UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

“Ritmicidade da emissão de propágulos em *Chthamalus bisinuatus*
(Pilsbry, 1916): componentes endógenas e exógenas.”

Paula Kasten

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte
das exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: Biologia Comparada

RIBEIRÃO PRETO - SP

2011

VERSÃO CORRIGIDA

“Ritmicidade da emissão de propágulos em *Chthamalus bisinuatus*
(Pilsbry, 1916): componentes endógenas e exógenas.”

Paula Kasten

Orientador: Prof. Dr. Augusto Alberto Valero Flores

Versão corrigida da dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada

RIBEIRÃO PRETO - SP

2011

Kasten, Paula

Ritmicidade da emissão de propágulos em *Chthamalus bisinuatus* (Pilsbry, 1916): componentes endógenas e exógenas.

Nº p.60 : il.;30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de concentração: Biologia Comparada.

Orientador: Flores, Augusto Alberto Valero

1.*Chthamalus bisinuatus* 2.emissão larval 3.muda
4.ritmos endógenos 5. ritmos de emissão

FOLHA DE APROVAÇÃO

Paula Kasten

“Ritmicidade da emissão de propágulos em *Chthamalus bisinuatus*
(Pilsbry, 1916): componentes endógenas e exógenas”

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte
das exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: Biologia Comparada

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura : _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura : _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura : _____

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar meu orientador, Prof. Dr. Augusto A. V. Flores por ter me recebido em seu laboratório e por ter depositado em mim confiança para desenvolver meu mestrado sob sua orientação. Foram ao total dois anos e meio de convivência e muito aprendizado, e sua ajuda foi indispensável no meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço em especial minha família, por sempre terem apoiado minhas decisões e atitudes, tenham elas sido as profissionais ou pessoais. Sem esse apoio não teria sido possível minha ida a São Sebastião, entrar no CEBIMar e desenvolver meu mestrado longe de casa. Graças a eles pude realizar meu sonho de morar e trabalhar na praia!

À Prof^a. Dr^a. Miriam D. Marques por sugestões importantes ao delinear os experimentos de laboratório, especialmente pela idéia testar o efeito combinado de pares de variáveis na sincronização de atividade das cracas, e não somente o efeito das mesmas isoladamente.

Aos funcionários todos do CEBIMar: ao pessoal da administração por sempre me auxiliarem nas questões burocráticas e administrativas; ao pessoal da cozinha, por sempre fazer do almoço meu momento favorito do dia e sempre nos receberem com um sorriso no rosto; ao pessoal da manutenção, que me ajudou a montar os experimentos em laboratório; ao pessoal da biblioteca, pela ajuda em localizar artigos e citações impossíveis de se achar e sempre propiciar um ambiente agradável para os estudos. Em especial agradeço os técnicos do CEBIMar: “Seu” Elso, Joseph, Joséilto e Edu que sempre me substituíram na função “babá” de cracas quando precisei, e por me ajudar a pensar e desenvolver todas as “parafernalias” necessárias para manter os experimentos funcionando e por sempre tornarem nosso trabalho mais simples e agradável!

Aos amigos de república (que foram tantos): Mariana Capparelli, Andréia Barbosa, Laura Branco, Maysa Ito, Danilo Vieira, Pedro Guerra, Rafael Duarte, Bruno Sayão, Amanda Teixeira e “Jajá” Jandyr por sempre me incentivarem e não me deixar desanimar frente os obstáculos do mestrado, por me acompanharem madrugada adentro durante os experimentos e por fazerem da vida em São Sebastião uma das melhores fases da minha vida. Mais um obrigada em especial para aqueles que, além de amigos, foram indispensáveis para a execução dos experimentos enquanto foram técnicos de laboratório: Ana Carolina Mazzuco, Ludmila Ciolfi, Maysa Ito, Pedro Guerra e Rafael Duarte. Sem a ajuda de vocês com certeza estaria até agora contando náuplios!

Aos pesquisadores e colegas do Cebimar Ronaldo Christofolletti, Soledad López, Karin Hoch Fehlauer Ale, Ezequiel Ale, Fabiane Galucci, Damián Mizrahi, Gustavo Fonseca e Prof^a. Áurea Ciotti pelo conselhos, dicas e sugestões dadas em relação ao trabalho em si, apresentações e à vida acadêmica.

E por fim agradeço à CAPES e CNPq pela concessão de bolsa nos primeiros meses de mestrado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado (Processo #2009/12645-0) e pelo auxílio de pesquisa (#2008/10085-5) concedidos.

RESUMO

A sincronização reprodutiva em invertebrados marinhos é comum, e organismos do entremarés se valem de pistas exógenas, como os ciclos ambientais gerados pelos movimentos da Terra e da Lua, na sincronização de uma componente endógena que colocará em fase pelo menos uma etapa do ciclo reprodutivo. Em estudos anteriores com cracas, notou-se uma clara relação entre emissão larval e elevada produção fitoplanctônica, enquanto outros apontam uma estrita relação com os regimes de maré e fases da lua. Neste projeto pretendeu-se detectar as variáveis ambientais associadas à ritmicidade da emissão naupliar na craca *Chthamalus bisinuatus* em condições constantes de laboratório, permitindo, então, a detecção de uma componente endógena associada a tal atividade e acompanhar a mesma atividade em campo, podendo associar quais condições ambientais em tempo real influenciam essa etapa do ciclo reprodutivo. Para esses objetivos, populações foram submetidas a testes em condições constantes de laboratório, sendo as variáveis temperatura, fotoperíodo e tempo de imersão testados isoladamente e conjugados dois a dois. Em campo, populações do cirripédio tiveram monitoradas por um período de 32 dias, durante o qual a atividade de emissão larval, e as variáveis temperatura, fluxo de água e concentração de clorofila-*a* foram medidas a fim de se estabelecer uma relação entre as emissões e tais variáveis. Os resultados indicam a existência de uma componente endógena marcando o ritmo de emissão larval e da atividade de muda sincronizada com o ciclo de amplitude de maré (14.4 dias), bem como um papel relevante da ação sinérgica da oscilação ultradiana da altura da maré e da temperatura como modulador da sincronização de tais atividades. Em campo, os eventos extremos de temperatura, a concentração de clorofila-*a* (um indicador da disponibilidade de alimentos para os adultos) e o fluxo de água atuaram como indutores da emissão larval em um intervalo antecedente de 1 e 6 dias para as duas primeiras variáveis, e um intervalo de 1 a 3 dias posteriores para a última variável, provando, então, serem importantes na determinação do momento da emissão larval. Portanto, se conclui que ritmos endógenos associados à amplitude de maré podem explicar parcialmente o padrão *circa* semilunar centrado nos períodos de quadratura examinados em outras populações, mas, como é mostrado aqui, tal ritmicidade pode ser interrompida por variações de temperatura, disponibilidade de alimento e intenso fluxo de água. Discute-se que o primeiro efeito pode estar relacionado a mecanismos fisiológicos que garantem a reprodução de indivíduos submetidos a maiores riscos de mortalidade, e que a alimentação é um recurso limitante para a reprodução da população estudada. Em uma escala temporal menor, a ritmicidade endógena, sincronizada pela combinação de temperatura e tempo de imersão, favorece a emissão larval em períodos de maré-alta. Na ausência de outros fatores ambientais que controlam a emissão, uma componente endógena permitirá a emissão larval nos momentos de maré-alta dos períodos de quadratura, o que promoveria a retenção na linha de costa e minimizaria o risco de encalhe.

ABSTRACT

Synchronized reproduction is common among marine invertebrates, and intertidal organisms make use of exogenous cues, such as environmental cycles generated by the movements of the Earth and Moon, to synchronize their biological clocks in phase with such oscillations, at least in one stage of the reproductive cycle. In previous reports on barnacle rhythms, some studies have stressed a clear relationship between larval emission and high phytoplankton production, while others indicate a close relationship with the regimes of tide and moon phases. In this project we intended to detect environmental variables associated with the rhythmic larval release activity in the barnacle *Chthamalus bisinuatus*, both in constant laboratory conditions, allowing the detection of an endogenous component associated with such activity, and in the field, by monitoring larval release and other environmental conditions that might influence the reproductive cycle. For such purposes, populations were tested in constant laboratory conditions, where the variables temperature, photoperiod and time of immersion were tested both alone and combined in pairs, and in the field, by monitoring reproductive activity in populations of these cirripedes for 32 days, together with temperature, water flow, and chlorophyll-*a* concentration, as to establish relationships between larval release and these variables. The results indicate the existence of an endogenous component setting the rhythm of emission and larval molt activity synchronized with the cycle of tidal range (14.4 days), and the use of tides and daily fluctuations in temperature as cues in the synchronization of ultradian release activities. In the field, extremes of temperature, peaks of chlorophyll-*a* concentration (a proxy of food availability for adults) and water flow, triggered naupliar release 1 and 6 days ahead, for the first two variables, and 1 and 3 days before for the last one, thus proving to be important variables in determining the time of larval emission. Therefore, it is concluded that endogenous tidal-amplitude rhythms may partly explain sharp fortnight patterns centered at neap-tide periods in populations examined elsewhere, but, as shown herein, such rhythmicity may be disrupted by variations of temperature, food availability and intense water flow. It is argued that the first effect may be related to a physiological mechanism ensuring reproduction in individuals at a higher mortality risk, and that food is a limiting resource for reproduction in the study population. In a shorter time scale, endogenous rhythmicity, entrained by the combined control of temperature and immersion time, favors high-tide larval release. In the absence of other environmental release-inducing factors, endogenous timing would lead to high-tide release during neap periods, which would favor coastal retention and minimize stranding risk.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
OBJETIVOS	13
MATERIAL E MÉTODOS	13
Modelo biológico	14
Procedimentos de campo: obtenção dos organismos	15
Procedimentos gerais de laboratório	15
I. Experimentos em laboratório.....	16
I.I. Testes de variáveis ambientais isoladas.....	17
I.I.a) Fotoperíodo.....	17
I.I.b) Temperatura	17
I.I.c) Tempo de imersão (simulação de maré).....	17
I.I.d) Amplitude de maré	18
I.II. Variáveis ambientais combinadas duas a duas.....	18
I.II.a) Simulação de maré x fotoperíodo	18
I.II. b) Simulação de maré x temperatura.....	19
II. Experimentos em campo: teste de influência de variáveis ambientais em tempo real. ...	19
Análises numéricas e estatísticas.	21
RESULTADOS	24
Experimento I.I.a): fotoperíodo.....	24
Experimento I.I.b): temperatura.	27
Experimento I.I.c): tempo de imersão (simulação de maré).	29
Experimento I.I.d): amplitude de maré	30
Experimento I.II.a): simulação de maré x fotoperíodo	33
Experimento I.II.b)simulação de maré x temperatura.	34
Experimento II: teste de efeitos de variáveis ambientais em tempo real.	39
DISCUSSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

INTRODUÇÃO

A sincronização dos eventos reprodutivos em invertebrados marinhos pode maximizar o sucesso reprodutivo, sendo uma característica comum em diferentes grupos (Menaker, 1971; Burrows et al., 1992; Muthiga, 2006; Hernandez-Olalde et al., 2007), promovida pelo ajuste simultâneo de pelo menos uma etapa do ciclo reprodutivo. É um fenômeno que pode resultar de interações entre conspecíficos, principalmente aquelas mediadas pela liberação de feromônios (Baker e Cardé, 1979; Snell e Morris, 1993; Bartels-Hardege et al., 1996; Watson et al., 2003; Silvegren et al., 2005), mas também ser consequência da sincronização do ciclo reprodutivo por oscilações ambientais, como a variação de temperatura (Neumann e Heimbach, 1984; Conner et al. 1985; Hsiao e Meier, 1992; Yan e Miao, 2004), salinidade (Alon e Stancyk, 1982; Forward et al., 1986; Skadsheim, 1989; Gelin et al., 2001), fotoperíodo (Korringa, 1947; Imai et al., 1950; Menaker, 1971; Bentley et al., 2001) e disponibilidade de alimento (Barnes, 1962; Newell et al., 1982; Starr et al., 1990; Yan e Miao, 2004). Na maioria dos organismos litorâneos, os ciclos ambientais gerados pelos movimentos da Terra e da Lua são particularmente importantes (Korringa, 1947; Ims, 1990; Macho et al., 2005; Morgan et al., 1995; Skov et al., 2005). Tais ciclos apresentam frequência muito variável, incluindo a oscilação sazonal, regulada pela movimentação da Terra ao redor do Sol (365 dias), ciclos de amplitude de maré (14,7 dias), separando marés consecutivas de sizígia ou quadratura, ciclos diários (24 horas), e ciclo de maré (12,4 horas), entre duas fases idênticas e consecutivas (ex. maré baixa, maré alta) (Palmer, 1995).

Os fatores seletivos que sincronizam a reprodução em uma população diferem entre os organismos e os ambientes, e a importância desse sincronismo depende, em grande parte, do modo de desenvolvimento. Existe uma ampla gama de estratégias reprodutivas apresentadas pelos invertebrados, cujas pressões seletivas que as causam podem ser a facilitação da hibridização de ovos (Babcock, 1995) ou da dispersão larval (Saigusa, 1981), a prevenção de encalhamento (Vries e Forward, 1989 e Ehlinger e Tankersley, 2006) ou a promoção da retenção das larvas perto do local de emissão (Basilone et al., 2006). Entretanto, o que mais se discute como sendo a principal pressão seletiva por trás da sincronia no ciclo reprodutivo é a predação, tanto da prole como dos pais (Fortier et al., 1987; Wissel e Brendl, 1988; Morgan e Christy, 1997). A sincronia na reprodução pode minimizar as perdas por predação de duas maneiras; (1) centrando os eventos de emissão de propágulos (gametas, ovos ou larvas) em períodos quando os predadores estão ausentes ou não estão se alimentando (Forward, 1987;

Morgan e Christy 1994), ou (2) liberar simultaneamente um número suficiente de propágulos capaz de saciar os predadores, aumentando, então, a probabilidade de sobrevivência (Hamilton, 1971; Foster e Treherne, 1981). Por exemplo, ciclos mareais, ciclos de amplitude de maré e diários se combinam de tal sorte que várias espécies de crustáceos braquiúros tendem a emitir suas larvas durante períodos noturnos de vazantes, em marés de grande amplitude (Forward, 1987; Morgan & Christy, 1994). Essa resposta promoveria, em tese, o rápido transporte de propágulos para o largo, minimizando a chance de predação perto da costa, onde os potenciais consumidores abundam.

