da carapaça, além de um corpo achatado dorso-ventralmente que aumenta a hidrodinâmica no momento da natação, tornando essas espécies conhecidas por seus movimentos ágeis de curta duração (MELO, 1996; WATT; WHITELEY; TAYLOR, 1999).

No CEP, os portunídeos são representados principalmente por espécies do gênero *Callinectes*, como *C. danae* e *C. ornatus*, porém recentemente foi constatado a existência de uma população de siri invasor oriundo do Pacífico, a espécie *Charybdis hellerii*. Além da competição por recursos com as espécies nativas de portunídeos, *C. hellerii* também compete com decápodes semi-terrestres, como as espécies pertencentes a família Menippidae, por exemplo, *Menippe nodifrons*. Tanto *C. hellerii* quanto *M. nodifrons* possuem hábitos ecológicos diferentes dos portunídeos locais, como *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* (OCCHI et al., 2019; SANT'ANNA et al., 2012).

Dessa maneira, nunca houve um momento em que o conhecimento sobre as respostas fisiológicas dessas espécies de crustáceos às mudanças climáticas têm sido tão imprescindível, dada a necessidade de gerar conhecimento sobre como o aumento das temperaturas, eventos extremos, acidificação e invasões biológicas tem afetado o bem estar, distribuição, abundância e risco de extinção de diversas espécies dos ecossistemas estuarinos. As populações de crustáceos decápodes que habitam o CEP possuem importância tanto econômica quanto ecológica para o desenvolvimento sustentável dessa região do litoral paranaense, porém o que se sabe sobre a sua resposta fisiológica a estressores abióticos, principalmente em decorrência das mudanças climáticas em curso, é muito pouco comparado com a importância dessas espécies para bom funcionamento do ecossistema local.

REFERÊNCIAS

BYRNE, M.; PRZESLAWSKI, R. Multistressor impacts of warming and acidification of the ocean on marine invertebrates' life histories. **Integrative and Comparative Biology**, v. 53, n. 4, p. 582–596, 2013.

CALDEIRA, K.; WICKETT, M. E. Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. **Journal of Geophysical Research**, v. 110, n. C9, p. C09S04, 16 jul. 2005.

CALOSI, P. et al. Regional adaptation defines sensitivity to future ocean acidification. **Nature Communications**, v. 8, n. January, p. 13994, 9 jan. 2017.

DUKES, J. S.; MOONEY, H. A. Does global change increase the success of biological invaders? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 4, p. 135–139, abr. 1999.

FEELY, R. A.; SABINE, C. L.; FABRY, V. J. Carbon dioxide and our ocean legacy. **Science Brief**, p. 1–3, 2006.

HEWITT, J. E.; ELLIS, J. I.; THRUSH, S. F. Multiple stressors, nonlinear effects and the implications of climate change impacts on marine coastal ecosystems. **Global change biology**, v. 22, n. 8, p. 2665–2675, 2016.

IPCC, 2014. In: **Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Geneva: IPCC, p. 151, 2014.

KROEKER, K. J.; MICHELI, F.; GAMBI, M. C. Ocean acidification causes ecosystem shifts via altered competitive interactions. **Nature Climate Change**, v. 3, n. 2, p. 156–159, 9 fev. 2013.

MADEIRA, D. et al. Thermal tolerance and potential impacts of climate change on coastal and estuarine organisms. **Journal of Sea Research**, v. 70, p. 32–41, maio 2012.

MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro**. Ed. Plêiade / Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. 1996.

MELZNER, F. et al. Ocean Acidification and Coastal Marine Invertebrates: Tracking CO2 Effects from Seawater to the Cell. **Annual Review of Marine Science**, v. 12, p. 499–523, 2020.

OCCHI, T. V. T. et al. Use of osmoregulatory ability to predict invasiveness of the Indo-Pacific swimming crab *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) an invader in Southern Brazil. **Nauplius**, v. 27, p. 1–6, 2019.

OCCHIPINTI-AMBROGI, A.; GALIL, B. Marine alien species as an aspect of global change. **Advances in Oceanography and Limnology**, v. 1, n. 1, p. 199–218, 2010.

ORR, J. C. et al. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 681–686, set. 2005.

PARMESAN, C. Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 37, n. 1, p. 637–669, dez. 2006.

PARMESAN, C.; YOHE, G. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. n. 6918, p. 37–42, 2 jan. 2003.

PICHLER, H. A. et al. Environmental influences on resident and transient fishes across shallow estuarine beaches and tidal flats in a Brazilian World Heritage area. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 164, p. 482–492, out. 2015.

QUEIROZ, G. M. N. et al. Caracterização da ictiofauna demersal de duas áreas do complexo estuarino de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Biociências**, v. 14, n. 2, p. 112–124, 2006.

RAHEL, F. J.; OLDEN, J. D. Assessing the effects of climate change on aquatic invasive species. **Conservation Biology**, v. 22, n. 3, p. 521–533, 2008.

REID, P. C. et al. A biological consequence of reducing Arctic ice cover: arrival of the Pacific diatom *Neodenticula seminae* in the North Atlantic for the first time in 800 000 years. **Global Change Biology**, v. 13, n. 9, p. 1910–1921, set. 2007.

SANT'ANNA, B. 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**, v. 7, n. 3, p. 347–356, 2012.

STILLMAN, J. H. Heat waves, the new normal: Summertime temperature extremes will impact animals, ecosystems, and human communities. **Physiology**, v. 34, n. 2, p. 86–100, 2019.

UMMENHOFER, C. C.; MEEHL, G. A. Extreme weather and climate events with ecological relevance: a review. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1723, p. 20160135, 19 jun. 2017.

VALIELA, I. et al. Increased rainfall remarkably freshens estuarine and coastal waters on the Pacific coast of Panama: Magnitude and likely effects on upwelling and nutrient supply. **Global and Planetary Change**, v. 92–93, p. 130–137, 2012.

VINAGRE, C. et al. Ecological traps in shallow coastal waters-Potential effect of heat-waves in tropical and temperate organisms. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–17, 2018.

WACKER, A.; HARZSCH, S. Crustaceans in a changing world. **Zoology**, v. 146, n. March, p. 125921, 2021.

WALTHER, G.-R. et al. Alien species in a warmer world: risks and opportunities. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 24, n. 12, p. 686–693, dez. 2009.

WATT, A. J. .; WHITELEY, N. .; TAYLOR, E. . An in situ study of respiratory variables in three British sublittoral crabs with different routine rates of activity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 239, n. 1, p. 1–21, jun. 1999.

WEATHERDON, L. V. et al. Observed and projected impacts of climate change on marine fisheries, aquaculture, coastal tourism, and human health: An update. **Frontiers in Marine Science**, v. 3, n. APR, 2016.

WHITELEY, N. M. et al. Sensitivity to near-future CO 2 conditions in marine crabs depends on their compensatory capacities for salinity change. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

CAPÍTULO I – RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE CRUSTÁCEOS CONGÊNERES ACLIMATADOS A PREVISÕES DE ONDAS DE CALOR

RESUMO

As mudanças climáticas afetam o planeta de diferentes formas, podendo ter consequências diretas ou indiretas sobre os ecossistemas, além de ter o seu efeito potencializado através de ação antrópica. Eventos climáticos extremos, como ondas de calor, tendem a se tornar mais frequentes e intensos. Os ecossistemas costeiros estão ameaçados pelas mudanças climáticas, embora as espécies que habitem tal região possuam mecanismos que permitem a elas suportarem a intensa variação abiótica diária e sazonal. Em um cenário de mudanças climáticas, é essencial saber se esses mecanismos existentes são suficientes para manter a viabilidade dessas populações. Neste capítulo buscamos avaliar a performance fisiológica (osmorregulação e metabolismo) dos crustáceos decápodes *Callinectes danae* e *C. ornatus,* aclimatados a um cenário semelhante às previsões de futuras ondas de calor. Espécies de *Callinectes* possuem mecanismos fisiológicos suficientes para que possam se ajustar ao aumento gradual de temperatura, uma vez que habitam ambientes estuarinos, mas podem não tolerar eventos climáticos extremos. Os espécimes foram coletados no Complexo Estuarino de Paranaguá-PR (CEP) e permaneceram em aquários para uma primeira aclimatação às condições controle. Após este período, houve nova aclimatação à 30 °C, simulando uma onda de calor. Ao final deste segundo período, foram realizados experimentos de diminuição de salinidade (35, 30, 25 e 20‰) simultaneamente com aumento de temperatura (de 26°C para 30 °C). Ao final dos experimentos, os animais foram crioanestesiados, eutanasiados e foi coletado material para as análises de osmolalidade, cloreto, magnésio e lactato (hemolinfa); além de teor hídrico (músculo). Também foi analisado consumo de oxigênio, excreção de amônia e foi medido o pH da água. Ambas as espécies de *Callinectes* toleraram bem a exposição a hiposalinidade, porém em exposição simultânea com aumento de temperatura, houve aumento na hidratação tecidual, consumo de oxigênio e excreção de amônia para *C. ornatus*. Isso corrobora a maior plasticidade fisiológica de *C. danae* em relação *a C. ornatus*, revelando maior nicho fundamental (incluindo salinidade e temperatura) de *C. danae* em relação ao seu congênere menos tolerante. Essas populações de *Callinectes* encontradas no CEP possuem alto valor ecológico e econômico, porém não haviam estudos de como essas espécies são afetadas pelo efeito sinérgico de fatores abióticos estressantes como temperatura e salinidade. Utilizando biomarcadores de osmorregulação e metabolismo, nossos resultados sugerem que mesmo espécies estuarinas eurihalinas e euritérmicas podem ter suas performances fisiológicas comprometidas. Dessa forma, essas espécies podem ter dificuldades em responder aos desafios imposto pelas mudanças climáticas, principalmente se forem expostas a fenômenos climáticos como ondas de calor com maior frequência e intensidade.

Palavras-chave: Eventos extremos, Osmorregulação, Brachyura.

ABSTRACT

Climate change affects the planet in different ways, it can have direct or indirect consequences on ecosystems and have its effect being potentiated through anthropic action. Extreme events, like heat waves tend to become more frequent and intense. Estuarine ecosystems are threatened by climate change, although the species that inhabit this region have mechanisms that allow them to withstand the intense abiotic daily and seasonal variation. In a climate change scenario, it is essential to know whether these existing mechanisms will be sufficient to maintain the viability of these populations. In this chapter, we seek to evaluate the physiological performance (osmoregulation and metabolism) of the decapod crustacean *Callinectes danae* and *C. ornatus*, acclimated to a scenario similar to the predicted characteristics of heat waves. *Callinectes* have enough physiological mechanisms that they can adjust to the gradual increase in temperature, but maybe not to extreme climate events, such as the heat waves. The specimens were collected in the Estuarine Complex of Paranaguá-PR (ECP) and kept in aquariums for a first acclimatization to control conditions. After this period, there was a new acclimatization in order to acclimate the individuals to a sudden increase in temperature. After this second period, experiments were carried out with variation in salinity (35, 30, 25 and 20‰) together with an increase in temperature (26 °C to 30 °C). At the end of the experiments, the animals were cryoanesthetized, euthanized and material collected for the analysis of osmolality, chloride, magnesium and lactate (hemolymph); in addition to water content (muscle). Oxygen consumption, ammonia excretion and water pH values were also analyzed. Both species of *Callinectes* tolerated exposure to hyposalinity well, but in combination with increased temperature, there was an increase in tissue hydration, oxygen consumption and ammonia excretion for *C. ornatus*. This corroborates the greater physiological plasticity of *C. danae* in relation to *C. ornatus*, revealing a greater fundamental niche (including salinity and temperature) of *C. danae* in relation to its less tolerant congener. These populations of *Callinectes* found in ECP have high ecological and economic value, but there were no studies on how these species are affected by the synergistic effect of stressful abiotic factors such as temperature and salinity. Using osmoregulation and metabolism biomarkers, our results suggest that even euryhaline and eurythermic estuarine species can have their physiological performance compromised. Thus, these species may have difficulties in responding to the challenges posed by climate change, especially if they are exposed to climatic phenomena such as heat waves with greater frequency and intensity.

Keywords: Extreme events; Osmoregulation; Brachyura.

1 INTRODUÇÃO

Um número cada vez maior de estudos vem apontando para o aumento na frequência e intensidade dos chamados eventos climáticos extremos, como ciclones, tornados, chuvas, secas, estiagem, nevascas e ondas de frio e calor (MADEIRA et al., 2018; IPCC, 2014; STILLMAN, 2019; UMMENHOFER; MEEHL, 2017). Em muitas regiões do planeta, o verão tem se tornado perigoso devido a altas taxas de mortalidade em decorrência das ondas de calor do início deste século (STILLMAN, 2019; UMMENHOFER; MEEHL, 2017). A frequência e a intensidade das ondas de calor registradas atualmente são as maiores dos últimos 150 anos e tem exposto a vida selvagem a temperaturas extremas, desafiando os mecanismos de defesa que esses organismos possuem (IPCC, 2014; STILLMAN, 2019).

Eventos extremos ligados a temperatura afetam diversos ecossistemas, como os ambientes estuarinos. Desse modo, o entendimento de como as espécies residentes de estuários respondem a esse tipo de estresse é útil, por exemplo, para a obtenção de dados mais precisos que alimentem modelos que preveem distribuição de espécies estuarinas (MADEIRA et al., 2018; UMMENHOFER; MEEHL, 2017). Ondas de calor afetam o limite térmico suportado pelos animais, que pode mudar de acordo com processos passivos e ativos, que ocorrem durante e após a exposição a temperaturas extremas (MADEIRA et al., 2012; WILLIAMS et al., 2016). Processos passivos incluem perda da homeostase metabólica, osmótica e iônica, piorando progressivamente durante o tempo de exposição. O dano acumulado e a energia perdida durante esses eventos (chamados de limites sub-letais) tornam a sobrevivência dependente da intensidade e frequência da exposição ao aumento de temperatura (PÖRTNER, 2001; WILLIAMS et al., 2016).

Como os limites de tolerância térmica são dependentes de vários fatores, como intensidade de exposição e plasticidade fisiológica, eles podem ser alterados por aclimatação e capacidade de aclimatização. Por sua vez, existem várias interações entre os níveis funcionais e estruturais do organismo, que limitam o aumento da janela de tolerância térmica (PORTNER; KNUST, 2007). A aclimatação refere-se a mudanças adaptativas em resposta a uma única variável climática. A aclimatização resulta de ajustes fisiológicos adaptativos duradouros, que levam a

aumento de tolerância a contínuas ou repetitivas exposições a vários estressores climáticos (SOMERO, 2010).

Estudos sobre a sensibilidade de ectotérmicos a aumento de temperatura tem apontado para o alto risco de extinção em baixas latitudes nas regiões marinhas (DEUTSCH et al., 2008; PINSKY et al., 2019) e também para níveis variados de ameaça para congêneres que são encontrados na mesma latitude, mas em níveis de estratificação vertical diferentes, por exemplo em costões rochosos de região entre-marés (STILLMAN; SOMERO, 2000). Esses estudos podem levar a uma importante generalização: as espécies atualmente com maior tolerância ao aquecimento estão entre as mais ameaçadas de extinção em vista do atual cenário de aquecimento do planeta, pelo fato de que esses organismos estão muito próximos de exceder os seus limites de tolerância térmicos, além de apresentar menor capacidade de plasticidade fisiológica (SOMERO, 2011; TOMANEK, 2008; VERBERK et al., 2016).

Entre as várias formas de tentar compreender como os efeitos das mudanças climáticas afetam a capacidade de sobrevivência e adaptação de várias espécies, destacam-se os estudos comparativos entre espécies de um mesmo gênero adaptadas a diferentes condições ambientais. Por exemplo, o estudo comparativo entre três espécies de moluscos de costão rochoso do gênero *Tegula* (*T. brunnea*, *T. montrereyi* e *T. funebralis*) demostrou que a habilidade de aclimatação da espécie mais euritérmica (*T. funebralis*) é limitada, justamente por estar mais próxima do seu limite de tolerância (SOMERO, 2011; TOMANEK, 2008). Esses estudos comparativos permitem diferenciar a resposta adaptativa/fisiológica dos efeitos exclusivamente da proximidade filogenética e sua aplicabilidade é muito ampla, seja em regiões com estratificação vertical, como costões rochosos, ou regiões de estratificação horizontal, como estuários.

Estuários como o Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP), são áreas marinhas costeiras salinas que recebem aporte de água doce, caracterizados por grandes variações de salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido, pH e quantidade de nutrientes (QUEIROZ et al., 2006). Habitantes de estuários e águas continentais devem apresentar alguma capacidade osmorregulatória, seja regulação anisosmótica extracelular e/ou regulação isosmótica intracelular (FARIA; AUGUSTO; MCNAMARA,

2011; FREIRE et al., 2008; HENRY et al., 2012), para que eles possam suportar a variação cíclica e diária da salinidade em ambientes estuarinos.

Entre as espécies que habitam os estuários, encontram-se *Callinectes danae* (Smith, 1869) e *Callinectes ornatus* (Ordway, 1863*),* crustáceos decápodes encontrados com facilidade em todo litoral ao longo da costa do Brasil, sendo que a sua maior abundância ocorre nos meses de verão e inverno (MANTELATTO; FRANSOZO, 2000). Crustáceos do gênero *Callinectes* são chamados de osmorreguladores fracos, pois conseguem a captação de sal de águas salinas diluídas, salobras, mas não de água doce. Eles são capazes de alternar o padrão osmorregulador para osmoconformador ou vice-versa, quando alternam entre o mar e estuário, especialmente em época de reprodução, pois a desova sempre ocorre em ambiente mais salino (MANTELATTO; FRANSOZO, 2000). Essa migração em período reprodutivo é maior para as populações de *C. danae*, que habitam regiões do estuário mais próxima da foz dos rios enquanto *C. ornatus* é encontrado em regiões de maior salinidade, mais próximo ao oceano (MANTELATTO; FRANSOZO, 2000; SEVERINO-RODRIGUES et al., 2009)

Neste capítulo, buscamos avaliar como *C. danae* e *C. ornatus* reagem a simulações de ondas de calor, através da sua performance fisiológica (osmorregulação e metabolismo). Apesar da importância dessas espécies aos ecossistemas estuarinos, tanto do ponto de vista ecológico quanto econômico, não se sabe como *C. danae* e *C. ornatus* são afetadas pela combinação de fatores abióticos estressantes, como temperatura e salinidade. Ambas as espécies foram aclimatadas a um cenário semelhante a ondas de calor, e expostas a experimentos de aumento de temperatura em conjunto com variação de salinidade. Espécies de *Callinectes*, por habitarem regiões da alta instabilidade, possuem mecanismos fisiológicos suficientes para que possam se ajustar ao aumento gradual de temperatura, porém, por estarem próximos aos seus limites de tolerância, podem não ser capazes de tolerar aumentos súbitos de temperatura, como ocorre durante as ondas de calor.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES, TRANSPORTE E ACLIMATAÇÃO

Espécimes de *Callinectes danae* foram coletados através de captura por armadilhas cilíndricas dispostas na Baía de Paranaguá, Paraná (25°31'44.3"S 48°28'23.1"W), enquanto os indivíduos de *Callinectes ornatus* foram obtidos através do descarte da fauna acompanhante da pesca com rede de arrasto de camarão na praia de Shangrilá, Pontal do Paraná, Paraná (25°37'29” S 48°25'3” W). De imediato, os animais foram acomodados em caixas plásticas contendo água do local de coleta e mantidos sob aeração constante e transportados para o laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO) do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná. No LFCO, os animais permaneceram em aquário estoque de 250 litros contendo água do mar durante sete dias com aeração constante, filtro externo, salinidade ± 35‰, temperatura de 26 °C, pH ± 8,3, oxigênio dissolvido na água em torno de 8,0 mg/L e fotoperíodo natural. Os valores das condições abióticas para aclimatação foram decididos com base em estudos da qualidade da água na Baía de Paranaguá pela empresa particular responsável pela administração do porto, em levantamentos realizados nos últimos 5 anos. Os animais foram alimentados com pedaços pequenos de filé de peixe a cada dois dias, sendo que a alimentação foi encerrada 24 horas antes dos experimentos. Após esse período, alguns indivíduos foram utilizados para os experimentos controle, em temperatura de 26 °C e redução de salinidade (descritos com mais detalhes na próxima sessão). Os demais espécimes foram aclimatados todos juntos no mesmo aquário estoque (densidade de 1 indivíduo/litro) durante sete dias ao aumento de temperatura equivalente a 4 °C acima da média anual encontrada no verão (26 °C para 30 °C). Os demais parâmetros na água do aquário estoque continuaram os mesmos e o aumento da temperatura foi feito através de aumento gradual de 0,5 °C por hora (entre 8h00 e 16h00) durante o primeiro dos sete dias de aclimatação a temperatura mais elevada.

2.2 EXPERIMENTOS

Para o design experimental foram utilizados duas temperaturas (26 e 30 °C) e quatro salinidades (35, 30, 25 e 20‰). As foram baseadas na média de temperatura do verão na Baía de Paranaguá (controle) e em projeções de aumento de temperatura realizadas pelo IPCC. Já os valores de salinidade foram baseados na variação de maré diária que ocorre no local. Os experimentos foram realizados através da transferência de indivíduos adultos (machos e fêmeas) em jejum do aquário estoque para aquários individuais preenchidos com 2 litros de água salgada ou salobra, obtida junto ao local de coleta dos animais. Os grupos controles foram mantidos em 26 °C e expostos a desafios salinos de redução de salinidade: 35‰ (salinidade controle), 30, 25 e 20‰, pelo período de seis horas. Os grupos experimentais foram mantidos em 30 °C e foram expostos aos mesmos desafios salinos: 35‰ (controle), 30, 25 e 20‰ pelo período de seis horas. Todo o processo foi repetido seis vezes para cada grupo controle ou experimental. Os seguintes fatores foram medidos na água e no início de todos experimentos: concentração de amônia, valor de pH e oxigênio dissolvido na água.

2.3 RETIRADA DE AMOSTRAS E PARÂMETROS ANALISADOS

Após os experimentos, os animais foram cobertos por gelo picado em caixa de isopor, crioanestesiados por aproximadamente cinco minutos e sem contato direto com o gelo, eutanasiados e houve a retirada de amostras de tecido muscular do quinto par de pereiópodo (adaptado para natação) para determinação de teor hídrico. Também houve coleta de hemolinfa por punção da membrana artrodial de um pereiópodo e armazenada em freezer -20 °C para determinação da osmolalidade, concentrações de cloreto, magnésio e lactato. Os seguintes parâmetros foram analisados ao final do experimento, através de amostras das águas experimentais: concentração de amônia, valores de pH e oxigênio dissolvido na água.

2.4 OSMOLALIDADE E TEOR HÍDRICO

A osmolalidade foi determinada em amostras de hemolinfa não diluídas, através de Micro-Osmômetro de Pressão de Vapor (VAPRO 5520, Wescor, USA).

Para a determinação do teor hídrico, amostras do tecido muscular foram pesadas (peso úmido) em tubos eppendorf de 2 mL previamente pesados e fechados (Balança Bioprecisa FA2104 N, precisão 0,1mg, Brasil), e em seguida foram secos em estufa por 48 horas a 62°C. Os tecidos secos foram pesados novamente (peso seco), e a perda de peso (água) foi expressa como porcentagem através da fórmula:

TH (%) = [(peso úmido – peso seco) / peso úmido] x 100

2.4 CONCENTRAÇÕES DE CLORETO, MAGNÉSIO E LACTATO

Para a determinação da concentração de cloreto, amostras de hemolinfa foram diluídas com água deionizada na proporção 1:5, lidas em duplicata na absorbância de 450 nm. Para magnésio, amostras de hemolinfa foram diluídas com água deionizada na proporção 1:25, lidas em duplicata na absorbância de 505 nm. Por fim, para a determinação da concentração de lactato, amostras de hemolinfa não diluídas foram lidas em duplicata na absorbância de 550 nm, após terem permanecido aquecidas em banho maria (WB/OB 7-45 WBU 45, Memmert, Germany) por 5 minutos em 37 °C. Todas as análises foram realizadas em espectrofotômetro colorimétrico (Ultrospec 2100 PRO Amersham Pharmacia biotech, Sweden) e foram utilizados kits comerciais específicos para cloreto (ref: 115), magnésio (ref: 50) e lactato (ref: 138) da empresa Labtest (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

2.5 CONSUMO DE OXIGÊNIO

Todos os experimentos foram realizados com aeração constante, que foi interrompida durante a última hora do experimento. Nesse momento, foram medidas as concentrações iniciais de oxigênio com o auxílio de um oxímetro (YSI 55, YSI, Yellow Springs, OH, USA). Ao final dessa hora, as concentrações finais de oxigênio também foram medidas e a diferenças entre esses dois valores foi utilizada em conjunto com a massa de cada animal para a obtenção do consumo de oxigênio por indivíduo, através da seguinte fórmula:

Consumo de O_2 (μgO_2/g.weight.h) = (O_2 inicial – O_2 final)*volume*1000/massa

Ao mesmo tempo, alguns aquários contendo apenas água foram medidos também, como forma de assegurar que os valores observados foram produzidos apenas pelos animais em experimento, sem incluir o consumo por micro-organismos presentes na água.

2.6 AMÔNIA EXCRETADA E VALORES DE PH NA ÁGUA

Antes do início dos experimentos, foram retiradas amostras de água para dosagem dos valores iniciais da concentração de amônia e dos valores de pH. O mesmo procedimento foi realizado ao final do experimento. Para determinar a concentração de amônia, foi utilizado o Spectro Kit Amônia Indotest (ref: 2542) comercializado pela empresa Alfakit (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil) e a leitura das amostras ocorreu em 630 nm utilizando o mesmo espectrofotômetro citado acima. Esse método é baseado na formação do azul de indofenol, em que o nitrogênio amoniacal presente na amostra reage com o hipoclorito de sódio para formação de monocloroamino, que vai reagir com o fenol, na presença de um catalisador. Os valores de pH água foram medidos com a utilização de um phmetro (inoLAB pH Level 1WTW (Germany).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado ANOVA de duas vias fixando os seguintes fatores: temperatura e salinidade. Caso o conjunto de dados não tenha atingido os requerimentos obrigatórios de normalidade e homogeneidade de variâncias, o teste de Scheirer-Ray-Hare foi utilizado. Para localizar as diferenças entre os grupos analisados, foi aplicado o teste de Tukey, como teste *post-hoc*. Para analisar as diferenças entre as espécies, foi utilizado Teste-t ou Mann-Whitney, se os dados não atingiam os requisitos de normalidade. Também foram realizados Testes-t pareados para encontrar diferenças entre os valores iniciais e finais de pH em uma mesma amostra. Os testes foram realizados através do software Sigmaplot e o limite de significância sempre foi igual ou menor do que 0,05.

3 RESULTADOS

3.1 OSMOLALIDADE DA HEMOLINFA

Em ambas as temperaturas houve diminuição da osmolalidade em salinidades 25‰ e 20‰ para as duas espécies (FIGURA 1A). Comparativamente, *C. danae* apresenta menor osmolalidade em temperatura e salinidades mais altas do *que C. ornatus* (TABELA 1).

3.2 HIDRATAÇÃO TECIDUAL MUSCULAR

A temperatura elevada aumentou a hidratação tecidual em *C. danae* em exposição a salinidade de 20‰. Em *C. ornatus*, ambas as temperaturas influenciaram no aumento de hidratação tecidual apenas em salinidade 20‰ (FIGURA 1B).

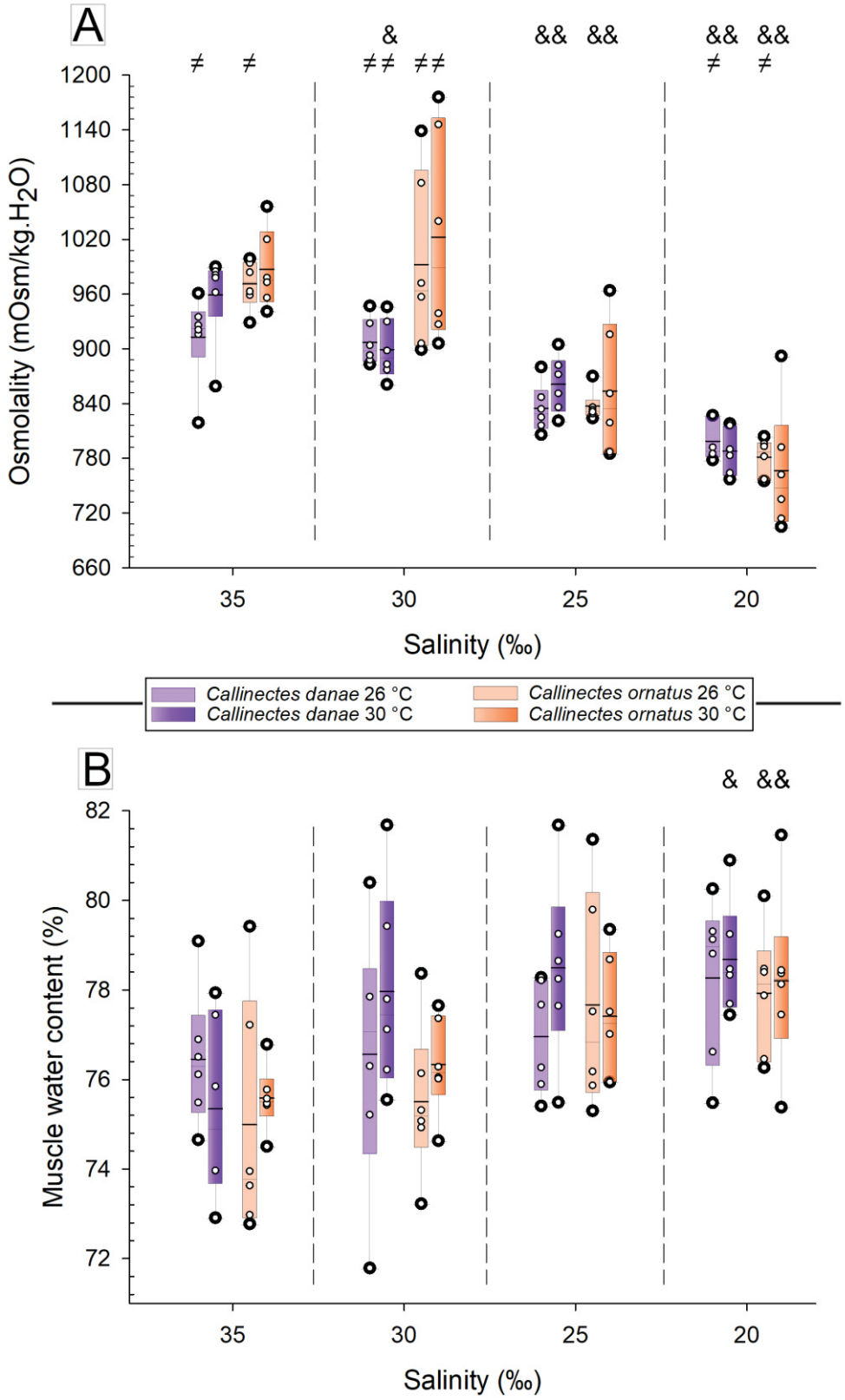


FIGURA 1. Osmolalidade da hemolinfa (A) e teor hídrico muscular (B) de *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* expostos as seguintes temperaturas: 26 °C (controle) e 30 °C, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. n = 6.

3.3 CONCENTRAÇÃO DE CLORETO NA HEMOLINFA

Em temperatura controle, houve diminuição de cloreto em *C. danae* em salinidade 20‰, mas em temperatura elevada, essa diminuição ocorreu em todas as salinidades. Para *C. ornatus*, a temperatura elevada influenciou na diminuição de cloreto apenas em salinidade 20‰ (FIGURA 2A).

3.4 CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO NA HEMOLINFA

A concentração de magnésio em *C. danae* diminuiu apenas na temperatura mais elevada e salinidade mais baixa. Para *C. ornatus*, a diminuição de magnésio ocorreu em todas as salinidades experimentais (FIGURA 2B). Comparativamente, *C. danae* apresenta menor concentração de magnésio do que *C. ornatus* de forma geral (TABELA 1).

