



SETAC – Brazil

Utilização de Larvas do Cirripedia *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854) como Organismo-teste na Avaliação de Toxicidade Aguda

R. CAMARGO SOUZA, F. POLEZA, M. V. MÁXIMO & C. RESGALLA JR.*

CTTMar/UNIVALI, C.P. 360, CEP 88.302-202, Itajaí, SC, Brasil

(Received August 30, 2006; Accepted November 11, 2006)

RESUMO

No Brasil, a Ecotoxicologia é uma ciência relativamente nova e com poucas espécies de uso rotineiro em testes de toxicidade. Larvas (Naupliu) de craca têm sido utilizadas por diferentes grupos de pesquisa no mundo como organismo-teste e com uma variedade de métodos e aplicações. Esse organismo tem como vantagens sua facilidade de obtenção em campo, disponibilidade ao longo do ano e fácil manipulação em laboratório. O uso desses organismos, no Brasil, ainda é limitado a testes da atividade de substâncias antiincrustantes e praticamente nada foi feito para investigar sua sensibilidade para uso na Ecotoxicologia. Este trabalho apresenta um protocolo de teste agudo utilizando larvas do Cirripedia *Megabalanus coccopoma*, um dos maiores exemplares da Subordem Balanomorpha e de ampla distribuição na costa brasileira. Foi investigada a sensibilidade de Naupliu II ante o sulfato de zinco e seu efeito sobre a mobilidade e a mortalidade. Naupliu de *M. coccopoma* foram obtidos de lamelas ovígeras de adultos e utilizados em testes de toxicidade sob efeito de sulfato de zinco, em experimentos estáticos de 48 horas e com a quantificação de organismos de baixa mobilidade e mortos a cada 12 horas. Nos testes de mobilidade a CE_{50} Incipiente de $0,24 \text{ mg L}^{-1}$ (Zn) foi obtida em 24 horas, enquanto a CL_{50} Incipiente de $0,27$ e $0,22 \text{ mg L}^{-1}$ (Zn) ocorreu em 36 e 48 horas, respectivamente. Observou-se que não houve diferença significativa entre os valores de CE_{50} e CL_{50} , o que permite o desenvolvimento dos testes em 24 horas para mobilidade ou de 48 horas para o de mortalidade. Os valores de CE_{50} e CL_{50} para a espécie demonstram sensibilidade similar ao misidáceo *Mysidopsis juniae* e ao Copepoda *Acartia lilljeborgi*.

Palavras-chave: Cirripedia, *Megabalanus coccopoma*, testes de toxicidade, Naupliu.

ABSTRACT

Barnacle larvae of *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854) as toxicity test organisms

In Brazil, Marine Ecotoxicology is a relatively new science with few species routinely used in toxicity tests. Barnacle larvae (Naupliu) have been used for different research groups in the world as test organisms with a variety of methods and applications. These organisms have the advantages of easy obtainment in the field, availability throughout the year and easy manipulation in the lab. The use of these organisms in Brazil is still limited to tests of the activity of anticrustant substances and few work has been done to investigate their sensitivity as test-organisms in Ecotoxicology. This work presents a standard operating procedure to perform toxicity tests with naupliu of the barnacle *Megabalanus coccopoma* one of the biggest exemplars of the subordem Balanomorpha and of great distribution around the Brazilian coast. The sensitivity of naupliu II to Zinc (Zn) was evaluated through mobility and mortality endpoints. Nauplius of the *M. coccopoma* were obtained from egged lamels of adults and used in 48 hours toxicity tests to assess the effect of zinc sulphate in static experimental conditions; poorly mobile and dead organisms were quantified every 12 hours. On the mobility tests, the EC_{50} of 0.24 mg L^{-1} (Zn) was obtained following 24 hours exposure; whilst the LC_{50} of 0.27 and 0.22 mg L^{-1} (Zn) were obtained following 36 and 48 hours of exposure, respectively. Significant differences were not observed between the EC_{50} and LC_{50} values for zinc therefore allowing the development of 24 h mobility and 48 h mortality tests. The EC_{50} ; 24 h and LC_{50} ; 48 h for zinc demonstrate similar sensitivity between the studied species the mysids *Mysidopsis juniae* and the copepod *Acartia lilljeborgi*.