Outras espécies desenvolveram respostas a estímulos externos, presumivelmente numa estratégia para assegurar condições ambientais propícias para o desenvolvimento pelágico da prole. Ouriços-do-mar (*Strongylocentrotus droebachiensis*) e mexilhões (*Mytilus edulis*) desencadeiam a desova a partir da liberação de metabólitos por diversas espécies do fitoplâncton (Starr *et al.*, 1990). Esses autores observaram posteriormente uma clara relação entre emissão larval e elevada produção fitoplanctônica para cracas da espécie *Semibalanus balanoides*. Esta relação entre desova, e/ou emissão larval, e a abundância fitoplanctônica remete à teoria “match-mismatch”, proposta primeiramente por Cushing (1975) para explicar a variação interanual no recrutamento de peixes de interesse econômico. Segundo essa teoria, quedas acentuadas na pesca de várias espécies podem ser devidas à não coincidência entre eventos de produção fitoplanctônica e desova.

Porém, essa relação não se verificou em outras espécies de cracas. Outros estudos apontam uma estrita relação com os regimes de maré e fases da lua (Macho *et al.*, 2005). Os autores estudaram o momento de emissão larval em três diferentes espécies de cracas; *Pollicipes pollicipes*, *Chthamalus* spp e *Ballanus* spp. A emissão larval nesses três grupos de indivíduos não foi ao acaso, mas coincidiu com as fases da lua. *Pollicipes pollicipes* apresentou emissão principal na lua crescente, *Chthamalus* spp nas luas nova e cheia (correspondendo a marés de sizígia) e *Ballanus* spp apresentou emissão mais freqüente nas luas nova e minguante. A maioria das larvas náuplio, nas três espécies, foi emitida durante as marés altas diurnas (Macho *et al.*, 2005). No entanto, o registro dessas fases larvais pode ainda sofrer a influência de seu comportamento na coluna de água, uma vez que apresentam fototactismo positivo e se agregam perto da superfície.

Alternativamente, a emissão larval, em condições naturais, da craca *Chthamalus bisinuatus*, examinada no litoral norte do estado de São Paulo (Bueno, *et al.*, 2010), apresentou maiores freqüências nas menores amplitudes de maré (quadraturas), sem qualquer variação nictemeral ou de acordo com o ciclo de maré (enchente / vazante). Neste estudo não

houve uma influência da concentração de diatomáceas do fitoplâncton na emissão larval, e, possivelmente, a amplitude de maré funciona como uma pista exógena, que arrasta o relógio endógeno do animal (*zeitgeber*), sincronizando a emissão larval ao ciclo de amplitude de maré (Palmer, 1995). Fatores ambientais podem alterar significativamente a intensidade e frequência de diferentes processos fisiológicos em cracas. Por exemplo, a temperatura é uma pista ambiental que induz e aumenta consideravelmente o período de reprodução em cracas de regiões tropicais (Yan e Miao, 2004). No caso do padrão temporal observado para *C. bisinuatus*, seria importante saber se a ritmicidade é promovida realmente por um ritmo endógeno, ou se responde inteiramente ao efeito de variáveis ambientais, uma vez que já foi constatado para outros cirripédios, que a reprodução não é controlada pelas condições ambientais imediatamente predominantes, mas sim por aquelas observadas por longos períodos antecedentes ao evento (Crisp & Clegg, 1960) ou então a combinação de mais de uma variável atuando sobre os organismos (Crisp & Patel, 1969). A sincronização da emissão larval com os ciclos de maré ou ciclos diários está provavelmente associada a oscilações da pressão hidrostática ou à temperatura, que pode ser mais elevada durante marés de quadratura para espécies que vivem nas zonas mais altas do entre marés. Para cracas, não se discute o fotoperíodo como uma variável representativa na sincronização das emissões, pois, mesmo dotadas de células fotorreceptoras nos apêndices torácicos, a luz parece apenas influenciar na atividade cirral desses animais (Gwilliam, 1965 e Gwilliam e Bradbury, 1971).

A sincronização de etapas do ciclo reprodutivo com ciclos ambientais depende da existência de uma componente endógena responsável pela geração de todos os ritmos presentes em um organismo, independentemente da presença de um ciclo ambiental (Naylor, 2005). Tanto os ciclos ambientais abióticos como os bióticos podem ser percebidos pelo por essa componente, acertando sua fase e período. Este processo de sincronização garante que determinadas funções ocorram sempre no mesmo momento ambiental, momento este no qual podem ser reunidas as condições mais favoráveis para a expressão de cada função (Marcus, 1985). Entretanto, a liberação sincrônica de propágulos reprodutivos pode não representar uma vantagem adaptativa face às pressões citadas acima, mas simplesmente refletir as limitações fisiológicas dos organismos.

Os padrões de emissão encontrados no ambiente natural apresentam freqüentemente uma ritmicidade de acordo com os ciclos referidos anteriormente, mas raramente é demonstrada a relação entre os ciclos observados no campo e os ritmos endógenos, que se expressam em cativeiro sob condições constantes. Porém, estabelecer essa relação é de vital importância. Ritmos endógenos tornam o indivíduo, até certo ponto, independente das

flutuações do ambiente, mantendo suas funções vitais. Quando expostos a alterações imprevisíveis, os indivíduos podem, portanto, se ajustar através de mudanças adaptativas, controladas por sistemas *circa* temporais (Palmer, 1991 e 1995). Entender a influência que os fatores ambientais exercem na modulação dos ritmos de emissão de larvas permitirá compreender melhor como populações de invertebrados litorâneos conseguem prevalecer a eventos ambientais extremos ao longo de sua história evolutiva.

OBJETIVOS

Nesta dissertação é testada a base endógena da ritmicidade reprodutiva na craca do entremarés *Chthamalus bisinuatus*, e sua relação com padrões observados no ambiente natural, em localidades com diferentes características, nomeadamente a Baixada Santista (Bueno et al. 2010) e o Canal de São Sebastião (este estudo).

Na primeira parte do estudo, populações de campo foram transferidas para o laboratório para ver se o ritmo de emissão larval semilunar observado em campo por Bueno e colaboradores (2010) pode ser observado em condições de livre-curso. Além desta componente, foi também verificado se é possível sincronizar ritmos associados aos períodos dos ciclos de variação de fotoperíodo (12:12h), temperatura (10:14h) ou de maré (12.4h). Para tal, foram realizadas as manipulações necessárias no laboratório para comparar o comportamento de grupos de cracas, submetidos à oscilação artificial de diferentes parâmetros. Foi examinada a resposta de atividade frente à oscilação de fotoperíodo e temperatura, como possíveis fatores capazes de sincronizar ciclos circadianos, e o resultado da imersão periódica, como indutor de uma variação *circa* mareal. Também foram medidas respostas de populações mantidas sob a ação combinada dessas variáveis, duas a duas, para testar possíveis efeitos sinérgicos entre elas. Em todos os casos, foi medida também a frequência de muda, para entender a relação entre os dois processos.

Na segunda parte, foi obtida uma série diária (32 dias) em condições naturais, complementado o estudo realizado por Bueno e colaboradores (2010), para verificar se os ritmos naturais variam de acordo com as condições ambientais predominantes. Especificamente, no Canal de São Sebastião os ciclos de amplitude de maré podem ser menos perceptíveis para *Chthamalus* devido à maior importância das anomalias causadas pela ação dos ventos. Na série obtida neste estudo, foram ainda monitorados os parâmetros temperatura, fluxo de água e concentração de clorofila-*a* em diferentes populações, separadas por dezenas de metros, para (i) verificar sua influência no padrão temporal geral de emissão larval e (ii) testar se diferenças nesses fatores entre essas populações é suficiente para gerar diferenças na resposta à pequena escala.

Esses resultados permitiram entender melhor o papel relativo do controle endógeno e das respostas adaptativas, frente a estímulos de ordem estocástica, na determinação de padrões naturais de atividade na espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Modelo biológico

No presente estudo, foram analisados os comportamentos de emissão larval e atividade de muda das cracas *Chthamalus bisinuatus* (Pilsbry, 1916) (Figura 1).

Fig 1. Exemplares do modelo biológico utilizado no presente estudo *Chthamalus bisinuatus*. Fonte: <http://cifonauta.cebimar.usp.br>

Esta espécie endêmica do Atlântico Sul está presente desde o litoral do Piauí até a costa Uruguaia. Na região sudeste brasileira está densamente distribuída no mesolitoral superior podendo encobrir todo o substrato (Young, 1993). São organismos hermafroditas, que apresentam fecundação cruzada e interna, fertilizando indivíduos adjacentes por meio de um pênis extensível. Animais com apenas 3 mm de tamanho já são aptos à reprodução e indivíduos com ovos são encontrados ao longo de todo o ano na região Sudeste do Brasil, havendo, aparentemente, uma estação reprodutiva centrada no verão (Gomes, 2007). A fertilização ocorre na cavidade do manto, de onde são emitidos os náuplios. Uma vez no plâncton, as larvas passam por seis estágios de desenvolvimento até sofrer uma muda para cipris, que é o estágio larval capaz de selecionar um substrato adequado para seu assentamento (Anderson, 1994).

Procedimentos de campo: obtenção dos organismos

Para a realização dos experimentos propostos, populações adultas da craca *C. bisinuatus* foram removidas junto a lascas de rocha de costões da região de São Sebastião, litoral Norte do Estado de São Paulo (Figura 2). Tomou-se cuidado para remover lascas de tamanhos similares e com populações homogêneas e semelhantes entre si, com o intuito de padronizar as populações a serem utilizadas nos experimentos.

Fig 2. Mapa de localização do local de estudo.

Procedimentos gerais de laboratório

Todos os procedimentos de laboratório foram executados nas instalações do Centro de Biologia Marinha da USP (CEBIMar), localizado na praia do Cabelo Gordo, município de São Sebastião. As populações foram mantidas em aquários quadrados de vidro com uma saída de escape de água no fundo, e submersas em água marinha corrente, dentro de salas fechadas. A circulação foi promovida por meio de bombas, com captação direta do mar. Instalou-se filtros de 3 μ m na saída para os aquários, evitando a entrada de outros náuplios, predadores, propágulos de algas e sedimentos que poderiam cobrir as rochas. As condições experimentais envolveram o controle da temperatura, fotoperíodo e do tempo de imersão durante os dias de sincronização.

Para o acompanhamento do número de náuplios e exúvias emitidos pelos animais, toda a água dos aquários foi filtrada, sempre no mesmo horário (após a alimentação), utilizando um copo coletor, dotado de uma rede de plâncton de malha de 100 µm e acoplado às saídas de escape dos aquários. Antes de remover o copo coletor, todo o aquário foi esvaziado para evitar perdas de espécimes que eventualmente ficassem perto do fundo, abaixo da altura do dreno. O material retido na rede foi armazenado em frascos contendo álcool 70% até às contagens, realizadas posteriormente sob estereomicroscópio. Após a retirada da amostra, os animais foram alimentados *ad libitum* por ½ hora, sempre no mesmo horário, com plâncton coletado com uma rede de 100 µm na praia do Segredo, adjacente às instalações do CEBIMar. Para a obtenção do alimento, um copo coletor de 12 cm de diâmetro por 15 cm de altura com uma rede de 100 µm em uma das saídas foi arrastado pela superfície da água 10 vezes, concentrando, assim, certa quantidade de plâncton para os organismos em cativeiro. Esse concentrado foi fornecido para os organismos e por ½ hora a água foi mantida em circulação, mas sem coleta do material proveniente do aquário. Após esse período, o aquário foi esvaziado, como dito anteriormente. Para minimizar a influência de variáveis externas no momento de esvaziamento dos aquários, e para evitar que a amostra seguinte se contaminasse com o plâncton introduzido, os animais foram então transferidos para outros aquários de iguais características, previamente preparados. As condições de sincronização permaneceram até que um pico de emissão larval fosse detectado e, logo a seguir, 5 dias de amostragens horárias foram executadas no caso dos experimentos para testar o controle endógeno em atividades de frequência ultra e infradiana.

I. Experimentos em laboratório

I.I. Testes de variáveis ambientais isoladas

Todos os experimentos de laboratório propostos foram realizados nas condições descritas anteriormente, diferenciando somente o fator de variação cíclica que se pretendia testar. Os animais foram mantidos submersos em água marinha corrente, alimentados sempre no mesmo horário. As variáveis que não estavam sendo testadas permaneceram constantes, mantendo a temperatura da sala e da água corrente, quando possível, em torno dos 25°C. Para cada novo experimento executado, novas populações de *C. bisinuatus* foram utilizadas.

I.I.a) Fotoperíodo: neste experimento o fator de variação cíclica testado foi a luz, controlada através de um temporizador, que manteve a iluminação da sala durante a fase de claro por volta dos 500 lux. O procedimento seguiu como descrito acima, sendo que, neste caso, foi aplicada uma variação de 12 h de claro e 12 h de escuro durante o período de sincronização, de maneira inversa à iluminação ambiente. Após este ciclo de estímulos com duração de cinco dias, os animais foram submetidos a condições constantes, por outros 5 dias, mantendo um dos aquários no escuro e outro no claro. As verificações e contagens de náuplios e exúvias seguiram de hora em hora.