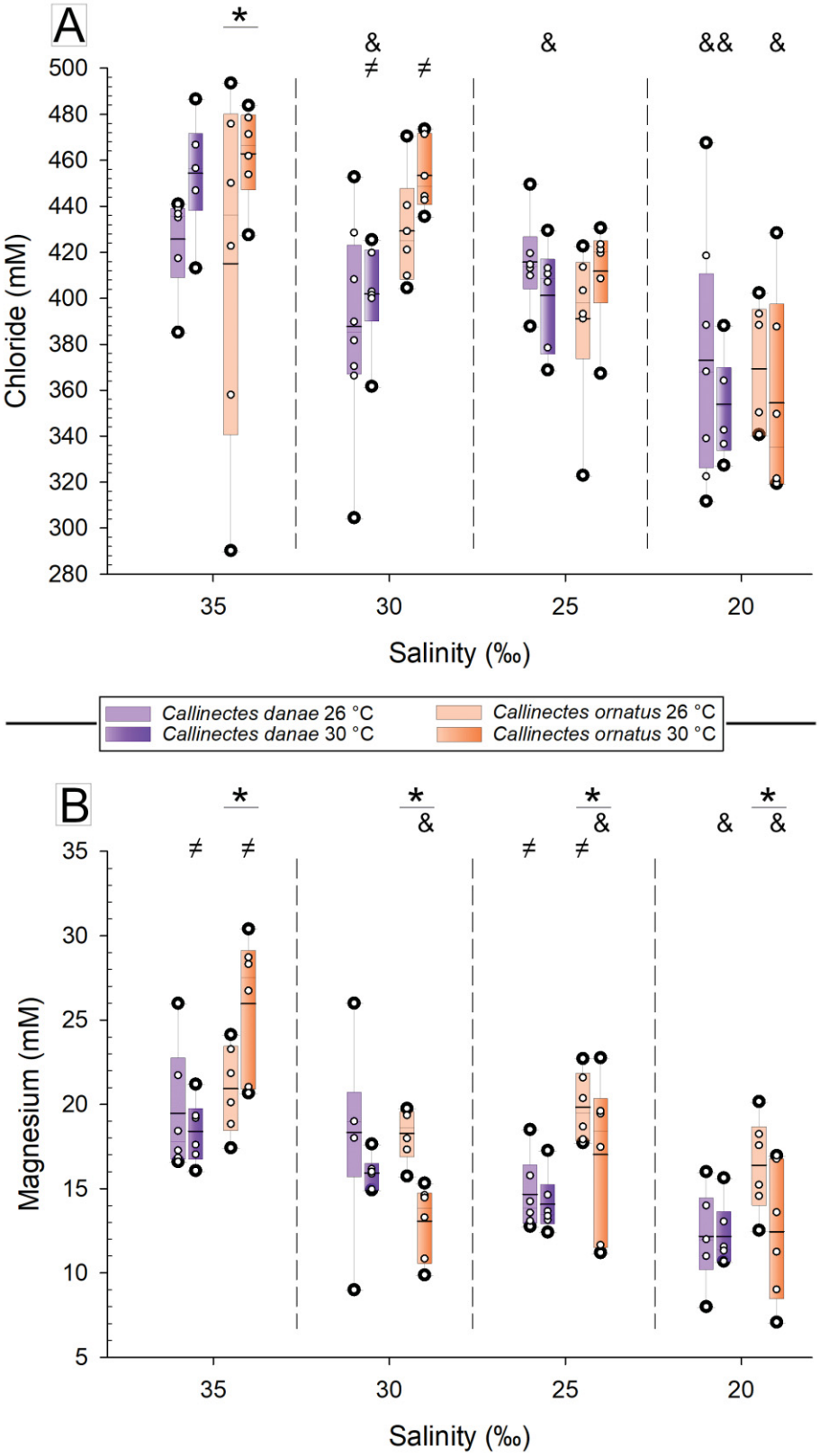


FIGURA 2. Concentração de cloreto (A) e concentração de magnésio (B) de *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* expostos as seguintes temperaturas: 26 °C (controle) e 30 °C, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas *: diferença entre a temperatura controle (26 °C) e experimental (30 °C) para cada espécie; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. n = 6.

TABELA 1. Osmolalidade (mOsm/kg.H_2O), teor hídrico (%) e concentrações iônicas de cloreto e magnésio (mM) em *Callinectes danae e Callinectes ornatus* após exposição a diferentes temperaturas (26 °C e 30 °C) e salinidades (35‰, 30‰, 25‰ e 20‰). Os dados foram representados pela média ± erro padrão. N = 6.

Table 1	T °C	Salinity	Osmolality (mOsm/kg.H_2O)	Water osmolality (mOsm/kg.H_2O)	Muscle water content (%)	Chloride (Mm)	Water chloride (Mm)	Magnesium (mM)	Water magnesium (Mm)
			Média ± Erro	*Prosser, 1973*	*Média ± Erro*	*Média ± Erro*	*Prosser, 1973*	*Média ± Erro*	*Prosser, 1973*
C. danae	26 °C	35 ‰	913,00 ± 19,88	1040,00	76,46 ± 0,62	425,70 ± 8,80	559,00	19,47 ± 1,51	55,00
		30 ‰	873,00 ± 4,93	900,00	76,57 ± 1,19	384,02 ± 21,24	479,00	18,40 ± 2,28	47,00
		25 ‰	834,67 ± 10,76	750,00	76,96 ± 0,51	415,77 ± 8,12	399,00	14,66 ± 0,89	39,30
		20 ‰	826,50 ± 5,67	600,00	78,27 ± 0,74	374,63 ± 24,97	319,00	12,07 ± 1,04	32,70
	30 °C	35 ‰	959,17 ± 20,40	1040,00	75,34 ± 0,84	454,41 ± 9,92	559,00	18,40 ± 0,76	55,00
		30 ‰	899,17 ± 13,36	900,00	77,97 ± 0,92	401,87 ± 9,14	479,00	15,93 ± 0,35	47,00
		25 ‰	861,17 ± 12,68	750,00	78,49 ± 0,83	401,26 ± 9,38	399,00	14,08 ± 0,50	39,30
		20 ‰	788,00 ± 10,41	600,00	78,68 ± 0,51	353,85 ± 9,15	319,00	12,17 ± 0,78	32,70
			Média ± Erro	*Prosser, 1973*	*Média ± Erro*	*Média ± Erro*	*Prosser, 1973*	*Média ± Erro*	*Prosser, 1973*
C. ornatus	26 °C	35 ‰	971,33 ± 10,73	1040,00	75,00 ± 1,10	415,11 ± 8,34	559,00	20,94 ± 1,06	55,00
		30 ‰	992,50 ± 39,74	900,00	75,51 ± 0,69	429,27 ± 6,44	479,00	18,28 ± 0,79	47,00
		25 ‰	837,17 ± 6,77	750,00	77,67 ± 0,99	391,18 ± 9,37	399,00	19,84 ± 1,03	39,30
		20 ‰	781,17 ± 8,47	600,00	77,84 ± 0,64	369,28 ± 18,35	319,00	16,38 ± 1,39	32,70
	30 °C	35 ‰	987,33 ± 17,52	1040,00	75,59 ± 0,30	462,86 ± 8,34	559,00	25,98 ± 1,69	55,00
		30 ‰	1022,33 ± 47,88	900,00	76,33 ± 0,44	453,47 ± 6,44	479,00	13,07 ± 1,11	47,00
		25 ‰	853,67 ± 29,68	750,00	77,41 ± 0,57	411,80 ± 9,37	399,00	17,03 ± 2,33	39,30
		20 ‰	766,67 ± 28,26	600,00	78,21 ± 0,80	354,44 ± 18,35	319,00	12,44 ± 2,03	32,70

3.5 CONSUMO DE OXIGÊNIO

O aquecimento da água levou ao aumento de consumo de oxigênio em apenas em *C. ornatus*, nas salinidades 35, 25 e 20‰ (TABELA 2). Comparativamente, consumo de oxigênio em *C. danae* é menor do que em *C. ornatus* em temperatura elevada nas salinidades 25 e 20‰ (FIGURA 3A).

3.6 CONCENTRAÇÃO DE LACTATO NA HEMOLINFA

A concentração de lactato aumentou em *C. danae* em decorrência do aquecimento da água, nas salinidades 35 e 20‰. Em *C. ornatus*, não houve influência de salinidade ou temperatura (FIGURA 3B).

3.7 AMÔNIA EXCRETADA NA ÁGUA

O aumento da temperatura levou também ao aumento na excreção de amônia em ambas as espécies, especialmente em salinidades 25 e 20‰. Comparativamente,

C. danae excreta menos amônia do que *C. ornatus* em salinidades mais baixas (FIGURA 3C).

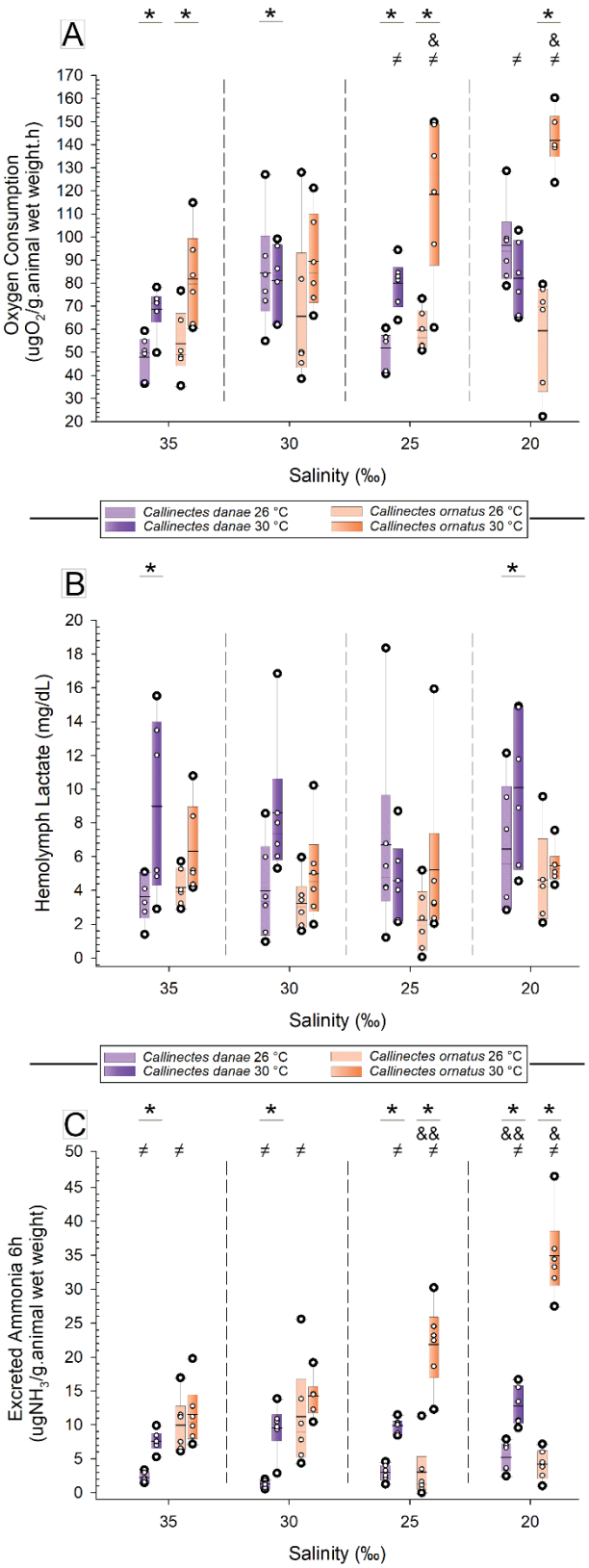


FIGURA 3. Consumo de oxigênio (A), concentração de lactato (B) e amônia excretada na água de *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* expostos as seguintes temperaturas: 26 °C (controle) e 30 °C, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas *: diferença entre a temperatura controle (26 °C) e experimental (30 °C) para cada espécie; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. N = 6.

3.8 VALORES INICIAIS E FINAIS DE pH

O aquecimento da água levou a diminuição do pH final em *C. danae* na salinidade 25‰ e aumento dos valores iniciais e finais em salinidade 25‰. Em *C. ornatus*, houve redução de pH após o aquecimento da água nas salinidades 35 e 20‰. De forma geral, *C. ornatus* tende a acidificar menos as suas águas do que *C. danae* (TABELA 2).

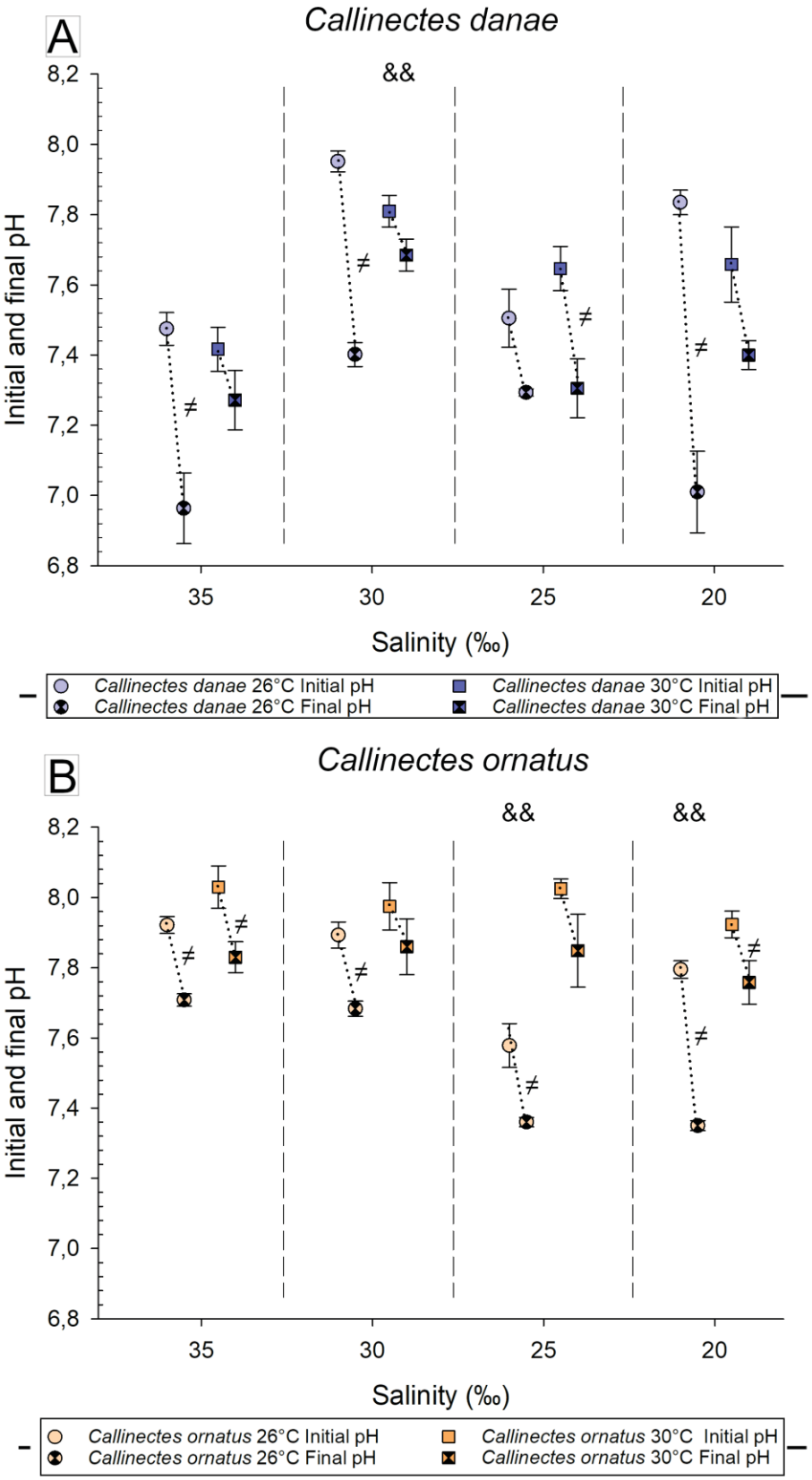


FIGURA 4. Valores iniciais e finais de pH na água de *Callinectes danae* (A) e *Callinectes ornatus* (B) expostos as seguintes temperaturas: 26 °C (controle) e 30 °C, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas. ≠: diferença entre os valores iniciais e finais de pH na água; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle em uma mesma temperatura. N = 6.

TABELA 2. Consumo de oxigênio (μgO_2/g.weight.h), concentração de lactato na hemolinfa (mg/dL), excreção de amônia (μgNH_3/g.weight) e valores iniciais e finais de pH em *Callinectes danae e Callinectes ornatus* após exposição a diferentes temperaturas (26 °C e 30 °C) e salinidades (35‰, 30‰, 25‰ e 20‰). Os dados foram representados pela média ± erro padrão. N = 6.

Table 2	T °C	Salinity	O_2 consumption μgO_2/g.weight.h			Hemolymph lactate (mg/dL)			Ammonia μgNH_3/g.weight			Initial pH			Final pH		
			Média	*±*	*Erro*	*Média*	*±*	*Erro*	*Média*	*±*	*Erro*	*Média*	*±*	*Erro*	*Média*	*±*	*Erro*
C. danae	26 °C	35 ‰	47,86	±	3,83	3,61	±	0,59	2,25	±	0,31	7,48	±	0,05	6,96	±	0,10
		30 ‰	84,31	±	9,93	3,96	±	1,17	1,29	±	0,25	7,95	±	0,03	7,40	±	0,03
		25 ‰	51,79	±	3,44	6,69	±	2,45	2,97	±	0,50	7,51	±	0,08	7,29	±	0,01
		20 ‰	96,32	±	7,26	6,44	±	1,60	5,20	±	1,01	7,84	±	0,03	7,01	±	0,10
	30 °C	35 ‰	68,62	±	4,01	8,99	±	2,17	7,64	±	0,77	7,42	±	0,06	7,27	±	0,08
		30 ‰	81,08	±	6,55	8,58	±	1,73	10,86	±	0,80	7,77	±	0,02	7,66	±	0,04
		25 ‰	79,78	±	4,33	4,57	±	1,00	9,87	±	0,46	7,65	±	0,06	7,31	±	0,08
		20 ‰	82,02	±	6,50	10,08	±	1,84	12,74	±	1,20	7,66	±	0,11	7,40	±	0,04
C. ornatus			*Média*	*±*	*Erro*	*Média*	*±*	*Erro*	*Média*	*±*	*Erro*	*Média*	*±*	*Erro*	*Média*	*±*	*Erro*
	26 °C	35 ‰	53,62	±	5,91	4,18	±	0,45	9,97	±	1,68	7,92	±	0,02	7,71	±	0,02
		30 ‰	65,51	±	13,90	3,22	±	0,64	11,22	±	3,19	7,89	±	0,04	7,68	±	0,02
		25 ‰	59,44	±	3,68	2,22	±	0,78	3,05	±	1,72	7,58	±	0,06	7,36	±	0,01
		20 ‰	59,30	±	9,75	4,61	±	1,08	4,17	±	0,92	7,80	±	0,02	7,35	±	0,01
	30 °C	35 ‰	81,93	±	8,40	6,32	±	1,09	11,52	±	1,84	8,03	±	0,06	7,83	±	0,04
		30 ‰	89,35	±	8,55	5,00	±	1,17	14,24	±	1,20	7,98	±	0,07	7,86	±	0,08
		25 ‰	118,43	±	14,11	5,23	±	2,17	21,88	±	2,46	7,98	±	0,07	7,85	±	0,10
		20 ‰	141,81	±	5,03	5,48	±	0,46	34,90	±	2,63	7,92	±	0,04	7,76	±	0,06

4 DISCUSSÃO

As mudanças climáticas afetam enormemente salinidade e temperatura nos sistemas estuarinos, potencializando os seus efeitos nos organismos ali residentes (RIVERA-INGRAHAM; LIGNOT, 2017; VALIELA et al., 2012). Além da importância de estudar os efeitos combinados de salinidade e temperatura sobre a fisiologia de espécies residentes em estuários, também é fundamental escolher as ferramentas mais adequadas para detectar e quantificar esses efeitos. Recentemente, parâmetros osmorregulatórios, principalmente a osmolalidade da hemolinfa, tem sido integrados como uma das ferramentas ideais para medir a capacidade de tolerar a exposição a baixas salinidade em conjunto com aumento de temperatura de crustáceos decápodes, como por exemplo, *Carcinus maenas* (TORRES et al., 2021). Nossos resultados indicam que biomarcadores fisiológicos (incluindo osmolalidade) são úteis para identificar e separar perfis diferentes de respostas a estressores abióticos. Embora *C. danae* e *C. ornatus* sejam muito resistentes a estressores ambientais, a ação conjunta da simulação de ondas de calor e variação de salinidade alterou de forma negativa a performance fisiológica de ambas as espécies, diminuindo a capacidade de osmorregulação e aumentando o metabolismo. De fato, *C. danae* é mais eurihalino e euritérmico do que *C. ornatus*, principalmente em condições mais extremas de redução de salinidade.

Indivíduos das espécies *Callinectes danae* e *C. ornatus* são costumeiramente encontrados em baias e estuários brasileiros, em que cada espécie habita locais levemente diferentes em relação a fatores abióticos como profundidade, salinidade, temperatura e sedimento, podendo haver uma certa sobreposição nas suas faixas de distribuição (MANTELATTO; FRANSOZO, 2000; MARTINS et al., 2014; SEVERINO-RODRIGUES et al., 2009). Entre os fatores que explicam essa diferença de distribuição entre espécies muito parecidas, as características fisiológicas como tolerância a temperatura e variação de salinidade, capacidade de osmorregulação, limites térmicos e taxas metabólicas de cada espécie desempenham um papel importante na ocupação desses nichos levemente diferentes. Essas características fisiológicas podem ser medidas e comparadas, gerando dados básicos sobre tolerância a temperatura ou salinidade, por exemplo, e que podem ser utilizados para diversos fins, como manejo e levantamento de fauna, ou mesmo aquicultura.

Embora as espécies do gênero *Callinectes* possuam uma boa capacidade osmorregulatória (KIRSCHNER, 2004; PÉQUEUX, 1995; PILLER et al., 1995) e de tolerância térmica (NOYOLA et al., 2015; ROME et al., 2005), a performance dessas espécies diante desses estressores não é a mesma, principalmente se houver sinergia entre os fatores temperatura e salinidade, como observado para *Callinectes sapidus* (ROME et al., 2005). Essas diferentes performances fisiológicas em *Callinectes* são confirmadas nesse trabalho utilizando diferentes marcadores fisiológicos relacionados a osmorregulação e metabolismo, assim como exposição a diferentes condições de salinidade e temperatura. Dessa maneira, mesmo levando em conta todas as limitações existentes em estudos laboratoriais e tomando todo o cuidado ao transpor essas informações para o ambiente natural, é possível presumir que as diferenças entre essas espécies podem ser fundamentais na maneira com elas responderão as atuais e futuras ameaças impostas pelas mudanças climáticas, principalmente os eventos extremos, como ondas de calor.

4.1 RESPOSTAS OSMORREGULATÓRIAS

As duas espécies de *Callinectes* apresentaram respostas diferentes aos desafios de exposição a diferentes temperaturas e salinidades. Em relação a osmolalidade, nota-se que *C. ornatus* apresenta maiores valores dessa variável em salinidades mais altas, porém, esses valores diminuem muito em salinidades mais baixas, enquanto *C. danae* permanece mais estável, corroborando estudos anteriores (FREIRE; TOGNI; HERMES-LIMA, 2011) . Esses resultados são condizentes com o padrão de distribuição no estuário em relação a salinidade para ambas as espécies. Em salinidades mais altas, a frequência em que *C. ornatus* é encontrado é maior do que *C. danae*, que por sua vez é encontrado com maior abundância em locais com salinidade reduzida (FREIRE; TOGNI; HERMES-LIMA, 2011; SEVERINO-RODRIGUES et al., 2009).

A temperatura e salinidade parecem ter efeito sinérgico sobre ambas as espécies, em que a temperatura mais alta afeta a osmorregulação. Vale ressaltar que esse resultado foi obtido através de experimentos utilizando indivíduos adultos, porém em experimentos realizados com larvas de *C. maenas*, os resultados encontrados foram diferentes. Foi observado que o aumento de temperatura pode mitigar os efeitos

da baixa salinidade, aumentando a capacidade osmorregulatória, sobrevivência e acelerar determinado estágio de desenvolvimento, porém não há trabalhos com indivíduos adultos sob as mesmas condições (TORRES et al., 2021). Com base no que temos na literatura até o momento, espécies como *C. maenas* desenvolvem melhor capacidade osmorregulatória durante a fase larval e avançam mais rapidamente em direção ao próximo estágio ontogenético, porém essas características não se mantém na fase adulta, o que pode tornar essas espécies mais sensíveis principalmente a aumento de temperatura de forma súbita (JOST; PODOLSKI; FREDERICH, 2012; SPITZNER et al., 2019; TORRES et al., 2021).

Ambas as espécies controlaram bem a hidratação tecidual, porém o aquecimento comprometeu a excelente capacidade de regular água tecidual em *C. danae*, um dos grandes fatores que explicam a sua grande eurihalinidade, como observado anteriormente (CUENCA; SOUZA; FREIRE, 2021; FREIRE et al., 2020). Em *C. ornatus*, o aumento de hidratação surge em ambas as temperaturas em 20‰. O padrão de hidratação tecidual encontrado em *C. ornatus* exige uma análise mais complexa. Os únicos trabalhos publicados com relação a hidratação tecidual são com tecido branquial e *in vitro*, em que a capacidade de hidratação foi considerada boa em exposição a hiposalinidade (AMADO et al., 2012). O fato de *C. ornatus* aumentar a hidratação tecidual também na temperatura controle, é um indício que essa espécie não é tão eurihalina quanto *C. danae,* como demonstrado por Freire et al., (2011). Contudo, o aumento da hidratação tecidual em exposição a temperaturas mais elevadas pode ser um indício de perda de performance ou incapacidade de ajuste de ambas as espécies em diferentes graus.

De forma similar com o descrito acima, em 26 °C houve diminuição na concentração de cloreto em *C. danae* apenas na salinidade mais desafiadora (20‰) corroborando a grande capacidade de regulação iônica, observada em trabalhos anteriores (CUENCA; SOUZA; FREIRE, 2021; FREIRE et al., 2020; FREIRE; TOGNI; HERMES-LIMA, 2011; GARÇON et al., 2021). Porém, em exposição a temperatura de 30 °C, ocorre diluição de cloreto na hemolinfa de *C. danae* em todas as salinidades experimentais, evidenciando uma queda na performance osmorregulatória em exposição a temperaturas elevadas.

Em *C. ornatus* não houve variação na concentração de cloreto durante exposição a diferentes salinidades em 26 °C. Em 30 °C, a diminuição de cloreto só

ocorre na salinidade mais desafiadora (20‰). Esses dados levam a crer que *C. ornatus* é um regulador de cloreto melhor do que *C. danae* em condições de aquecimento das águas. A regulação de cloreto em *C. ornatus* encontrada em 26°C é compatível com os estudos disponíveis para o gênero *Callinectes*, em que essas espécies são descritas como sendo capazes de regular cloreto independente da variação de salinidade estudada (CUENCA; SOUZA; FREIRE, 2021; ENGEL, 1977; FREIRE et al., 2020; FREIRE; TOGNI; HERMES-LIMA, 2011; PILLER et al., 1995).

A concentração de magnésio em ambas as espécies diminuiu em 30 °C: em *C. danae*, apenas em 20‰, porém em *C. ornatus* essa diminuição ocorreu em todas as salinidades, sugerindo que a temperatura afeta a regulação desse íon. Todos esses valores estão abaixo da concentração de magnésio das águas experimentais, e torna ambas as espécies hiporreguladoras de magnésio. Essa estabilidade na concentração de magnésio é típica de espécies de *Callinectes*, assim como em outras espécies caranguejos de movimentos ágeis, em que a regulação de magnésio em baixas concentrações é essencial a sua sobrevivência (FREDERICH et al., 2000; MORRITT; SPICER, 1993; WATT; WHITELEY; TAYLOR, 1999).

Não há dados sobre osmolalidade ou regulação iônica em *Callinectes* expostos a temperaturas elevadas simultaneamente a variação de salinidade, mas em decápodes de forma geral, a resposta é variável: a osmolalidade pode permanecer inalterada, como observado para *Litopenaeus stylirostris* (DIAZ et al., 2004) e *Litopenaeus vannamei* ou diminuir, como para juvenis de *Penaeus chinensis* (CHEN et al., 1995). Já a concentração de cloreto pode aumentar, como observado para os lagostins *Procambarus clarkii* e *P. zonangulus* (NEWSOM; DAVIS, 1994) diminuir, como para o palemonídeo *Palaemon longirostris* (CAMPBELL; JONES, 1989) ou permanecer constante, como para o caranguejo da neve *Chionoecetes opilio* (HARDY; MUNRO; DUTIL, 1994).

Além disso, é importante destacar que para ambas as espécies, a osmolalidade e as concentrações de cloreto e magnésio ficaram acima (osmolalidade e cloreto) ou abaixo (magnésio) dos valores encontrados no ambiente externo, independente da temperatura. Esse resultado indica que a queda de performance vista não foi suficiente para que ambas as espécies perdessem o controle da sua capacidade de regulação osmo-iônica, porém o efeito sinérgico da temperatura e salinidade pode ser prejudicial caso o tempo de exposição a esses dois fatores

estressantes seja maior. A maneira como a alta temperatura e salinidade afetam parâmetros osmorregulatórios em espécies do gênero *Callinectes* não era conhecida até o momento.

4.2 RESPOSTAS METABÓLICAS

O consumo de oxigênio em *C. danae* permaneceu estável em 26 °C e aumentou levemente em 30 °C. Já em *C. ornatus*, o consumo de oxigênio é muito maior em temperatura elevada, inclusive maior do que em *C. danae* em salinidades mais diluídas. A estabilidade do consumo de oxigênio em *C. danae* é mais um indício corroborando a sua maior eurihalinidade, visto que a mudança de salinidade não provocou nenhuma alteração nesse parâmetro, como demonstrado anteriormente para *C. danae* (FREIRE et al., 2020; RAMAGLIA; DE CASTRO; AUGUSTO, 2018). O aumento do consumo de oxigênio em temperaturas elevadas é um dos proxys indicando aumento de atividade metabólica e pode estar associada a ondas de calor. Isso evidencia a necessidade de gerar energia para a contenção dos danos gerados pela exposição a temperaturas próximas ao limite de tolerância de espécies aquáticas (ARAMBOUROU; STOKS, 2015; MADEIRA, et al., 2018; MCELROY; NGUYEN; BYRNE, 2012).

A concentração de lactato, de forma geral, permaneceu constante para as duas espécies. Esses valores podem ser considerados baixos, principalmente quando comparados com os valores de lactato observados por Freire et. al. (2020), em que a concentração máxima encontrada foi de ~22,5 mg/dL. Altas temperaturas afetam o balanço entre suprimento e demanda de oxigênio de um organismo, causando hipoxemia, que por sua vez, pode levar a ativação de metabolismo anaeróbico (PÖRTNER; BOCK; MARK, 2017; WILLIAMS et al., 2016). Entretanto, estes resultados demonstraram que ambas as espécies não precisaram recorrer ao metabolismo anaeróbico para manter a sua homeostase. Os limites térmicos são plásticos e podem ser alterados através de protocolos de aclimatação, como o que foi utilizado. O aumento de oxigênio e a pouca síntese de lactato em temperatura elevada pode ser resultado entre a tolerância adquirida pela aclimatação e a exposição em curto prazo (6 horas) aos agentes estressores. Analisando os dados disponíveis na

literatura, é fato que os danos e a energia gasta durante e após o estresse térmico estão relacionados à intensidade e tempo de exposição a temperaturas elevadas (PÖRTNER, 2010; WILLIAMS et al., 2016; WOODIN et al., 2013).

A excreção de amônia nas duas espécies é sempre maior em exposição as menores salinidades (25 e 20‰) e maior temperatura (30°C). De forma geral, *C.ornatus* excreta mais amônia do que *C. danae*. O catabolismo de proteínas em crustáceos gera como principal fonte de excreta nitrogenada, a amônia em sua forma protonada, o amônio (HENRY et al., 2012; LARSEN et al., 2014). Em exposição a hiposalinidade, a liberação de aminoácidos livres decorrente do catabolismo de proteínas, é uma estratégia utilizada por crustáceos para aumentar o efluxo de água e a absorção de sódio pela via paracelular através da criação de um gradiente de NH_4^+, e dessa forma manter a concentração iônica estável (LEONE et al., 2017; STREFEZZA; DE ANDRADE; AUGUSTO, 2019), como observado neste trabalho para as duas espécies de *Callinectes*. Além da excreção de amônia estar ligada diretamente ao processo de osmorregulação, o processo de catabolismo de proteínas através de desaminação gera um substrato que pode ser utilizado para gerar energia, como ocorre em algumas espécies camarões peneídeos (DIAZ et al., 2004). Isso explicaria o aumento da excreção de amônia em 30°C, uma vez que esses animais expostos a essa temperatura necessitam de gasto energético maior do que em 26 °C, para manutenção da sua homeostase.

Os valores de pH na água seguiram o mesmo padrão para as duas espécies: acidificação das águas experimentais em ambas as temperaturas em grande parte das salinidades testadas. Essa acidificação pode ser relacionada com a liberação de CO_2 proveniente do processo de respiração (HENRY; WHEATLY, 1992). Esse mesmo CO_2 é difundido através da água, formando H_2CO_3, que por sua vez sofre catálise pela ação da enzima anidrase carbônica, gerando próton e bicarbonato. O H^+ e HCO_3^- gerados são utilizados como contra íons no processo de osmorregulação, sendo trocados por sódio e cloreto, respectivamente (WHITELEY et al., 2001). Valores baixos de pH na água estão relacionados com aumento na excreção de produtos nitrogenados em crustáceos, tais quais ureia e amônia, como observado para *Daphnia magna* exposta em pH 4,0 (AL-REASI et al., 2013). Essa acidificação, mesmo que momentânea e de curta duração, pode ter o seu efeito potencializado pelo aumento de temperatura, afetando o escopo metabólico, diminuindo a capacidade de regulação

osmótica, como demonstrado para o camarão peneídeo habitante de regiões costeiras *Metapenaeus joyneri* (DISSANAYAKE; ISHIMATSU, 2011). A análise das variáveis relacionadas ao metabolismo corrobora o impacto do aumento da temperatura na rotina energética dessas espécies, acelerando o metabolismo para gerar a energia necessária para o ajuste a essa nova condição.