Key words: barnacle, Naupliu, *Megabalanus coccopoma*, acute tests.

*Corresponding author: Charrid Resgalla Jr., e-mail: cresgalla@univali.br.

INTRODUÇÃO

Megabalanus coccopoma é uma espécie de Cirripedia originária da costa leste do pacífico tropical da América Central e Sul e tem sido introduzida com sucesso no Sudeste brasileiro em águas rasas e fixas em estruturas disponibilizadas pelo homem (ACME, 2001). Segundo Young (1995), *M. coccopoma* vem competindo diretamente com a espécie nativa *M. tintinnabulum*. *M. coccopoma* apresenta, hoje, densidades superiores às da espécie nativa na área do sublitoral brasileiro. De qualquer forma, a invasão de *M. coccopoma* não parece ser um processo recente, já que foi registrada para a costa de Santa Catarina, na baía de Zimbros, desde 1961 (Young, 2000).

Em um estudo de larvas de Cirripedia na enseada da Armação do Itapocoroy, litoral norte de Santa Catarina, Severino (2000) e Severino & Resgalla Jr. (2005) observaram a dominância de *M. coccopoma* entre as espécies de cracas na região, assim como sua ocorrência contínua ao longo de todo o ano. Esse ciclo reprodutivo, sem sazonalidade marcada, é de fundamental importância nos estudos ecotoxicológicos. As facilidades de obtenção de embriões ou estágios larvais de invertebrados marinhos em laboratório é uma das principais técnicas necessárias ao desenvolvimento de testes ecotoxicológicos. Além disso, Severino (2000) e Severino & Resgalla Jr. (2005) realizaram detalhado estudo sobre as descrições morfológicas de cada estágio de desenvolvimento, assim como o tempo necessário para a sua obtenção em condições laboratoriais.

Testes de toxicidade com o uso de larvas de Cirripedia têm sido realizados por diferentes autores, assim como variações em suas metodologias. Blundo (1978) utilizou larvas de Cirripedia para avaliar a toxicidade de derivados de petróleo em testes agudos de curta duração. Efeitos nas taxas de assentamento das larvas de Cirripedia têm sido utilizados pela CCME (2001) para avaliar a toxicidade de surfactantes. As mesmas substâncias foram utilizadas por Cox (1996) para avaliar o efeito letal sobre larvas de cracas. Entretanto, os estudos mais frequentes, utilizando larvas de Cirripedia, envolvem alterações comportamentais, como a sua fototaxia (Wu *et al.*, 1997a; 1997b; Lam *et al.*, 2000).

No Brasil, o grupo de pesquisa do IEAPM (Marinha do Brasil) vem utilizando essas larvas para estudos de substâncias naturais antiincrustantes, com aplicação direta em tintas *antifouling* de embarcações da marinha brasileira e da marinha mercante (Valentin & Coutinho, 1988). Nesses estudos é investigada a inibição de acatamento das larvas em substratos artificiais tratados com substâncias inibidoras ou *antifouling*.

Em função de sua ampla utilização e características biológicas, o presente estudo investigou a sensibilidade das larvas de *M. coccopoma* ante o sulfato de zinco e propôs um protocolo para a execução de testes de toxicidade de curta duração.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de reprodutores e de larvas de Megabalanus coccopoma

Os reprodutores ou adultos de cracas da espécie *Megabalanus coccopoma* foram obtidos no sistema *long-line* de cultivo de moluscos marinhos da enseada da Armação do Itapocoroy, litoral norte de Santa Catarina (Brasil), em 13 coletas realizadas entre fevereiro de 2005 e março de 2006. Ovos fecundados e em estágios avançados de desenvolvimento foram obtidos de cracas adultas segundo o método de Costlow & Bookhout (1960) e Rice & Williamson (1970) para crustáceos, que consistiu em:

1. Retirada das lamelas ovíferas de adultos de cracas por rompimento da carapaça calcária. Para isso foram utilizados no mínimo 50 organismos adultos obtidos em campo.
2. Seleção das lamelas com ovos em estágio avançado de desenvolvimento.
3. Lavagem das lamelas em água do mar filtrada e esterilizada.
4. Manutenção das lamelas em frascos de 200 mL com água do mar natural filtrada e esterilizada a 20°C e 30‰, com fraca aeração até a eclosão dos ovos.