I.I.b) Temperatura: uma vez que os resultados do primeiro experimento não foram significativos (ver *Resultados*), optou-se por deixar os organismos em escuro constante a partir deste experimento, a fim de evitar condições não permissivas para os mesmos, uma vez que já foi constatado, para outras espécies de cirripédios, que a luz constante pode alterar os ciclos reprodutivos (Crisp & Patel, 1969). A temperatura do ambiente foi controlada utilizando o ar condicionado existente na sala em uso. Uma vez que a utilização apenas do ar condicionado não foi suficiente para manter as temperaturas desejadas nos aquários, foi necessária a utilização de uma caixa de água reserva, com capacidade de 50 l, para o aquecimento da mesma, sendo que nesta a temperatura da água foi mantida constante por meio de um termostato acoplado a um aquecedor. Inicialmente, as populações foram submetidas a um ciclo de 14:10 h de variação da temperatura, nomeadamente 14 h a 21°C e 10 h a 27°C. Nesse período de sincronização, variações nos ajustes da climatização da sala e da caixa reservatório foram suficientes para gerar um sinal amplo de variação térmica. Quando se notou o início de um pico de emissão, as populações voltaram a ser submetidas a condições constantes (temperatura de 25°C), permitindo uma condição de livre-curso. Nessa fase, foi usado tanto o ar condicionado como o termostato para manter a temperatura o mais constante possível. A atividade de emissão foi registrada de hora em hora por cinco dias consecutivos.

I.I.c) Tempo de imersão (simulação de maré): mais uma vez o procedimento foi idêntico, exceto que neste caso foi aplicado um estímulo simulando a maré. Durante o período de sincronização, os aquários foram preenchidos com água por 30 min a cada 12,4 h, intervalo de tempo entre duas marés altas na nossa região, proporcionando, então, uma simulação de marés diárias. As verificações e contagens de náuplios e exúvias seguiram o mesmo protocolo citado anteriormente. O controle do tempo de imersão e do intervalo entre esses períodos foi

realizado utilizando uma bomba de aquário externa alocada em uma caixa com capacidade de armazenamento de 50 l, ligada a um temporizador, que fez a bomba funcionar em um intervalo de 12 h 20 min, aproximadamente. Neste caso, os animais foram mantidos em um recipiente de plástico, e uma mangueira foi instalada como dreno, esvaziando o recipiente assim que o nível de água ultrapassasse a altura da mesma e fazendo com que a água corresse por um copo coletor (Figura 3).

Fig. 3: Foto ilustrativa da montagem do experimento para testar a sincronização das atividades de acordo com o ciclo de maré: a) caixa reservatório com termostato e a bomba de aquário; b) recipiente de plástico contendo a população de *C. bisinuatus*; c) copo coletor.

I.I.d) Amplitude de maré: neste teste, uma população de cracas foi mantida em condições constantes de temperatura, fotoperíodo e imersão ao longo de 60 dias, com o intuito de detectar possíveis ritmos endógenos *circa* semilunares de emissão trazidos do campo. Esperava-se encontrar uma periodicidade em torno de 14 dias para esse experimento, equivalendo às fases da lua que atuam nas marés de sizígia e quadratura. Os procedimentos para alimentação foram feitos como nos experimentos anteriores.

I.II. Variáveis ambientais combinadas duas a duas

I.II.a) Simulação de maré x fotoperíodo: os procedimentos adotados neste experimento foram iguais aos anteriores, sendo que a única diferença foi a aplicação de dois estímulos concomitantes durante o período de sincronização, nomeadamente a simulação de maré (inundação a cada 12,4 h) e ciclo de fotoperíodo (12 h claro e 12 h escuro). Como

anteriormente, esperou-se a detecção de um pico de emissão larval, a partir do qual os animais passaram a permanecer nas mesmas condições constantes anteriores por cinco dias consecutivos, durante os quais as amostras horárias foram retiradas.

I.II. b) Simulação de maré x temperatura: neste experimento, os estímulos aplicados foram a simulação de maré e variação de temperatura da água e do ar (10 h a 27°C e 14 h a 21°C).

II. Experimentos em campo: teste de influência de variáveis ambientais em tempo real

Seis áreas nos arredores do CEBIMar foram escolhidas de forma que houvesse uma intercalação entre paredes com sombreamento e sem sombreamento para futuras comparações nas atividades de emissão larval dos animais nessas diferentes condições (Figura 4).

Fig. 4. Mapa ilustrando a região de estudo. Os números indicam as áreas de amostragem. Os pontos 1 e 2 são paredes distintas, embora muito próximas.

Armadilhas de emissão larval (Figura 5) (Bueno & Flores, 2008) e registradores contínuos de temperatura, programados para marcar a temperatura local a intervalos de 10 minutos, foram instalados em seis diferentes áreas da região alta do mesolitoral, na faixa onde se localizam as cracas em questão. Realizaram-se perfurações necessárias para criar 10 possíveis posições de amostragens, a fim de minimizar o estresse provocado nos animais. As

armadilhas foram re-aloçadas diariamente sempre na baixa-mar, de modo aleatório, em blocos dentro de cada área, de forma que uma mesma posição foi amostrada uma vez dentro de um período de 10 dias. O conteúdo recolhido das armadilhas foi fixado em álcool 70% e as larvas emitidas foram contadas sob estereomicroscópio em laboratório.

Fig. 5. Armadilha de emissão utilizada na captura de náuplios e exúvias em campo.

A quantidade de alimento disponível para a população adulta pode ser considerado um fator que possivelmente influencia na emissão larval. Assim a concentração de clorofila-*a* na água foi utilizada como um parâmetro da disponibilidade de alimento. Tais valores foram determinados através da coleta diária de 2 litros de água do mar nas redondezas dos locais de amostragens, sendo cada litro obtido em um ponto distinto, totalizando dois replicados. Após um período máximo de 1 hora seguida da coleta, filtrou-se 500 ml de água para cada amostra, com o auxílio de um kit para filtração a vácuo Metallum, e filtros em microfibras de vidro de 25 µm Whatman® GF/F. Esses filtros foram armazenados em frascos contendo 5 ml de uma mistura previamente resfriada (-10°C) de acetona 90% e óxido de dimetil sulfato (6 : 4 em volume; Shoaf e Lium, 1976), por pelo menos 24 horas em freezer e ao abrigo da luz. Após esse período, as amostras foram levadas à temperatura ambiente, sempre protegidas da luz, e a fluorescência dos extratos foi quantificada em um fluorímetro Turner Designs® modelo AquaFluor™ Handheld, correspondendo à metodologia 445 do EPA (*US Environmental Protection Agency*) (Arar e Collins, 1997).

Estimou-se também o fluxo de água em cada área, através da taxa de desgaste de cilindros de gesso aparafusados à rocha, com 4 cm de diâmetro e 6 cm de altura (Figura 6). Os cilindros foram recobertos

Fig. 6. Gesso utilizado para estimar o fluxo de água.

com verniz, à exceção da extremidade superior, permitindo desta maneira somente o desgaste de cima para baixo, aproximadamente a uma taxa constante durante o tempo de imersão. Dois cilindros (replicados) foram alocados nas extremidades das áreas de coleta, sendo substituídos diariamente. Os mesmos foram pesados antes da exposição e após sua remoção da área de amostragem e permanência em estufa por 72 horas a 80°C. A diferença do desgaste, em massa (g), dos cilindros de cada localidade foi calculada, computando apenas o tempo de imersão dos mesmos, fornecendo uma estimativa indireta do fluxo (f) de água no período:

(1)

$$f = d - t_e$$

Onde d é a média do desgaste do gesso e t_e é o tempo relativo de exposição, variando entre zero (imersão constante) e 0,95 (maior período de submersão). O tempo de submersão foi estimado a partir dos dados de maré fornecidos por um marégrafo instalado na área adjacente aos pontos de coleta, levando em consideração a medida da altura onde se encontra o povoamento de *C. bisinuatus* em cada área de estudo (relativo à altura da maré 0,0 m).

O fluxo de clorofila-*a* foi estimado através da multiplicação das estimativas de fluxo de água e concentração de clorofila-*a*.

Análises numéricas e estatísticas

Todas as séries obtidas nos experimentos em laboratório foram submetidas a análises de autocorrelação, combinadas à análise espectral, para verificar a ocorrência de componentes periódicas. Períodos em torno de 14 dias, 24 e 12 horas seriam esperados para ritmos de atividade regidos por ciclos semilunares (ou de amplitude de maré), diários e ciclos de maré, respectivamente.

A análise de autocorrelação serviu para verificar a existência de periodicidade significativa nas séries. Picos de autocorrelação, excedendo intervalos de confiança a 95%, seriam registrados no caso de periodicidade significativa. Uma vez que estes testes de significância estatística consideram uma série de ruído branco, o erro padrão utilizado é $\pm 2/\sqrt{N}$, no qual N é número amostral. Porém, séries com componentes periódicos não cumprem essa premissa por definição, pelo que se fez necessário combinar esta análise paramétrica com resultados de análise espectral. Sendo assim, somente foram considerados períodos significativos aqueles que (1) após terem sido submetidos à uma análise espectral e a construção de um periódograma apresentaram picos que ultrapassaram o limite de confiança

(Rayner 1971), e (2) coincidiram com picos de autocorrelação que excedam intervalos de confiança. Quando necessário, os números de propágulos emitidos foram logaritimizadas ($\log X + 1$).

Já as séries temporais obtidas no experimento de campo foram correlacionadas duas a duas para detectar possíveis relações entre as variáveis consideradas. Para tal, foi necessário corrigir os graus de liberdade com o intuito de se obter a estimativa de erro estatístico do tipo I, ao invés de proceder ao ajuste de modelos autoregressivos integrados e médias móveis (ARIMA) para obtenção de séries de ruído branco, como proposto por Pyper e Peterman (1998). Examinaram-se as correlações entre emissão larval e as variáveis que possivelmente apresentam um papel no estímulo de tal atividade, nomeadamente as temperaturas médias diárias, percentis de 97,5 diários de temperatura (temperaturas extremas), fluxo de água, disponibilidade de alimento (concentração de clorofila-*a*) e fluxo de clorofila-*a*. Todas as correlações foram testadas a diferentes defasagens (0 a 15 dias).

Para as correlações que apresentaram significância estatística preliminar ($p < 0.05$), a correção dos graus de liberdade (N^*) foi calculada de acordo com a seguinte expressão:

(2)

$$\frac{1}{N^*} \approx \frac{1}{N} + \frac{2}{N} \sum_{j=1}^{\infty} \frac{(N-j)}{N} \rho_{xx}(j) \rho_{yy}(j)$$

Onde N é o tamanho da amostra e $\rho_{xx}(j)$ e $\rho_{yy}(j)$ são as autocorrelações de X e Y a uma defasagem j (Pyper & Peterman, 1998). Após a obtenção do número de graus de liberdade corrigido, o grau de significância da correlação (p) foi recalculado. De acordo com a orientação dos autores, os valores de autocorrelação foram corrigidos utilizando a correção de Chatfield (1989):

(3)

$$r_{xx}(j) = \frac{N}{N-j} \times \frac{\sum_{t=1}^{N-j} (X_t - \bar{X})(X_{t+j} - \bar{X})}{\sum_{t=1}^N (X_t - \bar{X})^2}$$

Para testar os padrões espaciais, os pontos de amostragem foram primeiramente classificados entre locais sujeitos a valores altos e baixos de temperatura e clorofila-*a*. No caso da temperatura, foi escolhido um valor diário extremo (percentil 97,5). Foram elaboradas curvas de frequência acumulada desses parâmetros para cada ponto, utilizando todos os valores diários possíveis, sendo que os locais puderam ser distinguidos a partir do acúmulo de 90% das observações. Uma vez agrupados os pontos nessas classificações, as populações

foram examinadas quanto ao seu comportamento frente aos pulsos de variação ambiental. Uma vez que tanto a temperatura quanto a clorofila-*a* mediarão o padrão temporal geral de emissão, com tempo de defasagem distinto, e que as populações responderam de maneira aproximadamente sincrônica (± 1 dia), foi calculada a variação da atividade de emissão, subtraindo a taxa de emissão no dia de pico, da taxa registrada dias atrás, quando do estímulo ambiental que desencadeou a resposta. Essa diferença foi dividida pela média de emissão em cada local, uma vez que houve diferenças substanciais quanto ao rendimento reprodutivo em cada área. Dessa maneira, foi obtida uma medida de resposta-padrão para todos os eventos de emissão em cada população, sendo estes eventos considerados como acontecimentos independentes. Os dados foram analisados usando um modelo específico de análise de variância no qual ‘locais’ (pontos), quentes e frios, foram níveis aninhados em condições contrastantes (dois níveis, alto e baixo) de ‘temperatura’ e ‘clorofila-*a*’. Análises separadas, porém equivalente, foram realizadas para cada parâmetro. O número de replicados correspondeu ao número de eventos de emissão registrados.

RESULTADOS

Experimento I.I.a): fotoperíodo.

Após um período de 5 dias de sincronização, as populações do cirripédio foram mantidas em condições constantes, permitindo que possíveis ritmos se expressassem em livre curso. Foi possível observar uma taxa de emissão de náuplios e exúvias decrescente ao longo dos 5 dias consecutivos, em ambos os aquários (Figuras 7 e 8).

Fig. 7. Efeito da exposição a ciclos claro e escuro (12 h: 12 h) na taxa horária de emissão de náuplios e muda, durante a fase de sincronização e livre curso em condições de claro constante.

Fig. 8. Efeito da exposição a ciclos de claro e escuro (12 h: 12 h) na taxa horária de emissão de náuplios e muda, durante a fase de sincronização e livre-curso em condições de escuro constante.