5 CONCLUSÃO

Uma das conclusões que obtivemos é que a maior eurihalinidade de *C. danae* em relação a *C. ornatus* deve-se também a suas diferenças na capacidade de osmorregulação e atividade metabólica, principalmente em condições mais extremas. A ação conjunta de variação de salinidade e aumento de temperatura altera de forma negativa a performance fisiológica, aqui representada por parâmetros osmorregulatórios e metabólicos, demonstrados pela primeira vez para espécies do gênero *Callinectes*. A regulação osmótica, iônica e hidratação muscular sofre alterações, embora essas alterações podem ser consideradas sutis e não provoquem a curto prazo a perda de homeostase. O aumento de oxigênio e excreção e amônia também são indicativos de aumento de metabolismo para a geração de energia e dessa forma combater o estresse combinado de hiposalinidade mais aumento de temperatura. O aumento de metabolismo em *C. ornatus* é maior, porém sua capacidade osmorregulatória é menor do que *C. danae*, sugerindo que *C. ornatus* utiliza o seu orçamento metabólico em outros mecanismos de defesa, como expressão de proteínas de ação protetiva, como HSP70 ou que o seu investimento em osmorregulação é pouco eficiente quando comparado com *C. danae*. As alterações sutis observadas em espécies comprovadamente eurihalinas e euritérmicas podem ser preocupantes a longo prazo, uma vez que as temperaturas e salinidades testadas nesse trabalho tendem a ser mais intensas e frequentes nos próximos anos, principalmente em decorrência de aumento de eventos climáticos extremos, representados aqui pela simulação de ondas de calor.

REFERÊNCIAS

AL-REASI, H. A. et al. The effect of dissolved organic matter (DOM) on sodium transport and nitrogenous waste excretion of the freshwater cladoceran (*Daphnia magna*) at circumneutral and low pH. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 158, n. 4, p. 207–215, nov. 2013.

AMADO, E. M. et al. Lead hampers gill cell volume regulation in marine crabs: Stronger effect in a weak osmoregulator than in an osmoconformer. **Aquatic Toxicology**, v. 106–107, p. 95–103, 15 jan. 2012.

ARAMBOUROU, H.; STOKS, R. Combined effects of larval exposure to a heat wave and chlorpyrifos in northern and southern populations of the damselfly *Ischnura elegans*. **Chemosphere**, v. 128, p. 148–154, jun. 2015.

CAMPBELL, P. J.; JONES, M. B. Ionic regulation of the estuarine prawn *Palaemon longirostris* (Caridea: Palaemonidae). **Ophelia**, v. 30, n. 2, p. 141–154, maio 1989.

CHEN, J. C. et al. Survival, haemolymph osmolality and tissue water of *Penaeus chinensis* juveniles acclimated to different salinity and temperature levels. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, v. 110, n. 3, p. 253–258, 1995.

CUENCA, A. L. R.; SOUZA, M. M.; FREIRE, C. A. Osmoregulatory power influences tissue ionic composition after salinity acclimation in aquatic decapods. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 259, n. February, p. 111001, set. 2021.

DEUTSCH, C. A. et al. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 18, p. 6668–6672, 6 maio 2008.

DIAZ, F. et al. Effects of temperature and salinity fluctuation on the oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of the blue shrimp *Litopenaeus Stylirostris*. **Journal of Shellfish Research**, v. 23, n. 3, p. 903–910, 2004.

DISSANAYAKE, A.; ISHIMATSU, A. Synergistic effects of elevated CO2 and temperature on the metabolic scope and activity in a shallow-water coastal decapod (*Metapenaeus joyneri*; Crustacea: Penaeidae). **ICES Journal of Marine Science**, v. 68, n. 6, p. 1147–1154, 1 jul. 2011.

ENGEL, D. W. Comparison of the osmoregulatory capabilities of two portunid crabs, *Callinectes sapidus* and *C. similis*. **Marine Biology**, v. 41, n. 3, p. 275–279, 1977.

FARIA, S. C.; AUGUSTO, A. S.; MCNAMARA, J. C. Intra- and extracellular osmotic regulation in the hololimnetic Caridea and Anomura: a phylogenetic perspective on the conquest of fresh water by the decapod Crustacea. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 181, n. 2, p. 175–186, 28 fev. 2011.

FREDERICH, M. et al. Haemolymph Mg(2+) regulation in decapod crustaceans: physiological correlates and ecological consequences in polar areas. **The Journal of experimental biology**, v. 203, n. Pt 8, p. 1383–93, abr. 2000.

FREIRE, C. A. et al. 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**, v. 149, n. 4, p. 435–446, abr. 2008.

FREIRE, C. A. et al. Biomarkers of homeostasis, allostasis, and allostatic overload in decapod crustaceans of distinct habitats and osmoregulatory strategies: an empirical approach. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 248, n. June, p. 110750, out. 2020.

FREIRE, C. A.; TOGNI, V. G.; HERMES-LIMA, M. Responses of free radical metabolism to air exposure or salinity stress, in crabs (*Callinectes danae* and *C. ornatus*) with different estuarine distributions. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 160, n. 2, p. 291–300, out. 2011.

GARÇON, D. P. et al. Osmotic and ionic regulation, and kinetic characteristics of a posterior gill (Na+, K+)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae* on acclimation to salinity challenge. **Marine Biology**, v. 168, n. 6, p. 79, 3 jun. 2021.

HARDY, D.; MUNRO, J.; DUTIL, J.-D. Temperature and salinity tolerance of the soft-shell and hard-shell male snow crab, *Chionoecetes opilio*. **Aquaculture**, v. 122, n. 2–3, p. 249–265, maio 1994.

HENRY, R. P. et al. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. November, p. 1–34, 2012.

HENRY, R. P.; WHEATLY, M. G. Interaction of respiration, ion regulation, and acid-base balance in the everyday life of aquatic crustaceans. **Integrative and Comparative Biology**, v. 32, n. 3, p. 407–416, 1992.

IPCC, 2014. In: **Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Geneva: IPCC, 2014. p. 151.

JOST, J.; PODOLSKI, S.; FREDERICH, M. Enhancing thermal tolerance by eliminating the pejus range: a comparative study with three decapod crustaceans. **Marine Ecology Progress Series**, v. 444, n. Shelford 1931, p. 263–274, 10 jan. 2012.

KIRSCHNER, L. B. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 9, p. 1439–1452, 1 abr. 2004.

LARSEN, E. H. et al. Osmoregulation and Excretion. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2014. v. 4p. 405–573.

LEONE, F. A. et al. **Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates**. Cham: Springer International Publishing, 2017.

MADEIRA, C. et al. Thermal stress and energy metabolism in two circumtropical decapod crustaceans: Responses to acute temperature events. **Marine Environmental Research**, v. 141, n. April, p. 148–158, out. 2018.

MADEIRA, D. et al. Thermal tolerance and potential impacts of climate change on coastal and estuarine organisms. **Journal of Sea Research**, v. 70, p. 32–41, maio 2012.

MANTELATTO, F. L. M.; FRANSOZO, A. Brachyuran community in Ubatuba Bay, northern coast of São Paulo State, Brazil. **Journal of Shellfish Research**, v. 19, n. 2, p. 701–709, 2000.

MARTINS, B. A. et al. Environmental factors modulating the abundance and distribution of *Callinectes danae* (Decapoda: Portunidae) from two areas of the southeastern coast of Brazil. **Biologia**, v. 69, n. 10, p. 1356–1364, 7 out. 2014.

MCELROY, D. J.; NGUYEN, H. D.; BYRNE, M. Respiratory response of the intertidal seastar *Parvulastra exigua* to contemporary and near-future pulses of warming and hypercapnia. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 416–417, p. 1–7, abr. 2012.

MORRITT, D.; SPICER, J. I. A brief re-examination of the function and regulation of extracellular magnesium and its relationship to activity in crustacean arthropods. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 106, n. 1, p. 19–23, set. 1993.

NEWSOM, J. E.; DAVIS, K. B. Osmotic responses of haemolymph in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) and white river crayfish (*P. zonangulus*) to changes in temperature and salinity. **Aquaculture**, v. 126, n. 3–4, p. 373–381, out. 1994.

NOYOLA REGIL, J. et al. Thermal biology of prey (*Melongena corona bispinosa*, *Strombus pugilis*, *Callinectes similis*, *Libinia dubia*) and predators (*Ocyurus chrysurus*, *Centropomus undecimalis*) of *Octopus maya* from the Yucatan Penin. **Journal of Thermal Biology**, v. 53, n. 2015, p. 151–161, out. 2015.

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

PILLER, S. et al. A comparison of the gill physiology of two euryhaline crab species, *Callinectes sapidus* and *Callinectes similis*: energy production, transport-related enzymes and osmoregulation as a function of acclimation salinity. **The Journal of experimental biology**, v. 198, p. 349–58, 1995.

PINSKY, M. L. et al. Greater vulnerability to warming of marine versus terrestrial ectotherms. **Nature**, v. 569, n. 7754, p. 108–111, 24 maio 2019.

PÖRTNER, H.-O. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p. 881–893, 15 mar. 2010.

PÖRTNER, H.-O.; BOCK, C.; MARK, F. C. Oxygen- and capacity-limited thermal tolerance: bridging ecology and physiology. **The Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 15, p. 2685–2696, 1 ago. 2017.

PÖRTNER, H. O. Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. **Die Naturwissenschaften**, v. 88, n. 4, p. 137–46, 8 abr. 2001.

PORTNER, H. O.; KNUST, R. Climate Change Affects Marine Fishes Through the Oxygen Limitation of Thermal Tolerance. **Science**, v. 315, n. 5808, p. 95–97, 5 jan. 2007.

QUEIROZ, G. M. N. et al. Caracterização da ictiofauna demersal de duas áreas do complexo estuarino de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Biociências**, v. 14, n. 2, p. 112–124, 2006.

RAMAGLIA, A. C.; DE CASTRO, L. M.; AUGUSTO, A. Effects of ocean acidification and salinity variations on the physiology of osmoregulating and osmoconforming crustaceans. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 188, n. 5, p. 729–738, 11 set. 2018.

RIVERA-INGRAHAM, G. A.; LIGNOT, J.-H. Osmoregulation, bioenergetics and oxidative stress in coastal marine invertebrates: raising the questions for future research. **The Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 10, p. 1749–1760, 15 maio 2017.

ROME, M. S. et al. Linking temperature and salinity tolerance to winter mortality of Chesapeake Bay blue crabs (*Callinectes sapidus*). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 319, n. 1–2, p. 129–145, 1 jun. 2005.

SEVERINO-RODRIGUES, E. et al. Diversity and biology of species of Portunidae (Decapoda, Brachyura) in the estuarine-lagunar complex of Iguape, Ilha Comprida and Cananéia, São Paulo, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 1, p. 47–60, 2009.

SOMERO, G. Comparative physiology: a “crystal ball” for predicting consequences of global change. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, n. 1, p. R1–R14, jul. 2011.

SOMERO, G. N. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine ‘winners’ and ‘losers’. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p. 912–920, 15 mar. 2010.

SPITZNER, F. et al. Unmasking intraspecific variation in offspring responses to multiple environmental drivers. **Marine Biology**, v. 166, n. 8, p. 112, 25 ago. 2019.

STILLMAN, J. H. Heat waves, the new normal: Summertime temperature extremes will impact animals, ecosystems, and human communities. **Physiology**, v. 34, n. 2, p. 86–100, 2019.

STILLMAN, J. H.; SOMERO, G. N. A Comparative Analysis of the Upper Thermal Tolerance Limits of Eastern Pacific Porcelain Crabs, Genus *Petrolisthes* : Influences of Latitude, Vertical Zonation, Acclimation, and Phylogeny. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 73, n. 2, p. 200–208, mar. 2000.

STREFEZZA, T. F.; DE ANDRADE, I. M.; AUGUSTO, A. Reduced pH and elevated salinities affect the physiology of intertidal crab Minuca mordax (Crustacea, Decapoda). **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 52, n. 5, p. 241–254, 2019.

TOMANEK, L. The Importance of Physiological Limits in Determining Biogeographical Range Shifts due to Global Climate Change: The Heat-Shock Response. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 81, n. 6, p. 709–717, nov. 2008.

TORRES, G. et al. Physiological basis of interactive responses to temperature and salinity in coastal marine invertebrate: Implications for responses to warming. **Ecology and Evolution**, v. 11, n. 11, p. 7042–7056, jun. 2021.

UMMENHOFER, C. C.; MEEHL, G. A. Extreme weather and climate events with ecological relevance: a review. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1723, p. 20160135, 19 jun. 2017.

VALIELA, I. et al. Increased rainfall remarkably freshens estuarine and coastal waters on the Pacific coast of Panama: Magnitude and likely effects on upwelling and nutrient supply. **Global and Planetary Change**, v. 92–93, p. 130–137, 2012.

VERBERK, W. C. E. P. et al. Can respiratory physiology predict thermal niches? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1365, n. 1, p. 73–88, 2016a.

VERBERK, W. C. E. P. et al. Does oxygen limit thermal tolerance in arthropods? A critical review of current evidence. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology**, v. 192, p. 64–78, 2016b.

WATT, A. J. .; WHITELEY, N. .; TAYLOR, E. . An in situ study of respiratory variables in three British sublittoral crabs with different routine rates of activity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 239, n. 1, p. 1–21, jun. 1999.

WHITELEY, N. M. et al. Effects of water salinity on acid-base balance in decapod crustaceans. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, n. 5, p. 1003–1011, 2001.

WILLIAMS, C. M. et al. Biological Impacts of Thermal Extremes: Mechanisms and Costs of Functional Responses Matter. **Integrative and Comparative Biology**, v. 56, n. 1, p. 73–84, jul. 2016.

WOODIN, S. A. et al. Climate change, species distribution models, and physiological performance metrics: predicting when biogeographic models are likely to fail. **Ecology and Evolution**, v. 3, n. 10, p. n/a-n/a, ago. 2013.

CAPÍTULO II – CAPACIDADE OSMORREGULATÓRIA/METABÓLICA DE DECÁPODES DO GÊNERO *CALLINECTES* SUBMETIDOS A VARIAÇÃO DE SALINIDADE E ACIDIFICAÇÃO

RESUMO

A acidificação dos oceanos é um fenômeno climático que tem se intensificado em razão de ações antrópicas após a revolução industrial. Esse fenômeno foi acentuado durante o século XX, quando a liberação de CO_2 na atmosfera aumentou consideravelmente. Os oceanos e as águas costeiras sequestram esse excesso de CO_2, resultando em um processo de acidificação que se torna mais intenso a cada dia. Como essa acidificação vai afetar os ecossistemas marinhos/estuarinos tem sido o foco de vários estudos, visando a preservação de tais ecossistemas. Crustáceos estuarinos do mesmo gênero, mas com distribuições diferentes, são considerados ótimos modelos de estudo sobre como ocorre a resposta de tais espécies a fatores abióticos estressores, como acidificação e salinidade. Pensando nisso, *Callinectes danae* e *C. ornatus* foram submetidas a acidificação simultaneamente com variação de salinidade. Os espécimes foram coletados e mantidos em aclimatação até os experimentos de acidificação (pH 8,0 e 7,3) em conjunto com hiposalinidade (35, 30, 25 e 20‰) ocorrerem. Ao final dos experimentos, os animais foram crioanestesiados, eutanasiados e coletado material para as análises de osmolalidade, cloreto, magnésio, lactato e oxihemocianina (hemolinfa) e teor hídrico (músculo). Também foi analisado consumo de oxigênio e excreção de amônia. Ambos os *Callinectes* foram afetados pela combinação de hiposalinidade mais acidificação, principalmente em relação a osmolalidade, regulação iônica e hidratação tecidual, porém *C. ornatus* demonstrou ser mais sensível a combinação de acidificação e hiposalinidade, refletido pelo aumento no consumo de oxigênio e excreção de amônia. Esses resultados são semelhantes ao encontrado no capítulo anterior, reafirmando que o nicho fundamental de *C. ornatus* é menor que o de *C. danae*. Esses resultados indicam que mesmo uma exposição de curto prazo em indivíduos adultos a hiposalinidade e acidificação pode alterar as suas performances fisiológicas, podendo ser prejudicais a médio e longo prazo. Além disso, a utilização de biomarcadores fisiológicos, aqui representados por osmorregulação e metabolismo, podem ser utilizados em uma abordagem mais ecológica, produzindo resultados que possuem aplicação prática, como na conservação e manejo de espécies estuarinas. A ampliação do uso desses protocolos em espécies que possuem características de ocupação de nicho e distribuição semelhantes torna-se bastante viável, visto os seus resultados, a facilidade e acessibilidade para a sua utilização.

Palavras-chave: Mudanças climáticas; Ecofisiologia; Brachyura

ABSTRACT

Ocean acidification is a climatic phenomenon that has intensified due to human actions after the industrial revolution. This phenomenon was accentuated during the 20th century, when the release of CO_2 into the atmosphere increased considerably. The oceans and coastal waters sequester this excess CO_2, resulting in an acidification process that becomes more intense every day. How this acidification will affect marine ecosystems has been the focus of several studies aimed at preserving these ecosystems. Estuarine crustaceans of the same genus, but with different distributions, are considered excellent models for studying how the relationship between tolerance to stressors, such as acidification and salinity, occurs. With that in mind, *Callinectes danae* and *C. ornatus* were subjected to acidification simultaneously with variation in salinity. The specimens were collected and kept in acclimation until the acidification experiments (pH 8.0 and 7.3) together with hyposalinity (35, 30, 25 and 20‰) occurred. At the end of the experiments, the animals were cryoanesthetized, euthanized and material collected for the analysis of osmolality, chloride, magnesium, lactate and oxyhemocyanin (hemolymph) and water content (muscle). Oxygen consumption and ammonia excretion were also analyzed. Both *Callinectes* were affected by the combination of hyposalinity plus acidification, mainly in relation to osmolality, ion regulation and tissue hydration. However, *C. ornatus* proved to be more sensitive to the combination of acidification and hyposalinity, reflected by the increase in oxygen consumption and ammonia excretion. These results are similar to those found in the previous chapter, reaffirming that the fundamental niche of *C. ornatus* is smaller than that of *C. danae*. These results indicate that even short-term exposure in adult individuals to hyposalinity and acidification can alter their physiological performance, which can be harmful in the medium and long term. Furthermore, the use of physiological biomarkers, here represented by osmoregulation and metabolism, can be used in a more ecological approach, producing results that have practical application, such as in the conservation and management of estuarine species. The expansion of the use of these protocols in species that have similar niche occupation and distribution characteristics becomes quite viable, given their results, the ease and accessibility for their use.

Keywords: Climate Change; Ecophysiology; Brachyura

1 INTRODUÇÃO

Limites fisiológicos, em conjunto com interações bióticas, moldam a distribuição de espécies, e também desempenharão um papel central em resposta as mudanças climáticas futuras (KELLY; HOFMANN, 2013; SOMERO, 2011). O aumento da temperatura ainda tem sido o foco das pesquisas sobre mudanças climáticas, mas há um considerável aumento em trabalhos sobre a acidificação dos oceanos, caracterizado por uma redução em escala global dos valores de pH, devido ao aumento da emissão de CO_2 (KELLY; HOFMANN, 2013; ORR et al., 2005). Os oceanos têm absorvido quase um terço das emissões de CO_2 desde o início da revolução industrial, resultando na diminuição dos valores de pH das águas superficiais em 0,1 unidades de pH e a redução da disponibilidade de íons carbonato usado por muitos invertebrados marinhos para o processo de calcificação (FEELY et al., 2004). Se as emissões de gás carbônico continuarem na mesma intensidade em que se encontram atualmente, estima-se que até o fim do século, os níveis de pH nos oceanos diminuam de 0,5 até 0,7 unidades de pH, o que pode resultar em mudanças na química do carbonato de forma abrupta, o que não permitiria a maioria dos organismos a possibilidade do surgimento de mecanismos genéticos adaptativos (CALDEIRA; WICKETT, 2005).

Além da acidificação lenta e gradual prevista, algumas regiões costeiras já enfrentam grandes variações no pH de forma abrupta. Ecossistemas costeiros, como o fiorde de Kiel, na Alemanha, podem enfrentar aumento na concentração de CO_2 muito maior do que o previsto em média para os oceanos (HIEBENTHAL et al., 2016), ou seja, alguns organismos podem experimentar valores de pH até menores do que os previstos até o fim do século durante períodos curtos de forma irregular ou sazonalmente (HIEBENTHAL et al., 2016; MELZNER et al., 2020). Por exemplo, no pacífico oriental e no mar Báltico, ocorre acidificação devido a mescla das águas de camadas mais superficiais com as águas frias com baixos valores de pH de camadas mais profundas (BYRNE; PRZESLAWSKI, 2013).

O processo de acidificação dos oceanos afeta a vida marinha de maneiras distintas, e a resposta dos organismos a esse estressor vai depender de vários fatores, como complexidade biológica, nível taxonômico, plasticidade fisiológica, capacidade adaptativa, história evolutiva, etc (MELZNER et al., 2020; WHITELEY et al., 2018).

Invertebrados bentônicos de regiões estuarinas experimentam variações diárias de fatores abióticos estressantes, como temperatura, pH, salinidade, oxigênio dissolvido, entre outros, devido a mudanças naturais associadas ao ciclo de maré (BYRNE; PRZESLAWSKI, 2013). Entre os táxons que habitam o ambiente estuarino, os crustáceos mostram uma grande variedade de respostas às mudanças de salinidade, desde osmorregulação, osmoconformação ou uma combinação entre elas (FREIRE et al., 2020; HENRY et al., 2012; KIRSCHNER, 2004; PÉQUEUX, 1995). Consequentemente, estudos em crustáceos estuarinos fornecem uma oportunidade ideal para examinar as relações entre variabilidade ambiental e a capacidade de tolerar os vários níveis do processo de acidificação (FEELY et al., 2004).

Em exposição a acidificação, a excreção de CO_2 através das brânquias de crustáceos estuarinos é comprometida, causando aumento da concentração de CO_2 no compartimento extracelular (hemolinfa), afetando o equilíbrio ácido-base. As mudanças no pH da hemolinfa são tamponados através de mecanismos fisiológicos e moleculares, como por exemplo, pela atuação da enzima anidrase carbônica (WHITELEY; TAYLOR, 1992). Tais ajustes são importantes porque eles mantêm o equilíbrio ácido base dos fluidos corporais dentro de limites necessários para a correta funcionalidade dos mecanismos intracelulares (WHITELEY, 2011). A regulação do pH é importante, por exemplo, para manter o suprimento de oxigênio em condições ideais, pois o aumento da concentração de prótons diminui a afinidade do oxigênio ao pigmento respiratório hemocianina, reduzindo a entrega de oxigênio aos tecidos (WHITELEY; TAYLOR, 1992).

A habilidade de compensar os efeitos da acidificação pode variar de acordo com o estilo de vida, além de outros fatores como plasticidade fisiológica e história evolutiva. Crustáceos decápodes com altas taxas de atividade tem uma maior capacidade para compensação passiva de distúrbio ácido base da hemolinfa, por possuírem maior nível circulante de hemocianina do que espécies menos ativas (WATT; WHITELEY; TAYLOR, 1999). Baixos níveis de hemocianina estão associados com baixas taxas de absorção de oxigênio e alta concentração lactato circulante, mostrando que para esses animais existe a necessidade de depender do metabolismo anaeróbico em algumas circunstâncias (WATT; WHITELEY; TAYLOR, 1999; WHITELEY, 2011).

Conforme são descritos os efeitos da acidificação dos oceanos sobre a ecologia e a fisiologia de invertebrados estuarinos, fica cada vez mais aparente que mesmo as espécies reconhecidas atualmente como tolerantes a um ambiente acidificado estão sob ameaça. Portanto, determinar a capacidade dos organismos de se aclimatarem ou se adaptarem as mudanças climáticas e estressores abióticos como pH, pode desempenhar um papel central na compreensão de como organismos e populações responderão aos vários cenários previstos de mudanças climáticas (DONELSON et al., 2010).

O conhecimento sobre como a acidificação em conjunto com salinidade atua sobre a fisiologia de espécies de *Callinectes* ainda é escasso, com um único estudo encontrado, em que *C. danae* teve a sua capacidade de osmorregular afetada negativamente após 72 horas de exposição a pH e salinidade reduzidas (RAMAGLIA; DE CASTRO; AUGUSTO, 2018). De forma parecida, nosso propósito neste capítulo é determinar se a exposição aguda a acidificação (6 horas) e variação de salinidade pode alterar a performance fisiológica *Callinectes danae* e *C. ornatus*. Espera-se que ambas as espécies, por estarem próximos ao seu limite fisiológico, tenham a osmorregulação alterada de forma negativa e aumentem o metabolismo para compensar os efeitos da acidificação em conjunto com hiposalinidade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Espécimes de *Callinectes danae* foram coletados através de captura por armadilhas cilíndricas dispostas na Baía de Paranaguá, Paraná (25°31'44.3"S 48°28'23.1"W), enquanto os indivíduos de *Callinectes ornatus* foram obtidos através do descarte da fauna acompanhante da pesca com rede de arrasto de camarão na praia de Shangrilá, Pontal do Paraná, Paraná (25°37'29" S 48°25'3" W). De imediato, os animais foram acomodados em caixas plásticas contendo água do local de coleta e mantidos sob aeração constante e transportados para o laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO) do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná. No LFCO, os animais permaneceram em aquário estoque de 250 litros contendo água do mar durante sete dias com aeração constante, filtro externo, salinidade ± 35‰, temperatura 26 °C, pH ± 8,0, oxigênio dissolvido na água em torno de 8,0 mg/L e fotoperíodo natural. Os valores das condições abióticas para aclimatação foram decididos com base em estudos da qualidade da água na Baía de Paranaguá pela empresa particular responsável pela administração do porto, em levantamentos realizados nos últimos 5 anos. Os animais foram alimentados com pedaços pequenos de filé de peixe a cada dois dias, sendo que a alimentação foi encerrada 24 horas antes dos experimentos.

2.2 EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados através da transferência de indivíduos do aquário estoque para aquários individuais preenchidos com 2 litros de água salgada/salobra. Os grupos controles foram mantidos em pH 8,0 e expostos a desafios salinos de redução de salinidade: 35‰ (salinidade controle), 30, 25 e 20‰, pelo período de seis horas. Os grupos experimentais foram mantidos em pH 7,3 e foram expostos aos mesmos desafios salinos: 35‰ (controle), 30, 25 e 20‰ pelo período de seis horas. Todo o processo foi repetido seis vezes para cada grupo controle ou experimental e os valores de pH na água foram obtidos através do borbulhamento de

CO_2 e acompanhados com a utilização de um phmetro (inoLAB pH Level 1WTW (Germany).

2.3 RETIRADA DE AMOSTRAS E PARÂMETROS ANALISADOS

Após os experimentos, os animais foram cobertos por gelo picado em caixa de isopor, crioanestesiados por aproximadamente cinco minutos sem contato direto como o gelo, eutanasiados e houve a retirada de amostras de tecido muscular do quinto par de pereiópodo (adaptado para natação) para determinação de teor hídrico. Também houve coleta de hemolinfa por punção da membrana artrodial de um pereiópodo e armazenada em freezer -20°C para determinação da osmolalidade, concentrações de cloreto, magnésio e lactato e oxihemocianina. Os seguintes parâmetros foram analisados através de amostras das águas experimentais: consumo de oxigênio e valores iniciais e finais de concentração de amônia.

2.4 OSMOLALIDADE E TEOR HÍDRICO

A osmolalidade foi determinada em amostras de hemolinfa não diluídas, através de Micro-Osmômetro de Pressão de Vapor (VAPRO 5520, Wescor, USA). Para a determinação do teor hídrico, amostras do tecido muscular foram pesadas (peso úmido) em tubos eppendorf de 2 mL previamente pesados e fechados (Balança Bioprecisa FA2104 N, precisão 0,1mg, Brasil), e em seguida foram secos em estufa por 48 horas a 62°C. Os tecidos secos foram pesados novamente (peso seco), e a perda de peso (água) foi expressa como porcentagem através da formula:

$$TH\ (\%) = [(\text{peso úmido} - \text{peso seco}) / \text{peso úmido}] \times 100$$

2.5 CONCENTRAÇÕES DE CLORETO, MAGNÉSIO E LACTATO

Para a determinação da concentração de cloreto, amostras de hemolinfa foram diluídas com água deionizada na proporção 1:5, lidas em duplicata na

absorbância de 450 nm. Para magnésio, amostras de hemolinfa foram diluídas com água deionizada na proporção 1:25, lidas em duplicata na absorbância de 505 nm. Por fim, para a determinação da concentração de lactato, amostras de hemolinfa não diluídas foram lidas em duplicata na absorbância de 550 nm, após terem permanecido aquecidas em banho maria (WB/OB 7-45 WBU 45, Memmert, Germany) por 5 minutos em 37 °C. Todas as análises foram realizadas em espectrofotômetro colorimétrico (Ultrospec 2100 PRO Amersham Pharmacia biotech, Sweden) e foram utilizados kits comerciais específicos para cloreto (ref: 115), magnésio (ref: 50) e lactato (ref: 138) da empresa Labtest (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

2.6 CONSUMO DE OXIGÊNIO

Todos os experimentos foram realizados com aeração constante, que foi interrompida durante a última hora do experimento. Nesse momento, foram medidas as concentrações iniciais de oxigênio com o auxílio de um oxímetro (YSI 55, YSI, Yellow Springs, OH, USA). Ao final dessa hora, as concentrações finais de oxigênio também foram medidas e a diferenças entre esses dois valores foi utilizada em conjunto com a massa de cada animal para a obtenção do consumo de oxigênio por indivíduo, através da seguinte fórmula:

Consumo de O_2 (μgO_2/g.weight.h) = (O_2 inicial – O_2 final)*volume*1000/massa

Ao mesmo tempo, alguns aquários contendo apenas água foram medidos também, como forma de assegurar que os valores observados foram produzidos apenas pelos animais em experimento.

2.7 AMÔNIA EXCRETADA E CONCENTRAÇÃO DE OXIHEMOCIANINA

Antes do início dos experimentos, foram retiradas amostras de água para dosagem dos valores iniciais da concentração de amônia e o mesmo procedimento foi realizado ao final dos experimentos. Para determinar a concentração de amônia, foi utilizado o Spectro Kit Amônia Indotest (ref: 2542) comercializado pela empresa Alfakit (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil) e a leitura das amostras ocorreu em 630

nm utilizando espectrofotômetro colorimétrico (Ultrospec 2100 PRO Amersham Pharmacia biotech, Sweden). Esse método é baseado na formação do azul de indofenol, em que o nitrogênio amoniacal presente na amostra reage com o hipoclorito de sódio para formação de monocloroamino, que vai reagir com o fenol, na presença de um catalisador. Os níveis de oxihemocianina na hemolinfa foram determinados pela adição de 100 µL de hemolinfa recém-amostrada a 900 µL de água deionizada em uma cubeta de quartzo de 10 mm. A absorbância foi lida imediatamente em 335 nm (comprimento de onda de absorção característico da oxihemocianina) em espectrofotômetro colorimétrico (Ultrospec 2100 pro - Amersham Pharmacia Biotech), conforme descrito por Hagerman (1986) e Cheng e Chen (2002). A concentração de oxihemocianina foi calculada com base em Hagerman (1986).

2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado ANOVA de duas vias fixando os seguintes fatores: acidificação e salinidade. Caso o conjunto de dados não tenha atingido os requerimentos obrigatórios de normalidade e homogeneidade de variâncias, o teste de Scheirer-Ray-Hare foi utilizado. Para localizar as diferenças entre os grupos analisados, foi aplicado o teste de Tukey, como teste post-hoc. Para analisar as diferenças entre as espécies, foi utilizado Teste-t ou Mann-Whitney, se os dados não atingiam os requisitos de normalidade. Os testes foram realizados através do software Sigmaplot e o limite de significância sempre foi igual ou menor do que 0,05.

3 RESULTADOS

3.1 OSMOLALIDADE DA HEMOLINFA

Em pH controle e experimental, a osmolalidade de *C. danae* diminuiu apenas em salinidade 20‰. Para *C. ornatus*, houve redução da osmolalidade em ambos os valores de pH e em todas as salinidades (TABELA 1). Comparativamente, a osmolalidade é menor para *C. danae* em salinidade alta (35‰) e maior em salinidade intermediaria (25‰) do que *C. ornatus* (FIGURA 1A).

3.2 HIDRATAÇÃO TECIDUAL MUSCULAR

Em meio mais acidificado, houve aumento da hidratação tecidual em ambas as espécies conforme a salinidade diminui, especialmente em 20‰, embora não tenha ocorrido diferenças entre as duas espécies (FIGURA 2B).