O tempo de espera para a eclosão dos ovos variou de 24 a 72 horas. Após a eclosão, as larvas foram concentradas em beakers de 200 mL com água do mar filtrada e esterilizada (20°C e 30‰) para imediata utilização nos testes de toxicidade. O volume de manutenção foi ajustado para densidade de 10 a 20 larvas por mL.

Testes agudo com larvas de Megabalanus coccopoma

Foram executados 13 testes de toxicidade utilizando a substância de referência sulfato de zinco ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$). Como *end point* dos experimentos, foram avaliados os percentuais de redução da mobilidade de natação dos nauplius e a sua mortalidade. Para avaliação da mobilidade de natação, foram consideradas com efeito larvas com movimento mas sem apresentar deslocamento vertical e horizontal. O tempo de exposição máxima dos experimentos foi de 48 horas e com avaliação de efeito a cada 12 horas.

Os testes foram realizados em placas multipoços com um volume final de 2 mL da solução-teste em seis concentrações mais o controle e com três réplicas por concentração. A água de diluição utilizada foi a mesma de manutenção. Em cada poço foram transferidos de 10 a 20 nauplius de *M. coccopoma* recém-eclosados (Estágio II). Foram considerados válidos os testes cujos resultados ao final do período de exposição apresentaram redução da mobilidade e mortalidade inferior a 20% nos poços-controle, caso contrário o teste era considerado inválido. Os testes foram executados nas condições-padrão de salinidade a 30‰ e na temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12:12.

Foram ainda realizados experimentos de sobrevivência das larvas em diferentes salinidades e avaliada a sensibilidade ante o sulfato de zinco em duas condições de salinidade (20 e 30‰) e temperatura (20 e 25°C).

Após o estabelecimento do protocolo dos testes de toxicidade com o nauplius de *M. coccopoma* foram realizados testes de toxicidade com outras substâncias de referência de uso comum em experimentos marinhos, incluindo dodecil sulfato de sódio (DSS), dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) e cloreto de amônia (NH_4Cl) para a comparação de sua sensibilidade com outros organismos-teste.

Os valores de CE_{50} e CL_{50} foram estimados pelo método Trimmed Spearman-Kärber utilizando-se o programa TSK versão 1.5 (EPA, Cincinnati, Ohio). As cartas-controle foram elaboradas segundo USEPA (2002), modificadas segundo recomendações de Greenberg *et al.* (1992).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Disponibilidade de lamelas ovígeras e tempo de eclosão

Das 13 coletas realizadas em um ano de amostragem apenas 3 não apresentaram desovas viáveis para a execução dos experimentos, com percentuais de efeito superiores a 20% no controle. Estes resultados indicam que há disponibilidade de material biológico para a execução dos testes de toxicidade durante todos os meses do ano, confirmando a ausência de sazonalidade em seu ciclo reprodutivo, destacado por Severino (2000) e Severino & Resgalla Jr. (2005).

O tempo necessário para a eclosão dos ovos em laboratório foi de menos de 24 horas a 72 horas, sendo o tempo predominante de 24 a 48 horas de espera para uso das larvas em testes de toxicidade. Uma prática que auxiliou a reduzir o tempo de espera foi a aeração das lamelas após a retirada dos adultos.