É importante ressaltar que as contagens de náuplios e exúvias no primeiro horário em livre curso apresentam números mais elevados que os demais pelo fato de estarem sendo contabilizadas, também, possíveis emissões que ocorreram anteriormente ao início da amostragem horária. Também que, durante a fase de sincronização, o acompanhamento das emissões foi diário, sendo os valores apresentados nas figuras 7 e 8 para esse período o resultado da contagem diária total dividido por 24, obtendo assim, valores médios horários para cada dia de arrastamento. O mesmo se procede para os demais experimentos e seus resultados.

Ao se aplicar o teste de autocorrelação com toda a série de emissão, tanto de náuplios, quanto de exúvias, para os dois tratamentos, nenhum pico que ultrapassasse o intervalo de confiança foi detectado ($p > 0,05$). Como é possível observar, as primeiras 36 horas de amostragem foram contrastantes do restante da série. Provavelmente esse foi um resultado direto da manipulação das lascas de rochas onde estavam os organismos, o que poderia ter estimulado a elevada emissão de náuplios e exúvias observada. Por isso, em um primeiro momento, as primeiras 48 horas foram excluídas da análise de autocorrelação e os valores absolutos de emissão foram transformados ($\text{Log } X+1$). Nenhum pico significativo foi observado (defasagem de 12 horas, $p > 0,05$). Em um segundo momento, apenas essas primeiras 48 horas foram submetidas à análise de autocorrelação (defasagem de 6 horas), com o intuito de averiguar se esse primeiro momento, contrastantes com o restante da emissão,

poderia apresentar um sinal de ritmicidade endógena que não se manteve nos organismos. Mais uma vez, o resultado não foi significativo ($p > 0,05$).

Apesar de não ser evidente nenhum ritmo de emissão que pudesse ter sido arrastado pelo ciclo de fotoperíodo, um teste qui-quadrado foi aplicado às séries com o intuito de averiguar se existiram desvios com relação à algum período de predominância dos eventos, claro ou escuro esperado. Mais uma vez não foram observadas diferenças estatísticas ($\chi^2_{\text{claro}} = 3,73$; $\chi^2_{\text{escuro}} = 0,46$; $p > 0,05$). É importante ressaltar, também, que um período de apenas 5 dias para sincronizar um ritmo circadiano de emissão larval associado à um ciclo de claro / escuro oposto ao do ambiente pode ter sido insuficiente para que as componentes endógenas de fato percebem tais estímulos e tivessem suas fases sincronizadas com esse novo ambiente. Logo, a fase de sincronização nesse experimento apresentou limitações, o que possivelmente influenciou nos resultados obtidos.

Experimento I.I.b): temperatura.

Seguindo o mesmo princípio do experimento anterior, após os 10 dias de sincronização, os animais foram mantidos por 5 dias adicionais em condições constantes. Para obter um acompanhamento mais rígido da temperatura da água nos dias em livre curso, registradores contínuos foram alocados nos aquários com os animais. As séries de temperatura estão representadas na Figura 9.

Fig. 9. Série temporal de temperatura da água obtida através dos dados do registrador contínuo alocado no aquário contendo a população de *C. bisinuatus*, por 15 dias no total.

É possível observar que a temperatura variou ao longo dos dias entre temperaturas mais elevadas e mais baixas durante a fase de sincronização, porém não foi possível manter uma constância nessa variação, uma vez que a água permaneceu corrente desde a caixa reservatório onde se encontrava o termostato até o aquário onde se encontrava os organismos. A temperatura máxima e mínima alcançadas durante essa primeira fase do experimento foi de 27,45°C e 18,41°C, respectivamente. Durante os 5 dias de amostragem horárias em condições de livre curso, a temperatura não se manteve perfeitamente constante como desejável, porém apresentou uma média próxima da pretendida, de 25,23°C, variando em limites aceitáveis ($\pm 1,22^\circ\text{C}$ de desvio padrão), se comparado com a fase de sincronização antecedente (Fig. 9).

Após a finalização do experimento a seguinte série de emissão de propágulos foi obtida (Figura 10):

Fig.10. Efeito da exposição a ciclos de temperatura (10 h: 14 h, 27°C: 21°C) na taxa horária de emissão de náuplios e muda, durante as fases de sincroniza e livre-curso em condições de escuro constante.

Mesmo com a constante emissão de náuplios, não foi possível detectar nenhuma ritmicidade, após a aplicação dos testes estatísticos, que se aproximasse do período de variação de temperatura aplicada durante o período de arrastamento, ou seja, próximos de 10 ou 14 horas ($p > 0,05$). O mesmo se obteve para as series de emissão de exúvias. Conclui-se, portanto, que novamente não foi possível sincronizar um ritmo de emissão influenciado por variações cíclicas de temperatura nesses organismos.

Experimento I.I.c): tempo de imersão (simulação de maré).

Da mesma forma como foi procedido nos experimentos anteriores, após um período de 46 dias de sincronização com simulação de maré, ou seja, inundação do recipiente com os organismos a cada 12,4 h, os animais foram mantidos em escuro constante e com temperatura da água sempre a 25°C por mais 5 dias, e a seguinte série de emissão de propágulos foi obtida (Figura 11):

Fig. 11. Efeito da exposição a ciclos inundação a cada 12.4 h na taxa horária de emissão de náuplios e muda, durante as fases de sincronização e livre-curso em condições de escuro constante.

Novamente observou-se uma diferença contrastante entre o número de náuplios emitidos nas primeiras 48 horas de amostragens. Assim como nos experimentos anteriores, não se constatou nenhum pico de correlação que ultrapassasse o intervalo de confiança, mesmo após a remoção das 48 primeiras horas, a logaritimização dos valores ($\log X + 1$) (defasagem de 12 horas $p > 0,05$), ou a análise dessas primeiras 48 horas apenas (defasagem de 6 horas, $p > 0,05$), indicando que este estímulo não arrastou nenhum ritmo de emissão nestes animais. O mesmo se passou para as séries de emissão das exúvias.

Experimento I.I.d): amplitude de maré.

Ao longo de 60 dias uma pequena população foi mantida em condições constantes de temperatura, luz, inundação (sempre submersa), resultando na seguinte série, em livre curso, de emissão naupliar e de exúvias (Figura 12):

Fig. 12. Série de emissão larval e de exúvias ao longo de 60 dias consecutivos em condições constantes de laboratório. As fases de lua cheia (círculos brancos) e nova (círculos pretos) reais estão representadas acima das séries.

Como é possível observar na figura a cima, os picos de emissão larval ocorreram entre um espaço de tempo consistente, anteriormente às fases de lua nova e cheia, indicando um possível ritmo *circa* semilunar. Essa observação pôde ser confirmada após a aplicação de um teste de autocorrelação (defasagem de 15 dias) e de um periodograma, os quais apresentaram resultados significativos (Figura 13):

Fig. 13. a) autocorrelação da série de emissão naupliar ao longo de 2 meses sob condições constantes de laboratório; b) periodograma da mesma série. (* $p < 0,05$)

O periodograma apresentou um único pico significativo que foi suportado por uma autocorrelação significativa ($p < 0,05$) apontada no correlograma. Tais resultados indicam que *C. bisinuatus* apresenta uma componente endógena que pode ter sido arrastada pelo ciclo semilunar, capaz de marcar o ritmo de emissão naupliar destes organismos que persiste em condições constantes, sem quaisquer pistas exógenas. O mesmo comportamento não foi observado para as emissões de exúvias, que não apresentaram picos significativos após a análise de autocorrelação ($p > 0,05$). Entretanto, um teste de correlação cruzada entre os valores de emissão de náuplios e exúvias mostrou um intervalo significativo entre os picos de emissão (Figura 14):

Fig 14. Correlação cruzada entre as séries de emissão naupliar e de exúvias dos organismos sob condições constantes de laboratório por 2 meses. (* $p < 0.05$).

Os resultados apresentam um coeficiente significativo e positivo na defasagem de 10 dias, indicando uma maior taxa de emissão de exúvias 10 dias após uma alta taxa de emissão de náuplios.

Experimento I.II.a): simulação de maré x fotoperíodo.

Mesmo com a aplicação de dois estímulos distintos concomitantemente, não foi possível sincronizar um ritmo de emissão larval nos organismos que fossem próximos de um ritmo circamareal (12,4 hrs) ou circadiano (~24 hrs). Não foram obtidos valores significativos nos testes de autocorrelação ($p > 0,05$). Obtiveram-se as seguintes séries temporais no período de experimento (Figura 15):

Fig 15. Efeito da exposição a ciclos de claro e escuro (12 h: 12 h) e ciclos de imersão a cada 12.4 h na taxa horária de emissão de náuplios e muda, durante as fases de sincronização e livre curso em condições de escuro constante.

Experimento I.II.b) simulação de maré x temperatura.

Após 10 dias de aplicação concomitante de duas variações cíclicas, uma simulando as marés (inundação a cada 12,4 h) e outra de temperatura (10: 14 h a 27°C e 21°C, respectivamente) obteve-se a seguinte série de emissão de propágulos (Figura 16):

Fig. 36: Efeito da exposição a ciclos de temperatura (10 h: 14 h; 27°C :21°C) na taxa horária de emissão de náuplios e muda, durante as fases de sincronização e livre curso em condições de escuro constante.

É possível observar que os picos de emissão de náuplios durante o período de livre curso se apresentaram em um espaço de tempo constante. Esse padrão é confirmado após a aplicação do teste de autocorrelação acompanhada de um periodograma (Figura 17):

Fig. 17: a) autocorrelação da série de emissão naupliar ao longo de 5 dias em condições de livre curso após um período de sincronização à ciclos de temperatura (10: 14 h; 27°C: 21°C) e ciclos de inundação a cada 12,4 h; b) periodograma da mesma série. (* $p < 0,05$).

Ao contrário do experimento anterior, neste experimento foi possível sincronizar um ritmo de emissão naupliar com o mesmo período do estímulo de simulação de maré durante a fase de sincronização do mesmo. Observa-se que os picos de emissão estão espaçados a um intervalo de 12 horas, intervalo esse muito próximo as 12,4 h dos estímulos de simulação de maré, permitindo inferir, então, que é possível sincronizar um ritmo de emissão na cracas em questão, uma vez que estejam presentes dois estímulos concomitantes: simulação de maré e variação cíclica de temperatura, simulando as oscilações diárias da mesma. Os picos de emissão em livre-curso corresponderiam aos períodos de imersão, embora se antecipando

ligeiramente nos últimos ciclos. A seguir está apresentada a série de dados de temperaturas (Figura 18) obtida a partir das informações dos registradores contínuos, alocados junto das lascas de rochas que permaneceram em um recipiente de plástico (ver em *Materiais e Métodos*).

Fig.18: Série temporal de temperatura da água obtida através dos dados do registrador contínuo alocado no recipiente de plástico contendo a população de *C. bisinuatus*, por 15 dias no total.

Durante os 10 dias de sincronização pôde-se manter uma oscilação entre temperaturas elevadas e temperaturas mais baixas como condições de sincronização, sendo que os valores máximos e mínimos atingidos foram 27,82°C e 18,17°C respectivamente. A combinação de tais oscilações com a simulação de maré permitiu que um ritmo de 12 horas fosse arrastado na atividade de emissão naupliar. Já a média da temperatura nos 5 dias de amostragens horárias foi de 25,10°C, com desvio padrão de $\pm 1,23^\circ\text{C}$, próximo do valor desejado para condições de livre curso.

Neste experimento também foi possível sincronizar um ritmo de emissão de exúvias, com um período de 10 horas (Figura 19):

Fig.19: a) autocorrelação da série de emissão de exúvias ao longo de 5 dias em condições de livre curso, após um período de submissão à ciclos de temperatura (10: 14 h; 27°C: 21°C) e ciclos de inundação a cada 12,4 h; b) periodograma da mesma série. (* $p < 0,05$).

Uma vez que as amostragens horárias sempre se iniciaram a 00:00, o período de 10 horas encontrado para a ritmicidade da atividade de muda coincide com as 10:00 h da manhã, momento em que se esperaria temperaturas mais elevadas da água na fase de sincronização, antecedente ao período de livre curso. Logo, pode-se questionar que foi o ciclo de temperatura o agente sincronizador do ritmo de emissão de exúvias, diferente do agente sincronizador encontrado para a atividade de emissão naupliar. Entretanto, ao se somar mais 10 horas após esse primeiro pico, o momento coincide com o horário de 20:00 h, momento em que a água estaria mais fria, deixando uma dúvida em relação ao real agente arrastador. É possível também que esse período de 10 horas seja o tempo necessário para a atividade de muda anteceder os eventos de emissão naupliar, uma vez que tais atividades são antagônicas ao nível do indivíduo, quase nunca ocorrendo ao mesmo

tempo. Se esse for o caso, também para a atividade de muda a simulação de maré serviu como agente arrastador, uma vez que 10 horas também é um período de tempo muito próximo das 12,4 h do intervalo entre as inundações.

A fim de se compreender melhor as relações existentes entre as atividades de muda e emissão naupliar, a tabela abaixo apresenta os resultados obtidos nas análises de autocorrelação para cada série individualmente, bem como os resultados das correlações cruzadas efetuadas entre as séries de emissão de náuplios e exúvias para cada experimento em laboratório.

Tabela 1. Resultados obtidos nas análises de autocorrelação para as séries de emissão de náuplios e exúvias no período de livre curso em cada experimento e nas análises de correlação cruzada entre tais séries para cada experimento. h: horas; d: dias; ns: não significativo; * $p < 0,001$; ** $p < 0,05$.