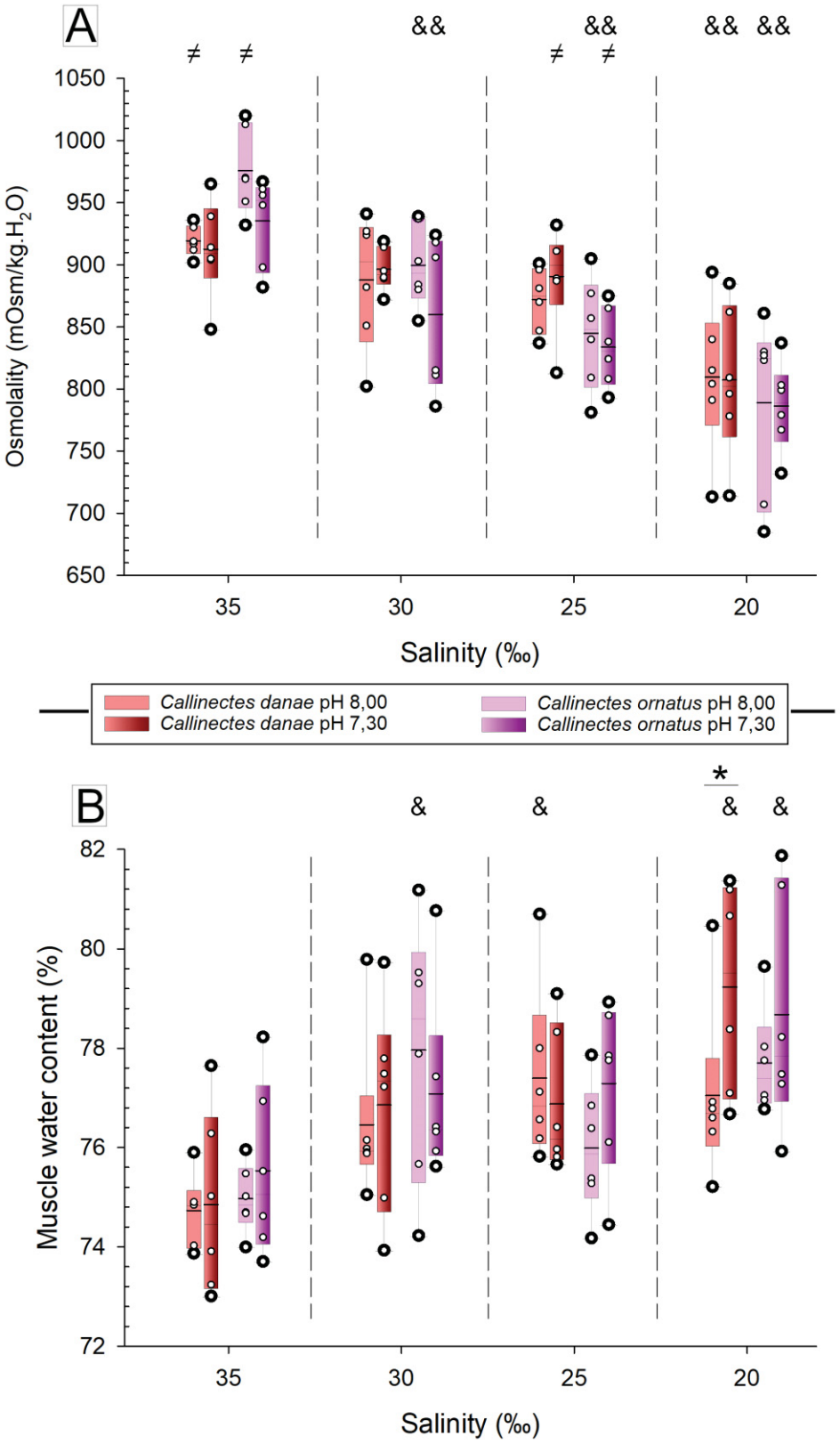


Figura 1. Osmolalidade da hemolinfa (A) e teor hídrico muscular (B), de *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* expostos aos seguintes valores de pH: 8,0 (controle) e 7,3, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas *: diferença entre pH controle (8,0) e experimental (7,3) para cada espécie; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. n = 6.

3.3 CONCENTRAÇÃO DE CLORETO NA HEMOLINFA

Em ambos os valores de pH, houve diminuição de cloreto em *C. danae* na salinidade 20‰. Em *C. ornatus*, houve diminuição de cloreto apenas em pH controle e em salinidades 25 e 20‰ (FIGURA 2B).

3.4 CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO NA HEMOLINFA

O meio mais acidificado levou a redução de magnésio em *C. danae* apenas em salinidade 20‰. Para *C. ornatus*, houve redução de magnésio quando exposto ao meio mais acidificado em todas as salinidades experimentais (FIGURA 2B). Comparativamente, *C. danae* apresenta menor concentração de magnésio do que *C. ornatus* nas salinidades altas e intermediárias (TABELA 1).

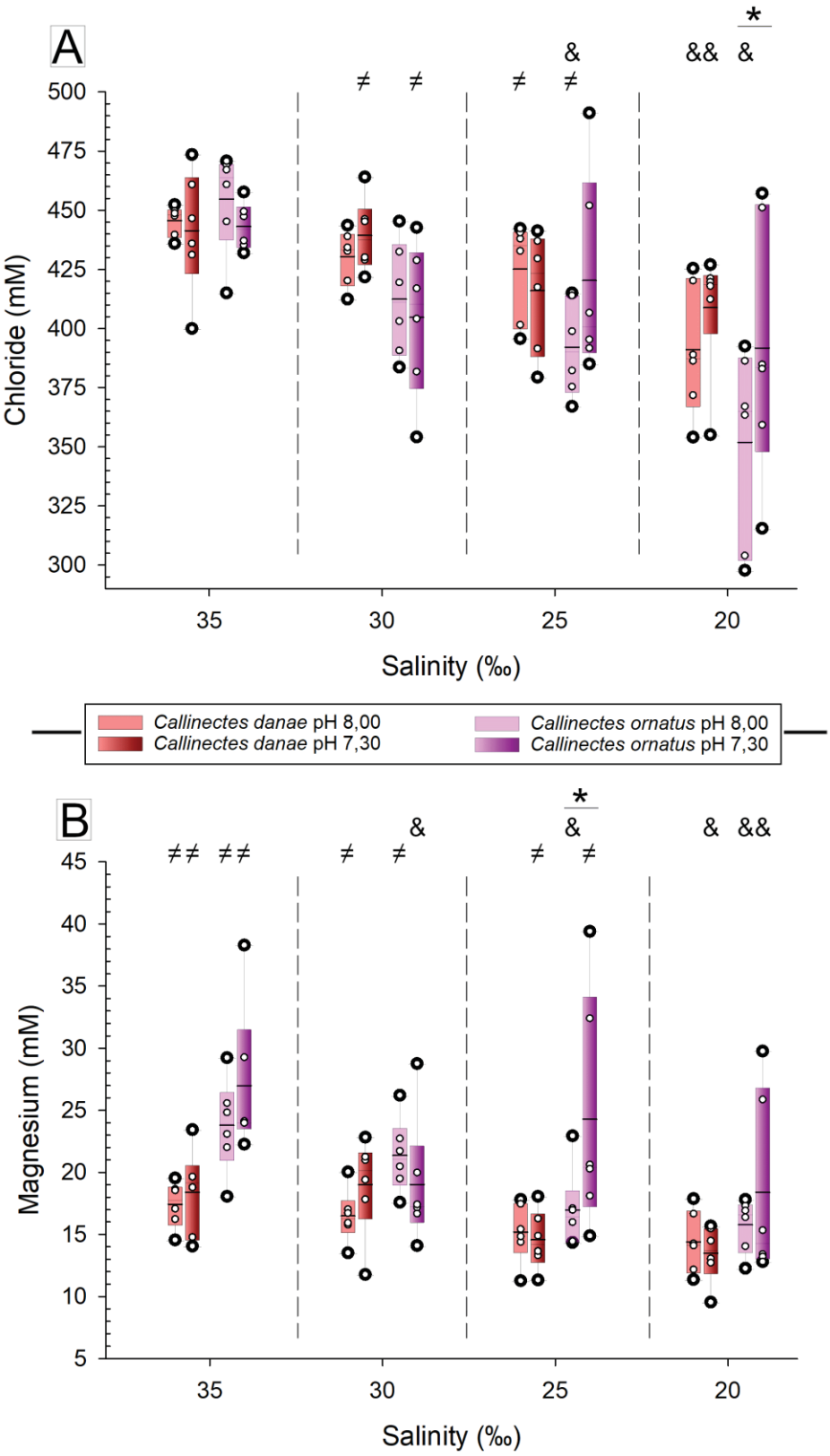


Figura 2. Concentração de cloreto (A) e concentração de magnésio (B) de *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* expostos aos seguintes valores de pH: 8,0 (controle) e 7,30, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas *: diferença entre pH controle (8,0) e experimental (7,3) para cada espécie; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. n = 6.

TABELA 1. Osmolalidade (mOsm/kg.H_2O), teor hídrico (%) e concentrações iônicas de cloreto e magnésio (mM) em *Callinectes danae e Callinectes ornatus* após exposição a diferentes valores de pH (8,00 e 7,30) e salinidades (35‰, 30‰, 25‰ e 20‰). Os dados foram representados pela média ± erro padrão. N = 6.

Table 1	pH	Salinity	Osmolality (mOsm/kg.H_2O)	Water osmolality (mOsm/kg.H_2O)	Muscle water content (%)	Chloride (Mm)	Water chloride (Mm)	Magnesium (mM)	Water magnesium (Mm)
			Média ± Erro	*Prosser, 1973*	*Média ± Erro*	*Média ± Erro*	*Prosser, 1973*	*Média ± Erro*	*Prosser, 1973*
C. danae	pH 8,00	35 ‰	919,33 ± 5,00	1040,00	74,73 ± 0,30	445,68 ± 2,61	559,00	17,43 ± 0,76	55,00
		30 ‰	887,83 ± 21,93	900,00	76,46 ± 0,68	430,40 ± 4,83	479,00	16,49 ± 0,87	47,00
		25 ‰	872,00 ± 10,57	750,00	77,40 ± 0,73	425,16 ± 8,52	399,00	15,20 ± 0,97	39,30
		20 ‰	809,50 ± 24,35	600,00	77,05 ± 0,73	391,12 ± 11,26	319,00	14,40 ± 1,02	32,70
	pH 7,30	35 ‰	912,50 ± 16,07	1040,00	74,85 ± 0,75	441,36 ± 10,46	559,00	18,39 ± 1,42	55,00
		30 ‰	896,50 ± 7,10	900,00	76,86 ± 0,85	439,43 ± 6,30	479,00	19,00 ± 1,61	47,00
		25 ‰	890,50 ± 16,91	750,00	76,88 ± 0,60	416,05 ± 10,34	399,00	14,58 ± 0,97	39,30
		20 ‰	807,33 ± 24,98	600,00	79,23 ± 0,86	408,90 ± 10,95	319,00	13,49 ± 0,93	32,70
			Média ± Erro	*Prosser, 1973*	*Média ± Erro*	*Média ± Erro*	*Prosser, 1973*	*Média ± Erro*	*Prosser, 1973*
C. ornatus	pH 8,00	35 ‰	975,83 ± 14,08	1040,00	74,97 ± 0,28	454,73 ± 8,81	559,00	23,80 ± 1,53	55,00
		30 ‰	899,67 ± 13,64	900,00	77,96 ± 1,06	412,45 ± 9,87	479,00	21,36 ± 1,21	47,00
		25 ‰	844,83 ± 18,43	750,00	75,99 ± 0,54	392,08 ± 8,28	399,00	16,96 ± 1,29	39,30
		20 ‰	788,83 ± 30,00	600,00	77,70 ± 0,44	351,84 ± 16,77	319,00	15,79 ± 0,88	32,70
	pH 7,30	35 ‰	935,33 ± 14,71	1040,00	75,53 ± 0,71	443,17 ± 4,06	559,00	26,99 ± 2,46	55,00
		30 ‰	860,00 ± 25,48	900,00	77,08 ± 0,78	404,77 ± 13,25	479,00	19,01 ± 2,10	47,00
		25 ‰	833,83 ± 13,06	750,00	77,29 ± 0,70	420,34 ± 17,22	399,00	24,28 ± 3,88	39,30
		20 ‰	786,17 ± 14,59	600,00	78,68 ± 0,97	391,79 ± 22,22	319,00	18,40 ± 3,04	32,70

3.5 CONSUMO DE OXIGÊNIO

Em meio mais acidificado, houve aumento no consumo de oxigênio em *C. ornatus* em todas as salinidades. Comparativamente, *C. danae* consome menos oxigênio do que *C. ornatus* em meio mais acidificado nas salinidades 25 e 20‰ (FIGURA 3A).

3.6 CONCENTRAÇÃO DE LACTATO NA HEMOLINFA

A concentração de lactato na hemolinfa de ambas as espécies permaneceu estável em exposição aos dois valores de pH utilizados. Comparativamente, *C. danae* apresenta maior concentração de lactato do que *C. ornatus* em praticamente todas as condições experimentais (FIGURA 3B).

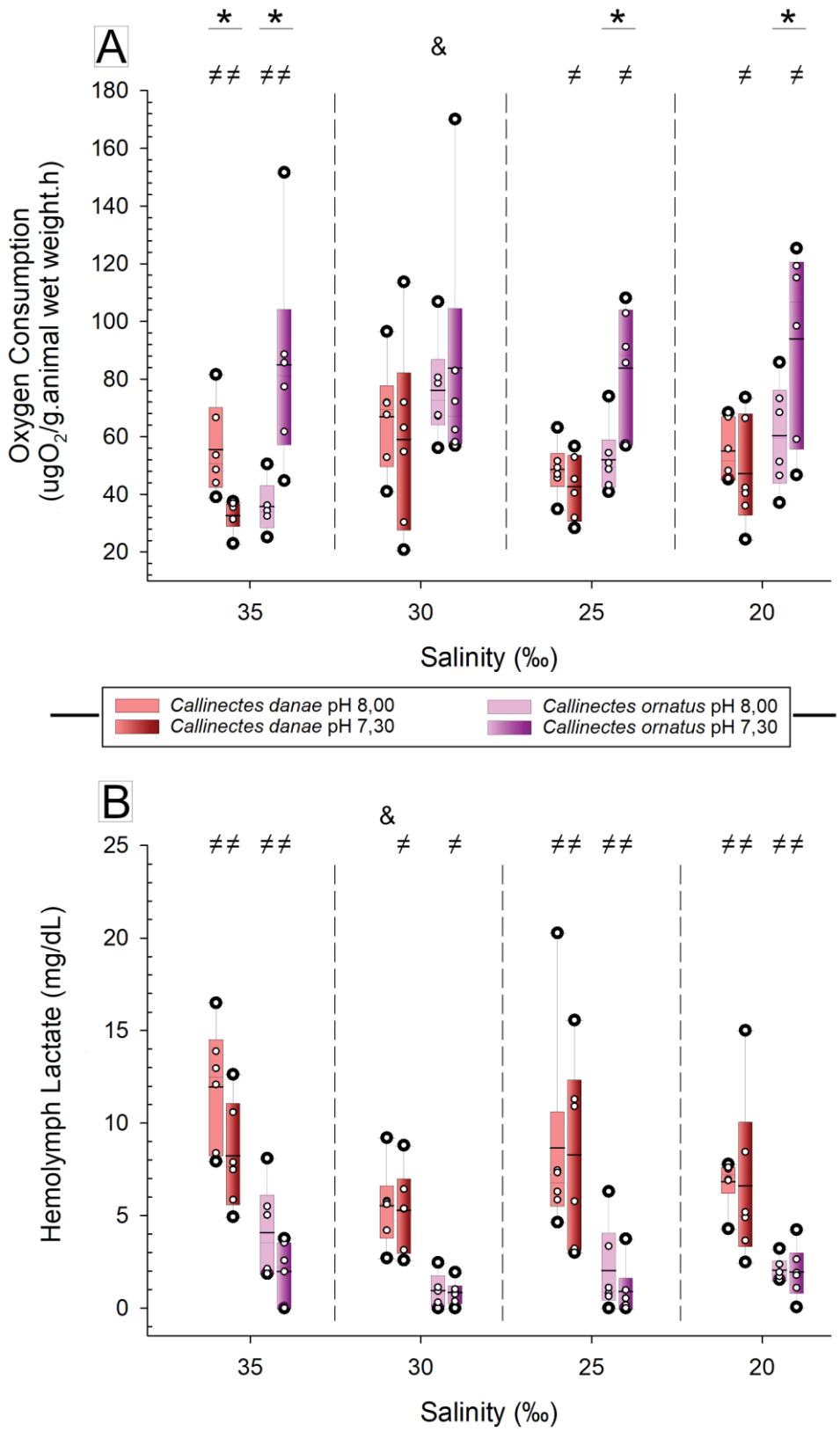


Figura 3. Consumo de oxigênio (A) e concentração de lactato (B) de *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* expostos aos seguintes valores de pH: 8,0 (controle) e 7,3, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas *: diferença entre pH controle (8,0) e experimental (7,3) para cada espécie; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. n = 6.

3.7 AMÔNIA EXCRETADA NA ÁGUA

O meio mais acidificado levou a diminuição da excreção de amônia em *C. danae* na salinidade 30‰, e em *C. ornatus* nas salinidades 35 e 25‰ (TABELA 2). Comparativamente, a excreção de amônia é maior em *C. danae* em pH controle, apenas em 30‰, mas menor do que em *C. ornatus* também em pH controle e salinidade 25‰ (FIGURA 4A).

3.8 CONCENTRAÇÃO DE OXIHEMOCIANINA

A concentração de oxihemocianina em ambas as espécies é diferente em ambas as condições de pH em salinidade 35‰. Conforme a salinidade diminui, a concentração de oxihemocianina tende a tornar-se igual para ambas as espécies (FIGURA 4B).

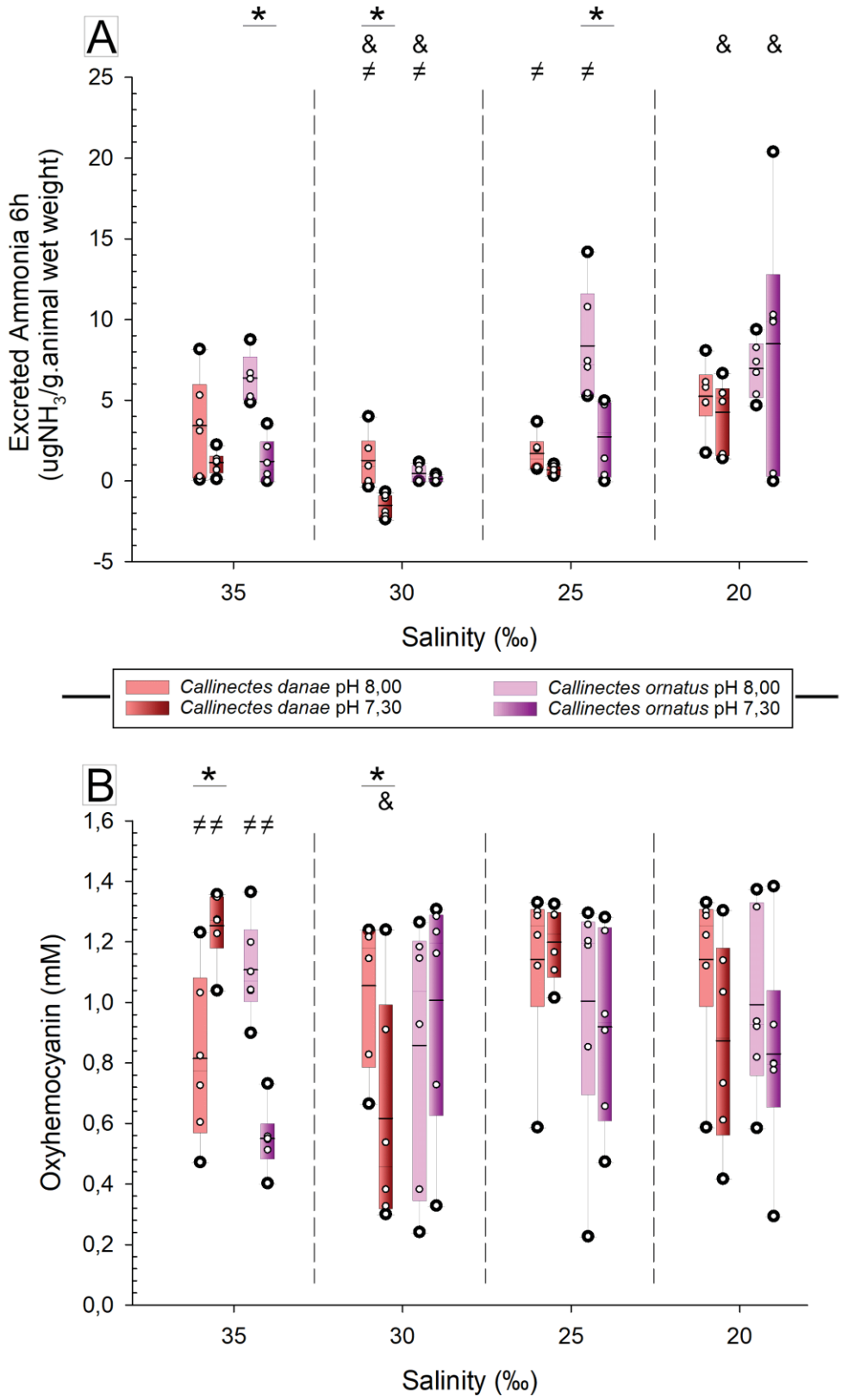


Figura 4. Amônia excretada na água (A) e concentração de oxihemocianina (B) de *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* expostos aos seguintes valores de pH: 8,0 (controle) e 7,3, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas *: diferença entre pH controle (8,0) e experimental (7,3) para cada espécie; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. n = 6.

TABELA 2. Consumo de oxigênio (µgO_2/g.weight.h), concentração de lactato na hemolinfa (mg/dL), excreção de amônia (µgNH_3/g.weight) e concentração de oxihemocianina em *Callinectes danae e Callinectes ornatus* após exposição a diferentes valores de pH (8,00 e 7,30) e salinidades (35‰, 30‰, 25‰ e 20‰). Os dados foram representados pela média ± erro padrão. N = 6.

Table 2	pH	Salinity	O_2 consumption µgO_2/g.weight.h			Hemolymph lactate (mg/dL)			Ammonia µgNH_3/g.weight			Oxyhemocyanin (mM)		
			Média	*±*	*Erro*	*Média*	*±*	*Erro*	*Média*	*±*	*Erro*	*Média*	*±*	*Erro*
C. danae	pH 8,00	35 ‰	55,60	±	6,47	11,95	±	1,35	3,43	±	1,25	0,82	±	0,11
		30 ‰	66,94	±	7,73	5,53	±	0,88	1,26	±	0,64	1,06	±	0,10
		25 ‰	48,62	±	3,74	8,64	±	2,37	1,70	±	0,46	1,14	±	0,11
		20 ‰	55,00	±	4,28	6,84	±	0,53	5,25	±	0,85	0,95	±	0,18
	pH 7,30	35 ‰	32,63	±	2,21	8,23	±	1,19	1,14	±	0,29	1,25	±	0,05
		30 ‰	59,12	±	13,51	5,28	±	0,92	-1,52	±	0,29	0,62	±	0,15
		25 ‰	42,63	±	4,60	8,29	±	2,07	0,69	±	0,11	1,20	±	0,05
		20 ‰	47,21	±	7,71	6,61	±	1,87	4,26	±	0,89	0,87	±	0,14
			Média	*±*	*Erro*	*Média*	*±*	*Erro*	*Média*	*±*	*Erro*	*Média*	*±*	*Erro*
C. ornatus	pH 8,00	35 ‰	35,74	±	3,78	4,08	±	1,04	6,38	±	0,62	1,11	±	0,07
		30 ‰	76,13	±	7,13	7,64	±	6,69	0,47	±	0,22	0,86	±	0,18
		25 ‰	52,06	±	4,84	2,03	±	0,97	8,36	±	1,42	1,00	±	0,17
		20 ‰	60,41	±	7,51	2,05	±	0,26	6,97	±	0,72	0,99	±	0,12
	pH 7,30	35 ‰	84,96	±	14,92	1,98	±	0,67	1,20	±	0,57	0,55	±	0,04
		30 ‰	83,80	±	17,73	0,83	±	0,27	0,12	±	0,08	1,01	±	0,16
		25 ‰	83,74	±	8,98	0,90	±	0,59	2,72	±	0,97	0,92	±	0,13
		20 ‰	94,01	±	13,59	1,95	±	0,58	8,51	±	3,09	0,83	±	0,14

4 DISCUSSÃO

Esse capítulo avaliou a performance fisiológica (osmorregulação e metabolismo) de *Callinectes* danae e *C. ornatus* expostos de forma aguda a combinação de acidificação e hiposalinidade por 6 horas. Mesmo a exposição de poucas horas a esses dois fatores foi suficiente para que ambas as espécies apresentassem prejuízos na sua osmorregulação e aumento de metabolismo. Quando o tratamento em que as condições de pH e salinidade foram mais desafiadoras, em ambas as espécies houve redução de osmolalidade da hemolinfa, influxo de água no tecido muscular, aumento no consumo de oxigênio e excreção de amônia, porém esse efeito foi mais evidente em *C. ornatus*.

Ambas as espécies demonstraram redução na osmolalidade nos dois valores de pH utilizados: em *C. danae* apenas em salinidade 20‰, mas para *C. ornatus*, em todas as salinidades. Em trabalho publicado por Ramaglia; De Castro; Augusto (2018) indivíduos de *C. danae* também foram expostos a variação de salinidade (40, 35, 30, 25 e 20 e 10‰) e pH (8,0 e 7,3), porém o tempo de exposição foi maior: 72 horas. Os resultados obtidos mostraram que *C. danae* passou a exibir osmoconformação em 20 e 10‰, demonstrando perda da regulação osmótica. Em comparação, nossos resultados demonstram que ambas as espécies de *Callinectes* mantém valores considerados adequados de osmolalidade, porém com tendência de queda mais evidente para *C. ornatus*, sugerindo que o tempo e a frequência de exposição desempenham papel fundamental nos mecanismos de resposta de espécies de *Callinectes* a esses estressores.

A regulação iônica também foi afetada pela ação sinérgica de acidificação e hiposalinidade, porém de forma mais sutil, com *C. danae* apresentando menor concentração de cloreto na sua hemolinfa do que *C. ornatus*, que por sua vez, apresenta maior concentração de magnésio. A exposição a valores baixos de pH pode levar ao acúmulo de HCO_3^- no liquido extracelular (HU et al., 2016; SPICER; RAFFO; WIDDICOMBE, 2007) como uma tentativa de regulação ácido base, mitigando os efeitos prejudiciais da acidose proveniente da exposição a concentrações elevadas de pCO_2.

Em crustáceos, esse mecanismo de acúmulo HCO_3^- está ligado diretamente à regulação iônica (HENRY et al., 2012; HU et al., 2016), no qual o bicarbonato pode ser trocado por cloreto através da ação do trocador HCO_3^-/Cl, especialmente diante da necessidade de manter a regulação iônica diante de hiposalinidade (WHITELEY et al., 2001). Um possível aumento de bicarbonato no liquido extracelular, sua relação com cloreto e com os mecanismos de regulação ácido base/iônica poderia explicar, porque em *C. ornatus*, a concentração de cloreto aumentou em exposição a pH 7,3 e 20‰.

A concentração de magnésio foi maior em *C. ornatus* do que em *C. danae*, em salinidade controle (35‰) e independente de pH. Conforme a salinidade diminui, a diferença entre as espécies desaparece. O modo como a exposição a acidificação afeta a regulação de magnésio é dependente do tempo que cada espécie de crustáceo leva para compensar essa diferença de pH. Por exemplo, no siri *Necora puber* exposto a pH de 7,3, houve aumento da concentração de magnésio nos primeiros três dias (de ~ 12 mM para ~20 mM), embora esse valor tenha voltado ao nível basal após 16 dias de exposição (SPICER; RAFFO; WIDDICOMBE, 2007). De forma semelhante, a concentração de magnésio em *Carcinus maenas* aumentou de 21 mM para 29 mM após exposição a pCO_2 de 1.800 uatm, porém essa espécie não foi capaz de regular magnésio mesmo após exposição de 4 semanas (MAUS; BOCK; PÖRTNER, 2018).

É importante ressaltar dois pontos neste momento: 1) os trabalhos sobre regulação de magnésio citados envolvem apenas níveis diferentes de acidificação, não levando em conta o papel da hiposalinidade nesse processo, pois não há trabalhos sobre regulação de magnésio em que essas duas variáveis são analisadas para crustáceos decápodes. 2) Apesar do efeito sinérgico evidente das duas variáveis analisadas, a concentração iônica de magnésio e cloreto são diferentes das respectivas concentrações desses íons nas águas experimentais. Isso evidencia que as duas espécies demonstraram grande capacidade de regulação iônica, porém a performance fisiológica foi inferior em condições mais desafiadoras.

A regulação iônica em hiposalinidade depende principalmente da atividade de proteínas de membrana (NAKATPase, NKCC, canais de potássio e cloreto) localizados no epitélio branquial, que captam ativamente NaCl do ambiente e mantem a homeostase do liquido extracelular (HENRY et al., 2012; PÉQUEUX, 1995). Esse processo é custoso energeticamente, principalmente pelo aumento de atividade da

NAKATPase, que é considerada um dos principais responsáveis pelo aumento de taxas metabólicas observadas em muitos crustáceos osmorreguladores (BROWN et al., 2020). Além disso, crustáceos do gênero *Callinectes* são caracterizados por apresentarem brânquias de alta condutividade (do tipo *leaky*), o que faz com que essas espécies tenham altas taxas de perda de sal para o ambiente externo (HENRY et al., 2012; LARSEN et al., 2014). Consequentemente, essas perdas de sal devem ser compensadas através de mecanismos de captação ativa, aumentando os custos com a osmorregulação (HENRY et al., 2012; PÉQUEUX, 1995). Essa característica poderia explicar a manutenção da osmolalidade em níveis considerados aceitáveis em exposição em salinidades e pH mais baixos, porém ao custo do aumento da concentração de lactato utilizado como substrato energético auxiliar (*C. danae*) ou do consumo de oxigênio (*C. ornatus*) para a geração de energia necessária para a ativação de transportadores de íons.

Um dos proxys mais comuns utilizados em animais aquáticos para demonstrar aumento na taxa metabólica é o consumo de oxigênio, que pode aumentar, diminuir ou permanecer estável em decápodes expostos a hiposalinidade (DIAZ et al., 2004; PILLAI; DIWAN, 2002; PILLER et al., 1995; URBINA et al., 2010). Nossos resultados apontaram que *C. danae* e *C.ornatus* não apresentaram aumento no consumo de oxigênio quando expostos apenas a hiposalinidade, com exceção de um leve aumento de oxigênio em *C. ornatus* em salinidade 30‰. Há algumas possíveis explicações para o resultado observado: o consumo de oxigênio já é alto (ou pelo menos suficiente) em salinidade controle para manter a regulação de cloreto e magnésio em níveis adequados, reforçando ainda mais a eurihalinidade de ambas as espécies; o tempo de exposição de seis horas pode ter sido curto, visto que em espécies de *Callinectes* expostas a pelo menos duas semanas de aclimatação a hiposalinidade, foi observado aumento no consumo de oxigênio (PILLER et al., 1995). Em trabalho publicado por Freire et al., (2020), o consumo de oxigênio em *C. danae* foi similar ao descrito aqui, não sendo afetado pela salinidade em 6 horas. Contudo, após 12 horas, o consumo de oxigênio aumentou conforme a salinidade diminuiu. Mesmo em comparação ao capítulo anterior dessa tese, o consumo de oxigênio em ambas as espécies também não é afetado apenas por hiposalinidade.

A acidificação do meio levou ao aumento no consumo de oxigênio em *C. ornatus,* assim como o aquecimento da água no capítulo 1 dessa tese. Esse resultado

é mais uma evidência de que *C. ornatus* é mais vulnerável a mudanças ambientais do que o seu congênero *C. danae*. O aumento no consumo de oxigênio observado em *C. ornatus* é incomum para invertebrados marinhos expostos a acidificação. Mesmo com o efeito sinérgico da hiposalinidade, a literatura encontrada aponta para uma diminuição no consumo de oxigênio em tais condições (BROWN et al., 2020; RAMAGLIA; DE CASTRO; AUGUSTO, 2018; SMALL et al., 2010).

A excreção de amônia é um biomarcador importante, pois a sua síntese está relacionado tanto a osmorregulação quanto ao metabolismo. O aumento da sua excreção por decápodes em baixas salinidades ocorre pela desaminação de aminoácidos livres, que são excretados para o ambiente externo em forma de amônia, carregando o excesso de água proveniente do influxo de água resultante da diferença de gradiente entre a osmolalidade dentro e fora do organismo (HENRY et al., 2012; LARSEN et al., 2014). Esses aminoácidos surgem principalmente do metabolismo de proteínas, que em situações de estresse e de alta demanda energética, podem ser utilizados para geração de energia (SOKOLOVA, 2013; SOKOLOVA et al., 2012). Esse pode ser o caso observado em *C. ornatus*, que em exposição a pH 7,3 tem grande consumo de oxigênio, possui baixa concentração de lactato (que pode já ter sido todo consumido durante o experimento) e aumento da excreção de amônia. Um fator importante a se destacar aqui: os valores de consumo de oxigênio, concentração de lactato e excreção de amônia observados em *C. ornatus* são menores neste capítulo do que no capítulo anterior, que teve como alvo a exposição a aumento de temperatura. Isso pode indicar que a acidificação pode afetar o metabolismo, tornando as respostas metabólicas mais lentas. Até mesmo em *C. danae* o consumo de oxigênio e a excreção de amônia foi menor em exposição a acidificação do que ao aumento de temperatura (Capítulo 1 dessa tese). Resultados parecidos foram obtidos por Ramaglia; De Castro; Augusto, (2018) em que *C. danae* exposto por 72 horas a 20‰ e pH 7,3 diminuiu o consumo de oxigênio e excreção de amônia. Nossos resultados sugerem que acidificação e aumento de temperatura afetam *C. danae* e *C. ornatus* de maneiras distintas, quase antagônicas em relação ao seu metabolismo.

Outro fator utilizado para analisar a demanda e oferta energética em um organismo é a produção de lactato. O aumento da sua concentração indica necessidade de utilização do metabolismo anaeróbico para suprir as demandas energéticas (FREIRE et al., 2020; HENRY et al., 2012; MACIEL et al., 2008). Neste

trabalho, a concentração de lactato na hemolinfa de *C. danae* e principalmente *C. ornatus* manteve-se estável em níveis considerados baixos (~7,5 mg/dL em *C.danae* e ~ 2,68 mg/dL em *C. ornatus*) em comparação com outro estudo realizado com *Callinectes danae* (~22,5 mg/dL) (FREIRE et al., 2020). Entretanto, esses valores estão próximos aos do capítulo 1 dessa tese: ~6,6 mg/dL em *C. danae* e ~4,6 mg/dL em *C. ornatus*. Isso indica que a energia gerada pela respiração celular proveniente do oxigênio foi suficiente para manter a homeostase, embora o lactato possa ter contribuido em menor escala, principalmente para *C. danae*. Outro fato que se destaca é que a concentração de lactato na hemolinfa de *C. ornatus* é muito menor do que em *C. danae*, o que pode indicar menoar ativação do metabolismo anaeróbico ou o completo uso desse substrato energético ao longo das 6 horas de exposição.