Tempo de teste e end point

Através dos testes realizados com o tóxico de referência sulfato de zinco, foi determinado o tempo mínimo de execução dos experimentos. Segundo os resultados apresentados na Figura

1, são necessárias 24 horas para a realização dos testes de mobilidade e 36 horas para os de mortalidade. Esses tempos foram determinados a partir da estabilização dos valores de CE_{50} e CL_{50} , que indicam as concentrações incipientes para cada experimento. Para os experimentos de mortalidade, o tempo de exposição adotado foi de 48 horas por questões de praticidade de trabalho entre o início e o término dos experimentos. O tempo de teste estabelecido é equivalente ao protocolo de 48 horas para Copepodas (CETESB, 1992a) e mais rápido que o de Mysidáceos com 96 horas (CETESB, 1992b).

Observou-se também grande similaridade entre os valores de CE_{50} e CL_{50} obtidos nos experimentos de mobilidade em 24 horas e de mortalidade em 36 e 48 horas. Nos testes de mobilidade, a CE_{50} média foi de 1,06 mg L⁻¹ (sulfato de zinco), enquanto a CL_{50} foi de 1,19 mg L⁻¹ em 36 horas e 0,99 mg L⁻¹ em 48 horas (Tabela 1). Segundo os resultados da ANOVA (para $p < 0,05$), não há diferenças significativas entre esses valores, permitindo a execução dos diferentes experimentos sem comprometer o resultado final. Deve-se, entretanto, ser avaliado o tipo de efeito em função das características do produto a ser testado, evitando o uso do efeito de mobilidade em substâncias que interferem nessa atividade (por exemplo, alta viscosidade ou a formação de precipitados).

Segundo Axiak (1991), é de conhecimento, em Ecotoxicologia, que os efeitos subletais precedem a letalidade e que ocorrem em menor concentração mas com maior tempo de exposição. O clássico trabalho de Pyefinch & Mott (1948) destaca essa característica utilizando larvas de *Balanus balanoides* sob efeito de sulfato de cobre com CE_{50} de 0,01 a 0,024 mg L⁻¹ em 7 a 8 dias de teste e CL_{50} de 0,34 a 0,46 mg L⁻¹ para 6 horas de exposição. Entretanto, os resultados obtidos no presente trabalho, sob efeito de zinco, demonstram concentrações similares para efeitos subletais e letais, mas com tempo de exposição menor para os efeitos subletais. A variabilidade observada pode ser atribuída ao tipo de efeito subletal considerado e, principalmente, às condições de execução dos testes de toxicidade.

Tabela 1 – Valores médios de CE_{50} (mobilidade) e CL_{50} (mortalidade) e desvio-padrão (DP) para o sulfato de zinco (mg L⁻¹) em experimentos de mobilidade e mortalidade utilizando larvas de *M. coccopoma* em diferentes tempos de exposição.

Tempo (horas)	CE_{50} (DP)	CL_{50} (DP)
12	2,88 (0,89)	5,28 (1,10)
24	1,06 (0,43)	2,53 (0,98)
36	0,71 (0,41)	1,19 (0,59)
48	0,65 (0,42)	0,99 (0,46)

Carta-control de sensibilidade

Observou-se que a variação dos valores de CL_{50} nos testes de mortalidade foram maiores que os de CE_{50} nos de mobilidade, apresentando limites superior e inferior mais amplos (Figura 2). Além disso, o número de testes fora dos limites da amplitude de variação foram 2 nos testes de mobilidade (25%) e 3 nos testes de mortalidade (30%). Os coeficientes de variação (CV) foram de 32,26% e 38,99% para os testes de mobilidade e mortalidade, respectivamente. Estes resultados demonstram que os testes de mobilidade apresentam maior precisão e que há certa variabilidade dos experimentos, a qual pode ser reduzida com melhor treinamento do operador e maior número de larvas por poço-teste. Segundo USEPA (2002), valores de CV de até 45% são observados em estudos de precisão intra e interlaboratorial.

Variações de sensibilidade com a salinidade e temperatura

Larvas de *M. coccopoma* apresentaram alta resistência quanto às variações de salinidade, mostrando sobrevivência acima de 80% em salinidades superiores a 20‰ (Figura 3). As características eurihalinas de nauplius de Cirripedia têm sido destacadas por Bougis (1976) e Raymond (1983), sendo por isso um organismo meroplânctônico típico de regiões

estuarinas. Larvas de Cirripedia são também euritérmicas, principalmente pelo fato de que sua liberação natural frequentemente está relacionada a processos de choques térmicos, comuns entre as estações do ano (Severino & Resgalla Jr., 2005).