Experimento	Autocorrelação		Correlação Cruzada
	Náuplios	Exúvias	Náuplios x Exúvias
I.I.a) Fotoperíodo			
Claro Constante	ns	ns	1h*
Escuro Constante	ns	ns	0h*
I.I.b) Temperatura			
I.I.c) Simulação de maré	ns	ns	13h**
I.I.d) Amplitude de Maré	12d**	ns	10d**
I.II.a) Simulação de maré x fotoperíodo			
I.II.a) Simulação de maré x fotoperíodo	ns	ns	0h*
I.II.b) Simulação de maré x temperatura			
I.II.b) Simulação de maré x temperatura	12h**	10h**	12h*

Em todos os casos, à exceção do experimento da simulação de maré, a emissão e a muda parecem acontecer ao mesmo tempo para a população, independentemente da existência de um ritmo associado às emissões. Diferenças de 1 h e 0 h são interpretadas como não havendo defasagem entre as atividades. As 13 h de diferença observada para o experimento de variação de temperatura, que foi dada com fase de 12 h, mostram como as atividades se espaçam no tempo uma vez que variações de temperatura são oferecidas, tornando os eventos antagônicos. No experimento de simulação de maré com variação de temperatura é possível notar que o ciclo de inundação sincronizou o ritmo de emissão de náuplios e possivelmente o de exúvias, porém as atividades permaneceram espaçadas no tempo, cerca de 12 h, mais uma vez mostrando a antagonicidade dos eventos. Pode ser argüido que há alguma diferença no caso da amplitude de maré, uma vez que um ritmo *circa* semilunar se apresentou na atividade de emissão larval, mas

não na atividade de muda, porém, em uma escala de tempo maior, nota-se que essas atividades são realmente espaçadas, e dificilmente ocorrem ao mesmo tempo nos indivíduos.

Experimento II: teste de efeitos de variáveis ambientais em tempo real.

Após 32 dias de amostragens diárias, detectaram-se dias com registros de temperaturas elevadas, com picos a cima dos 40°C, bem como índices elevados de fluxo de clorofila-*a* (Figura 20):

Fig 20. Séries temporais dos parâmetros monitorados no estudo de campo, ao longo de 32 dias de amostragem nos 6 pontos. Os dados de temperatura não incluem o ponto 2, devido a falha nos sensores a partir do dia 19/02. Não houve registros, além da temperatura, no dia 15/02 devido a condições ambientais adversas. Barras verticais correspondem ao erro padrão. Os números acima das barras indicam quais os picos de emissão foram considerados nas análises de ANOVA hierárquica.

Após obter os resultados de correlações cruzadas entre a emissão naupliar e as variáveis ambientais aqui investigadas, concluiu-se que apenas a concentração de clorofila-*a* (valores médios), as temperaturas extremas (percentis de 97,5%) e o fluxo de água influenciaram a atividade de emissão (Tabela 2):

Tabela 2. Análises de correlação cruzada para testar a associação entre o padrão de emissão larval e as variáveis ambientais testadas. (d: defasagem; *r*: coeficiente de correlação, *p*: probabilidade de erro tipo I).

	Emissão Larval		
	d	<i>r</i>	<i>p</i>
Temperaturas Médias	-	-	ns
Temperaturas Extremas (Percentil 97,5)	-1d	+ 0.424	0.0175
Clorofila- <i>a</i>	-6d	+ 0.481	0.0053
Fluxo de água	1d / 3d	+ 0.418 / + 0.422	0.0193 / 0.018
Fluxo Clorofila- <i>a</i>	-	-	ns

As temperaturas extremas influenciaram a emissão naupliar de uma maneira quase que instantânea, com um período de defasagem de apenas um dia. Ou seja, após apenas um dia do registro de temperaturas elevadas, detectou-se um pico de emissão naupliar. A concentração de clorofila-*a* apresenta uma influência em um espaço de tempo um pouco maior, a uma defasagem de 6 dias. Já o fluxo de água apresentou uma correlação com os eventos de emissão a uma defasagem adiantada em 1 e 3 dias. Este padrão só pode ser verificado para a emissão de larvas, uma vez que não foram obtidas correlações significativas entre a taxa de muda e os parâmetros testados.

Dentre os 6 pontos amostrados, foi possível identificar locais com condições contrastantes de exposição a valores extremos de temperatura e concentração de alimento (Figura 21):

Fig 21. Gráfico de frequências acumuladas de a) temperaturas extremas (percentil 97,5); b) concentração de clorofila-*a* nos 6 pontos de amostragem. Letras iguais correspondem a pontos com características similares.

Agrupamento a) locais mais sombreados e b) menos sombreados em relação às temperaturas e a) menor concentração e b) maior concentração de clorofila-*a*.

Só foi possível distinguir dois grupos com 2 pontos amostrais cada em relação à temperatura acumulada próximo do percentil de 97,5%, sendo que os pontos 1 e 3 foram considerados mais frios (grupo **a**), por estarem em locais com maior sombreamento e os pontos 2 e 4 mais quentes (grupo **b**), por estarem em locais com menor sombreamento. Em relação aos locais com diferentes aportes de concentração de clorofila-*a* também só foi possível distinguir dois grupos de pontos amostrais por semelhança, baseado na distribuição de frequência das mesmas, sendo o grupo com menor concentração composto por três locais e o segundo por dois locais. Pelo fato de dois dos pontos do grupo **a** terem os mesmos dados de

concentração de clorofila-*a* (ver em *Materiais e Métodos*), optou-se por utilizar os dados de emissão do ponto 1 nos cálculos seguintes.

Para o cálculo da resposta padrão foram usados os valores observados máximos, para cada lugar, próximos aos eventos mostrados na figura 20 (± 1 dia) e os valores que antecederam esse eventos em 1 dia, no caso da temperatura, e 6 dias, no caso da concentração de clorofila-*a*. Não foram encontradas quaisquer diferenças na resposta-padrão obtida para locais de diferentes características (Tabela 3), indicando que não os padrões temporais são semelhantes ao longo do trecho de costa amostrado.

Tabela 3: Resumo dos valores da ANOVA hierárquica para os grupos de paredes mais frias e quentes (temperatura) e com menor e maior concentração de clorofila-*a*. Significância $p < 0,05$. GL: graus de liberdade; QM: quadrados médios.

f.v.	GL	QM	F	<i>p</i>
Temperatura: T	1	0.00	0.00	0.991
Ponto (T)	2	180.4	1.19	0.325
resíduo	20	78.5		
<hr/>				
[Clorofila-<i>a</i>] : cl	1	1.24	0.62	0.51
Ponto (cl)	2	2.00	0.18	0.84
resíduo	20	11.09		

DISCUSSÃO

Diferente do que ocorre com a maioria dos invertebrados marinhos do entremarés, os quais apresentam uma sincronização de pelo menos uma etapa do ciclo reprodutivo com ciclos ambientais tais como a temperatura (Neumann e Heimbach, 1984; Conner et al. 1985; Hsiao e Meier, 1992; Yan e Miao, 2004), o fotoperíodo (Korringa, 1947; Imai et al., 1950; Menaker, 1971; Bentley et al., 2001), e / ou ciclos de marés (Saigusa, 1982; Forward, 1987; Marcus, 1985; Macho *et al.*, 2005; Ziegler & Forward, 2006; Villanueva & Montaña, 2008; Forward & Bourla, 2008; Krinsky et al., 2009), subpopulações do cirripédio *Chthamalus bisinutaus*, estudado no presente trabalho, apresentam uma sincronia de eventos de emissão larval em campo mediadas por um sinal mais irregular, provocado por eventos estocásticos de variação térmica, fluxo de água e do suprimento de alimento, indicando, então, a importância das condições ambientais em tempo real influenciando nessa etapa do ciclo reprodutivo. Entretanto, em condições constantes de laboratório, esses organismos revelam uma componente endógena arrastada por ciclos concomitantes de marés diárias e temperatura a uma escala de apenas alguns dias e ciclos de amplitude de maré, a uma escala de semanas, marcando o ritmo da atividade de emissão, confirmando, assim, a existência de um relógio endógeno nesses cirripédios. Nota-se, portanto, que esses crustáceos possuem a capacidade de antecipar certas fases de ciclos geofísicos quando em condições constantes, e sincronizar a emissão de larvas à essas fases, promovendo uma vantagem adaptativa aos mesmos, porém, em situação natural, as condições extremas prevalentes no ambiente atuam como agentes mascaradores, e os organismos acabam respondendo de forma quase que imediata à tais variáveis, permitindo uma resposta mais eficiente perante uma situação prejudicial à população.

O fotoperíodo é um dos fatores que melhor contribui para a antecipação de um evento reprodutivo, uma vez que sua variação ao longo do ano é contínua e regular, tornando-o um indicador preciso de sazonalidade (Menaker, 1971). A sincronização com os ciclos de claro/escuro diários garantem que aspectos da fisiologia do animal, como a gametogênese ou emissão de propágulos reprodutivos, estejam associados a períodos específicos do ano (Lawrence & Soame, 2004). É comum observar na natureza diversos grupos de invertebrados marinhos que sofrem a influência do fotoperíodo em alguma etapa do seu ciclo reprodutivo, como nos poliquetos *Nereis virens*, *N. diversicolor* e *Harmotoe imbricata* (Rees & Olive, 1999; Garwood, 1980), nos cnidários de barreiras de corais (Babcock, 1995) e em muitos

crustáceos, como *Sesarma kasaoka* e *S. izu*, os quais apresentam emissão larval sincronizada com a fase clara do dia (Saigusa, 1982). Em outros decápodos, como *Menippe mercenaria* (Krimsky et al, 2009) e ermitões *Clibanarius vittatus* (Ziegler & Forward, 2006) a emissão ocorre preferencialmente na fase escura do dia. Já foi observado, em condições experimentais de laboratório, a permanência dessa influência na atividade reprodutiva, como resultado de um arrastamento ou sincronização da função pelos ciclos diários de claro/escuro, como é possível constatar nos estudos de Yoshika (1989) realizados com o quíton *Acanthopleura japonica*, além de estudos com foco em outros organismos como o copépodo marinho *Labidocera aestiva* (Marcus, 1985), a estrela-do-mar *Pisaster ochraceus* (Pearse & Eernisse, 1982) e crustáceos decápodes como *Rhithropanopeus harrisii* (Forward et al, 1982) e *Uca pugilator* (Bergin, 1981).

Considerando os crustáceos cirripédios, a influência do fotoperíodo nos eventos reprodutivos parece ser importante dependendo da espécie ou latitude em que se encontram. Para as espécies *Chthamalus fissus*, *Balanus glândula* e *Tetraclita squamosa rubescens* estudadas na Califórnia, o fotoperíodo não exerce nenhum tipo de influência no momento da emissão larval (Hines, 1978). Já a espécie bóreo-artica *Semibalanus balanoides* aparentemente utiliza-se de pistas de noites mais longas para iniciar o desenvolvimento de suas gônadas e coincidir a emissão larval com as florações fitoplanctônicas do início da primavera (Davenport et al., 2005), e também algumas espécies dos gêneros *Chthamalus* e *Balanus* da Península Ibérica, que emitem suas larvas na fase clara do dia preferencialmente (Macho et al., 2005). Durante o levantamento bibliográfico realizado não foram encontrados trabalhos que relatem uma componente endógena regulando o ritmo de emissão larval em cirripédios e no presente estudo não foi possível arrastar nenhum ritmo de emissão associado ao ciclo claro / escuro diário na craca *Chthamalus bisinuatus*, nem detectar tal sincronização mesmo quando os animais foram mantidos em condições de arrastamento sob influência concomitante de um ciclo diário de claro / escuro e um ciclo de imersão, simulando assim tanto as oscilações diárias do nível da água como do fotoperíodo. Esses resultados podem ser uma consequência direta da pouca sensibilidade à luz que esses organismos apresentam, uma vez que, mesmo dotadas de células fotorreceptoras nos apêndices torácicos, a luz parece apenas influenciar a atividade cirral desses animais (Fales, 1928; Gwilliam, 1965 e Gwilliam e Bradbury, 1971). A luz ou a duração do dia parece atuar como agente sincronizador de eventos reprodutivos para espécies que se encontram em elevadas latitudes, uma vez que a amplitude do ciclo fotoperiódico tende ao máximo nas regiões polares e é negligenciável nas latitudes tropicais, como na região de estudo em questão (Olive, 1995).

Sincronizar a emissão larval com o ciclo claro-escuro e / ou a temperatura pode apresentar uma vantagem adaptativa ao organismo uma vez que tal evento ocorrerá no momento mais propício à sobrevivência tanto da prole quanto da fêmea em questão (Morgan & Christy, 1994; Yan & Miao, 2004). Emissões durante o período de escuro, ou reguladas de acordo com uma co-variável, no caso o decréscimo diário da temperatura, podem reduzir a taxa de mortalidade larval inicial pelo consumo de predadores visuais (Forward, 1987; Christy, 2003). A temperatura, que sofre um ciclo de mudança similar a cada ano, se apresenta como um fator expressivo na sincronização de eventos reprodutivos dos invertebrados marinhos, influenciando desde o início do ciclo de gametogênese até a emissão de larvas ou a desova em si (Patel & Crisp, 1960; Sastry, 1963; Olive, 1995; Schroeder, 1984; Giese & Kanatani, 1987; Yan & Miao, 2004 e Lawrance & Soame, 2004).

Quando a reprodução requer um patamar ótimo de temperatura para sua indução, a estação reprodutiva será restrita quando tais patamares prevalecem por um curto período de tempo, como nos locais de elevadas latitudes. Porém, quando uma espécie apresenta uma distribuição ampla em relação à latitude, a estação reprodutiva é prolongada quanto mais próximo do equador esta população se encontrar (Orton, 1920; Giese & Kanatani, 1987). É esse o padrão que se observa para a espécie alvo deste estudo; sua reprodução é contínua ao longo do ano, com maiores picos ocorrendo nos meses de verão (Gomes, 2007). Desse modo, não parece provável que a temperatura exerça um papel de agente arrastador da atividade de emissão naupliar a uma ampla escala de tempo, de questão de meses, mas sim tenha uma influência marcante em uma menor escala temporal, na questão de dias ou semanas. Nossos resultados suportam tal idéia ao se averiguar uma sincronização dos eventos de emissão naupliar com ciclos de inundação concomitantes às variações diárias de temperatura em laboratório ou mesmo em condições naturais em campo, nas quais se constatou uma correlação entre eventos extremos de temperatura e a atividade de emissão.