A eficiência da geração energética em crustáceos é dependente do transporte de oxigênio pelos pigmentos respiratórios chamados de hemocianina, e a sua concentração está relacionada diretamente ao consumo de oxigênio. A capacidade respiratória é dependente da concentração de hemocianina na hemolinfa e sua capacidade de transportar e liberar moléculas de O_2 para os tecidos (COATES; NAIRN, 2014; HUNDAHL; FAGO; WEBER, 2003). A exposição a acidificação pode comprometer a afinidade da hemocianina por oxigênio, o chamado efeito Bohr (RAMAGLIA; DE CASTRO; AUGUSTO, 2018). Se um valor de pH baixo diminui a afinidade de hemocianina, a ação de moduladores, como os íons inorgânicos, principalmente magnésio, em menor extensão cloreto e até mesmo lactato podem atuar aumentando essa afinidade (BRIDGES, 2001; BROUWER; BONAVENTURA; BONAVENTURA, 1978; TRUCHOT, 1980).

A concentração de oxihemocianina medida para *C. danae* e *C. ornatus* manteve-se estável, não sendo muito afetada pela combinação de salinidade e acidificação, com exceção da salinidade controle em ambos os valores de pH. Com o aumento do consumo de oxigênio em *C. ornatus*, esperava-se que fosse observado também aumento na concentração de oxihemocianina, maior produção de lactato e menor concentração de magnésio e cloreto, uma vez que esses íons poderiam estar ligados a hemocianina, aumentando a sua afinidade por oxigênio, como observado em estudo anterior do nosso laboratório com essas mesmas espécies (ainda não publicado). Essa incompatibilidade entre a demanda (consumo de oxigênio) e a sua entrega (concentração de oxihemocianina) é mais um indício de que *C. ornatus*

necessita aumentar os seus esforços para gerar energia suficiente visando manter a sua homeostase. Porém, essa tentativa de aumentar o orçamento metabólico é comprometida, pois a acidificação tende a reduzir a capacidade de resposta metabólica desses *Callinectes*, ao contrário do efeito provocado pelo aumento de temperatura, conforme observado no capítulo 1.

5 CONCLUSÃO

Os efeitos de acidificação e variação de salinidade em crustáceos estuarinos adultos em exposição de curto prazo a essas variáveis são desconhecidos. Neste trabalho, ambas as espécies de *Callinectes* tiveram suas performances fisiológicas afetadas negativamente pela combinação de hiposalinidade mais acidificação, em relação a osmolalidade, regulação iônica, hidratação tecidual, consumo de oxigênio e excreção de amônia. Porém, *C. ornatus* demonstrou ser mais sensível a combinação de acidificação e hiposalinidade. Esses resultados são semelhantes ao encontrado no capítulo 1 dessa tese, corroborando que o nicho fundamental de *C. ornatus* é menor que o de *C. danae*. Essas pequenas diferenças de performance podem ser prejudiciais a médio e longo prazo para as demais funções do organismo, como crescimento e reprodução e afetar a estabilidade dessas populações no CEP, ainda mais se as previsões sobre acidificação forem confirmadas. Ambas as espécies de *Callinectes* desempenham funções ecológicas essenciais e também são recursos pesqueiros locais, portanto a manutenção das populações dessas espécies são fundamentais para a ecologia e economia do CEP. Além disso, a utilização de biomarcadores fisiológicos, por exemplo, osmorregulação e metabolismo, podem ser utilizados em uma abordagem mais ecológica, produzindo resultados que vão além da pesquisa de base. A abordagem ecofisiológica possui aplicação prática, e pode ser aplicado na conservação, manejo ou levantamento de fauna de espécies estuarinas, identificando seus nichos, o quão bem elas respondem a fatores abióticos estressantes combinados e quais os melhores biomarcadores a serem usados para descobrir essas informações. A ampliação do uso desses protocolos em espécies que possuem características de ocupação de nicho e distribuição semelhantes torna-se bastante viável, visto os seus resultados, rapidez, facilidade, economia e acessibilidade para a sua utilização.

REFERÊNCIAS

BRIDGES, C. R. Modulation of haemocyanin oxygen affinity: properties and physiological implications in a changing world . **Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 1021–1032, 2001.

BROUWER, M.; BONAVENTURA, C.; BONAVENTURA, J. Analysis of the effect of three different allosteric ligands on oxygen binding by hemocyanin of the shrimp, *Penaeus setiferus*. **Biochemistry**, v. 17, n. 11, p. 2148–2154, 30 maio 1978.

BROWN, J. et al. Contrasting responses to salinity and future ocean acidification in arctic populations of the amphipod *Gammarus setosus*. **Marine Environmental Research**, v. 162, n. September, p. 105176, dez. 2020.

BYRNE, M.; PRZESLAWSKI, R. Multistressor impacts of warming and acidification of the ocean on marine invertebrates' life histories. **Integrative and Comparative Biology**, v. 53, n. 4, p. 582–596, 2013.

CALDEIRA, K.; WICKETT, M. E. Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. **Journal of Geophysical Research**, v. 110, n. C9, p. C09S04, 16 jul. 2005.

CHENG, S. Y.; CHEN, J. C. Joint action of elevated ambient nitrite and nitrate on hemolymph nitrogenous compounds and nitrogen excretion of tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 131, n. 3, p. 303–314, 2002.

COATES, C. J.; NAIRN, J. Diverse immune functions of hemocyanins. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 45, n. 1, p. 43–55, jul. 2014.

DIAZ, F. et al. Effects of Temperature and Salinity Fluctuation on the Oxygen Consumption, Ammonium Excretion, and Osmoregulation of the Blue Shrimp *Litopenaeus Stylirostris*. **Journal of Shellfish Research**, v. 23, n. 3, p. 903–910, 2004.

DONELSON, J. et al. Effects of elevated water temperature and food availability on the reproductive performance of a coral reef fish. **Marine Ecology Progress Series**, v. 401, p. 233–243, 22 fev. 2010.

FEELY, R. A. et al. Impact of anthropogenic CO2 on the CaCO3 system in the oceans.

Science (New York, N.Y.), v. 305, n. 5682, p. 362–6, 16 jul. 2004.

FREIRE, C. A. et al. Biomarkers of homeostasis, allostasis, and allostatic overload in decapod crustaceans of distinct habitats and osmoregulatory strategies: an empirical approach. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 248, n. June, p. 110750, out. 2020.

HAGERMAN, L. Haemocyanin concentration in the shrimp *Crangon crangon* (l.) after exposure to moderate hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, v. 85, n. 4, p. 721–724, 1986.

HENRY, R. P. et al. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. November, p. 1–34, 2012.

HIEBENTHAL, C. et al. Kiel fjord pCO2 datasets between 2012 (July) and 2015 (January) measured using a HydroC® pCO2 sensor. **Data Set, GEOMAR Helmholtz Centre for Ocean Research Kiel, Kiel, Ger**, v. 2012, n. January, p. 2012–2015, 2016.

HU, M. Y. et al. Strong Ion Regulatory Abilities Enable the Crab *Xenograpsus testudinatus* to Inhabit Highly Acidified Marine Vent Systems. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–11, 1 fev. 2016.

HUNDAHL, C.; FAGO, A.; WEBER, R. E. Effects of water activity on oxygen-binding in high-molecular weight, extracellular invertebrate hemoglobin and hemocyanin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, n. 1, p. 83–90, set. 2003.

KELLY, M. W.; HOFMANN, G. E. Adaptation and the physiology of ocean acidification. **Functional Ecology**, v. 27, n. 4, p. 980–990, ago. 2013.

KIRSCHNER, L. B. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 9, p. 1439–1452, 1 abr. 2004.

LARSEN, E. H. et al. Osmoregulation and Excretion. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2014. v. 4p. 405–573.

MACIEL, J. E. S. et al. Lactate metabolism in the muscle of the crab *Chasmagnathus*

granulatus during hypoxia and post-hypoxia recovery. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 151, n. 1, p. 61–65, set. 2008.

MAUS, B.; BOCK, C.; PÖRTNER, H.-O. Water bicarbonate modulates the response of the shore crab *Carcinus maenas* to ocean acidification. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 188, n. 5, p. 749–764, 23 set. 2018.

MELZNER, F. et al. Ocean Acidification and Coastal Marine Invertebrates: Tracking CO2 Effects from Seawater to the Cell. **Annual Review of Marine Science**, v. 12, p. 499–523, 2020.

ORR, J. C. et al. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 681–686, set. 2005.

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

PILLAI, B. R.; DIWAN, A. D. Effects of acute salinity stress on oxygen consumption and ammonia excretion rates of the marine shrimp *Metapenaeus monoceros*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 22, n. 1, p. 45–52, 2002.

PILLER, S. et al. A comparison of the gill physiology of two euryhaline crab species, *Callinectes sapidus* and *Callinectes similis*: energy production, transport-related enzymes and osmoregulation as a function of acclimation salinity. **The Journal of experimental biology**, v. 198, p. 349–58, 1995.

RAMAGLIA, A. C.; DE CASTRO, L. M.; AUGUSTO, A. Effects of ocean acidification and salinity variations on the physiology of osmoregulating and osmoconforming crustaceans. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 188, n. 5, p. 729–738, 11 set. 2018.

SMALL, D. et al. Impact of medium-term exposure to CO2 enriched seawater on the physiological functions of the velvet swimming crab *Necora puber*. **Aquatic Biology**, v. 10, n. 1, p. 11–21, 22 jun. 2010.

SOKOLOVA, I. M. et al. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. **Marine Environmental Research**, v. 79, p. 1–15, ago. 2012.

SOKOLOVA, I. M. Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. **Integrative and Comparative Biology**, v. 53, n. 4, p. 597–608, 2013.

SOMERO, G. Comparative physiology: a “crystal ball” for predicting consequences of global change. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, n. 1, p. R1–R14, jul. 2011.

SPICER, J. I.; RAFFO, A.; WIDDICOMBE, S. Influence of CO2-related seawater acidification on extracellular acid–base balance in the velvet swimming crab *Necora puber*. **Marine Biology**, v. 151, n. 3, p. 1117–1125, 6 maio 2007.

TRUCHOT, J. P. Lactate increases the oxygen affinity of crab hemocyanin. **Journal of Experimental Zoology**, v. 214, n. 2, p. 205–208, nov. 1980.

URBINA, M. et al. Physiological energetics of the estuarine crab *Hemigrapsus crenulatus* (Crustacea: Decapoda: Varunidae): responses to different salinity levels. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 90, n. 2, p. 267–273, 14 mar. 2010.

WATT, A. J. .; WHITELEY, N. .; TAYLOR, E. . An in situ study of respiratory variables in three British sublittoral crabs with different routine rates of activity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 239, n. 1, p. 1–21, jun. 1999.

WHITELEY, N. Physiological and ecological responses of crustaceans to ocean acidification. **Marine Ecology Progress Series**, v. 430, p. 257–271, 26 maio 2011.

WHITELEY, N. M. et al. Effects of water salinity on acid-base balance in decapod crustaceans. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, n. 5, p. 1003–1011, 2001.

WHITELEY, N. M. et al. Sensitivity to near-future CO 2 conditions in marine crabs depends on their compensatory capacities for salinity change. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

WHITELEY, N. M.; TAYLOR, E. W. Oxygen and Acid-Base Disturbances in the Hemolymph of the Lobster *Homarus Gammarus* During Commercial Transport and Storage. **Journal of Crustacean Biology**, v. 12, n. 1, p. 19–30, 1 jan. 1992.

CAPÍTULO III – PERFORMANCES FISIOLÓGICAS DO INVASOR *CHARYBDIS HELLERI* (DECAPODA: PORTUNIDAE) E DA ESPÉCIE NATIVA *MENIPPE NODIFRONS* (DECAPODA: MENIPPIDAE) EXPOSTOS A DESAFIOS TÉRMICOS/SALINOS

RESUMO

As invasões biológicas sempre foram foco de preocupação em relação a como os ecossistemas se ajustam a presença de organismos não pertencentes a determinado local. Os processos de invasão biológica geralmente causam consequências graves a economia, ecologia e conservação, que tendem a ser intensificadas em decorrência das mudanças climáticas em curso. Nesse sentido, estudos que tratem invasões biológicas e mudanças climáticas pela perspectiva da fisiologia da conservação oferecem uma nova perspectiva a um tema tão importante. Neste capítulo, foram estudadas as possíveis consequências dessas alterações climáticas em duas espécies de crustáceos decápodes que habitam o Complexo Estuarino de Paranaguá – PR (CEP): *Charybdis hellerii* (invasor) e *Menippe nodifrons* (nativo). As duas espécies habitam os mesmos locais, e uma melhor performance fisiológica pode significar vantagem na competição interespecífica por recursos. Os espécimes foram coletados e mantidos em aquários para aclimatação em temperatura controle (26 °C) e experimental (30 °C) por uma semana. Logo após esse período, os indivíduos foram expostos a diminuição de salinidade (35, 30, 25 e 20‰) em ambas as temperaturas, crioanestesiados, eutanasiados e coletado material para as análises de osmolalidade, cloreto, magnésio, lactato e teor hídrico (músculo). Também foi analisado consumo de oxigênio e excreção de amônia. Ambas as espécies foram afetadas pela exposição a hiposalinidade e houve efeito sinérgico com aumento de temperatura, afetando *C. hellerii* em maior intensidade, representado pelo aumento na hidratação tecidual, no consumo de oxigênio e excreção de amônia. Ao contrário da maioria das espécies invasoras quando comparadas com espécies nativas, *C. hellerii* apresenta performance fisiológica inferior em relação a espécie nativa que ocupa nicho semelhante, embora *M. nodifrons* também não tenha uma performance tão boa diante de desafios térmicos e salinos. Apesar de populações da espécie invasora estarem estabelecidas no CEP atualmente, a sua sensibilidade a variação de salinidade em conjunto com aumento de temperatura pode ser um fator chave que pode limitar a dispersão ou mesmo extinguir essas populações diante de cenários futuros de aquecimento global.

Palavras-Chave: Invasão; metabolismo; osmorregulação.

ABSTRACT

Biological invasions have always been a focus of concern regarding how ecosystems adjust to the presence of non-local organisms. Biological invasion processes generally have serious consequences for the economy, ecology and conservation, which tend to be intensified as a result of ongoing climate change. However, studies that address biological invasions and climate change from the perspective of conservation physiology can offer a new perspective on such an important topic. In this chapter, the possible consequences of these climate changes in two species of decapods crustaceans that inhabit the Estuarine Complex of Paranaguá – PR (CEP) were studied. Both species inhabit the same places, and better physiological performance can mean an advantage in interspecific competition for resources. The specimens were collected and kept in aquariums for acclimatization at a control (26 °C) and experimental (30 °C) temperature for one week. Soon after this period, the individuals were exposed to a decrease in salinity (35, 30, 25 and 20‰) at both temperatures, cryoanaesthetized, euthanized and material collected for the analysis of osmolality, chloride, magnesium, lactate and water content (muscle). Oxygen consumption and ammonia excretion were also analyzed. Both species were affected by exposure to hyposalinity and there was a synergistic effect with increase in temperature, affecting *C. hellerii* in greater intensity, represented by the increase in tissue hydration, oxygen consumption and ammonia excretion. Unlike most invasive species when compared to native species, *C. hellerii* has a lower physiological performance compared to native species that occupy a similar niche, although *M. nodifrons* also does not have such a good performance when compared to the control condition itself. Although invasive species populations are currently established in CEP, their sensitivity to salinity variation in conjunction with temperature increase may be a key factor that may limit the dispersion or even extinguish these populations in the face of future global warming scenarios.

Keywords: Invasion; metabolism; osmoregulation

1 INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas e as invasões biológicas são dois fatores importantes que afetam a biodiversidade e os ecossistemas (WALTHER et al., 2009). Entretanto, os seus efeitos normalmente são analisados de forma independente, embora existam dados na literatura que apontam para uma relação próxima entre alterações climáticas e aumento no ritmo e intensidade das invasões biológicas (DUKES; MOONEY, 1999; WALTHER et al., 2009). As espécies nativas têm tido mudanças nas suas populações durante as últimas décadas, devido ao aumento de temperatura, que tem alterado a dinâmicas dessas populações, como por exemplo, alterações no seu alcance geográfico (PARMESAN, 2006). De forma semelhante, as mudanças climáticas podem alterar a probabilidade de introdução e de sucesso adaptativo de espécies invasoras (WALTHER et al., 2009). Normalmente, as invasões seguem 4 estágios bem determinados: introdução, colonização, estabelecimento e dispersão, sendo que as mudanças climáticas influenciam, em maior ou menor grau, cada uma dessas etapas.

A introdução de espécies invasoras é facilitada pelo aumento e frequência de eventos climáticos extremos, como furacões e tempestades que provocam inundações, resultando na fuga de espécies aquáticas invasoras previamente confinadas em locais de cultivo, como observado no Reino Unido entre 2003 e 2007, com a ostra do Pacífico (*Crassostrea gigas*), a Manila Clam, chamada no Brasil de ameijoa japonesa (*Venerupis philippinarum*) e a lagosta americana (*Homarus americanus*) (GOLLASCH; KIESER; DAN MINCHIN, 2007). Além disso, outro evento preocupante é o derretimento da cobertura de gelo do ártico no verão, entre os nortes dos oceanos atlântico e pacifico, o que poderia proporcionar rotas de invasão de espécies para um ou outro oceano (REID et al., 2007). Também tem sido observada uma tendência de migração de espécies que habitam regiões mais quentes de baixas latitudes em direção as regiões de mais frias de alta latitude, aumentando a chance de ocorrerem invasões (SOMERO, 2010).

Outra maneira das mudanças climáticas facilitarem a introdução e expansão de espécies invasoras é através das consequências de eventos extremos. Ondas de calor podem levar a mortalidades em massa de espécies nativas, que resultam em nichos vazios que podem ser ocupados por espécies invasoras (OCCHIPINTI-

AMBROGI, 2007). Por exemplo, no norte do mar mediterrâneo, altas temperaturas da água têm permitido que pseudo-populações até então estéreis do peixe ornamental *Thalassoma pavo* possam se reproduzir e estabelecer populações férteis (VACCHI et al., 2001).

Além de facilitar o escape, introdução e expansão de espécies invasoras, as alterações climáticas podem modificar condições abióticas como temperatura, salinidade, pH e disponibilidade de oxigênio, que podem atuar de forma sinérgica e aumentar o fator de estresse em que as populações aquáticas estarão expostas, o que pode impactar diretamente a saúde do ecossistema ou prejudicar atividades humanas, como a pesca, pela alteração na composição das comunidades nativas (OCCHIPINTI-AMBROGI, 2007). Essas alterações abióticas são a principal causa de estresse fisiológico, que atua fortemente em espécies estuarinas, já próximas do seu limite de tolerância (SOMERO, 2011).

No Brasil, a única espécie de crustáceo invasora presente no litoral paranaense é o decápode *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867), cuja introdução na costa brasileira possa ter ocorrido através de formas larvais encontradas em tanques de lastro (MANTELATTO; DIAS, 1999). Essa espécie é originária da região Indo-Pacífico, onde ocorre em habitats tão diversos quanto recifes de coral, manguezais e costões rochosos (SANT'ANNA et al., 2015; WATANABE et al., 2014). As consequências ecológicas de sua introdução em habitats sensíveis como os recifes coralinos brasileiros podem ser graves, já que *C. hellerii* pode competir com as espécies nativas por habitat e alimento (SANT'ANNA et al., 2012). Por exemplo, estima-se que na Baía de Todos os Santos (BA), *C. hellerii* já seja mais abundante do que o portunídeo nativo *Callinectes larvatus* (CARQUEIJA; GOUVÊA, 1996).

No Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP), *C. hellerii* co-ocorre com a espécie nativa *Menippe nodifrons* (OCCHI et al., 2019; SANT'ANNA et al., 2012), que apresenta distribuição semelhante aos ambientes recentemente conquistados pelo *C. hellerii*. Além da importância ecológica, em algumas regiões do hemisfério norte e em algumas regiões do Brasil, como o próprio CEP, *M. nodifrons* é explorado como recurso pesqueiro (BERTINI et al., 2007; OSHIRO, 1999), enquanto que *C. hellerii* não é alvo de pescaria artesanal para consumo no CEP.

A plasticidade fisiológica pode atuar como um fator preponderante na competição entre espécies nativas e exóticas. Se uma espécie apresenta baixa tolerância a variações ambientais, como temperatura e salinidade, ela pode ser excluída e/ou substituída por uma ou mais espécies que sejam mais tolerantes através do processo de competição interespecífica. Portanto, a aplicação de uma abordagem ecofisiológica é de extrema importância na tentativa de entender como espécies nativas e invasoras respondem as mudanças ambientais e quais estratégias utilizam para evitar ou se ajustar a tais mudanças. Nesse capítulo pretendemos determinar a capacidade de aclimatação de uma espécie nativa e uma invasora através da avaliação de parâmetros fisiológicos após exposição a desafios salinos/térmicos. A hipótese de trabalho é que a espécie invasora apresenta performances fisiológicas mais eficientes quando expostas aos fatores de estresse salino/térmico quando comparada com a espécie nativa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES, TRANSPORTE E ACLIMATAÇÃO

Espécimes de *Charybdis hellerii* e *Menippe nodifrons* foram coletados através de captura por armadilhas cilíndricas dispostas na Baía de Paranaguá, Paraná (25°31'44.3"S 48°28'23.1"W) ou obtidos através de captura ativa na ilha da Banana, localizada na Baía de Paranaguá (25°31'44.3"S 48°28'23.1"W). Os animais foram acomodados em caixas plásticas contendo água do local de coleta, mantidos sob aeração constante e transportados para o laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO) do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná. No LFCO, os animais permaneceram em aquário estoque de 250 litros contendo água do mar durante sete dias com aeração constante, filtro externo, salinidade ± 35‰, temperatura 26 °C, pH ± 8,3, oxigênio dissolvido na água em torno de 8,0 mg/L e fotoperíodo natural. Os valores das condições abióticas para aclimatação foram decididos com base em estudos da qualidade da água na Baía de Paranaguá pela empresa particular responsável pela administração do porto, em levantamentos realizados nos últimos 5 anos. Os animais foram alimentados com pedaços pequenos de filé de peixe a cada dois dias, sendo que a alimentação foi encerrada 24 horas antes dos experimentos. Após esse período, alguns indivíduos foram utilizados para os experimentos controle, em temperatura de 26 °C e redução de salinidade (descritos com mais detalhes na próxima sessão). Os demais espécimes foram aclimatados todos juntos no mesmo aquário estoque (densidade de 1 indivíduo/litro) durante sete dias ao aumento de temperatura equivalente a 4 °C acima da média anual encontrada no verão (26 °C para 30 °C). Os demais parâmetros na água do aquário estoque continuaram os mesmos e o aumento da temperatura foi feito através de aumento gradual de 0,5 °C por hora (entre as 8h00 e 16h00) durante o primeiro dos sete dias de aclimatação a temperatura mais elevada.

2.2 EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados através da transferência de indivíduos do aquário estoque para aquários individuais preenchidos com 2 litros de água

salgada/salobra. Os grupos controles foram mantidos em 26 °C e expostos a desafios salinos de redução de salinidade: 35‰ (salinidade controle), 30, 25 e 20‰, pelo período de seis horas. Os grupos experimentais foram mantidos em 30 °C e foram expostos aos mesmos desafios salinos: 35‰ (controle), 30, 25 e 20‰ pelo período de seis horas. Todo o processo foi repetido seis vezes para cada grupo controle ou experimental.

2.3 RETIRADA DE AMOSTRAS E PARÂMETROS ANALISADOS

Após os experimentos, os animais foram cobertos por gelo picado em caixa de isopor, crioanestesiados por aproximadamente cinco minutos sem contato direto com o gelo, eutanasiados e houve a retirada de amostras de tecido muscular do quinto par de pereiópodo (adaptado para natação) em *C. hellerii,* e da quela direita em *M. nodifrons*, para determinação de teor hídrico. Também houve coleta de hemolinfa por punção da membrana artrodial de um pereiópodo e armazenada em freezer -20°C para determinação da osmolalidade, concentrações de cloreto, magnésio e lactato. Os seguintes parâmetros foram analisados através de amostras das águas experimentais: consumo de oxigênio e valores iniciais e finais de concentração de amônia.

2.4 OSMOLALIDADE E TEOR HÍDRICO

A osmolalidade foi determinada em amostras de hemolinfa não diluídas, através de Micro-Osmômetro de Pressão de Vapor (VAPRO 5520, Wescor, USA). Para a determinação do teor hídrico, amostras do tecido muscular foram pesadas (peso úmido) em tubos eppendorf de 2 mL previamente pesados e fechados (Balança Bioprecisa FA2104 N, precisão 0,1mg, Brasil), e em seguida foram secos em estufa por 48 horas a 62°C. Os tecidos secos foram pesados novamente (peso seco), e a perda de peso (água) foi expressa como porcentagem através da fórmula:

TH (%) = [(peso úmido – peso seco) / peso úmido] x 100

2.5 CONCENTRAÇÕES DE CLORETO, MAGNÉSIO E LACTATO

Para a determinação da concentração de cloreto, amostras de hemolinfa foram diluídas com água deionizada na proporção 1:5, lidas em duplicata na absorbância de 450 nm. Para magnésio, amostras de hemolinfa foram diluídas com água deionizada na proporção 1:25, lidas em duplicata na absorbância de 505 nm. Por fim, para a determinação da concentração de lactato, amostras de hemolinfa não diluídas foram lidas em duplicata na absorbância de 550 nm, após terem permanecido aquecidas em banho maria (WB/OB 7-45 WBU 45, Memmert, Germany) por 5 minutos em 37 °C.. Todas as análises foram realizadas em espectrofotômetro colorimétrico (Ultrospec 2100 PRO Amersham Pharmacia biotech, Sweden) e foram utilizados kits comerciais específicos para cloreto (ref: 115), magnésio (ref: 50) e lactato (ref: 138) da empresa Labtest (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

2.6 CONSUMO DE OXIGÊNIO

Todos os experimentos foram realizados com aeração constante, que foi interrompida durante a última hora do experimento. Nesse momento, foram medidas as concentrações iniciais de oxigênio com o auxílio de um oxímetro (YSI 55, YSI, Yellow Springs, OH, USA). Ao final dessa hora, as concentrações finais de oxigênio também foram medidas e a diferenças entre esses dois valores foi utilizada em conjunto com a massa de cada animal para a obtenção do consumo de oxigênio por indivíduo, através da seguinte fórmula:

Consumo de O_2 (μgO_2/g.weight.h) = (O_2 inicial – O_2 final)*volume*1000/massa

Ao mesmo tempo, alguns aquários contendo apenas água foram medidos também, como forma de assegurar que os valores observados foram produzidos apenas pelos animais em experimento.

2.7 EXCREÇÃO DE AMÔNIA NA ÁGUA

Antes do início dos experimentos, foram retiradas amostras de água para dosagem dos valores iniciais da concentração de amônia e o mesmo procedimento foi realizado ao final dos experimentos. Para determinar a concentração de amônia, foi utilizado o Spectro Kit Amônia Indotest (ref: 2542) comercializado pela empresa Alfakit (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil) e a leitura das amostras ocorreu em 630 nm utilizando espectrofotômetro colorimétrico (Ultrospec 2100 PRO Amersham Pharmacia biotech, Sweden). Esse método é baseado na formação do azul de indofenol, em que o nitrogênio amoniacal presente na amostra reage com o hipoclorito de sódio para formação de monocloroamino, que vai reagir com o fenol, na presença de um catalisador.

2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado ANOVA de duas vias fixando os seguintes fatores: temperatura e salinidade. Caso o conjunto de dados não tenha atingido os requerimentos obrigatórios de normalidade e homogeneidade de variâncias, o teste de Scheirer-Ray-Hare foi utilizado. Para localizar as diferenças entre os grupos analisados, foi aplicado o teste de Tukey, como teste post-hoc. Para analisar as diferenças entre as espécies, foi utilizado Teste-t ou Mann-Whitney, se os dados não atingiam os requisitos de normalidade. Os testes foram realizados através do software Sigmaplot e o limite de significância sempre foi igual ou menor do que 0,05.

3 RESULTADOS

3.1 OSMOLALIDADE DA HEMOLINFA

O aquecimento da água levou a diminuição da osmolalidade em ambas as espécies nas salinidades 25 e 20‰. Comparativamente, *C. hellerii* apresenta menos osmolalidade do que *M. nodifrons* em temperatura mais alta e em salinidades mais baixas (FIGURA 1A).

3.2 HIDRATAÇÃO TECIDUAL MUSCULAR

O aquecimento da água levou ao aumento da hidratação tecidual em *C. hellerii* em todas as salinidades experimentais (TABELA 1). Em *M. nodifrons*, esse aumento tambem ocorreu em temperatura elevada, mas apenas em salinidade 20‰. Comparativamente, *C. hellerii* sofreu maior influxo de água do que *M. nodifrons* em ambas as temperaturas e em salinidades 25 e 20‰ (FIGURA 1B).

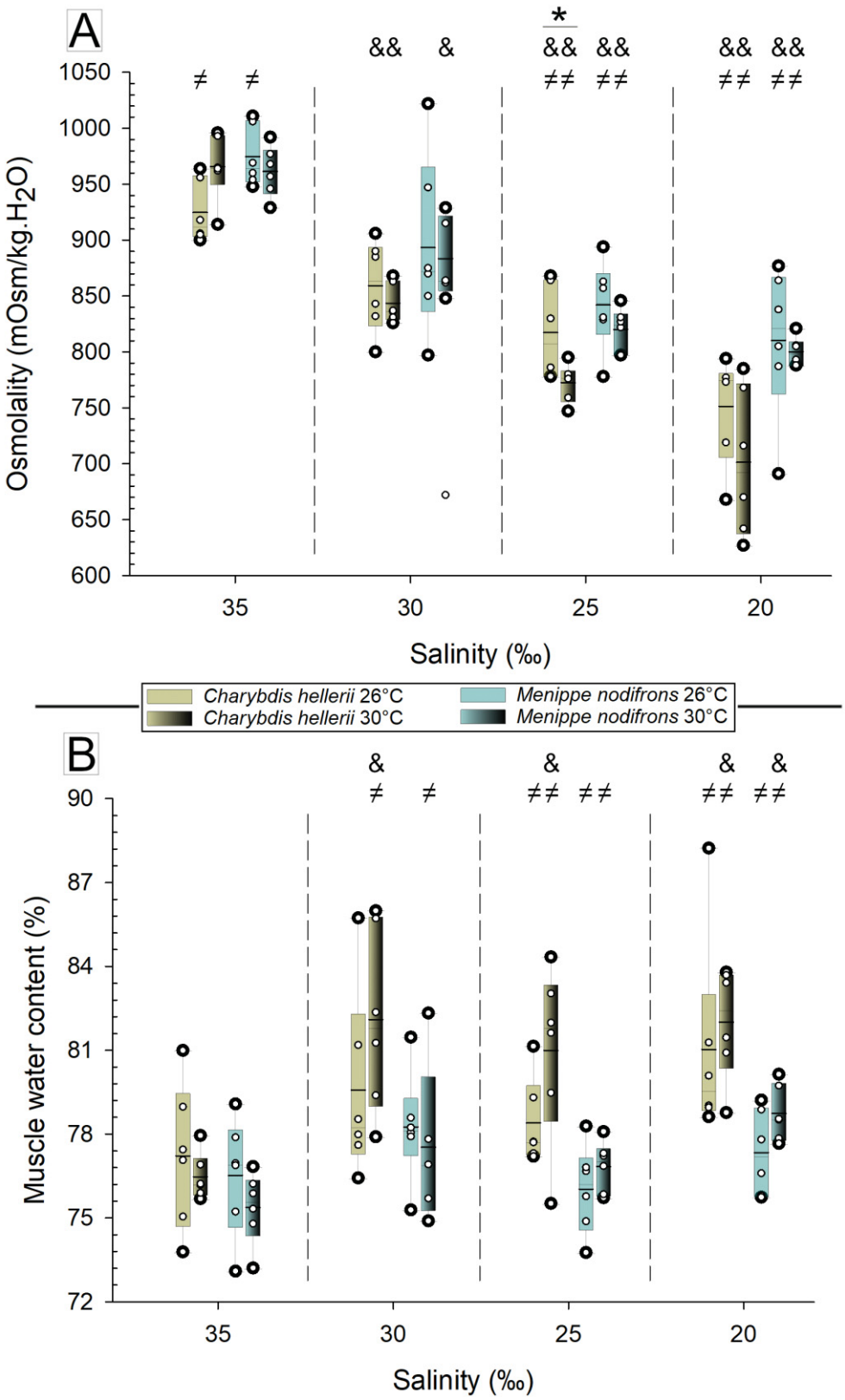


Figura 1. Osmolalidade da hemolinfa (A) e teor hídrico muscular (B) de *Charybdis hellerii* e *Menippe nodifrons* expostos as seguintes temperaturas: 26 °C (controle) e 30 °C, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas *: diferença entre a temperatura controle (26 °C) e experimental (30 °C) para cada espécie; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. n = 6.

3.3 CONCENTRAÇÃO DE CLORETO NA HEMOLINFA

Em exposição a ambas as temperaturas, houve diminuição de cloreto para as duas espécies em todas as salinidades experimentais. Comparativamente, *C. hellerii* possui menos cloreto na hemolinfa do que *M. nodifrons* na temperatura mais alta e em salinidades 25 e 20‰ (FIGURA 2A).