Testes com a substância de referência sulfato de zinco na salinidade extrema de sobrevivência (20‰) e a 25°C (Tabela 2) apresentaram resultados de CE_{50} (testes de mobilidade) e CL_{50} (testes de mortalidade) dentro da faixa de aceitação segundo a carta-control de sensibilidade (Figura 2). Esse fato destaca a possibilidade de execução dos experimentos em ampla faixa de aplicação, envolvendo tanto as características dos efluentes a serem testados quanto a distribuição geográfica de ocorrência da espécie.

Protocolo dos testes agudos com nauplius de *Megabalanus coccopoma*

Um protocolo de execução de teste de toxicidade para larvas de *M. coccopoma* é proposto com base nos resultados obtidos nos experimentos de tempo de exposição, carta-control e sensibilidade ante a salinidade e a temperatura. Na Tabela 3 são apresentados os requisitos básicos para a execução dos testes de mobilidade e mortalidade.

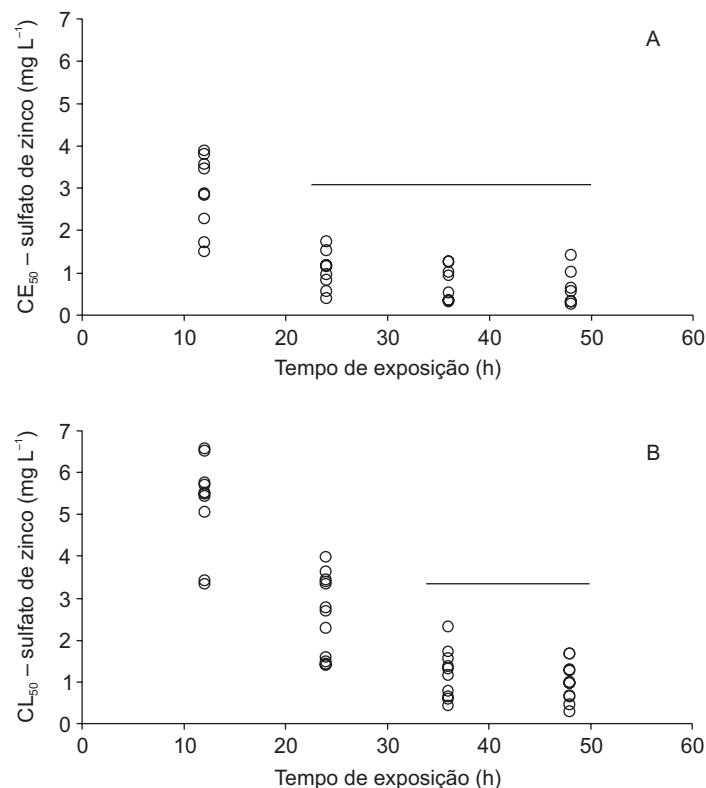


Figura 1 – Relação entre o tempo de exposição ou duração do teste e os valores de CE_{50} (A – mobilidade) e CL_{50} (B – mortalidade) sob efeito do sulfato de zinco ($mg L^{-1}$). A barra indica os tempos significativamente semelhantes segundo ANOVA e teste de Tukey *a posteriori* para $p < 0,05$.

Tabela 2 – Valores de CE_{50} ; 24 h e CL_{50} ; 48 h (e intervalo de confiança de 95%) de larvas de *M. coccopoma* sob efeito de sulfato de zinco em experimentos a 20‰ (a 20°C) e a 25°C (a 30‰).