É interessante observar que, no teste de arrastamento utilizando apenas as variações diárias de temperatura, nenhum ritmo pode ser marcado, entretanto, quando se combinou variações diárias de temperatura e simulações de maré, os animais mantiveram um ritmo de emissão naupliar (12 horas) e de muda (10 horas) durante os cinco dias em livre curso, em que nenhuma variação foi aplicada. A aplicação de dois estímulos concomitantes pode simular as condições naturais do habitat da população utilizada no experimento, e, assim, uma condição de arrastamento pode se realizar mais efetivamente. *Chthamalus bisinuatus* é uma espécie de craca que habita o alto entremarés, estando submetida a poucos períodos de inundação e variações diárias de temperatura mais marcantes. Dessa forma, estando em

condições de simulação de maré e oscilações diárias de temperatura por 10 dias, os animais podem ter se aproveitado de tais pistas e sincronizado seus relógios endógenos com tais ciclos, permitindo maior sucesso durante a emissão das larvas e exúvias. Ainda mais, essa sincronização pode ser o resultado de parte de uma sincronização de maior escala temporal com os ciclos de amplitude de maré (14,4 dias), sincronia que também foi averiguada em nossos resultados. Levando em consideração que dois ciclos de maré resultam em um dia lunar, de aproximadamente 24,8 h, é possível que as cracas em questão tenham utilizado a variação diária de inundação como uma pista exógena remetendo à uma parte do ciclo da amplitude de maré, sendo essa variação de 12,4 h de inundação apenas uma das componentes do ciclo de maior periodicidade que é o ciclo semilunar. Outros trabalhos já demonstraram que simulações de marés diárias, juntamente à outros fatores oscilantes, são cronadores requisitados no controle de ritmos semilunares do ciclo reprodutivo de insetos marinhos (Neumann, 1975; 1976 e 1978). Dessa forma, a utilização apenas das variações de temperatura como pista ambiental pode não ter sido suficiente para arrastar o ritmo, pois, na realidade, a ritmicidade de emissão é dependente da modulação de dois agentes externos, a temperatura juntamente das inundações diárias, que providenciam informações temporais diferentes, porém complementares. Essa capacidade de sincronização de moduladores endógenos possibilita que esses organismos antecipem os momentos de maré alta que seriam os mais apropriados para a emissão de larvas, já que o fluxo de água sobre as mesmas seria maior, permitindo, então, que as cracas realizem as atividades nas esperadas marés altas dos períodos de determinadas fases da lua.

Como dito anteriormente, além de uma componente endógena relacionada ao ciclo de maré (cerca de 12 h), foi ainda detectada a capacidade de manter ciclos de emissão de menor frequência. Quando populações trazidas do campo foram mantidas em condições constantes de livre curso no laboratório, sem terem antes passado por períodos de arrastamento face a estímulos artificiais, foi detectado um período de 12 dias entre os principais picos de emissão. Esse período pode estar associado à sincronização da atividade com o ciclo de amplitude de maré real (14,4 dias), arrastado quando os organismos ainda estavam em seu habitat natural. Ao se comparar os dias em que esses picos ocorreram com as fases da lua, nota-se que os picos de emissão ocorreram nas fases minguante e crescente, quando ocorrem as marés de quadratura. O fato do período de emissão ser relativamente menor que o período do ciclo em questão pode revelar a capacidade da população em antecipar o evento, no caso as marés de quadratura, e emitir as larvas no momento ótimo para sua sobrevivência, ou antes de serem submetidas a uma condição desfavorável à sobrevivência dos adultos, uma vez que nessas

marés o tempo de emersão é mais prolongado e o efeito da dessecação maior. Resultados semelhantes para a mesma espécie já foram observados em campo por Bueno e colaboradores (2010), os quais detectaram uma periodicidade de 11 dias entre os principais eventos de emissão, sempre próximos das luas minguante e crescente. Esses autores discutem que tal sincronização com essas fases da lua, pouco comum entre os invertebrados do entremarés, seria um resultado do efeito da dessecação que os animais enfrentam nessas marés, uma vez que, por estarem no estrato mais alto desse ambiente, eles seriam apenas banhados pelos respingos das ondas ao se chocarem contra as rochas.

Não se pode afirmar, baseando-se apenas nesses resultados, que de fato o ciclo da amplitude de maré é o agente arrastador de tal ritmicidade averiguada nas condições experimentais. Talvez esse período de 12 dias entre um evento e outro seja o tempo necessário para a maturação das gônadas e dos ovos entre uma fecundação e outra. O que se sabe para outras espécies do mesmo gênero é que, quando cultivadas em laboratório, os ovos de *Chthamalus fissus* levam de 12 a 14 dias para estarem plenamente desenvolvidos e as larvas náuplios prontas para serem emitidas, quando sujeitas a temperaturas de 19°C e 12°C respectivamente. Os ovos são depositados tão logo quanto a quantidade suficiente de nutrientes é acumulada (Hines, 1978). Entretanto, são várias as evidências que levam a crer que os ciclos de maturação das gônadas não é o fator que promove a sincronização da emissão. A chance que a maturação das gônadas tenha proporcionado o mesmo padrão semilunar observado em campo (Bueno et al., 2010) e em laboratório (nesse estudo), em anos diferentes e em populações diferentes é baixa; similarmente, se a maturação das gônadas fosse de extrema influência, deveria ter sido observado um padrão de período semelhante em campo, fato não constatado nesse estudo. O que é importante ressaltar de nossos resultados é a proximidade dos picos de emissão com as fases da lua responsáveis pelas marés de quadratura. O experimento em questão teve início em uma data de lua cheia (17/02/2011), porém os picos de emissão só começaram a aparecer a partir do dia 22/02/2011, muito próxima da data em que a lua passou a fase minguante, no dia 24/02/2011, realçando o possível papel de agente arrastador da amplitude de maré na ritmicidade averiguada. Desse modo, tanto os resultados de Bueno e colaboradores (2010) bem como os resultados aqui apresentados apontam a importância dos períodos de inundação na indução de uma resposta endógena nessas cracas, e que elas podem (no caso de ser um sinal claro, sem oscilações de outros fatores disruptores), ou não (no caso da ação do vento em linhas de costas que promovem uma variação não astronômica do nível do mar e na presença de grandes diferenças de temperaturas e, principalmente alimento) refletir em ritmos dessa natureza no

campo. A existência de um ritmo endógeno de emissão larval associado às marés de quadratura permitiria as cracas uma condição favorável para a sobrevivência das larvas, que estariam menos tempo na presença de predadores visuais, e também pelo fato de diminuir as chances de encalhe das mesmas, uma vez que nas marés de quadratura a ação das ondas se limita aos extratos inferiores da costa rochosa, diminuindo a chance das larvas recém emitidas sejam lançadas novamente em direção as rochas.

Assim como a emissão larval, os eventos de exuviação também apresentaram uma ritmicidade (período de 10 horas) arrastada aparentemente aos ciclos variações da temperatura quando fornecidas concomitantemente à ciclos de inundação que simulam as marés diárias. Já se sabe da influência da temperatura na atividade de muda para os cirripédios e o fato dos organismos nesse estudo terem demonstrado uma periodicidade na atividade de muda igual ao período de temperaturas mais elevadas fornecidas durante a aclimação no referido experimento confirma tal importância. É interessante observar, no entanto, que mesmo com uma periodicidade próxima da averiguada para a atividade de emissão larval (12 horas), ambas as atividades permaneceram espaçadas a uma defasagem de 12 ou 13 horas, tanto neste experimento como no experimento de variação de temperatura apenas (ver *Resultados*), mais uma vez demonstrando a influência da temperatura no ciclo de vida desses cirripédios, como já averiguado para outras espécies (Patel e Crisp, 1960 e 1961; El-komi e Kajihara, 1991). O mesmo não se sucedeu com os experimentos nos quais se aplicou um ciclo de variação do fotoperíodo isoladamente ou acompanhado de simulações de maré; em ambos os casos a atividade de muda não apresentou periodicidades significativas e a relação entre as mudas e a emissão de larvas se deu em um espaço de tempo quase nulo, variado entre 0 e 1 hora apenas, o que demonstra a capacidade da população, ou mesmo do indivíduo, em se reproduzir e realizar a muda ao mesmo tempo, fato já observado em outras espécies (Patel e Crisp, 1961). Em todos os casos, à exceção do experimento da simulação de maré, a emissão e a muda parecem acontecer ao mesmo tempo para a população, independentemente de haver um ritmo ou não. No caso de ausência de um cronador ambiental, a resposta sincrônica, ainda que arritmica, pode ser estimulada por indução química entre as cracas. Nas populações utilizadas nos experimentos deve haver subgrupos, enquanto uns emitem, outros mudam, mas, aparentemente, sempre nas mesmas janelas temporais. Dessa maneira conclui-se que são atividades coincidentes para a população, mas possivelmente antagônicas para o indivíduo. Essa antagonicidade fica mais evidente em uma escala temporal maior, como observada no experimento de amplitude de maré, em que nenhum estímulo foi aplicado à população e os ritmos endógenos dos animais puderam se expressar em condições de livre curso. Nesse caso,

o tempo entre uma elevada taxa de emissão naupliar e uma elevada taxa de muda foi de 10 dias.

Animais do entremarés estão expostos a períodos recorrentes de emersão e submersão, e a duração relativa desses processos, que depende tanto do nível do entremaré em que o organismo se encontra, bem como da fase do ciclo semilunar, pode afetar fortemente suas atividades reprodutivas (Yoshioka, 1989), sendo comum, então, a sincronização de eventos reprodutivos com as marés diárias ou mesmo com o ciclo de amplitude de maré, regido pelas fases da lua. Crustáceos braquiúros tendem a emitir suas larvas durante períodos noturnos de vazantes, em marés de sizígia, utilizando, então, dos ciclos de amplitude de maré e diários como pista exógena (Forward, 1987; Morgan & Christy, 1994). Essa resposta promoveria, em tese, o rápido transporte de propágulos para o largo, minimizando a chance de predação perto da costa, onde os potenciais consumidores são abundantes. Para cracas desse ambiente já foram observados em campo, ritmos de emissão larval associados a diferentes fases do dia, lua e marés. Mesmo considerando este ritmo no gênero *Chthamalus*, diferentes populações apresentam diferentes padrões de emissão no campo, já tendo sido verificadas maiores taxas de emissão durante marés altas diurnas, nas luas nova e cheia (Macho *et al*, 2005), ou às marés de quadratura, sem relação ao período do dia (Bueno *et al.*, 2010). Nota-se, portanto, que diferentes populações podem apresentar diferentes agentes sincronizadores para esta atividade reprodutiva. Sabe-se que o padrão temporal de emissão larval provavelmente não é fixo geneticamente para uma espécie, podendo variar ao longo da sua distribuição geográfica, por exemplo (Saigusa, 1985; Morgan, 1996; Hines, 1978). Se os ritmos de emissão fossem rigidamente fixos, a variação intraespecífica poderia culminar em uma diminuição da sobrevivência entre larvas recém emitidas assentando em diferentes locais (Thurman, 2004).

A periodicidade dos eventos de emissão larval de 12 dias encontrada em condições de laboratório não se repetiu em campo, como pode ser observado nas séries temporais de tal experimento (ver *Resultados*). Picos de emissão foram observados durante os 32 dias de manipulação das populações em campo, porém em um intervalo de tempo de 8 dias e apresentando uma correlação com as concentrações elevadas de clorofila-*a* (defasagem de 6 dias), temperaturas extremas (defasagem de apenas 1 dia), aqui consideradas como os percentis de 97,5 das médias diárias e fluxo de água (defasagem de 1 e 3 dias). A influência quase que imediata das temperaturas extremas sob os eventos de emissão larval pode ser inferida como uma consequência do estresse térmico e de dessecação provocada pelas elevadas temperaturas durante as marés baixas, estimulando os indivíduos adultos a liberar as larvas antes que tais condições provocassem a morte dos mesmos, fato já constatado para

mexilhões também do entremarés (Petes, et al., 2007). No referido trabalho, os autores evidenciaram que a exposição a elevadas temperaturas do ar, considerado como um estresse ambiental teve um efeito negativo nos bivalves *P. canaliculus* e *M. galloprovincialis* da Nova Zelândia, reduzindo as taxas de crescimento e a energia alocada para reprodução, e elevando a atividade de emissão de propágulos nos mesmos.

O estresse pode afetar muitos aspectos da reprodução, incluindo o momento da emissão larval, a qualidade dos gametas e o sucesso da fertilização (Petes, et al., 2007; Schereck et al., 2001). Quando um estado de estresse ocorre, os organismos devem realocar suas energias das mais variadas funções, como crescimento, reprodução, metabolismo, entre outros, para reparar seu mecanismo de defesa e poder sobreviver a tal estado. Dessa forma, os custos da reprodução são os mais utilizados nesse balanço, uma vez que esses custos serão pagos em termos de sobrevivência e na próxima reprodução (Roff, 1992; Stearns 1992; Petes, et al., 2008). O estresse no alto entremarés é resultado tanto da menor disponibilidade de alimento, bem como da elevada exposição às temperaturas do ar e dessecação durante as marés baixas. Assim, é possível inferir que o estresse provocado pelos eventos extremos de temperatura observados em nossos resultados tenha estimulado a emissão naupliar. Na nossa região é comum observar eventos de mortalidade em massa dessas cracas durante períodos de quadratura no pico de verão, especialmente na metade superior de sua ocupação vertical no costão, pelo que essa resposta poderia garantir a reprodução de indivíduos em elevado risco de morte.

Nossos resultados também apontam a importância da disponibilidade de alimento na coluna d'água previamente à emissão larval, uma vez que se constatou uma correlação positiva entre a concentração de clorofila-*a* e os eventos de emissão em questão a uma defasagem de 6 dias. Em outros cirripédios, como *Chthamalus fissus*, o desenvolvimento dos ovos é diretamente regulado pela disponibilidade de alimento, e a frequência de desova é diretamente proporcional ao tamanho da dose de alimentação (Hines, 1978).