3.4 CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO NA HEMOLINFA

Em exposição a ambas as temperaturas, houve diminuição de magnésio para as duas espécies em salinidade 25 e 20‰ (TABELA 1). Comparativamente, *C. hellerii* apresenta menor concentração de magnésio do que *M. nodifrons* em temperatura elevada quando expostos a todas as salinidades experimentais (FIGURA 2B).

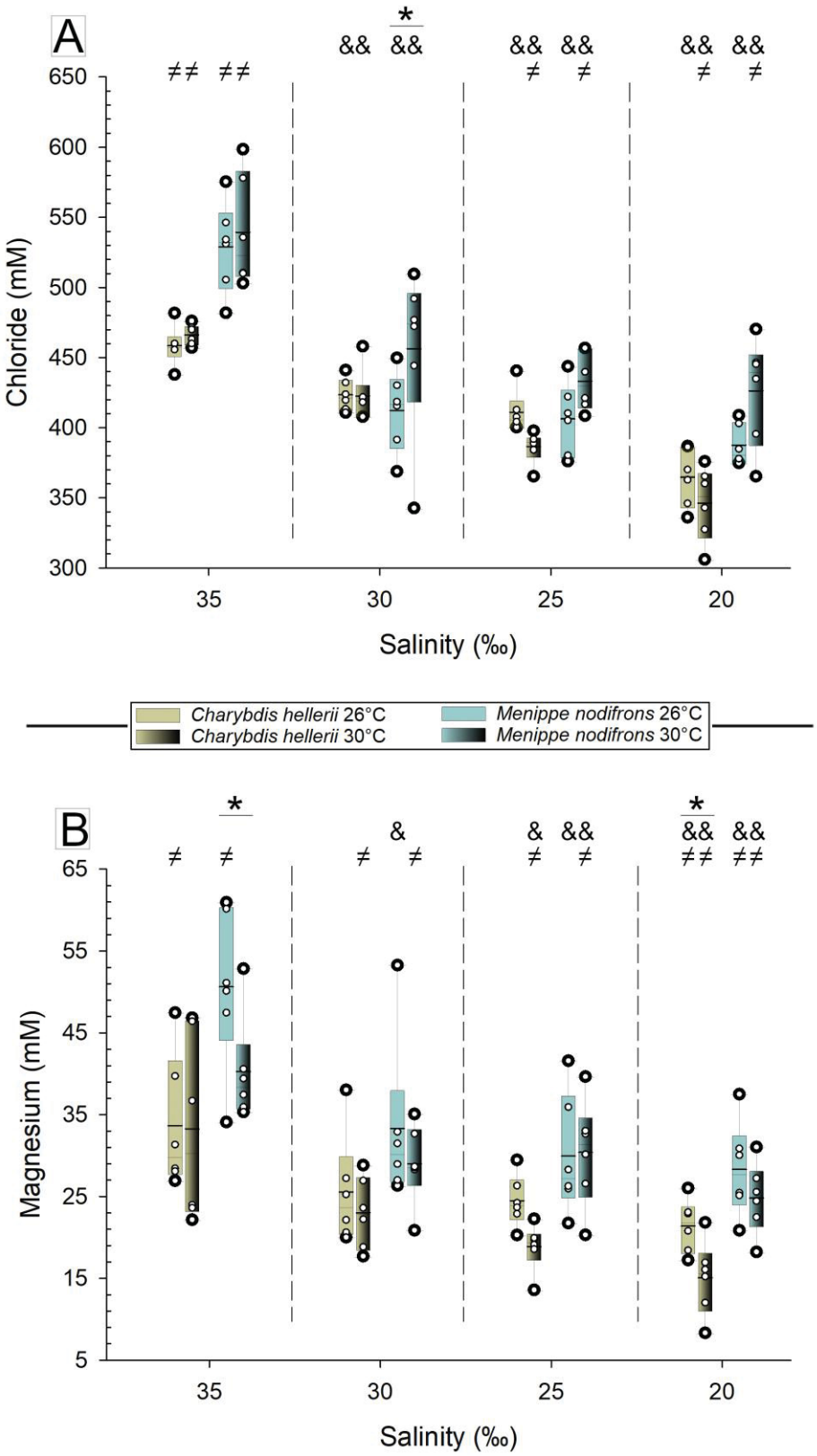


Figura 2. Concentração de cloreto (A) e concentração de magnésio (B) de *Charybdis hellerii* e *Menippe nodifrons* expostos as seguintes temperaturas: 26 °C (controle) e 30 °C, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas *: diferença entre a temperatura controle (26 °C) e experimental (30 °C) para cada espécie; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. n = 6.

TABELA 1. Osmolalidade (mOsm/kg.H_2O), teor hídrico (%) e concentrações iônicas de cloreto e magnésio (mM) em *Charybdis hellerii e Menippe nodifrons* após exposição a diferentes temperaturas (26 °C e 30 °C) e salinidades (35‰, 30‰, 25‰ e 20‰). Os dados foram representados pela média ± erro padrão. N = 6.

Table 1	T °C	Salinity	Osmolality (mOsm/kg.H_2O)	Water osmolality	Muscle water content (%)	Chloride (Mm)	Water chloride	Magnesium (mM)	Water magnesium
			Média ± Erro	*Prosser, 1973*	*Média ± Erro*	*Média ± Erro*	*Prosser, 1973*	*Média ± Erro*	*Prosser, 1973*
C. hellerii	26 °C	35 ‰	924,83 ± 11,43	1040,00	77,22 ± 1,06	458,47 ± 5,73	559,00	33,66 ± 3,35	55,00
		30 ‰	859,33 ± 16,64	900,00	79,58 ± 1,39	423,45 ± 4,70	479,00	25,54 ± 2,74	47,00
		25 ‰	817,50 ± 17,23	750,00	78,40 ± 0,63	410,97 ± 6,21	399,00	24,47 ± 1,28	39,30
		20 ‰	751,33 ± 19,66	600,00	81,03 ± 1,49	364,65 ± 8,46	319,00	21,41 ± 1,33	32,70
	30 °C	35 ‰	965,67 ± 12,05	1040,00	76,47 ± 0,34	466,35 ± 3,00	559,00	33,28 ± 4,73	55,00
		30 ‰	843,50 ± 7,17	900,00	82,10 ± 1,34	422,52 ± 7,55	479,00	23,02 ± 1,79	47,00
		25 ‰	772,50 ± 6,92	750,00	80,99 ± 1,28	386,55 ± 4,61	399,00	18,87 ± 1,18	39,30
		20 ‰	701,33 ± 26,89	600,00	82,01 ± 0,82	346,31 ± 10,66	319,00	15,07 ± 1,87	32,70
			Média ± Erro	*Prosser, 1973*	*Média ± Erro*	*Média ± Erro*	*Prosser, 1973*	*Média ± Erro*	*Prosser, 1973*
M. nodifrons	26 °C	35 ‰	974,67 ± 11,09	1040,00	76,52 ± 0,86	529,06 ± 13,23	559,00	50,65 ± 4,00	55,00
		30 ‰	893,50 ± 32,39	900,00	78,26 ± 0,80	412,38 ± 11,68	479,00	33,33 ± 4,12	47,00
		25 ‰	842,00 ± 16,08	750,00	76,03 ± 0,65	406,27 ± 10,41	399,00	29,96 ± 3,01	39,30
		20 ‰	810,33 ± 27,63	600,00	77,34 ± 0,62	387,54 ± 6,02	319,00	28,30 ± 2,37	32,70
	30 °C	35 ‰	961,50 ± 9,18	1040,00	75,37 ± 0,52	539,28 ± 16,33	559,00	40,26 ± 2,65	55,00
		30 ‰	848,33 ± 37,63	900,00	77,53 ± 1,30	456,28 ± 24,38	479,00	29,01 ± 1,98	47,00
		25 ‰	820,17 ± 7,88	750,00	76,84 ± 0,37	433,25 ± 8,53	399,00	30,40 ± 2,68	39,30
		20 ‰	800,17 ± 5,29	600,00	78,74 ± 0,41	426,27 ± 15,75	319,00	24,82 ± 1,77	32,70

3.5 CONSUMO DE OXIGÊNIO

O aquecimento da água aumentou o consumo de oxigênio em ambas as espécies: Em *C. hellerii* em todas salinidades, e em *M. nodifrons*, nas salinidades 30 e 20‰ (TABELA 2). Comparativamente, o consumo de oxigênio é maior em *C. hellerii* do que em *M. nodifrons* temperatura elevada nas salinidades 30 e 25‰ (FIGURA 3A).

3.6 CONCENTRAÇÃO DE LACTATO NA HEMOLINFA

O aquecimento da água levou ao aumento da concentração de lactato para as duas espécies: Em *C. hellerii*, apenas em 20‰ e em *M. nodifrons* em 25 e 20‰. Comparativamente, a concentração de lactato foi maior em *C. helleri* do que em *M. nodifrons* apenas na temperatura controle e em salinidade 25‰ (FIGURA 3B).

3.7 AMÔNIA EXCRETADA NA ÁGUA

Em temperatura elevada, houve aumento da excreção de amônia em ambas as espécies: Em *C. hellerii* para as salinidades 30, 25 e 20‰ e em *M. nodifrons* para

todas as salinidades (TABELA 2). Comparativamente, a excreção de amônia é sempre maior em *C. hellerii* do que em *M. nodifrons* em temperatura elevada e nas salinidades 25 e 20‰ (FIGURA 3C).

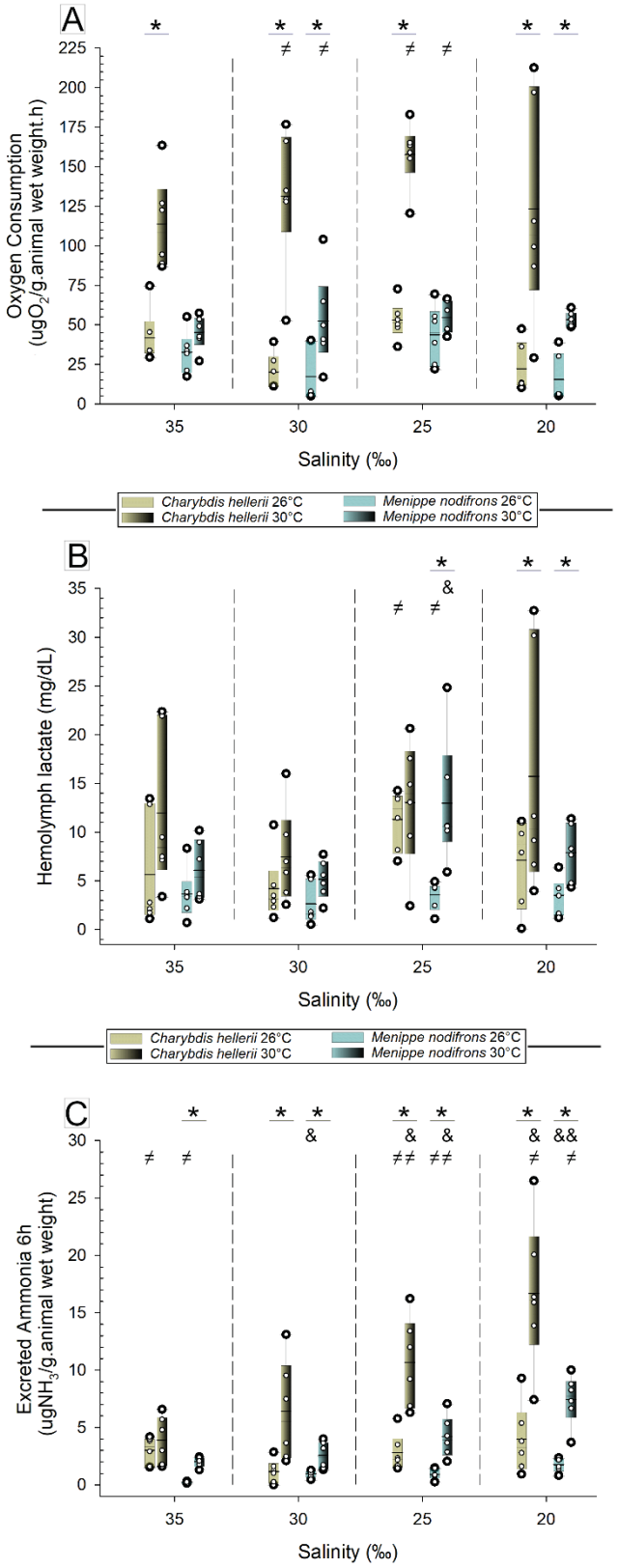


Figura 3. Consumo de oxigênio (A), concentração de lactato (B), amônia excretada na água (C) de *Charybdis hellerii* e *Menippe nodifrons* expostos as seguintes temperaturas: 26 °C (controle) e 30 °C, além das salinidades 35‰ (controle), 30‰, 25‰ e 20‰ por 6 horas *: diferença entre a temperatura controle (26 °C) e experimental (30 °C) para cada espécie; &: diferença entre as salinidades experimentais e controle (35‰); ≠: diferença entre as espécies em sua respectiva condição experimental. n = 6.

TABELA 2. Consumo de oxigênio (μgO_2/g.weight.h), concentração de lactato na hemolinfa (mg/dL), excreção de amônia (μgNH_3/g.weight) em *Charybdis hellerii e Menippe nodifrons* após exposição a diferentes temperaturas (26 °C e 30 °C) e salinidades (35‰, 30‰, 25‰ e 20‰). Os dados foram representados pela média ± erro padrão. N = 6.

Table 2	**T °C**	**Salinity**	**O_2 consumption μgO_2/g.weight.h**			**Hemolymph lactate (mg/dL)**			**Ammonia μgNH_3/g.weight**		
			Média	*±*	*Erro*	*Média*	*±*	*Erro*	*Média*	*±*	*Erro*
C. hellerii	26 °C	35 ‰	41,83	±	6,92	5,67	±	2,37	3,01	±	0,49
		30 ‰	20,21	±	4,67	4,21	±	1,38	1,17	±	0,42
		25 ‰	53,01	±	4,88	11,32	±	1,24	2,82	±	0,66
		20 ‰	22,31	±	6,37	7,14	±	1,88	3,97	±	1,24
	30 °C	35 ‰	113,95	±	12,16	11,97	±	3,32	3,91	±	0,85
		30 ‰	131,41	±	17,78	7,50	±	1,98	6,39	±	1,80
		25 ‰	157,76	±	8,40	13,04	±	2,62	10,67	±	1,59
		20 ‰	123,45	±	28,42	15,73	±	5,09	16,69	±	2,60
M. nodifrons			*Média*	*±*	*Erro*	*Média*	*±*	*Erro*	*Média*	*±*	*Erro*
	26 °C	35 ‰	32,68	±	5,45	3,67	±	1,05	0,24	±	0,02
		30 ‰	17,43	±	7,18	2,66	±	0,88	0,96	±	0,12
		25 ‰	43,77	±	7,56	3,57	±	0,60	0,93	±	0,19
		20 ‰	15,37	±	6,21	3,54	±	0,77	1,76	±	0,25
	30 °C	35 ‰	45,22	±	4,39	6,09	±	1,27	2,04	±	0,17
		30 ‰	52,48	±	12,14	5,17	±	0,81	2,56	±	0,49
		25 ‰	54,62	±	4,21	12,97	±	2,69	4,21	±	0,74
		20 ‰	53,27	±	1,97	7,89	±	1,20	7,45	±	0,89

4 DISCUSSÃO

As mudanças climáticas podem ter potencial tanto para fortalecer quanto para enfraquecer os processos de invasão biológica. Com o auxílio de ferramentas fisiológicas aplicadas a ecologia, nós identificamos potenciais mecanismos que demonstram se a espécie invasora *Charybdis hellerii* possui vantagens nas suas performances fisiológicas em relação a aumento de temperatura e variação de salinidade quando comparada com a espécie nativa *M. nodifrons*. Os resultados que serão discutidos em detalhes mais abaixo, demonstram que ambas as espécies possuem repostas semelhantes em exposição apenas a hiposalinidade, porém a espécie invasora tem performance fisiológica inferior quando exposta a aumento de temperatura em conjunto com hiposalinidade.

Ambas as espécies tiveram suas osmolalidades diluídas em decorrência da exposição as salinidades mais baixas e independente da temperatura, sendo nítida a performance inferior da espécie invasora. Em um artigo recentemente publicado, *C. hellerii* é caracterizado como hiper-osmoconformador fraco (OCCHI et al., 2019), porém com a habilidade de regulação da osmolalidade inferior a outros portunídeos, como os próprios *Callinectes danae* e *C. ornatus,* espécies alvo dos estudos nos capítulos anteriores dessa tese. Em comparação direta com os *Callinectes* acima, essa capacidade inferior de regulação osmótica de *C. hellerii* fica evidente. Na condição mais desafiadora, de 30 °C e salinidade 20‰, essas espécies apresentam os seguintes valores de osmolalidade: 788±10 mOsm/kg.H_2O em *C. danae*, 766±28 mOsm/kg.H_2O em *C. ornatus* e 701±26 mOsm/kg.H_2O em *C. hellerii*. Embora a comparação entre essas espécies seja pertinente (todas as três pertencem a família Portunidae), *C. hellerii* possui um nicho realizado diferente das espécies de *Callinectes*, tornando a espécie invasora mais próxima ecologicamente de espécies de decápodes semi terrestres, como *M. nodifrons*.

A hidratação muscular em ambas as espécies foi estável em 26 °C, porem houve influxo de água em 30 °C, especialmente em *C. hellerii*. Resultados similares foram encontrados para *Clibanarius taeniatus* e *Clibanarius virescens,* duas espécies de caranguejo ermitão encontrados em regiões de entre-marés, que possuem semelhanças ecológicas com *C. hellerii* e *M. nodifrons*. Em estudo realizado por Dunbar e Coates (2004), indivíduos *de C. taeniatus e C. virescens* foram submetidos

a aumento de temperatura (de 15 °C para 35 °C) e diminuição de salinidade (36‰ para 8‰) por seis horas. Em ambas as espécies houve ganho no peso corporal, que foi utilizado como medida indireta para regulação da hidratação tecidual. A mesma tendência de entrada de água no tecido muscular de *C. hellerii* foi observada em estudo prévio realizado pelo nosso laboratório. Quando submetido a diluição gradual de salinidade (de 30‰ para 20‰ e 10‰) por 24 horas, houve aumento progressivo de água no músculo de *C. hellerii*, demonstrando algum grau de sensibilidade a choques hipo-salinos graduais e de grande intensidade, principalmente quando o tempo de exposição é maior (OCCHI et al., 2019).

Os resultados de regulação iônica indicam que as duas espécies possuem perfis fisiológicos semelhantes em temperatura controle: *C. hellerii* e *M. nodifrons* são hiper-hipo reguladores de cloreto. Magnésio é hipo-regulado muito bem por *C. hellerii*, enquanto *M. nodifrons* alterna momentos de hipo-regulação com osmoconformação. Em exposição a 30 °C, esses perfis são alterados para *M. nodifrons*, que passa a regular cloreto em salinidades baixas e conformar em salinidades mais altas, além de hipo-regular magnésio em todas as salinidades. Variações na temperatura podem afetar a capacidade de regulação iônica de crustáceos de maneiras diferentes, seja aumentando, diminuindo, ou não afetando essa regulação, sem haver uma tendência nos estudos realizados até o momento (BORECKA; JANAS; KENDZIERSKA, 2016; DIAZ et al., 2004; DOBRZYCKA-KRAHEL; KRZAK; SZANIAWSKA, 2014; WEBER; SPAARGAREN, 1970). A influência da temperatura em conjunto com hiposalinidade na regulação iônica de decápodes ainda é pouca explorada. Por exemplo, para as espécies de caranguejo ermitão, *C. taeniatus* e *C. virescens***,** aumento de temperatura e diminuição de salinidade prejudicam a regulação iônica, levando a grandes diluições na hemolinfa desses animais. Foi relatado a diminuição da concentração dos principais cátions conhecidos: Sódio, potássio, cálcio e magnésio (DUNBAR; COATES, 2004)**.**

A salinidade não influenciou no padrão de consumo de oxigênio nas duas espécies, porém foi observado efeito sinérgico de aumento de temperatura com hiposalinidade, fazendo com que o aumento no consumo de oxigênio fosse evidente para a espécie invasora em comparação com a espécie nativa. Temperatura e salinidade geralmente atuam aumentando o consumo de oxigênio em decápodes estuarinos, como visto para o caranguejo *Scylla Serrata* (CHEN; CHIA, 1996), e os

camarões peneídeos *Litopenaeus stylirostris* (DIAZ et al., 2004), *Marsupenaeus japonicus* (CHEN; LAI, 1993; SETIARTO et al., 2004), *Palaemon peringueyi* (ALLAN; FRONEMAN; HODGSON, 2006), *Palaemon macrodactylus, Palaemon longirostris e Palaemonetes varians* (LEJEUSNE et al., 2014). O ponto isosmótico dos crustáceos também parece influenciar o consumo de oxigênio. Nos estudos citados acima, houve diminuição do consumo de oxigênio quando a osmolalidade da hemolinfa era igual a osmolalidade do ambiente externo, indicando menor gasto energético com a osmorregulação. Essa tendência também foi observada parcialmente aqui para *C. helleri*, que diminui o seu consumo de oxigênio no ponto isosmótico, que seria 30‰, de acordo com Occhi et al. (2019), mas apenas na temperatura controle. Com aumento de temperatura, o consumo de oxigênio no ponto isosmótico aumenta também, sugerindo aumento do gasto energético para manutenção do perfil osmorregulatório.

Em estudo realizado por Lejeusne et al. (2014), foi mensurado o consumo de oxigênio para as espécies nativas de camarões peneídeos *Palaemon longirostris, Palaemonetes varians* e a espécie invasora *Palaemon macrodactylus* submetidas a variação de salinidade (5, 15, 25, 35 e 45‰) e aumento de temperatura (20, 25 e 30 °C). De modo similar ao que foi observado aqui, todas as espécies de camarão apresentaram aumento do consumo de oxigênio com aumento de temperatura e variação de salinidade. Porém, a espécie de camarão invasora foi pouco afetada, obtendo o menor consumo de oxigênio em comparação com as espécies nativas, de modo inverso ao que foi encontrado aqui para o invasor *C.hellerii.* A resposta de espécies de artrópodes invasoras ao efeito de combinação de salinidade/temperatura geralmente é pouca diferença de performance fisiológica sob essas condições, como observado para os anfípodas *Dikerogammarus villosus* (BRUIJS et al., 2001), *Caprella scaura* (ROS et al., 2021), e o hemíptera *Trichocorixa verticalis verticalis,* (COCCIA et al., 2013), o que faz com que essas espécies invasoras tenham vantagem quando comparadas com as espécies nativas.

Apesar da grande variação na medição de lactato na hemolinfa, é possível observar que há aumento de lactato em temperatura mais elevada, em ambas as espécies, principalmente quando expostas a salinidades mais desafiadoras. A síntese de lactato pode ocorrer em decorrência da ausência de oxigênio disponível ou funcionar como um substrato energético auxiliar quando a demanda energética não e

suprida totalmente pela respiração aeróbica (FREIRE et al., 2017, 2020; MACIEL et al., 2008). O aumento da concentração de lactato em crustáceos ocorre em resposta a atividade física, exposição a hipoxia ou anoxia, salinidade ou temperatura (FREIRE et al., 2017, 2020; MACIEL et al., 2008; SHERWOOD; KLANDORF; YANCEY, 2013). Não há registros de como o efeito combinado de variação de salinidade e temperatura afetam a produção de lactato em crustáceos, porém aqui nós demonstramos que a espécie invasora *C. hellerii* possui níveis elevados de lactato na hemolinfa mesmo em condições controle e que esses níveis aumentam durante as condições experimentais. Quando comparado com a espécie nativa *M. nodifrons* e mesmo com as espécies nativas de *Callinectes* que habitam o Complexo Estuarino de Paranaguá (*C. danae e C. ornatus,* Capítulo I dessa tese), fica evidente que *C. hellerii* necessita de maior suprimento energético, provavelmente para suprir os danos causados pelo efeito sinérgico da combinação de temperatura e salinidade.

Ambas as espécies demonstraram aumento na excreção de amônia na água conforme a temperatura aumenta e a salinidade diminui. Este aumento de excreção é maior em *C. hellerii* do que em *M. nodifrons*. A excreção de amônia em crustáceos decápodes tende a aumentar conforme a diminuição de salinidade, conforme as revisões recentes publicadas (HENRY et al., 2012; LEONE et al., 2017; ROMANO; ZENG, 2013; WEIHRAUCH, 2004). A amônia constitui o principal composto nitrogenado excretado por crustáceos decápodes em água doce e mesmo em águas mais diluídas, sendo produzida primariamente pelo catabolismo de aminoácidos (LARSEN et al., 2014). Em espécies osmorreguladoras, os aminoácidos livres gerados por esse processo também são utilizados durante o processo de osmorregulação (STREFEZZA; DE ANDRADE; AUGUSTO, 2019). O fato de crustáceos apresentarem essa característica faz com que grande parte dos trabalhos encontrados na literatura sobre excreção e tolerância a amônia em crustáceos invasores sejam direcionados para espécies de água doce ou para espécies que iniciaram o processo de invasão do ambiente dulcícola a partir de estuários ou baías. Os resultados encontrados são diversos: enquanto os invasores anfípodas *Crangonyx pseudogracilis* e *Dikerogammarus villosus* parecem ser mais sensíveis a grandes concentrações de amônia, o lagostim *Procambarus clarkii* possui mecanismos para conter a toxicidade de amônia (GERGS; SCHLAG; ROTHHAUPT, 2013; NORMANT-SAREMBA; BECKER; WINKELMANN, 2015; PRENTER et al., 2004; SHEN et al.,

2021). Espécies de crustáceos invasores estuarinos, como *Carcinus maenas, Hemigrapsus Takanoi, H. sanguineus e Charybdis japonica* possuem taxas de excreção de amônia elevadas, do mesmo modo que as espécies nativas, porém as espécies invasoras possuem mecanismos de proteção e tolerância a amônia mais eficientes (FEHSENFELD; WEIHRAUCH, 2016; FOWLER; GERNER; SEWELL, 2011; LANDEIRA et al., 2020; WATANABE et al., 2009).

Alguns pontos importantes a se ressaltar neste momento é que os parâmetros fisiológicos de *C. hellerii* (assim como em *M. nodifrons*) sofreram apenas uma queda de performance osmorregulatória/metabólica e não uma completa perda de homeostase, tal qual as espécies de *Callinectes* nos capítulos anteriores. Embora a espécie invasora tenha uma certa desvantagem em relação a espécie nativa, principalmente se levarmos em contas os futuros cenários de mudanças climáticas, certamente outros fatores ecológicos atuando no Complexo Estuarino de Paranaguá são igualmente importantes e provavelmente são aspectos chave na manutenção de uma população de *C. hellerii* no estuário. Por exemplo, a dieta de *C. helleri* pode sobrepor a dieta de *M. nodfirons*, estabelecendo competição por recurso alimentar pelas duas espécies. Espécies invasoras geralmente apresentam maior voracidade do que espécies nativas, levando vantagem neste quesito. A maior capacidade de obtenção de recursos alimentares da espécie invasora pode servir como um contraponto a sua menor performance fisiológica, gerando a energia necessária para o processo de osmorregulação e dessa forma ameaçar a viabilidade de populações de *M. nodifrons.*

Outra possibilidade para a performance fisiológica inferior da espécie invasora é que essa invasão pode ser considerada recente. Por exemplo, apesar do caranguejo invasor *E. sinensis* ter invadido o Reino Unido nos 1970, somente nos anos 1990 a sua população começou a crescer e se alastrar (HÄNFLING; EDWARDS; GHERARDI, 2011). Portanto, talvez *C. hellerii* ainda não tenha otimizado o seu fitness em um ambiente ainda diferente do original, o que exige cuidados ainda maiores no monitoramento da sua população para os próximos anos.

5 CONCLUSÃO

A utilização de ferramentas fisiológicas dentro de um contexto ecológico (ecofisiologia) tem o potencial de se tornar uma poderosa abordagem para o entendimento da relação entre espécies invasoras, nativas e como essa relação entre elas pode influenciar na resposta das mesmas as futuras mudanças climáticas. Aqui nós optamos por utilizar abordagens osmorregulatórias e metabólicas no intuito de analisar a performance fisiológica de duas espécies de crustáceos decápodes, uma espécie invasora e uma espécie nativa. Os resultados demonstram que embora as duas espécies apresentem certa semelhança nas suas performances quando submetidas apenas a estresse salino, quando o fator temperatura é adicionado a salinidade, os resultados observados são diferentes devido ao efeito sinérgico. A espécie invasora *C. hellerii* demonstra uma performance inferior do que a espécie nativa *M. nodifrons*, tanto em relação ao aspecto osmorregulatório quanto metabólico, evidenciando a sua queda de performance em temperaturas elevadas. As conclusões obtidas por este trabalho poderão ser utilizados para o manejo, controle e preservação das populações de crustáceos que são encontradas no Complexo estuarino de Paranaguá, além de fornecer dados fisiológicos que poderão ser utilizados em estudos comparativos de outros locais com características ecológicas semelhantes e que também possam estar atravessando processos de invasões biológicas. Além disso, os dados obtidos aqui podem ser utilizados em futuros modelos visando prever o impacto das mudanças climáticas em populações locais e também sobre a dinâmica da coexistência de espécies invasoras e nativas em um mesmo ambiente.

REFERÊNCIAS

ALLAN, E. L.; FRONEMAN, P. W.; HODGSON, A. N. Effects of temperature and salinity on the standard metabolic rate (SMR) of the caridean shrimp *Palaemon peringueyi*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 337, n. 1, p. 103–108, set. 2006.

BERTINI, G. et al. Relative growth and sexual maturity of the stone crab *Menippe nodifrons* Stimpson, 1859 (Brachyura, Xanthoidea) in southeastern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 2, p. 259–267, mar. 2007.

BORECKA, A.; JANAS, U.; KENDZIERSKA, H. The combined effect of temperature and salinity changes on osmoregulation and haemocyanin concentration in *Saduria entomon* (Linnaeus, 1758). **Marine Biology Research**, v. 12, n. 3, p. 316–322, 2016.

BRUIJS, M. C. M. et al. Oxygen consumption, temperature and salinity tolerance of the invasive amphipod *Dikerogammarus villosus*: indicators of further dispersal via ballast water transport. **Fundamental and Applied Limnology**, v. 152, n. 4, p. 633–646, 10 jan. 2001.

CARQUEIJA, C. R. G.; GOUVÊA, E. P. A ocorrência, na costa brasileira, de um Portunidae (Crustacea, Decapoda), originário do Indo-Pacífico e Mediterrâneo. **Nauplius**, v. 4, n. 1, p. 105–112, 1996.

CHEN, J.-C.; CHIA, P.-G. Oxygen uptake and nitrogen excretion of juvenile *Scylla serrata* at different temperature and salinity levels. **Journal of Crustacean Biology**, v. 16, n. 3, p. 437–442, 1996.

CHEN, J. C.; LAI, S. H. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia-N excretion of juvenile *Penaeus japonicus* Bate. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 165, n. 2, p. 161–170, 1993.

COCCIA, C. et al. 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, 17 maio 2013.

DIAZ, F. et al. Effects of temperature and salinity fluctuation on the oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of the blue shrimp *Litopenaeus Stylirostris*. **Journal of Shellfish Research**, v. 23, n. 3, p. 903–910, 2004.

DOBRZYCKA-KRAHEL, A.; KRZAK, M.; SZANIAWSKA, A. A laboratory-based comparison of osmoregulatory ability at different water temperatures and salinities in the stenothermic isopod *Saduria entomon* (Linnaeus, 1758) and the eurythermic amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766) from the Baltic Sea. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 47, n. 1, p. 29–39, 2014.

DUKES, J. S.; MOONEY, H. A. Does global change increase the success of biological invaders? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 4, p. 135–139, abr. 1999.

DUNBAR, S. G.; COATES, M. Differential tolerance of body fluid dilution in two species of tropical hermit crabs: Not due to osmotic/ionic regulation. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 137, n. 2, p. 321–337, 2004.

FEHSENFELD, S.; WEIHRAUCH, D. Mechanisms of acid–base regulation in seawater-acclimated green crabs (*Carcinus maenas*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 94, n. 2, p. 95–107, fev. 2016.

FOWLER, A. E.; GERNER, N. V.; SEWELL, M. A. Temperature and salinity tolerances of Stage 1 zoeae predict possible range expansion of an introduced portunid crab, *Charybdis japonica*, in New Zealand. **Biological Invasions**, v. 13, n. 3, p. 691–699, 2 mar. 2011.

FREIRE, C. A. et al. Oxygen consumption remains stable while ammonia excretion is reduced upon short time exposure to high salinity in *Macrobrachium acanthurus* (Caridae: Palaemonidae), a recent freshwater colonizer. **Zoologia**, v. 34, n. Anger 2013, p. 1–9, 1 set. 2017.

FREIRE, C. A. et al. Biomarkers of homeostasis, allostasis, and allostatic overload in decapod crustaceans of distinct habitats and osmoregulatory strategies: an empirical approach. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 248, n. June, p. 110750, out. 2020.

GERGS, R.; SCHLAG, L.; ROTHHAUPT, K.-O. Different ammonia tolerances may facilitate spatial coexistence of *Gammarus roeselii* and the strong invader *Dikerogammarus villosus*. **Biological Invasions**, v. 15, n. 8, p. 1783–1793, 10 ago. 2013.

GOLLASCH, S.; KIESER, D.; DAN MINCHIN, I. W. **Status of Introductions of Non-Indigenous Marine Species to the North Atlantic and Adjacent Waters**. Copenhagen, Denmark: [s.n.].

HÄNFLING, B.; EDWARDS, F.; GHERARDI, F. Invasive alien Crustacea: dispersal, establishment, impact and control. **BioControl**, v. 56, n. 4, p. 573–595, 30 ago. 2011.