	Mobilidade CE_{50}; 24 horas	Mortalidade CL_{50}; 48 horas
Salinidade (20‰-20°C)	1,03 mg L ⁻¹ (0,92-1,16)	0,78 mg L ⁻¹ (0,70-0,87)
Temperatura (25°C-30‰)	–	0,92 mg L ⁻¹ (0,84-1,00)

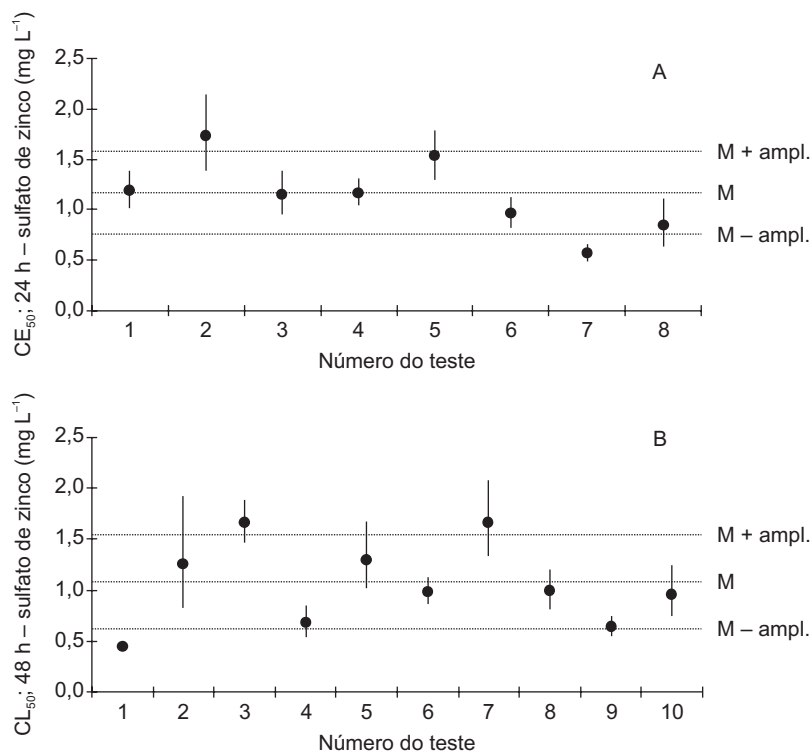


Figura 2 – Valores de CE_{50} e CL_{50} (ponto), intervalo de confiança de 95% (barra vertical), média da CE_{50} e CL_{50} (M), limite superior (M + ampl.) e inferior (M – ampl.) da amplitude de variação do intervalo de confiança de 95%.

Comparativamente, o protocolo proposto apresenta uma definição quanto ao tempo de duração do experimento, já que há, para larvas de Cirripedia, falta de padronização, podendo variar de 6 a 96 horas para testes letais (Lang *et al.*, 1981).

Sensibilidade de nauplius de *Megabalanus coccopoma* em testes agudos

A sensibilidade dos nauplius de *M. coccopoma* ante diferentes tóxicos de referência, como zinco, cobre, cromo, o detergente dodecil sulfato de sódio (DSS) e amônia não ionizada, está representada na Tabela 4. Na mesma tabela são também apresentados resultados obtidos com diferentes crustáceos planctônicos que vêm sendo utilizados em testes de toxicidade no Brasil. *M. coccopoma* tem mostrado

sensibilidade comparada a outros crustáceos, incluindo outras espécies de Cirripédios como *Balanus improvisus*.

CONCLUSÕES

Em função das características biológicas, as larvas de Cirripedia apresentam grande potencial de aplicabilidade de uso em testes de toxicidade, destacando-se:

1. São organismos abundantes, de ampla distribuição na costa brasileira e de importância ecológica no sistema bentônico de substratos duros.
2. Apresentam reprodução contínua ao longo do ano, conseqüentemente, há disponibilidade de larvas em qualquer período.

3. Há conhecimento de sua biologia e histórico no uso de testes de toxicidade.
4. São de fácil obtenção no meio e manutenção sem a necessidade de seu cultivo e de custo elevado em laboratório.
5. Podem ser utilizados em amplo intervalo de salinidade (> 20‰) e temperatura (20 e 25°C).
6. Apresentam sensibilidade similar a outros crustáceos planctônicos.