Espécies de regiões temperadas ou elevadas latitudes, locais em que as florações fitoplanctônicas são bem marcadas temporalmente e de curta duração, apresentam uma sincronia entre os eventos de emissão larval e as ditas florações, garantindo abundância de alimento para as larvas assim que as mesmas chegam ao ambiente pelágico (Barnes, 1962; Himmelman, 1975; Starr et al., 1990, 1991). Entretanto, em nossa região subtropical, a situação não parece ser semelhante. De fato, não seria uma vantagem adaptativa a sincronização dos eventos de emissão larval com florações fitoplanctônicas em nossa região, pois a produtividade primária durante o verão, período em que foi realizado nosso

experimento, é relativamente alta e constante ao longo do tempo (Gaeta e Brandini, 2006). Durante o verão, é comum observar na costa sudeste do Brasil os efeitos provocados pela ressurgência de Cabo Frio, Rio de Janeiro, evento provocado pela ação persistente de ventos nordestes e que permitem migração das ACAS (Água Central do Atlântico Sul) para as regiões costeiras, proporcionando uma queda na temperatura da água, porém um aumento da quantidade de nutriente na mesma (Lorenzzetti e Gaeta, 1996). Mas, neste caso, a variação de nutrientes obedece à ação dos ventos, aos quais não estão associadas quaisquer pistas ambientais que permitam a antecipação de condições favoráveis.

Desse modo, ao longo de todo o verão, independentemente se as águas contêm quantidade suficiente de alimento ou não, eventuais respostas à variação da concentração do fitoplâncton são necessariamente parte de uma estratégia oportunista, sem relação com qualquer controle endógeno. No caso das populações amostradas na Baixada Santista (Bueno et al., 2010) a falta de resposta com relação à concentração de diatomáceas pode indicar que, em condições eutróficas, que caracterizam o local daquele estudo (Braga et al., 2000), a disponibilidade de alimento não seja fator limitante. Os resultados do presente estudo, para as populações de São Sebastião, indicam, no entanto, que essa condição não é geral para a região. Os seis dias de defasagem na correlação entre concentração de clorofila-*a* e os eventos de emissão larval é demasiado longo para que possa ser interpretado como uma resposta adaptativa para garantir condições favoráveis ao desenvolvimento das larvas, uma vez que nesse período de tempo tal situação pode ser facilmente revertida. Alternativamente, é mais plausível que esse período corresponda ao tempo necessário para o desenvolvimento das gônadas fornecidas as condições nutricionais suficientes. Esta hipótese é condizente com o estudo de Crisp e Spencer (1958), que constataram que a alimentação dos adultos provoca a emissão larval em *Semibalanus balanóides*, sendo esta inibida quando em condições de inanição. A condição nutricional e a temperatura também parecem ser fatores principais da regulação da atividade de muda e emissão larval de *Balanus amphitrite*, *B. trigonus* e *B. eburneus* (El-Komi e Kajihara, 1991). Dessa maneira, o mecanismo proposto aqui não coincide com o sugerido por Starr et al. (1990 e 1991). Esses autores indicam que é necessário um contato direto com as células fitoplanctônicas para que a emissão larval seja estimulada. Nossa hipótese é centrada na questão da assimilação energética envolvida após a alimentação dos adultos, e recebe suporte de outros estudos nos quais é apontada a importância da alimentação para a finalização do desenvolvimento das larvas e sua emissão (Crisp e Spencer, 1958; Hines, 1978).

Já a correlação averiguada entre os picos de emissão larval e grandes fluxos de água a uma defasagem de um e três dias posteriores aos eventos de emissão é de difícil interpretação. Pode ser, na realidade, o resultado da influência de grandes fluxos de água gerados pelos ciclos de amplitude de maré, mais especificamente as marés de sizígia, que ocorreram anteriormente aos nossos experimentos, levando a crer, então, que essa correlação estaria defasada dias passados da nossa série temporal. Entretanto, na região de estudo já foi averiguado que os elevados fluxos de água não estão associados necessariamente às marés de sizígia, mas sim às condições de ventos que acabam provocando anomalias de marés estocasticamente (Barbosa, 2010). Logo, alguma outra componente cíclica atuando antes do início de nossa série temporal possa ser a responsável por tal correlação, porém, a falta de dados amostrais no período precedente não permite maiores interpretações.

Ritmos endógenos tornam o indivíduo, até certo ponto, independente das flutuações do ambiente, mantendo suas funções vitais. Quando expostos a alterações imprevisíveis, os indivíduos podem, portanto, se ajustar através de mudanças adaptativas, controladas por sistemas *circa* temporais (Palmer, 1991). Neste estudo ficou claro o papel executado pelas marés, sejam elas diárias ou a cada 14 dias, o dito ciclo de amplitude de maré, e da temperatura, em combinação com o ciclo mareal na sincronização dos eventos de emissão larval e da atividade de muda nas cracas do entremarés *Chthamalus bisinuatus*. Essas variáveis podem atuar como verdadeiros cronadores das mencionadas funções e essa sincronização permite que os animais antecipem eventos cíclicos naturais e realizem essas atividades no momento mais propício, seja para sobrevivência das larvas ou para manter o “fitness” dos adultos. É simples compreender como as marés diárias atuam como cronadores, uma vez que sem a ação da inundação, ou pelo a ação mais constante das ondas durante as marés cheias, as cracas não conseguiriam emitir suas larvas e exúvias. Sendo assim, o controle endógeno favorece a realização dessas atividades durante a preamar, em períodos de baixa amplitude de maré (quadraturas). Essa capacidade permite, portanto, (i) a emissão quando o risco de encalhamento das larvas pela subida da maré é mínimo, e (ii) um potencial de retenção máximo, uma vez que nas quadraturas o potencial de transporte de propágulos para longe da população parental é baixo porque as correntes de maré são mínimas.

A temperatura é uma das variáveis físicas mais importantes no controle de funções vitais dos organismos marinhos, influenciando desde o período reprodutivo, presença de larvas no plâncton, recrutamento até o metabolismo em si (Bhaud, et al, 1995; Olive, 1995). Mudanças gerais no ciclo de temperatura previstas no cenário das mudanças climáticas mundiais poderiam alterar a relação de fase entre ciclos geofísicos não alterados como o

fotoperíodo e componentes anuais do ciclo de temperatura. Ocorreria, por exemplo, um avanço ou atraso no momento exato em que uma determinada temperatura é alcançada em relação ao tempo real e outros fatores que não se alterariam, tais como a duração do dia. Também é possível que a variabilidade média ou os ruídos nos sinais de temperatura cresçam, alterando a sincronização de eventos sazonais (Olive, 1995). Já pôde ser constatada no ambiente terrestre uma alteração na fenologia de alguns eventos, desde a década de 60, como a antecipação da reprodução de aves e anfíbios na primavera (Walther, et al., 2002). Em nosso trabalho foi constatada a influência indireta da temperatura extrema como uma pista exógena na sincronização da emissão larval, demonstrando a vulnerabilidade do cirripédio *C. bisinuatus* a essa variável. Outros organismos do entremarés podem bem ser afetados de modo semelhante. Entretanto, para se prever as consequências das mudanças ambientais, é necessário também algum conhecimento das componentes genéticas que controlam as respostas às pistas ambientais, assim como o grau de herdabilidade e variações desses traços (Olive, 1992).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alon, N.C. e Stancyk, N.E. (1982) Variation in life-history patterns of the grass shrimp *Palaemonetes pugio* in two South Carolina estuarine systems. *Marine Biology*, 68(3): 265-276.
- Anderson, D.T. (1994) *Barnacles. Structure, function, development and evolution*. Londres: Chapman e Hall, 357p.
- Arar, E.J. e Collins, G.B. (1997) In Vitro Determination of Chlorophyll-a and Pheophytin a in Marine and Freshwater algae by fluorescence. *National Exposure Research Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency*, (September):1-22.
- Babcock R. (1995) Synchronous multispecific spawning on coral reefs: potential for hybridization and roles of gamete recognition. *Reproduction, Fertility and Development*.7(4):943–950.
- Baker, T.C. e Cardé, R.T. (1979) Endogenous and exogenous factor affecting periodicities of female calling and male sex pheromone response in *Grapholitha molesta* (Busk). *Journal of Insect Physiology*, 25(12): 943-950.
- Barbosa, A. C. C. (2010) *Importância de fenômenos físicos e biológicos na regulação do assentamento larval de uma população da craca Chthamalus bisinuatus Pilsbry (1916) no entre-marés consolidado*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Barnes, H. (1962) Note on variations in the release of nauplii of *Balanus balanoides* with special reference to the spring diatom outburst. *Crustaceana*, 4(2):118–122.
- Bartels-Herdege, H.H; Hardege, J.D; Zeeck, E. et al. (1996) Sex pheromones in marine polychaetes V: a biologically active volatile compound from the coelomic fluid female *Nereis (Neanthes) japonica* (Annelida Polychaeta). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 201(1-2): 275-284.
- Basilone, G; Guisande, C; Patti, B. et al. (2006) Effect of habitat conditions on reproduction of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the Strait of Sicily. *Fisheries Oceanography*, 15(4): 271–280.
- Bentley, M.G; Olive, P.J.W. e Last, K. (2001) Sexual satellites, moonlight and nuptial dances of worms: the influence of the moon on the reproduction of marine animals. *Earth, Moon and Planets* 85-86: 67-84.
- Bergin, M.E. (1981). Hatching rhythms in *Uca pugilator* (Decapoda:Brachyura). *Marine Biology*. 63(2): 151-158.

- Berry, A.J. (1986) Semi-lunar and lunar spawning periodicity in some tropical littorinid gastropods. *Journal of Molluscan Studies*. 52: 144-149.
- Bhaud, M; Cha, J.H; Duchêne, J.C. e Nozais, C. (1995) Influence of temperature on the marine fauna: What can be expected from a climatic change. *Journal of Thermal Biology*. 20(1-2): 91-104.
- Bueno, M; Flores, A. A. V. (2008) A sampling device to quantify offspring release of sessile marine invertebrates. *Invertebrate Reproduction & Development*, 52: 41-44.
- Braga, E.S; Bonetti, C.V.D.H; Burone, L. e Bonetti, J. (2000) Eutrophication and bacterial pollution caused by industrial and domestic wastes at the Baixada Santista estuarine system—Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 40:165–173.
- Bueno, M; Moser, G; Tocci, B. e Flores, A. (2010) Retention-favorable timing of propagule release in barnacles and periwinkles. *Marine Ecology Progress Series*. 414: 155-165.
- Burrows, M.T; Hawkins, S.J. e Southward, A.J. (1992) A comparison of reproduction in co-occurring chthamalid barnacles, *Chthamalus stellatus* and *Chthamalus montagui* Southward. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 160: 229-249.
- Chatfield, C. (1989) *The analysis of time series: an introduction*. 6th edition. Chapman & Hall.
- Christy, J.H. (2003) Reproductive timing and larval dispersal of intertidal crabs : the predator avoidance hypothesis. *Revista Chilena de Historia Natural*. 76:177-185.
- Conner, W.E; Webster, R.P. e Itagaki, H. (1985) Calling behavior in arctiid moths - The effects of temperature and wind-speed on the rhythmic exposure of the sex attractant gland. *Journal of Insect Physiology*, 31(10): 815-820.
- Crisp, D. e Clegg, D. (1960) The induction of the breeding condition in *Balanus balanoides* (L.). *Oikos*. 11(2): 265–275.
- Crisp, D.J. e Patel, B. (1969) Environmental control of the breeding of three boreo-arctic cirripedes. *Marine Biology*. 2(3):283-295.
- Crisp, D.J. e Spencer, C.P. (1958) The control of the hatching process in barnacles. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character*. Royal Society (Great Britain) 149(935): 278-99.
- Cushing, D.H. (1975) *Marine Ecology and fisheries*. Cambridge University Press, Nova Iorque, 278p.
- Davenport, J; Berggren, M.S; Brattegard, T. et al. (2005) Doses of darkness control latitudinal differences in breeding date in the barnacle *Semibalanus balanoides*. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*. 85(1): 59-63.

- Ehlinger, G.S. e Tankersley, R.A. (2006) Endogenous rhythms and entrainment cues of larval activity in the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 337(2): 205–214.
- El-Komi, M.M. e Kajihara T. (1991) Breeding and moulting of barnacles under rearing conditions. *Marine Biology*, 108: 83-89.
- Fales D.E. (1928) The Light-Receptive Organs of Certain Barnacles. *Biological Bulletin*, 54(6): 534.
- Fish, J.D. (1979) The rhythmic spawning behaviour of *Littorina littorea* (L.). *Journal of Molluscan Studies*, 45: 172-177.
- Foster, W.A. e Treherne, J.E. (1981) Evidence for the dilution effect in the selfish herd from fish predation on a marine insect. *Nature*, 293: 466-467.
- Fortier, L; Legget, W.C. e Gosselin, S. (1987) Patterns of larval emergence and their potential impact on stock differentiation in beach spawning capelin (*Mallotus villosus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44(7): 1326-1336.
- Forward, R.B; Lohmann, K. e Cronin, T.W. (1982) Rhythms in larval release by an estuarine crab (*Rhithropanopeus harrisii*). *Biological Bulletin*, 163(2): 287-300.
- Forward, R.B.J; Douglass, J.K. e Kenney, B.E. (1986) Entrainment of the larval release rhythm of the crab *Rhithropanopeus harrisii* (Brachyura: Xanthida) by cycles in salinity change. *Marine Biology*, 544: 537-544.
- Forward, R.B. (1987) Larval release rhythms of decapod crustaceans: an overview. *Bulletin of Marine Science*, 41(2): 165–176.
- Forward, R.B. e Bourla, M.H. (2008) Entrainment of the larval release rhythm of the crab *Rhithropanopeus harrisii* (Brachyura: Xanthidae) by cycles in hydrostatic pressure. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 357(2): 128-133.
- Gaeta, S.A. e Brandini, F.P. (2006) Produção primária do fitoplâncton na região entre o Cabo de São Tomé (RJ) e o Chuí (RS). em: Rossi-Wongtschowski, C.L.D.B. & Marureira, L.S.P. (Orgs.), *O Ambiente Oceanográfico da Plataforma Continental e do Talude na Região Sudeste-Sul do Brasil*. São Paulo: Edusp. 2006. p. 161-218.
- Garwood, P.R. (1980). The role of temperature and daylength in the control of the reproductive cycle of *Harmothoe imbricata*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 47: 35–53.
- Gelin, A.G; Crivelli, A.J; Rosecchi, E. et al. (2001) Can salinity changes affect reproductive success in the brown shrimp *Crangon crangon*? *Journal of Crustacean Biology*, 21(4): 905-911.
- Giese, A. C. e Kanatani, H. (1987) Maturation and Spawning. Em: A.C. Giese, J. S. Pearse, V. B. Pearse, *Reproduction of Marine Invertebrates* Eds. (Blackwell Scientific, Palo Alto, CA/ Boxwood Press, Pacific Grove, CA, 1987), vol. 9, pp. 251-329.