HENRY, R. P. et al. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. November, p. 1–34, 2012.

LANDEIRA, J. M. et al. Salinity effects on the first larval stage of the invasive crab *Hemigrapsus takanoi*: Survival and swimming patterns. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 245, n. January, p. 106976, out. 2020.

LARSEN, E. H. et al. Osmoregulation and Excretion. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2014. v. 4p. 405–573.

LEJEUSNE, C. et al. Do invaders always perform better? Comparing the response of native and invasive shrimps to temperature and salinity gradients in south-west Spain. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 136, p. 102–111, jan. 2014.

LEONE, F. A. et al. **Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates**. Cham: Springer International Publishing, 2017.

MACIEL, J. E. S. et al. Lactate metabolism in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* during hypoxia and post-hypoxia recovery. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 151, n. 1, p. 61–65, set. 2008.

MANTELATTO, F. L. M.; DIAS, L. L. Extension of the Known Distribution of *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) (Decapoda, Portunidae) along the Western Tropical South Atlantic. **Crustaceana**, v. 72, n. 6, p. 2013–2015, 1999.

NORMANT-SAREMBA, M.; BECKER, J.; WINKELMANN, C. Physiological and behavioral responses of the invasive amphipod, *Dikerogammarus villosus*, to ammonia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 189, p. 107–114, nov. 2015.

OCCHI, T. V. T. et al. Use of osmoregulatory ability to predict invasiveness of the Indo-Pacific swimming crab *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) an invader in Southern Brazil. **Nauplius**, v. 27, p. 1–6, 2019.

OCCHIPINTI-AMBROGI, A. Global change and marine communities: Alien species and climate change. **Marine Pollution Bulletin**, v. 55, n. 7–9, p. 342–352, jan. 2007.

OSHIRO, L. M. Y. 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.

PARMESAN, C. Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 37, n. 1, p. 637–669, dez. 2006.

PRENTER, J. et al. Lethal and sublethal toxicity of ammonia to native, invasive, and parasitised freshwater amphipods. **Water Research**, v. 38, n. 12, p. 2847–2850, jul. 2004.

REID, P. C. et al. A biological consequence of reducing Arctic ice cover: arrival of the Pacific diatom *Neodenticula seminae* in the North Atlantic for the first time in 800 000 years. **Global Change Biology**, v. 13, n. 9, p. 1910–1921, set. 2007.

ROMANO, N.; ZENG, C. Toxic Effects of Ammonia, Nitrite, and Nitrate to Decapod Crustaceans: A Review on Factors Influencing their Toxicity, Physiological Consequences, and Coping Mechanisms. **Reviews in Fisheries Science**, v. 21, n. 1, p. 1–21, jan. 2013.

ROS, M. et al. Environmental stress responses in sympatric congeneric crustaceans: Explaining and predicting the context-dependencies of invader impacts. **Marine Pollution Bulletin**, v. 170, p. 112621, set. 2021.

SANT'ANNA, B. 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**, v. 7, n. 3, p. 347–356, 2012.

SANT'ANNA, B. S. et al. Diet and population biology of the invasive crab *Charybdis hellerii* in southwestern Atlantic waters. **Marine Biology Research**, v. 11, n. 8, p. 814–823, 14 set. 2015.

SETIARTO, A. et al. Short-term responses of adult kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* (Bate) to environmental salinity: osmotic regulation, oxygen consumption and ammonia excretion. **Aquaculture Research**, v. 35, n. 7, p. 669–677, jun. 2004.

SHEN, C. et al. Comparative transcriptome analysis of the gills of *Procambarus clarkii* provide novel insights into the response mechanism of ammonia stress tolerance. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 3, p. 2611–2618, 3 mar. 2021.

SHERWOOD, L.; KLANDORF, H.; YANCEY, P. **Animal Physiology: From Genes to Organisms**. 2° ed. Belmont, USA: Brooks/Cole, 2013.

SOMERO, G. Comparative physiology: a “crystal ball” for predicting consequences of global change. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, n. 1, p. R1–R14, jul. 2011.

SOMERO, G. N. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine ‘winners’ and ‘losers’. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p. 912–920, 15 mar. 2010.

STREFEZZA, T. F.; DE ANDRADE, I. M.; AUGUSTO, A. Reduced pH and elevated salinities affect the physiology of intertidal crab *Minuca mordax* (Crustacea, Decapoda). **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 52, n. 5, p. 241–254, 3 set. 2019.

VACCHI, M. et al. Temperature changes and warm-water species in the Ligurian Sea: the case of the ornate wrasse *Thalassoma pavo* (Linnaeus, 1758). **Archo Oceanography and Limnology**, v. 22, p. 149–154, 2001.

WALTHER, G.-R. et al. Alien species in a warmer world: risks and opportunities. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 24, n. 12, p. 686–693, dez. 2009.

WATANABE, S. et al. Short-Term Responses of the Adults of the Common Japanese Intertidal Crab, *Hemigrapsus Takanoi* (Decapoda: Brachyura: Grapsoidea) at Different Salinities: Osmoregulation, Oxygen Consumption, and Ammonia Excretion. **Journal of Crustacean Biology**, v. 29, n. 2, p. 269–272, 1 jan. 2009.

WATANABE, T. T. et al. Population biology and distribution of the portunid crab *Callinectes ornatus* (Decapoda: Brachyura) in an estuary-bay complex of southern Brazil. **Zoologia (Curitiba)**, v. 31, n. 4, p. 329–336, ago. 2014.

WEBER, R. E.; SPAARGAREN, D. H. On the influence of temperature on the osmoregulation of C*rangon crangon* and its significance under estuarine conditions. **Netherlands Journal of Sea Research**, v. 5, n. 1, p. 108–120, nov. 1970.

WEIHRAUCH, D. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 26, p. 4491–4504, 15 dez. 2004.

EPÍLOGO

Nessa tese procurou-se avaliar a performance fisiológica das seguintes espécies de crustáceos decápodes encontradas no Complexo estuarino de Paranaguá (CEP): *Callinectes danae, Callinectes ornatus, Charybdis hellerii* e *Menippe nodifrons*. Embora essas espécies possuam mecanismos de defesa que permitem a elas suportarem intensa variação abiótica, nós procuramos descobrir se esses mecanismos atuam de forma compatível com a velocidade em que as mudanças climáticas ocorrem. Nesse sentido, utilizamos biomarcadores osmorregulatórios e metabólicos aliados ao contexto ecológico. Essa abordagem ecofisiológica se provou uma poderosa ferramenta no estudo de espécies estuarinas, identificando seus nichos ecológicos, o quão bem elas respondem a fatores abióticos estressantes combinados e quais os melhores biomarcadores para obter esses dados. Nossos resultados indicam que mesmo espécies eurialinas, euritérmicas ou invasoras têm suas performances fisiológicas comprometidas por aquecimento/acidificação em conjunto com redução de salinidade. As ferramentas fisiológicas utilizadas foram eficientes em reafirmar que o nicho fundamental de *C. ornatus* é menor que o de *C. danae,* e que o invasor *C. hellerii* possui performance fisiológica inferior do que as espécies nativas do CEP, o que pode ser um fator chave para limitar a sua dispersão. Os resultados obtidos podem ser utilizados em modelos ecológicos visando refinar previsões sobre como as mudanças climáticas podem afetar as espécies estudadas ou como ocorre a dinâmica da coexistência de espécies invasoras e nativas, por exemplo. Por fim, esse trabalho gerou conhecimento fisiológico e ecológico sobre espécies de crustáceos do litoral paranaense importantes para o ecossistema estuarino e que possuem valor econômico para as populações humanas locais. A queda de performance fisiológica observada em exposição a aquecimento e/ou acidificação sugere que essas espécies podem ter dificuldades em responder de forma adequada os desafios impostos pelas mudanças climáticas.

APÊNDICE I – DOUTORADO SANDUÍCHE: ANÁLISE DA FISIOLOGIA TÉRMICA E COMPORTAMENTO DE QUATRO ESPÉCIES DE ESTRELAS-DO-MAR DO ESTUÁRIO DE SAINT LAWRENCE, CANADÁ

Pesquisador Visitante através de acordo de intercâmbio entre Universidade Federal do Paraná (UFPR) e University of Quebéc at Rimouski (UQAR), com apoio financeiro do Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP) e sob orientação do Professor Piero Calosi (UQAR).

1 INTRODUÇÃO

Estuários, por serem locais de transição entre os ambientes de água doce e marinho, apresentam condições desafiadoras para os seus habitantes, entre elas, a variação de fatores abióticos como temperatura, pH e salinidade (BYRNE, 2013). O estuário de St. Lawrence é um dos mais importantes da américa do norte e terceiro maior do mundo. Destaca-se pelo tamanho significativo e pela alta variabilidade das condições físicas, refletida nas comunidades bentônicas, que mostram um amplo espectro de composições, densidades e biomassa. À medida que se desloca do estuário superior para o golfo, a abundância e a biomassa aumentam gradativamente e o número de espécies aumenta (DUFOUR, 2010). Entre as principais comunidades de invertebrados que habitam o estuário de Saint Lawrence, estão os equinodermos, especialmente as espécies de estrelas-do-mar.

As estrelas-do-mar desempenham papel fundamental na cadeia alimentar, podendo servir de alimento para muitos peixes e crustáceos, e também como predadores eficazes, principalmente de moluscos. Dessa maneira, tornam-se importantes componentes dos ecossistemas marinhos, e alterações nessas comunidades podem trazer consequências imprevisíveis ao ecossistema (DUFOUR, 2010). Através da comparação entre levantamentos de fauna de invertebrados realizados nos anos 80 e nos anos 2010, foi constatado mudanças significativas na densidade das populações de espécies de estrelas-do-mar no estuário de Saint Lawrence (HIMMELMAN, 1991; JOHNSON et al., 2019).

De forma geral, a distribuição de invertebrados bentônicos móveis mudou de espécies com distribuições subárticas para aquelas com faixas de temperatura boreal. Isso é mais aparente nas estrelas-do-mar, onde as espécies subárticas de *Leptasterias polaris*, *Crossaster papposus* e *Solaster endeca* declinaram em termos

relativos e absolutos, enquanto a boreal *Asterias rubens* teve um aumento de densidade de nove vezes (JOHNSON et al., 2019). Uma das explicações para essa mudança nas populações locais pode estar relacionada ao aumento de temperatura, uma vez que a região do estuário de Saint Lawrence tem experimentado médias de temperatura de até 5 °C acima da média esperada para o verão.

De acordo com relatório publicado pelo IPCC em 2014, espera-se que globalmente a média de temperatura aumente em até 4 °C, mantendo-se as atuais concentrações de gases do efeito estufa na atmosfera. Além disso, fenômenos climáticos extremos, como ondas de calor, tendem a tornar-se mais frequentes e intensas (IPCC, 2014). Diante dessas projeções, é fundamental sabermos como populações de invertebrados marinho responderiam diante de tal cenário. Para isso, diversas ferramentas podem ser utilizadas, como análises comportamentais e fisiológicas comparativas entre espécies alvo. Nossa hipótese foi que a substituição de espécies com distribuição subártica por espécies de distribuição boreal tem como um dos fatores principais, o aumento de temperatura. Nosso objetivo foi avaliar comparativamente a performance comportamental e fisiológica de quatro espécies de estrelas-do-mar diante de futuros cenários de aquecimento e de eventos extremos, como ondas de calor.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA, TRANSPORTE E MANUTENÇÃO DAS ESPÉCIES

As espécies de estrelas-do-mar *Leptasterias polaris* (~4,1 cm de diâmetro, N = 18), *Asterias rubens* (~3,7 cm de diâmetro, N = 29), *Solaster endeca* (~5,4 cm de diâmetro, N = 24) e *Crossaster papposus* (~7,5 cm de diâmetro, N = 6) foram coletadas no Estuário de Saint Lawrence, próximo à região de Godbout, Quebec, Canadá (49°19'N, 67°36'W) e transportados dentro de caixas refrigeradas para a Universidade de Québec em Rimouski (Rimouski, Quebec) dentro de 6 horas a partir da coleta. Durante o transporte, a temperatura nas caixas térmicas foi monitorada constantemente por meio de um termômetro, e mantida entre 8,0°C e 3,5°C através da adição de bolsas de gelo conforme necessário. Uma vez no laboratório, os espécimes foram mantidos em tanques de 60 L com as seguintes condições abióticas:

temperatura 5,0 °C +/-0,7 (N = 104), salinidade 30,4 +/-0,7 ‰ (N = 63). Inicialmente, os indivíduos foram divididos em três tanques experimentais medindo 60 cm de comprimento, 40 cm de largura e 25 cm de altura, com capacidade para 60L de água. Os tanques foram cobertos para evitar a evaporação, a água mantida em salinidade 30,4 +/-0,7 ‰. Todos os dias até 50% da água em cada tanque era trocada para manter a sua qualidade.

2.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram construídas 3 gaiolas com polietileno de alta densidade (uma por tanque) para evitar o contato entre os indivíduos e assim evitar interações prejudiciais entre as espécies, como a predação. Cada gaiola tinha as seguintes dimensões: 40 cm de comprimento, 40 cm de largura e 25 cm de altura. O primeiro tanque foi a condição de controle (temperatura de 5,0 °C +/-0,7). O segundo e terceiro tanques foram as condições experimentais, em que os indivíduos foram submetidos a um aumento gradual da temperatura, até 9,0 °C (tanque 2) e 13,0 °C (tanque 3), ambas temperaturas previstas em cenários de aquecimento global pelo IPCC. As temperaturas escolhidas levam em consideração um aumento gradual nas médias de temperatura (9,0 °C) e um aumento na intensidade das ondas de calor (13,0 °C). O aquecimento gradual durou três dias em ambos os tanques. Para o tanque 2, o aumento da temperatura foi de 1,3 °C d^{-1} e para o tanque 3, foi de 2,7 °C d^{-1}, até atingir a temperatura desejada. Após esse período de aquecimento gradual, os indivíduos foram mantidos por sete dias expostos às novas condições de temperatura.

2.3 TESTE DE COMPORTAMENTO E MORTALIDADE

Ao final desses sete dias, os espécimes foram submetidos a ensaios de comportamento com base no método de UBALDO et al., 2007. Após os ensaios, os espécimes foram medidos, pesados e eutanasiados para obtenção dos tecidos que foram imediatamente armazenados em freezer -80 °C para realizar análises metabolômicas. Para a análise da resposta comportamental, os indivíduos foram rápida e suavemente transferidos para um novo tanque de 60 litros, ajustado na mesma condição abiótica do tanque anterior. Os indivíduos foram invertidos,

colocados com a superfície dorsal (aboral) em contato com o fundo do tanque e a superfície ventral (oral) voltada para cima. Foram cronometrados o momento em que o indivíduo iniciou o movimento para retornar à posição original e o momento em que esse movimento foi finalizado. O ensaio foi considerado concluído quando toda a superfície oral do espécime estava voltada para baixo, sem sobreposição dos braços. O tempo necessário para completar a resposta comportamental foi medido em segundos e usado para calcular o coeficiente de atividade ($CA = 1000 \times s^{-1}$), conforme descrito por PERCY, 1973. Esse processo foi repetido por um tempo máximo de 15 minutos por indivíduo, e ao final foi determinado quantas vezes cada indivíduo conseguiu retornar à sua posição original. A mortalidade foi avaliada diariamente desde o início dos experimentos até o momento em que os ensaios relativos ao comportamento foram concluídos.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O efeito da temperatura no comportamento e mortalidade das diferentes espécies de estrelas-do-mar investigadas foi analisado usando um teste GLM binomial negativo para avaliar o comportamento e um GLM binomial proporcional para avaliar a mortalidade. Como fatores fixos, usamos “Temperatura” e “Espécie”. O tamanho do corpo (massa corporal úmida) foi utilizado como covariável e “tanque” como fator aleatório. Para a análise de normalidade foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk e para a homogeneidade de variância foi utilizado o teste de Levene. Todos os modelos foram validados analisando os resíduos, com base em Modelos de Efeitos Mistos e Extensões em Ecologia com R (ZUUR et al. 2009). O nível de significância foi fixado em 95%.

3 RESULTADOS

3.1 MORTALIDADE

Em relação a mortalidade, foi observado que para *L. polaris* houve 0% de mortalidade no tanque 1 (5 °C), 14% no tanque 2 (9 °C) e 50% no tanque 3 (13 °C).

Já para *A. rubens*, a mortalidade foi de 0% no tanque 1 (5 °C), 33% no tanque 2 (9 °C) e 0% no tanque 3 (13 °C). A espécie *C. papposus* teve 14% de mortalidade no tanque 1 (5 °C) e 100% de mortalidade nos tanques 2 (9 °C) e 3 (13 °C). Por fim, *S. endeca* teve 0% de mortalidade no tanque 1 (5 °C) 0% no tanque 2 (9 °C) e 36% no tanque 3 (13 °C). Os resultados indicam que *C. papposus* é a espécie mais sensível, apresentando maior mortalidade que as demais espécies. Em geral, o aumento da temperatura está relacionado ao aumento da mortalidade (FIGURA 1).

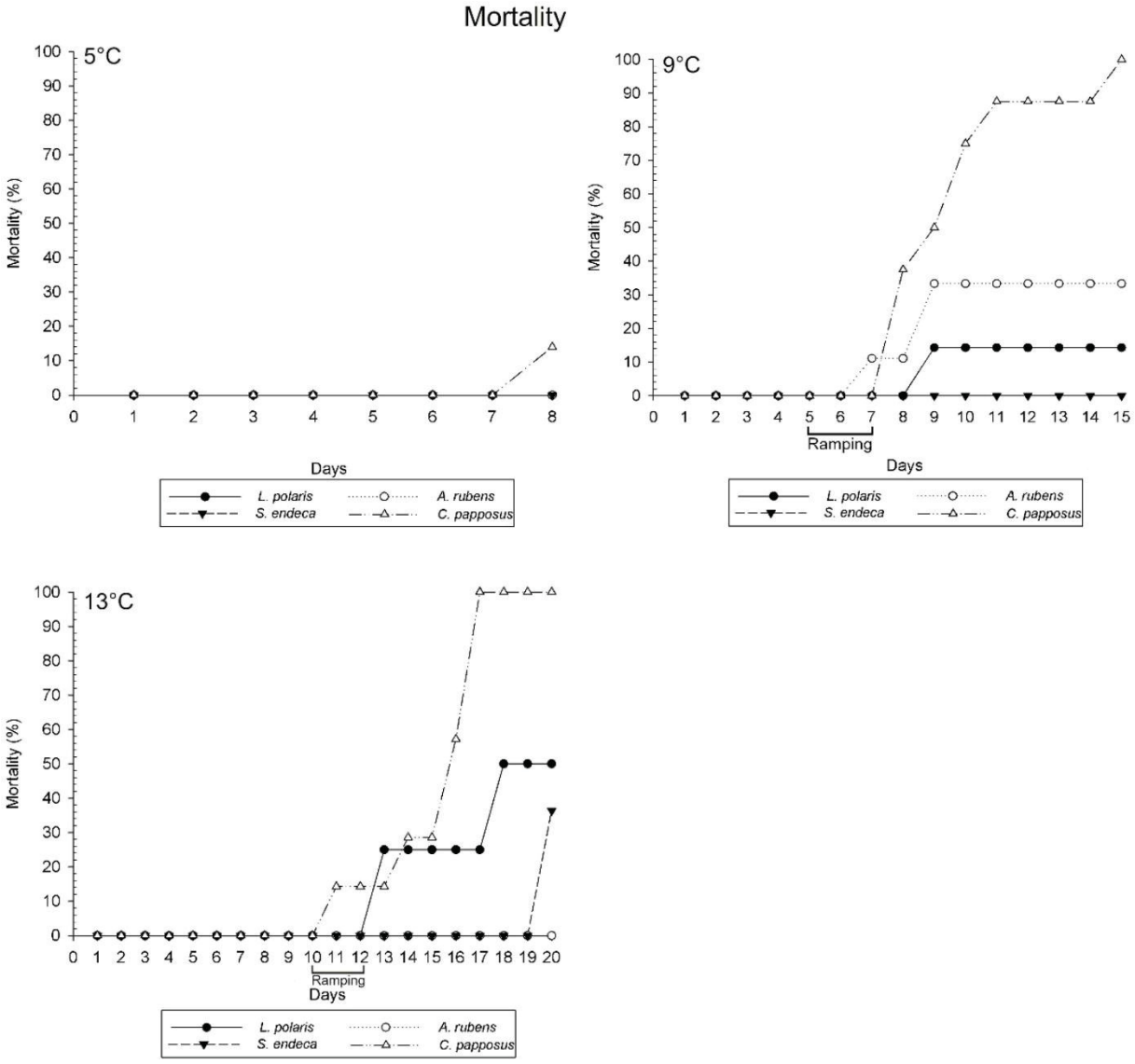


Figura 1. Mortalidade de *Lepstaterias polaris, Asterias rubens*, *Crossaster papposus* e *Solaster endeca* expostos as seguintes temperaturas: 5 °C (controle), 9 °C (aquecimento global) e 13 °C (onda de calor) por 7 dias. n = 104.

3.2 ENSAIO COMPORTAMENTAL

Foi observado efeito da massa sobre o número de viradas de cada indivíduo, então a massa dos indivíduos foi utilizada como covariável. Para avaliar o efeito da temperatura e da massa no comportamento dos indivíduos, foi utilizada a análise GLM binomial negativa, seguida de um teste de associação entre as variáveis preditoras. Foi possível observar que os tanques mais quentes tendem a ter indivíduos sobreviventes com menor massa corporal (FIGURA 2). Entre as espécies, *Leptasterias polaris* tem menos massa corporal e tende a virar mais em temperaturas mais altas (FIGURA 3). Da mesma forma, o tempo necessário para o início da virada está relacionado à massa e temperatura, ocorrendo mais rapidamente em indivíduos com menor massa corporal e em tanques de maior temperatura (FIGURA 4).

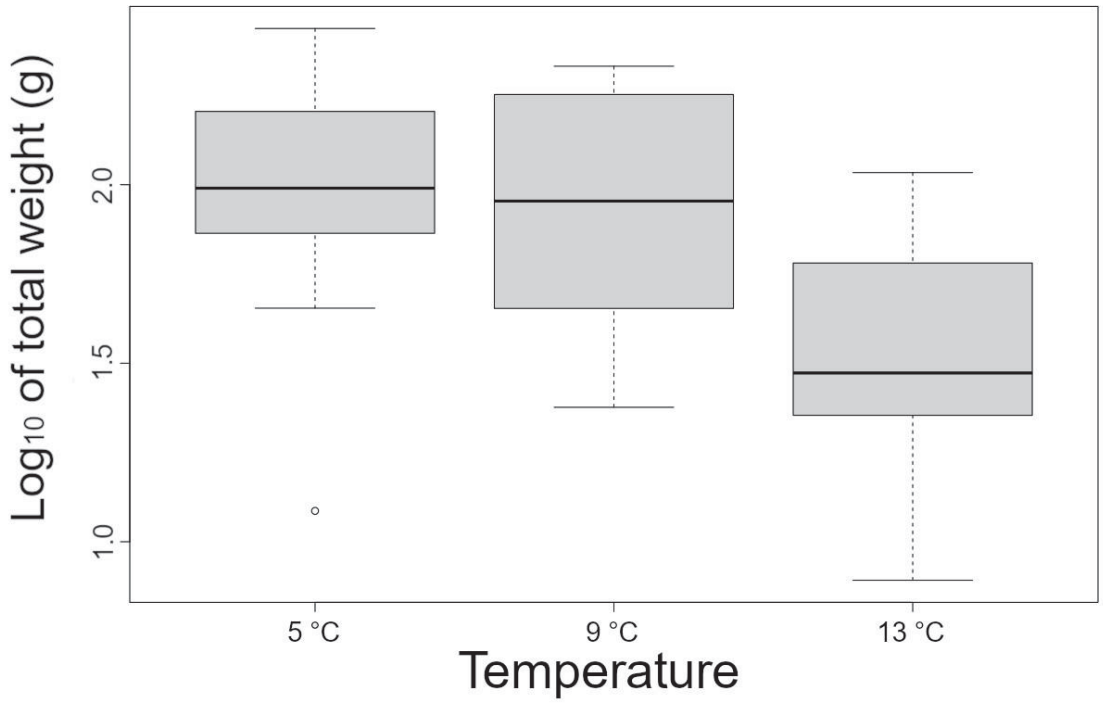


Figura 2. Massa corporal de *Lepstaterias polaris, Asterias rubens*, *Crossaster papposus* e *Solaster endeca* expostos as seguintes temperaturas: 5 °C (controle), 9 °C (aquecimento global) e 13 °C (onda de calor) por 7 dias. n = 104.

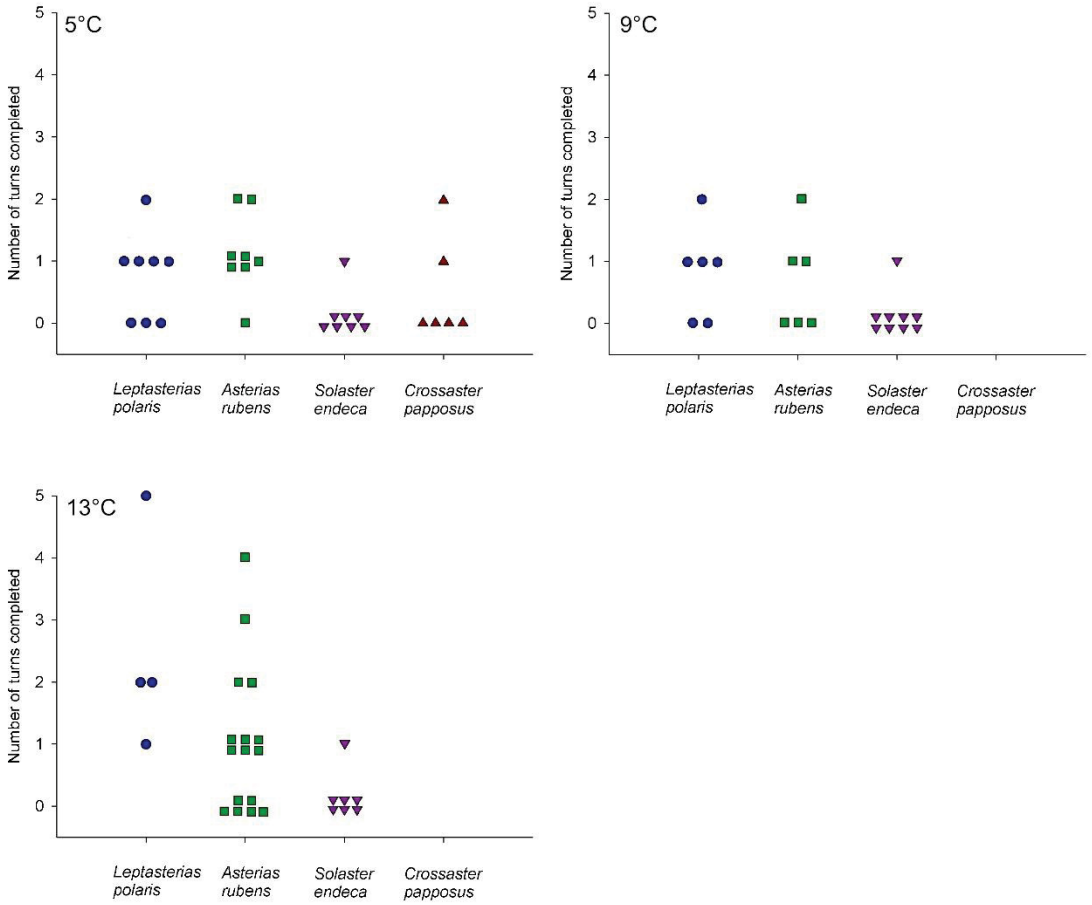


Figura 3. Número de viradas de *Lepstaterias polaris, Asterias rubens*, *Crossaster papposus* e *Solaster endeca* expostos as seguintes temperaturas: 5 °C (controle), 9 °C (aquecimento global) e 13 °C (onda de calor) por 7 dias. n = 104.

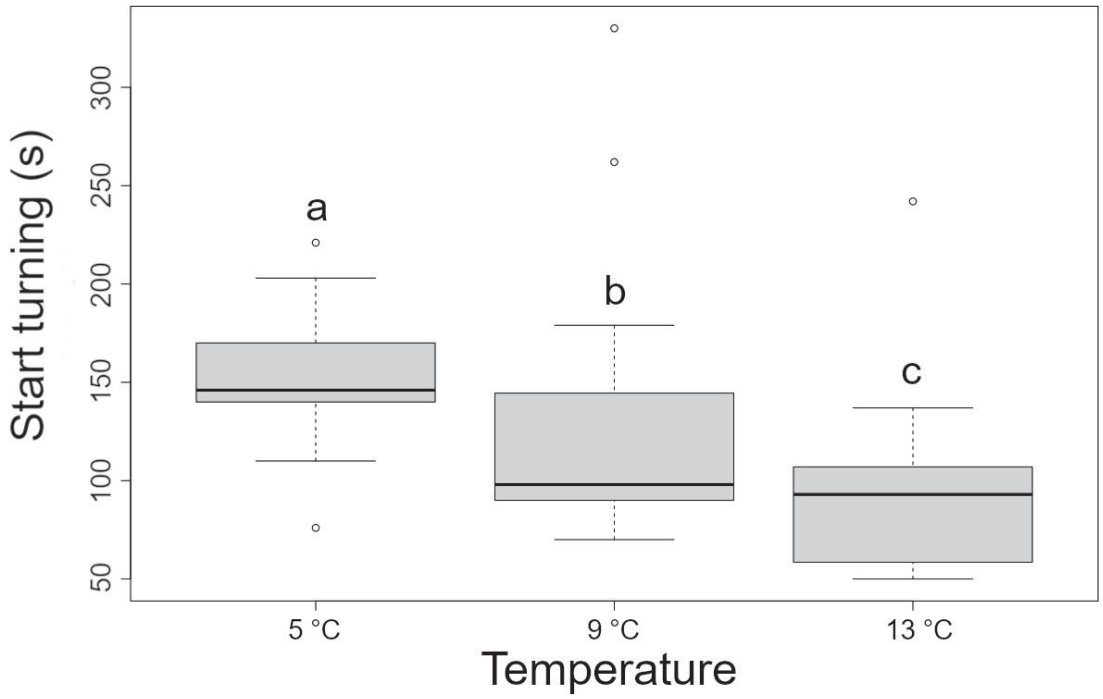


Figura 3. Tempo de início das viradas (em segundos) de *Lepstaterias polaris, Asterias rubens*, *Crossaster papposus* e *Solaster endeca* expostos as seguintes temperaturas: 5 °C (controle), 9 °C (aquecimento global) e 13 °C (onda de calor) por 7 dias. n = 104.

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A análise comportamental, em especial o "*righting response",* tem sido empregada com sucesso em equinodermos desde o início dos anos 70 (J.A. PERCY, 1973). Essa técnica tem sido utilizada como um biomarcador de estresse abiótico, sendo aplicada em estudos de exposição de estrelas-do-mar ao ar (LAWRENCE; COWELL, 1996), baixa salinidade (BARKER; RUSSELL, 2008; HELD; HARLEY, 2009) e temperatura (BELLUCCI; SMITH, 2019; UBALDO; UY; DY, 2008). Embora a maioria dos estudos estejam relacionados a limites de tolerância, nós utilizamos o "*righting response"* em conjunto com análises metabolômicas (que serão finalizadas em breve) como um proxy para avaliação de ativação de metabolismo em exposição a altas temperaturas.

Nossos resultados preliminares indicam que a mortalidade aumenta com a temperatura, e que essa mortalidade está relacionada tanto a espécie quanto ao tamanho dos indivíduos. Resultados semelhantes foram obtidos com espécies de invertebrados marinhos (equinodermos, moluscos, crustáceos, ascídias) em que

indivíduos menores obtiveram uma taxa maior de sobrevivência em exposição a altas temperaturas (PECK et al., 2009). Em uma mesma espécie, indivíduos maiores geralmente já estão maduros sexualmente, e a sua retirada da população pode impactar a reprodução, o recrutamento e o assentamento de determinada população, além da ocorrência de seleção natural favorável a sobrevivência e reprodução de indivíduos menores (PECK et al., 2009; PERRIN; SIBLY; NICHOLS, 1993). Se essa retirada ocorrer principalmente por fatores abióticos como a temperatura, os diversos cenários de aquecimento propostos pelo IPCC podem ter consequências devastadoras para as espécies de estrelas-do-mar do estuário de Saint Lawrence.

De forma semelhante, o número e o início das viradas está relacionado ao tamanho dos espécimes, com animais menores exibindo maior atividade em temperaturas mais altas. Historicamente falando, animais menores são mais ágeis do que animais maiores, especialmente em invertebrados marinhos (CARDILLO, 2003; PECK et al., 2009). Isso pode ajudar a explicar porque espécies menores tendem a sobreviver a eventos de extinção, principalmente relacionados ao aquecimento (CARDILLO, 2003). Nossos resultados de mortalidade e das análises comportamentais sugerem que indivíduos menores das espécies de estrelas-do-mar do estuário de Saint Lawrence estarão mais aptos a sobreviver em um cenário de aquecimento. Dessa forma, a adição dos dados metabolômicos poderão confirmar essa conclusão e ainda explicar as diferenças encontradas entre essas espécies, que não foram possíveis de serem explicadas apenas com dados de comportamento.

REFERÊNCIAS

BARKER, M. F.; RUSSELL, M. P. The distribution and behaviour of *Patiriella mortenseni* and *P. regularis* in the extreme hyposaline conditions of the Southern New Zealand Fiords. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 355, n. 1, p. 76–84, 2008.