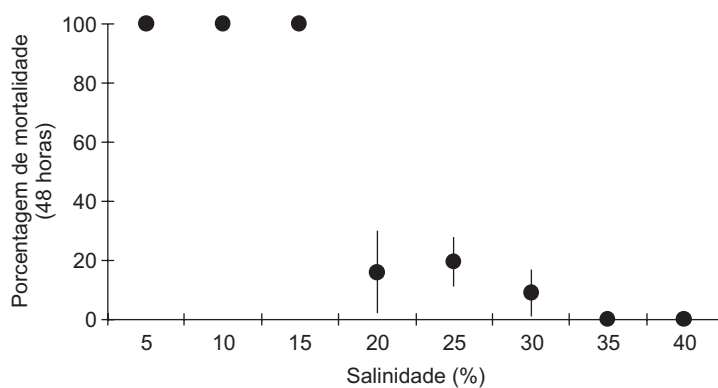


Figura 3 – Porcentagem de mortalidade de larvas de *M. coccopoma* mantidas por 48 horas em diferentes salinidades.

Tabela 3 – Protocolo de teste de toxicidade aguda com nauplius de *Megabalanus coccopoma*.

Requisitos	Condições	
Tipo de ensaio	Estático	
Organismo-teste	Nauplius II de <i>Megabalanus coccopoma</i>	
Água de diluição	Água natural marinha filtrada	
Volume mínimo da solução-teste	2 mL	
Número mínimo de replicatas por diluição	3	
Número de organismos por replicata	Mínimo de 10 e máximo de 20	
Aeração	não	
Alimentação	não	
pH	7 a 9	
Salinidade	20 a 35‰	
Temperatura	20 a 25°C	
Fotoperíodo	12 h luz e 12 h escuro	
Efeito observado	Mobilidade	Mortalidade
Duração do teste	24 horas	48 horas
Período para a quantificação do número de organismos afetados	Não necessita	A cada 24 horas
Validade do teste	Máximo de 20% de efeito no controle	

Tabela 4 – Valores de CL_{50} em $mg L^{-1}$ para diferentes substâncias utilizando nauplius de *Megabalanus coccopoma* e de outros crustáceos utilizados em testes de toxicidade segundo diferentes autores.

Organismo-teste	Tempo de teste	Zn	Cu	Cr	DSS	NH ₃	Autores
<i>Acartia lilljeborgi</i> (Copepoda)	48 horas	0,32 a 0,89	0,24	–	1,4 a 2,6	–	Nipper <i>et al.</i> (1993) e Resgalla Jr. & Laitano (2002)
<i>Temora stylifera</i> (Copepoda)	48 horas	0,03 a 1,56	0,02	–	2,31 a 3,0	–	Nipper <i>et al.</i> (1993) e Resgalla Jr. & Laitano (2002)
<i>Mysidopsis juniae</i> (Mysidacea)	96 horas	0,34 a 0,41	0,03	3,66	2,3	0,42	Nipper <i>et al.</i> (1993) e Resgalla Jr. & Laitano (2002)
<i>Balanus improvisus</i> (Cirripedia)	48 horas	–	0,01 a 0,10	–	–	–	Lang <i>et al.</i> (1981)
<i>Megabalanus coccopoma</i> (Cirripedia)	48 horas	0,06 a 0,44	< 0,06	1,9	1,7	0,21	Este trabalho