- Gomes, C.C. (2007) *Variação sazonal da intensidade reprodutiva e do recrutamento juvenil de Chthamalus bisinatus (Cirripedia: Chthamaloidea) na Baixada Santista, SP*. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), Universidade Estadual Paulista, São Vicente.
- Gwilliam, G.F. (1965) The mechanism of the shadow reflex in cirripedia. II. Photoreceptor cell response, second-order responses, and motor cell output. *The Biological Bulletin*, 129: 244-256.
- Gwilliam, G. F. e Bradbury, J.C. (1971) Activity patterns in the isolated central nervous system of the barnacle and their relation to behavior. *Biology Bulletin*, 141: 502-513.
- Hamilton, W.D. (1971) Geometry for the Selfish Herd. *Journal of Theoretical Biology*, 31(2): 295-311.
- Hernandes-Olalde, L; Garcia-Dominguez, F; Arellano-Martinez, I. et al. (2007) Reproductive cycle of the pearl oyster *Pteria sterna* (Pteriidae) in the Ojo the Liebre lagoon, B.C.S. Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 26(2): 543-548.
- Himmelman, J. (1975) Phytoplankton as a stimulus for spawning in three marine invertebrates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 20(2): 199-214.
- Hines, A. (1978) Reproduction in three species of intertidal barnacles from central California. *The Biological Bulletin*, 154: 262-281.
- Hsiao, S.M e Meier, A. H. (1992) Freerunning circasemilunar spawning rhythm of *Fundulus grandis* and its temperature compensation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 10(3): 259-265
- Imai, T; Hatanaka, M. e Sato, R. (1950) Artificial breeding of oysters in tanks. *Tohoku Journal of Agricultural Research*. 1: 69-86.
- Ims, R.A. (1990) The ecology and evolution of reproductive synchrony. *Trends in Ecology & Evolution*, 5(5):135-140.
- Klepal, W. e Barnes, H. (1975) Further observations on the ecology of *Chthamalus depressus* (Poli). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 17(3): 269-296.
- Korringa, P. (1947) Relations between the moon and periodicity in the breeding of marine animals. *Ecological Monographs*, 17: 349-381.
- Korringa, P. (1957) Water temperature and breeding throughout the geographical range of *Ostrea edulis*. *Annals of Biology*, 33: 1-17.
- Krimsky, L.S; Gravinese, P.M; Tankersley, R.A. e Epifanio, C.E. (2009) Patterns of larval release in the Florida stone crab, *Menippe mercenaria*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 373(2): 96-101.
- Lawrence, A.J e Soame, J.M. (2004) The effects of climate change on the reproduction of coastal invertebrates. *Ibis*. 146: 29-39.

- Lorenzzetti, J. e Gaeta, S. (1996) The Cape Frio upwelling effect over the south brazil bight northern sector shelf waters: a study using AVHRR images. *International Archives of Photogrammetry and Remote Sensing*, 31 (part B7).
- Macho, G; Molares, J.e Vásquez, E. (2005) Timing of larval release by three barnacles from the NW Iberian Peninsula. *Marine Ecology Progress Series*, 298: 251-260.
- Marcus, N. H. (1985) Endogenous control of spawning in a marine copepod. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 91: 263-269.
- Menaker, M. (1971) Rhythms, reproduction, and photoreception. *Biology of Reproduction*, 4: 295-308.
- Morgan, S.G e Christy, J.H. (1994) Plasticity, constraint, and optimality in reproductive timing. *Ecology*, 75(8): 2185-2203.
- Morgan, S.G; Christy, J.H. e Lacey, R. (1995) Adaptive significance of the timing of larval release by crabs. *The American Naturalist*, 145(3): 457-479.
- Morgan, S.G. (1996) Influence of tidal variation on reproductive timing. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 206 (1-2): 237-251.
- Morgan, S. G. e Christy, J. H. (1997) Planktivorous fishes as selective agents for reproductive synchrony. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 209: 89- 101.
- Muthiga, N.A. (2006) The reproductive biology of a new species of sea cucumber, *Holothuria* (Mertensiothuria) *arenavaca* in a Kenyan marine protected area: the possible role of light and temperature on gametogenesis and spawning. *Marine Biology*, 149(3): 585-593.
- Naylor E. (2005) Chronobiology: implications for marine resource exploitation and management. *Scientia Marina*, 69(S1): 157-167.
- Neumann, D. (1975) Lunar and tidal rhythms in the development and reproduction of an intertidal organism. Em *Physiological adaptation to the environment*. Editado por F. J. Vernberg, Intext Educational Publ., Nova Iorque, pp. 451-463.
- Neumann, D. (1976) Adaptations of chironomids to intertidal environments. *Annual Review of Entomology*, 21: 387-414.
- Neumann, D. (1978) Entrainment of a semilunar rhythm by simulated tidal cycles of mechanical disturbance. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 35: 73-85.
- Neumann, D. e Heimbach, F. (1984) Time cues for semilunar reproduction rhythms in european populations of *Clunio marinus*. II. The influence of tidal temperature cycles. *Biological Bulletin*, 166: 509-524.
- Newell, R.I.E; Hilbish, T.J; Koehn, R.K. et al. (1982) Temporal variation in the reproductive cycle of *Mytilus edulis* L. (Bivalvia, Mytilidae) from localities on the east coast of the United States. *The Biological Bulletin*, 162: 299-310.

- Olive, P.J.W. (1975). Reproductive biology of *Eulalia viridis* (Müller) (Polychaeta: Phyllodocidae) in the north eastern U.K.. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 55: 313-326.
- Olive, P.J. (1992) The adaptative significance of seasonal reproduction in marine invertebrates. *Invertebrate Reproduction and Development*, 22(1-3): 165-174.
- Olive, P.J. (1995) Annual breeding cycles in marine invertebrates and environmental temperature: probing the proximate and ultimate causes of reproductive. *Journal of Thermal Biology*, 20(1-2): 79-90.
- Orton, J.H. (1920). Sea-temperature, breeding and distribution in marine animals. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 12 : 339-366.
- Palmer, J.D. (1991) Contributions made to chronobiology by studies of fiddler crab rhythms. *Chronobiology International*, 8(2): 110-130.
- Palmer, J.D. (1995) *The biological rhythms and clocks of intertidal animals*. Oxford University Press, Nova Iorque, 217p.
- Patel, B. (1959) The influence of temperature on the reproduction and moulting of *Lepas anatifera* L. under laboratory conditions. *Journal of Marine Biology Association of the UK*, 38(3): 589-597.
- Patel, B. e Crisp, D. (1960) The influence of temperature on the breeding and the moulting activities of some warm-water species of operculate barnacles. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*. 39(03): 667–680.
- Pearse, J.S. e Eernisse, D.J. (1982) Photoperiodic regulation of gametogenesis and gonadal growth in the sea star *Pisaster ochraceus*. *Marine Biology*, 67(2): 121-125.
- Petes, L.E; Menge, B.A. e Murphy, G.D. (2007) Environmental stress decreases survival , growth, and reproduction in New Zealand mussels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 351: 83-91.
- Petes, L.E; Menge, B. e Harris, A. (2008) Intertidal mussels exhibit energetic trade-offs between reproduction and stress resistance. *Ecological Monographs*, 78(3): 387-402.
- Pilsbry, H. A. (1916) The sessile barnacles (Cirripedia) contained in the collection of the U.S. National Museum including a monograph of the American species. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 103: 185-188.
- Pyper, B.J. e Peterman, R.M. (1998) Comparison of methods to account for autocorrelation in correlation analyses of fish data. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55: 2127-2140.
- Rayner, J.N. (1971) *An introduction to spectral analysis*. Pion Press, Londres.

- Rees, S.W. & Olive, P.J.W. (1999). Photoperiodic changes influence the incorporation of vitellin yolk protein by the oocytes of the semelparous polychaete *Nereis* (Neanthes) *virens*. *Comparative Biochemistry and Physiology part A*, 123: 213–220.
- Roff, D.A. (1992). *Evolution of life histories: theory and analysis*. Chapman and Hall, Nova Iorque, EUA.
- Saigusa, M. (1981) Adaptive significance of a semilunar rhythm in the terrestrial crab *Sesarma*. *The Biological Bulletin*, 160(2): 311-321.
- Saigusa, M. (1982) Larval release rhythm coinciding with solar day and tidal cycles in the terrestrial crab *Sesarma*- harmony with the semilunar timing and its adaptative significance. *Biological Bulletin*, 162: 371-386.
- Saigusa, M. (1985) Tidal timing of larval release activity in non-tidal environment. *Japanese Journal of Ecology*, 35(2): 243–251.
- Sastry, A. (1963) Reproduction of the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. Influence of temperature on maturation and spawning. *Biological Bulletin*, 125(1): 146–153.
- Schreck C; Contreras-Sanchez, W. e Fitzpatrick, M. (2001) Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, 197(1-4): 3-24.
- Shoaf, W.T. e Lium, B.W. (1976) Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethyl sulfoxide. *Limnology and Oceanography*, 21(6): 926-928.
- Schroeder, P. C. (1984) A summary of the endocrine control of gametogenesis in invertebrates other than insects. Em: *Advances in Invertebrate Reproduction 3*. Edited by Engels W. et al. pp. 203-211.
- Silvegren, G; Löfstedt, C. e Rosén, W.Q. (2005) Circadian mating activity and effect of pheromone pre-exposure on pheromone response rhythms in the moth *Spodoptera littoralis*. *Journal of Insect Physiology*, 51(3): 277-286.
- Skadsheim, A. (1989) Regional variation in amphipod history: effects of temperature and salinity on breeding. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 127(1): 25-42.
- Skov, M.W; Hartnoll, R.G; Ruwa, R.K, et al. (2005) Marching to a different drum: crabs synchronize reproduction to a fourteen month lunar-tidal cycle. *Ecology*, 86(5): 1164-1171.
- Snell, T.W. e Morris, P.D. (1993). Sexual communication in copepods and rotifers. *Hydrobiologia*, 255/256: 109–116.
- Starr, M; Himmelman, J.H. e Therriault, J.C. (1990) Direct coupling of marine invertebrate spawning with phytoplankton blooms. *Science*, 247(4946): 1071-4.
- Starr, M; Himmelman, J.H. e Therriault, J.C. (1991) Coupling of nauplii release in barnacles with phytoplankton blooms: a parallel strategy to that of spawning in urchins and mussels. *Journal of Plankton Research*, 13(3):561-571.

- Stearns, S.C. (1992). *The evolution of life histories*. Oxford University Press, EUA, 264 pp.
- Shoaf, W. T.; Lium, B. W. (1976). Improved extraction of chlorophyll-A and chlorophyll-B from algae using dimethyl-sulfoxide. *Limnology And Oceanography*, 21: 926-928.
- Thurman ,C.L. (2004) Unravelling the ecological significance of endogenous rhythms in intertidal crabs. *Biological Rhythm Research*, 35(1): 43–67.
- Villanueva, R.D; Yap, H. e Montaña, M.N.E. (2008) Timing of planulation by pocilloporid corals in the northwestern Philippines. *Marine Ecology Progress Series*, 370: 111-119.
- Vries, M.C. e Forward, R.B. (1989) Rhythms in larval release of sublittoral crab *Neopanope sayi* and the supralittoral crab *Sesarma cinereum* (Decapoda: Brachyura). *Marine Biology*, 100(2): 241-248
- Walther, G.R; Post, E; Convey, P. et al. (2002) Ecological responses to recent climate change. *Nature*, 416 (6879): 389–395.
- Watson, G.(2003) The role of chemical signals in the spawning induction of polychaete worms and other marine invertebrates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.294(2):169-187.
- Wissel, C. e Brandl, R. (1988) A model for the adaptative significance of partial reproductive synchrony within social units. *Evolutionary Ecology*, 2(2): 102-114.
- Yan, Y. e Miao, S. (2004) The effect of temperature on the reproduction cycle of the tropical barnacle *Chthamalus malayensis* PILSBRY (CIRRIPIEDIA). *Crustaceana*, 77(2): 205-212.
- Young, P.S. (1993) Verrucomorpha e Chthamaloidea from the Brazilian Coast (Crustacea:Cirripedia). *Revista Brasileira de Biologia*, 53 (2): 255-267.
- Yoshioka E. (1989) Phase shift of semilunar spawning periodicity of the chiton *Acanthopleura japonica* (Lischke) by artificial regimes of light and tide. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 129(2): 133–140.
- Ziegler, T.A. e Forward, R.B. (2006) Larval release behaviors of the striped hermit crab, *Clibanarius vittatus* (Bosc): temporal pattern in hatching. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 335(2): 245–255.