BELLUCCI, L. M.; SMITH, N. F. Crawling and righting behavior of the subtropical sea star *Echinaster (Othilia) graminicola*: effects of elevated temperature. **Marine Biology**, v. 166, n. 11, p. 1–9, 2019.

BYRNE, M.; PRZESLAWSKI, R. Multistressor impacts of warming and acidification of the ocean on marine invertebrates' life histories. **Integrative and Comparative Biology**, v. 53, n. 4, p. 582–596, 2013.

CARDILLO, M. Biological determinants of extinction risk: Why are smaller species less vulnerable? **Animal Conservation**, v. 6, n. 1, p. 63–69, 2003.

DUFOUR, R. et al. Ecosystem status and trends report: Estuary and Gulf of St. Lawrence ecozone. **Department of Fisheries and Oceans. Canadian Science Advisory Secretariat. Research Document**, v. 30, p. 193, 2010.

HELD, M. B. E.; HARLEY, C. D. G. Responses to low salinity by the sea star Pisaster ochraceus from high- and low-salinity populations. **Invertebrate Biology**, v. 128, n. 4, p. 381–390, nov. 2009.

HIMMELMAN, J. H. Diving observations of subtidal communities in the northern Gulf of St. Lawrence. **The Gulf of St. Lawrence: small ocean or big estuary**, p. 319-332, 1991.

IPCC, 2014. In: **Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Geneva: IPCC, p. 151, 2014.

JOHNSON, L. E. et al. Subtidal rocky shores of the north-west Atlantic Ocean. **Interactions in the Marine Benthos: Global patterns and processes**, p. 90-127, 2019.

LAWRENCE, J. M.; COWELL, B. C. The righting response as an indication of stress

in *Stichaster striatus* (Echinodermata, asteroidea). **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 27, n. 4, p. 239–248, jul. 1996.

PECK, L. S. et al. Animal temperature limits and ecological relevance: Effects of size, activity and rates of change. **Functional Ecology**, v. 23, n. 2, p. 248–256, 2009.

PERCY, J. A. Thermal adaptation in the boreo-arctic echinoid *Strongylocentrotus droebachiensis* (OF Müller, 1776). II. Seasonal acclimatization and urchin activity. **Physiological Zoology**, v. 46, n. 2, p. 129-138, 1973.

PERRIN, N.; SIBLY, R. M.; NICHOLS, N. K. Optimal growth strategies when mortality and production rates are size-dependent. **Evolutionary Ecology**, v. 7, n. 6, p. 576–592, 1993.

UBALDO, J. P.; UY, F. A.; DY, D. T. Temperature tolerance of some species of Philippine intertidal echinoderms. **Philippine Scientist**, v. 44, p. 105-119, 2007.

ZUUR, A. F. et al. **Mixed effects models and extensions in ecology with R**. New York: Springer, 2009.

REFERÊNCIAS GERAIS

AL-REASI, H. A. et al. The effect of dissolved organic matter (DOM) on sodium transport and nitrogenous waste excretion of the freshwater cladoceran (*Daphnia magna*) at circumneutral and low pH. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 158, n. 4, p. 207–215, nov. 2013.

ALLAN, E. L.; FRONEMAN, P. W.; HODGSON, A. N. Effects of temperature and salinity on the standard metabolic rate (SMR) of the caridean shrimp *Palaemon peringueyi*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 337, n. 1, p. 103–108, set. 2006.

AMADO, E. M. et al. Lead hampers gill cell volume regulation in marine crabs: Stronger effect in a weak osmoregulator than in an osmoconformer. **Aquatic Toxicology**, v. 106–107, p. 95–103, 15 jan. 2012.

ARAMBOUROU, H.; STOKS, R. Combined effects of larval exposure to a heat wave and chlorpyrifos in northern and southern populations of the damselfly *Ischnura elegans*. **Chemosphere**, v. 128, p. 148–154, jun. 2015.

BARKER, M. F.; RUSSELL, M. P. The distribution and behaviour of *Patiriella mortenseni* and *P. regularis* in the extreme hyposaline conditions of the Southern New Zealand Fiords. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 355, n. 1, p. 76–84, 2008.

BERTINI, G. et al. Relative growth and sexual maturity of the stone crab *Menippe nodifrons* Stimpson, 1859 (Brachyura, Xanthoidea) in southeastern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 2, p. 259–267, mar. 2007.

BORECKA, A.; JANAS, U.; KENDZIERSKA, H. The combined effect of temperature and salinity changes on osmoregulation and haemocyanin concentration in *Saduria entomon* (Linnaeus, 1758). **Marine Biology Research**, v. 12, n. 3, p. 316–322, 2016.

BRIDGES, C. R. Modulation of haemocyanin oxygen affinity: properties and physiological implications in a changing world . **Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 1021–1032, 2001.

BROUWER, M.; BONAVENTURA, C.; BONAVENTURA, J. Analysis of the effect of three different allosteric ligands on oxygen binding by hemocyanin of the shrimp, *Penaeus setiferus*. **Biochemistry**, v. 17, n. 11, p. 2148–2154, 30 maio 1978.

BROWN, J. et al. Contrasting responses to salinity and future ocean acidification in arctic populations of the amphipod *Gammarus setosus*. **Marine Environmental Research**, v. 162, n. September, p. 105176, dez. 2020.

BRUIJS, M. C. M. et al. Oxygen consumption, temperature and salinity tolerance of the invasive amphipod *Dikerogammarus villosus*: indicators of further dispersal via ballast water transport. **Fundamental and Applied Limnology**, v. 152, n. 4, p. 633–646, 10 jan. 2001.

BYRNE, M.; PRZESLAWSKI, R. Multistressor impacts of warming and acidification of the ocean on marine invertebrates' life histories. **Integrative and Comparative Biology**, v. 53, n. 4, p. 582–596, 2013.

CALDEIRA, K.; WICKETT, M. E. Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. **Journal of Geophysical Research**, v. 110, n. C9, p. C09S04, 16 jul. 2005.

CALOSI, P. et al. Regional adaptation defines sensitivity to future ocean acidification. **Nature Communications**, v. 8, n. January, p. 13994, 9 jan. 2017.

CAMPBELL, P. J.; JONES, M. B. Ionic regulation of the estuarine prawn *Palaemon longirostris* (Caridea: Palaemonidae). **Ophelia**, v. 30, n. 2, p. 141–154, maio 1989.

CARDILLO, M. Biological determinants of extinction risk: Why are smaller species less vulnerable? **Animal Conservation**, v. 6, n. 1, p. 63–69, 2003.

CARQUEIJA, C. R. G.; GOUVÊA, E. P. A ocorrência, na costa brasileira, de um Portunidae (Crustacea, Decapoda), originário do Indo-Pacífico e Mediterrâneo. **Nauplius**, v. 4, n. 1, p. 105–112, 1996.

CHEN, J.-C.; CHIA, P.-G. Oxygen uptake and nitrogen excretion of juvenile *Scylla serrata* at different temperature and salinity levels. **Journal of Crustacean Biology**, v. 16, n. 3, p. 437–442, 1996.

CHEN, J. C. et al. Survival, haemolymph osmolality and tissue water of *Penaeus chinensis* juveniles acclimated to different salinity and temperature levels. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, v. 110, n. 3, p. 253–258, 1995.

CHEN, J. C.; LAI, S. H. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia-N excretion of juvenile *Penaeus japonicus* Bate. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 165, n. 2, p. 161–170, 1993.

COATES, C. J.; NAIRN, J. Diverse immune functions of hemocyanins. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 45, n. 1, p. 43–55, jul. 2014.

COCCIA, C. et al. 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, 17 maio 2013.

CUENCA, A. L. R.; SOUZA, M. M.; FREIRE, C. A. Osmoregulatory power influences tissue ionic composition after salinity acclimation in aquatic decapods. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 259, n. February, p. 111001, set. 2021.

DEUTSCH, C. A. et al. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 18, p. 6668–6672, 6 maio 2008.

DIAZ, F. et al. Effects of temperature and salinity fluctuation on the oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of the blue shrimp *Litopenaeus Stylirostris*. **Journal of Shellfish Research**, v. 23, n. 3, p. 903–910, 2004a.

DIAZ, F. et al. Effects of Temperature and Salinity Fluctuation on the Oxygen Consumption, Ammonium Excretion, and Osmoregulation of the Blue Shrimp *Litopenaeus Stylirostris*. **Journal of Shellfish Research**, v. 23, n. 3, p. 903–910, 2004.

DISSANAYAKE, A.; ISHIMATSU, A. Synergistic effects of elevated CO2 and temperature on the metabolic scope and activity in a shallow-water coastal decapod (*Metapenaeus joyneri*; Crustacea: Penaeidae). **ICES Journal of Marine Science**, v. 68, n. 6, p. 1147–1154, 1 jul. 2011.

DOBRZYCKA-KRAHEL, A.; KRZAK, M.; SZANIAWSKA, A. A laboratory-based comparison of osmoregulatory ability at different water temperatures and salinities in the stenothermic isopod *Saduria entomon* (Linnaeus, 1758) and the eurythermic amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766) from the Baltic Sea. **Marine and**

Freshwater Behaviour and Physiology, v. 47, n. 1, p. 29–39, 2014.

DONELSON, J. et al. Effects of elevated water temperature and food availability on the reproductive performance of a coral reef fish. **Marine Ecology Progress Series**, v. 401, p. 233–243, 22 fev. 2010.

DUFOUR, R. et al. Ecosystem status and trends report: Estuary and Gulf of St. Lawrence ecozone. **Department of Fisheries and Oceans. Canadian Science Advisory Secretariat. Research Document**, v. 30, p. 193, 2010.

DUKES, J. S.; MOONEY, H. A. Does global change increase the success of biological invaders? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 4, p. 135–139, abr. 1999.

DUNBAR, S. G.; COATES, M. Differential tolerance of body fluid dilution in two species of tropical hermit crabs: Not due to osmotic/ionic regulation. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 137, n. 2, p. 321–337, 2004.

ENGEL, D. W. Comparison of the osmoregulatory capabilities of two portunid crabs, *Callinectes sapidus* and *C. similis*. **Marine Biology**, v. 41, n. 3, p. 275–279, 1977.

FARIA, S. C.; AUGUSTO, A. S.; MCNAMARA, J. C. Intra- and extracellular osmotic regulation in the hololimnetic Caridea and Anomura: a phylogenetic perspective on the conquest of fresh water by the decapod Crustacea. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 181, n. 2, p. 175–186, 28 fev. 2011.

FEELY, R. A. et al. Impact of anthropogenic CO2 on the CaCO3 system in the oceans. **Science (New York, N.Y.)**, v. 305, n. 5682, p. 362–6, 16 jul. 2004.

FEELY, R. A.; SABINE, C. L.; FABRY, V. J. Carbon dioxide and our ocean legacy. **Science Brief**, p. 1–3, 2006.

FEHSENFELD, S.; WEIHRAUCH, D. Mechanisms of acid–base regulation in seawater-acclimated green crabs (*Carcinus maenas*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 94, n. 2, p. 95–107, fev. 2016.

FOWLER, A. E.; GERNER, N. V.; SEWELL, M. A. Temperature and salinity tolerances of Stage 1 zoeae predict possible range expansion of an introduced portunid crab, *Charybdis japonica*, in New Zealand. **Biological Invasions**, v. 13, n. 3, p. 691–699, 2 mar. 2011.

FREDERICH, M. et al. Haemolymph Mg(2+) regulation in decapod crustaceans: physiological correlates and ecological consequences in polar areas. **The Journal of experimental biology**, v. 203, n. Pt 8, p. 1383–93, abr. 2000.

FREIRE, C. A. et al. 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**, v. 149, n. 4, p. 435–446, abr. 2008.

FREIRE, C. A. et al. Oxygen consumption remains stable while ammonia excretion is reduced upon short time exposure to high salinity in *Macrobrachium acanthurus* (Caridae: Palaemonidae), a recent freshwater colonizer. **Zoologia**, v. 34, n. Anger 2013, p. 1–9, 1 set. 2017.

FREIRE, C. A. et al. Biomarkers of homeostasis, allostasis, and allostatic overload in decapod crustaceans of distinct habitats and osmoregulatory strategies: an empirical approach. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 248, n. June, p. 110750, out. 2020.

FREIRE, C. A.; TOGNI, V. G.; HERMES-LIMA, M. Responses of free radical metabolism to air exposure or salinity stress, in crabs (*Callinectes danae* and *C. ornatus*) with different estuarine distributions. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 160, n. 2, p. 291–300, out. 2011.

GARÇON, D. P. et al. Osmotic and ionic regulation, and kinetic characteristics of a posterior gill (Na+, K+)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae* on acclimation to salinity challenge. **Marine Biology**, v. 168, n. 6, p. 79, 3 jun. 2021.

GERGS, R.; SCHLAG, L.; ROTHHAUPT, K.-O. Different ammonia tolerances may facilitate spatial coexistence of *Gammarus roeselii* and the strong invader *Dikerogammarus villosus*. **Biological Invasions**, v. 15, n. 8, p. 1783–1793, 10 ago. 2013.

GOLLASCH, S.; KIESER, D.; DAN MINCHIN, I. W. **Status of Introductions of Non-Indigenous Marine Species to the North Atlantic and Adjacent Waters**. Copenhagen, Denmark: [s.n.].

HÄNFLING, B.; EDWARDS, F.; GHERARDI, F. Invasive alien Crustacea: dispersal,

establishment, impact and control. **BioControl**, v. 56, n. 4, p. 573–595, 30 ago. 2011.

HARDY, D.; MUNRO, J.; DUTIL, J.-D. Temperature and salinity tolerance of the soft-shell and hard-shell male snow crab, *Chionoecetes opilio*. **Aquaculture**, v. 122, n. 2–3, p. 249–265, maio 1994.

HELD, M. B. E.; HARLEY, C. D. G. Responses to low salinity by the sea star Pisaster ochraceus from high- and low-salinity populations. **Invertebrate Biology**, v. 128, n. 4, p. 381–390, nov. 2009.

HENRY, R. P. et al. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. November, p. 1–34, 2012.

HENRY, R. P.; WHEATLY, M. G. Interaction of respiration, ion regulation, and acid-base balance in the everyday life of aquatic crustaceans. **Integrative and Comparative Biology**, v. 32, n. 3, p. 407–416, 1992.

HEWITT, J. E.; ELLIS, J. I.; THRUSH, S. F. Multiple stressors, nonlinear effects and the implications of climate change impacts on marine coastal ecosystems. **Global change biology**, v. 22, n. 8, p. 2665–2675, 2016.

HIEBENTHAL, C. et al. Kiel fjord pCO2 datasets between 2012 (July) and 2015 (January) measured using a HydroC® pCO2 sensor. **Data Set, GEOMAR Helmholtz Centre for Ocean Research Kiel, Kiel, Ger**, v. 2012, n. January, p. 2012–2015, 2016.

HIMMELMAN, J. H. Diving observations of subtidal communities in the northern Gulf of St. Lawrence. **The Gulf of St. Lawrence: small ocean or big estuary**, p. 319-332, 1991.

HU, M. Y. et al. Strong Ion Regulatory Abilities Enable the Crab *Xenograpsus testudinatus* to Inhabit Highly Acidified Marine Vent Systems. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–11, 1 fev. 2016.

HUNDAHL, C.; FAGO, A.; WEBER, R. E. Effects of water activity on oxygen-binding in high-molecular weight, extracellular invertebrate hemoglobin and hemocyanin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, n. 1, p. 83–90, set. 2003.

IPCC, 2014. In: **Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Geneva: IPCC, 2014. p. 151.

JOHNSON, L. E. et al. Subtidal rocky shores of the north-west Atlantic Ocean. **Interactions in the Marine Benthos: Global patterns and processes**, p. 90-127, 2019.

JOST, J.; PODOLSKI, S.; FREDERICH, M. Enhancing thermal tolerance by eliminating the pejus range: a comparative study with three decapod crustaceans. **Marine Ecology Progress Series**, v. 444, n. Shelford 1931, p. 263–274, 10 jan. 2012.

KELLY, M. W.; HOFMANN, G. E. Adaptation and the physiology of ocean acidification. **Functional Ecology**, v. 27, n. 4, p. 980–990, ago. 2013.

KIRSCHNER, L. B. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 9, p. 1439–1452, 1 abr. 2004.

KROEKER, K. J.; MICHELI, F.; GAMBI, M. C. Ocean acidification causes ecosystem shifts via altered competitive interactions. **Nature Climate Change**, v. 3, n. 2, p. 156–159, 9 fev. 2013.

LANDEIRA, J. M. et al. Salinity effects on the first larval stage of the invasive crab *Hemigrapsus takanoi*: Survival and swimming patterns. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 245, n. January, p. 106976, out. 2020.

LARSEN, E. H. et al. Osmoregulation and Excretion. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2014. v. 4p. 405–573.

LAWRENCE, J. M.; COWELL, B. C. The righting response as an indication of stress in *Stichaster striatus* (Echinodermata, asteroidea). **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 27, n. 4, p. 239–248, jul. 1996.

LEJEUSNE, C. et al. Do invaders always perform better? Comparing the response of native and invasive shrimps to temperature and salinity gradients in south-west Spain. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 136, p. 102–111, jan. 2014.

LEONE, F. A. et al. **Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates**. Cham: Springer International Publishing, 2017.

MACIEL, J. E. S. et al. Lactate metabolism in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* during hypoxia and post-hypoxia recovery. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 151, n. 1, p. 61–65, set. 2008.

MADEIRA, C. et al. Thermal stress and energy metabolism in two circumtropical decapod crustaceans: Responses to acute temperature events. **Marine Environmental Research**, v. 141, n. April, p. 148–158, out. 2018.

MADEIRA, D. et al. Thermal tolerance and potential impacts of climate change on coastal and estuarine organisms. **Journal of Sea Research**, v. 70, p. 32–41, maio 2012.

MANTELATTO, F. L. M.; DIAS, L. L. Extension of the Known Distribution of *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) (Decapoda, Portunidae) along the Western Tropical South Atlantic. **Crustaceana**, v. 72, n. 6, p. 2013–2015, 1999.

MANTELATTO, F. L. M.; FRANSOZO, A. Brachyuran community in Ubatuba Bay, northern coast of São Paulo State, Brazil. **Journal of Shellfish Research**, v. 19, n. 2, p. 701–709, 2000.

MARTINS, B. A. et al. Environmental factors modulating the abundance and distribution of *Callinectes danae* (Decapoda: Portunidae) from two areas of the southeastern coast of Brazil. **Biologia**, v. 69, n. 10, p. 1356–1364, 7 out. 2014.

MAUS, B.; BOCK, C.; PÖRTNER, H.-O. Water bicarbonate modulates the response of the shore crab *Carcinus maenas* to ocean acidification. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 188, n. 5, p. 749–764, 23 set. 2018.

MCELROY, D. J.; NGUYEN, H. D.; BYRNE, M. Respiratory response of the intertidal seastar *Parvulastra exigua* to contemporary and near-future pulses of warming and hypercapnia. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 416–417, p. 1–7, abr. 2012.

MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro**. [s.l: s.n.].

MELZNER, F. et al. Ocean Acidification and Coastal Marine Invertebrates: Tracking

CO2 Effects from Seawater to the Cell. **Annual Review of Marine Science**, v. 12, p. 499–523, 2020.

MORRITT, D.; SPICER, J. I. A brief re-examination of the function and regulation of extracellular magnesium and its relationship to activity in crustacean arthropods. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 106, n. 1, p. 19–23, set. 1993.

NEWSOM, J. E.; DAVIS, K. B. Osmotic responses of haemolymph in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) and white river crayfish (*P. zonangulus*) to changes in temperature and salinity. **Aquaculture**, v. 126, n. 3–4, p. 373–381, out. 1994.

NORMANT-SAREMBA, M.; BECKER, J.; WINKELMANN, C. Physiological and behavioral responses of the invasive amphipod, *Dikerogammarus villosus*, to ammonia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 189, p. 107–114, nov. 2015.

NOYOLA REGIL, J. et al. Thermal biology of prey (*Melongena corona bispinosa*, *Strombus pugilis*, *Callinectes similis*, *Libinia dubia*) and predators (*Ocyurus chrysurus*, *Centropomus undecimalis*) of *Octopus maya* from the Yucatan Penin. **Journal of Thermal Biology**, v. 53, n. 2015, p. 151–161, out. 2015.

OCCHI, T. V. T. et al. Use of osmoregulatory ability to predict invasiveness of the Indo-Pacific swimming crab *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) an invader in Southern Brazil. **Nauplius**, v. 27, p. 1–6, 2019.

OCCHIPINTI-AMBROGI, A. Global change and marine communities: Alien species and climate change. **Marine Pollution Bulletin**, v. 55, n. 7–9, p. 342–352, jan. 2007.

OCCHIPINTI-AMBROGI, A.; GALIL, B. Marine alien species as an aspect of global change. **Advances in Oceanography and Limnology**, v. 1, n. 1, p. 199–218, 2010.

ORR, J. C. et al. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 681–686, set. 2005.

OSHIRO, L. M. Y. 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.

PARMESAN, C. Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 37, n. 1, p. 637–669, dez. 2006.

PARMESAN, C.; YOHE, G. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. n. 6918, p. 37–42, 2 jan. 2003.

PECK, L. S. et al. Animal temperature limits and ecological relevance: Effects of size, activity and rates of change. **Functional Ecology**, v. 23, n. 2, p. 248–256, 2009.

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

PERCY, J. A. Thermal adaptation in the boreo-arctic echinoid *Strongylocentrotus droebachiensis* (OF Müller, 1776). II. Seasonal acclimatization and urchin activity. **Physiological Zoology**, v. 46, n. 2, p. 129-138, 1973.

PERRIN, N.; SIBLY, R. M.; NICHOLS, N. K. Optimal growth strategies when mortality and production rates are size-dependent. **Evolutionary Ecology**, v. 7, n. 6, p. 576–592, 1993.

PICHLER, H. A. et al. Environmental influences on resident and transient fishes across shallow estuarine beaches and tidal flats in a Brazilian World Heritage area. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 164, p. 482–492, out. 2015.

PILLAI, B. R.; DIWAN, A. D. Effects of acute salinity stress on oxygen consumption and ammonia excretion rates of the marine shrimp *Metapenaeus monoceros*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 22, n. 1, p. 45–52, 2002.

PILLER, S. et al. A comparison of the gill physiology of two euryhaline crab species, *Callinectes sapidus* and *Callinectes similis*: energy production, transport-related enzymes and osmoregulation as a function of acclimation salinity. **The Journal of experimental biology**, v. 198, p. 349–58, 1995.

PINSKY, M. L. et al. Greater vulnerability to warming of marine versus terrestrial ectotherms. **Nature**, v. 569, n. 7754, p. 108–111, 24 maio 2019.

PÖRTNER, H.-O. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. **Journal of**

Experimental Biology, v. 213, n. 6, p. 881–893, 15 mar. 2010.

PÖRTNER, H.-O.; BOCK, C.; MARK, F. C. Oxygen- and capacity-limited thermal tolerance: bridging ecology and physiology. **The Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 15, p. 2685–2696, 1 ago. 2017.

PÖRTNER, H. O. Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. **Die Naturwissenschaften**, v. 88, n. 4, p. 137–46, 8 abr. 2001.

PORTNER, H. O.; KNUST, R. Climate Change Affects Marine Fishes Through the Oxygen Limitation of Thermal Tolerance. **Science**, v. 315, n. 5808, p. 95–97, 5 jan. 2007.

PRENTER, J. et al. Lethal and sublethal toxicity of ammonia to native, invasive, and parasitised freshwater amphipods. **Water Research**, v. 38, n. 12, p. 2847–2850, jul. 2004.

QUEIROZ, G. M. N. et al. Caracterização da ictiofauna demersal de duas áreas do complexo estuarino de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Biociências**, v. 14, n. 2, p. 112–124, 2006.

RAHEL, F. J.; OLDEN, J. D. Assessing the effects of climate change on aquatic invasive species. **Conservation Biology**, v. 22, n. 3, p. 521–533, 2008.

RAMAGLIA, A. C.; DE CASTRO, L. M.; AUGUSTO, A. Effects of ocean acidification and salinity variations on the physiology of osmoregulating and osmoconforming crustaceans. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 188, n. 5, p. 729–738, 11 set. 2018.

REID, P. C. et al. A biological consequence of reducing Arctic ice cover: arrival of the Pacific diatom *Neodenticula seminae* in the North Atlantic for the first time in 800 000 years. **Global Change Biology**, v. 13, n. 9, p. 1910–1921, set. 2007.

RIVERA-INGRAHAM, G. A.; LIGNOT, J.-H. Osmoregulation, bioenergetics and oxidative stress in coastal marine invertebrates: raising the questions for future research. **The Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 10, p. 1749–1760, 15 maio 2017.

ROMANO, N.; ZENG, C. Toxic Effects of Ammonia, Nitrite, and Nitrate to Decapod Crustaceans: A Review on Factors Influencing their Toxicity, Physiological Consequences, and Coping Mechanisms. **Reviews in Fisheries Science**, v. 21, n. 1, p. 1–21, jan. 2013.

ROME, M. S. et al. Linking temperature and salinity tolerance to winter mortality of Chesapeake Bay blue crabs (*Callinectes sapidus*). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 319, n. 1–2, p. 129–145, 1 jun. 2005.

ROS, M. et al. Environmental stress responses in sympatric congeneric crustaceans: Explaining and predicting the context-dependencies of invader impacts. **Marine Pollution Bulletin**, v. 170, p. 112621, set. 2021.

SANT'ANNA, B. 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**, v. 7, n. 3, p. 347–356, 2012.

SANT'ANNA, B. S. et al. Diet and population biology of the invasive crab *Charybdis hellerii* in southwestern Atlantic waters. **Marine Biology Research**, v. 11, n. 8, p. 814–823, 14 set. 2015.

SETIARTO, A. et al. Short-term responses of adult kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* (Bate) to environmental salinity: osmotic regulation, oxygen consumption and ammonia excretion. **Aquaculture Research**, v. 35, n. 7, p. 669–677, jun. 2004.

SEVERINO-RODRIGUES, E. et al. Diversity and biology of species of Portunidae (Decapoda, Brachyura) in the estuarine-lagunar complex of Iguape, Ilha Comprida and Cananéia, São Paulo, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 1, p. 47–60, 2009.

SHEN, C. et al. Comparative transcriptome analysis of the gills of *Procambarus clarkii* provide novel insights into the response mechanism of ammonia stress tolerance. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 3, p. 2611–2618, 3 mar. 2021.

SHERWOOD, L.; KLANDORF, H.; YANCEY, P. **Animal Physiology: From Genes to Organisms**. 2° ed. Belmont, USA: Brooks/Cole, 2013.

SMALL, D. et al. Impact of medium-term exposure to CO2 enriched seawater on the physiological functions of the velvet swimming crab *Necora puber*. **Aquatic Biology**,

v. 10, n. 1, p. 11–21, 22 jun. 2010.

SOKOLOVA, I. M. et al. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. **Marine Environmental Research**, v. 79, p. 1–15, ago. 2012.

SOKOLOVA, I. M. Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. **Integrative and Comparative Biology**, v. 53, n. 4, p. 597–608, 2013.

SOMERO, G. Comparative physiology: a “crystal ball” for predicting consequences of global change. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, n. 1, p. R1–R14, jul. 2011.

SOMERO, G. N. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine ‘winners’ and ‘losers’. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p. 912–920, 15 mar. 2010.

SPICER, J. I.; RAFFO, A.; WIDDICOMBE, S. Influence of CO2-related seawater acidification on extracellular acid–base balance in the velvet swimming crab *Necora puber*. **Marine Biology**, v. 151, n. 3, p. 1117–1125, 6 maio 2007.

SPITZNER, F. et al. Unmasking intraspecific variation in offspring responses to multiple environmental drivers. **Marine Biology**, v. 166, n. 8, p. 112, 25 ago. 2019.

STILLMAN, J. H. Heat waves, the new normal: Summertime temperature extremes will impact animals, ecosystems, and human communities. **Physiology**, v. 34, n. 2, p. 86–100, 2019.

STILLMAN, J. H.; SOMERO, G. N. A Comparative Analysis of the Upper Thermal Tolerance Limits of Eastern Pacific Porcelain Crabs, Genus *Petrolisthes* : Influences of Latitude, Vertical Zonation, Acclimation, and Phylogeny. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 73, n. 2, p. 200–208, mar. 2000.

STREFEZZA, T. F.; DE ANDRADE, I. M.; AUGUSTO, A. Reduced pH and elevated salinities affect the physiology of intertidal crab *Minuca mordax* (Crustacea, Decapoda). **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 52, n. 5, p. 241–254, 2019.

TOMANEK, L. The Importance of Physiological Limits in Determining Biogeographical Range Shifts due to Global Climate Change: The Heat-Shock Response. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 81, n. 6, p. 709–717, nov. 2008.

TORRES, G. et al. Physiological basis of interactive responses to temperature and salinity in coastal marine invertebrate: Implications for responses to warming. **Ecology and Evolution**, v. 11, n. 11, p. 7042–7056, jun. 2021.

TRUCHOT, J. P. Lactate increases the oxygen affinity of crab hemocyanin. **Journal of Experimental Zoology**, v. 214, n. 2, p. 205–208, nov. 1980.

UBALDO, J. P.; FREDERICK, A.; DANILO, T. Temperature tolerance of some species of Philippine intertidal echinoderms. **Philippine Scientist**, v. 44, p. 105-119, 2007.

UMMENHOFER, C. C.; MEEHL, G. A. Extreme weather and climate events with ecological relevance: a review. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1723, p. 20160135, 19 jun. 2017.

URBINA, M. et al. Physiological energetics of the estuarine crab *Hemigrapsus crenulatus* (Crustacea: Decapoda: Varunidae): responses to different salinity levels. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 90, n. 2, p. 267–273, 14 mar. 2010.

VACCHI, M. et al. Temperature changes and warm-water species in the Ligurian Sea: the case of the ornate wrasse *Thalassoma pavo* (Linnaeus, 1758). **Archo Oceanography and Limnology**, v. 22, p. 149–154, 2001.

VALIELA, I. et al. Increased rainfall remarkably freshens estuarine and coastal waters on the Pacific coast of Panama: Magnitude and likely effects on upwelling and nutrient supply. **Global and Planetary Change**, v. 92–93, p. 130–137, 2012.

VERBERK, W. C. E. P. et al. Can respiratory physiology predict thermal niches? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1365, n. 1, p. 73–88, 2016a.

VERBERK, W. C. E. P. et al. Does oxygen limit thermal tolerance in arthropods? A critical review of current evidence. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology**, v. 192, p. 64–78, 2016b.

VINAGRE, C. et al. Ecological traps in shallow coastal waters-Potential effect of heat-waves in tropical and temperate organisms. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–17, 2018.

ZUUR, A. F. et al. **Mixed effects models and extensions in ecology with R**. New York: Springer, 2009.

WACKER, A.; HARZSCH, S. Crustaceans in a changing world. **Zoology**, v. 146, n. March, p. 125921, 2021.

WALTHER, G.-R. et al. Alien species in a warmer world: risks and opportunities. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 24, n. 12, p. 686–693, dez. 2009.

WATANABE, S. et al. Short-Term Responses of the Adults of the Common Japanese Intertidal Crab, *Hemigrapsus Takanoi* (Decapoda: Brachyura: Grapsoidea) at Different Salinities: Osmoregulation, Oxygen Consumption, and Ammonia Excretion. **Journal of Crustacean Biology**, v. 29, n. 2, p. 269–272, 1 jan. 2009.

WATANABE, T. T. et al. Population biology and distribution of the portunid crab *Callinectes ornatus* (Decapoda: Brachyura) in an estuary-bay complex of southern Brazil. **Zoologia (Curitiba)**, v. 31, n. 4, p. 329–336, ago. 2014.

WATT, A. J. .; WHITELEY, N. .; TAYLOR, E. . An in situ study of respiratory variables in three British sublittoral crabs with different routine rates of activity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 239, n. 1, p. 1–21, jun. 1999.

WEATHERDON, L. V. et al. Observed and projected impacts of climate change on marine fisheries, aquaculture, coastal tourism, and human health: An update. **Frontiers in Marine Science**, v. 3, n. APR, 2016.

WEBER, R. E.; SPAARGAREN, D. H. On the influence of temperature on the osmoregulation of *Crangon crangon* and its significance under estuarine conditions. **Netherlands Journal of Sea Research**, v. 5, n. 1, p. 108–120, nov. 1970.

WEIHRAUCH, D. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 26, p. 4491–4504, 15 dez. 2004.

WHITELEY, N. Physiological and ecological responses of crustaceans to ocean acidification. **Marine Ecology Progress Series**, v. 430, p. 257–271, 26 maio 2011.

WHITELEY, N. M. et al. Effects of water salinity on acid-base balance in decapod crustaceans. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, n. 5, p. 1003–1011, 2001.

WHITELEY, N. M. et al. Sensitivity to near-future CO 2 conditions in marine crabs depends on their compensatory capacities for salinity change. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

WHITELEY, N. M.; TAYLOR, E. W. Oxygen and Acid-Base Disturbances in the Hemolymph of the Lobster *Homarus Gammarus* During Commercial Transport and Storage. **Journal of Crustacean Biology**, v. 12, n. 1, p. 19–30, 1 jan. 1992.

WILLIAMS, C. M. et al. Biological Impacts of Thermal Extremes: Mechanisms and Costs of Functional Responses Matter. **Integrative and Comparative Biology**, v. 56, n. 1, p. 73–84, jul. 2016.

WOODIN, S. A. et al. Climate change, species distribution models, and physiological performance metrics: predicting when biogeographic models are likely to fail. **Ecology and Evolution**, v. 3, n. 10, p. n/a-n/a, ago. 2013.