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACME, 2001, Advisory Committee on the Marine Environment. *Report of the working group on introductions and transfers of marine organisms*. Barcelona, Spain. ICES CM 2001/ACME:08 Ref. E, F. 104p.
- AXIAK, V., 1991, Sublethal toxicity test: physiological respos. In: P. D. Abel & AXIAK V. (eds.), *Ecotoxicology and the marine environment*. Ellis Horwood Limited.
- BLUNDO, R., 1978, The toxic effects of the water soluble fractions of No. 2 fuel oil and of three aromatic hydrocarbons on the behavior and survival of barnacle larvae. *Contr. Mar. Sci.*, 21: 25-37.
- BOUGIS, P., 1976, *Marine plankton ecology*. North Holland. Publ. Comp., Amsterdam, 355p.
- CCME, 2001, Canadian Council of Ministers of the Environment. *Canadian water quality guidelines of the protection of aquatic life. Nonylphenol and its Ethoxylates*. EPPC – Agenda #8 – Att 2. 8p.
- CETESB, 1992a, *Água do mar – teste de toxicidade aguda com Acartia lilljeborgi Giesbrecht, 1892*. L5.024, 21p.
- CETESB, 1992b, *Água do mar – teste de toxicidade aguda com Mysidopsis juniae Silva, 1979*. L5.251, 19p.
- COSTLOW, J. D. & BOOKHOUT, C. G., 1960, A method for developing Brachyuran eggs in vitro. *Limnol. Oceanogr.*, 5: 212-215.
- COX, C., 1996, *Inert ingredient fact sheet. Nonyl Phenol and related chemical*. *J. Pesticide Reform.*, 16: 15-20.
- GREENBERG, A. E., CLESCERI, L. S. & EATON, A. D., 1992, *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 18. ed. American Public Health Association, Washington, D. C. 400p.
- LAM, P. K. S., WO, K. T. & WU, R. S. S., 2000, Effects of cadmium on the development and swimming behavior of barnacle larvae *Balanus amphitrite* Darwin. *Env. Toxicol.*, 15: 8-13.
- LANG, W. H., MILLER, D. C., RITACCO, P. J. & MARCY, M., 1981, The effects of copper and cadmium on the behavior and development of barnacle larvae. pp. 165-203. In: F. J. Vernberg, A. Calabrese, F. P. Thurberg & W. B. Vernberg (eds.), *Biological Monitoring of Marine Pollutants*, Academic Press.
- NIPPER, M. G., BADARÓ-PEDROSO, C., JOSÉ, V. F. & MELO, S. L. R., 1993, Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Mysis and Copepods. *Bull. Envirom. Contam. Toxicol.*, 51: 83-95.
- PYEFINCH, K. A. & MOTT, J. C., 1948, The sensitivity of barnacles and their larvae to copper and mercury. *J. Exp. Biol.*, 25: 276-298.
- RAYMOND, J. E. G., 1983, *Plankton and productivity in the oceans*. 2. ed. Vol. 2. Zooplankton. Pergamon Press, Oxford, 382p.
- REGALLA Jr., C. & LAITANO, K., 2002, Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. *Notas Téc. Facimar*, 6: 153-163.
- RICE, A. L. & WILLIAMSON, D. I., 1970, Methods for rearing larval decapod Crustacea. *Helgoländer wiss. Meer.*, 20: 417-434.
- SEVERINO, A. & REGALLA Jr., C., 2005, Descrição dos estágios larvais de *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854) e sua variação temporal na enseada de Itapocoroy (Santa Catarina, Brasil). *Rev. Atlântica*, 27: 5-16.
- SEVERINO, A., 2000, *Taxonomia e variação temporal de larvas de Cirripedia na praia de Armação, Penha, Santa Catarina*. Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Oceanografia, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC, 43p.
- USEPA, 2002, *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms*. 3. ed. Washington. EPA-821-R-02-014.
- VALENTIN, J. L. & COUTINHO, R., 1988, Programa de Biologia Marinha e a participação do IEAPM em estudos de incrustação. *Publicação do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM)*, 211: 123-136.

WU, R. S. S., LAM, P. K. S. & ZHOU, B. S., 1997a, A phototaxis inhibition assay using barnacle larvae. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 12: 231-236.

WU, R. S. S., LAM, P. K. S. & ZHOU, B. S., 1997b, Effects of two oil dispersants on phototaxis and swimming behaviour of barnacle larvae. *Hydrobiologia*, 352: 9-16.

YOUNG, P. S., 1995, New interpretations of South American patterns of barnacle distribution. In: F. R. Schran & J. T. Hoeg (eds.), *New frontiers in barnacles evolution. Crustacean Issues*, 10: 229-253.

YOUNG, P. S., 2000, Cirripedia thoracica (Crustacea) collected during the *Campagne de La Calypso (1961-1962)* from the Atlantic shelf of South America. *Zoosystema*, 22: 85-100.