

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DINÂMICA  
DOS OCEANOS E DA TERRA - DOT

Estudo sistemático de *Newmanella* Ross, 1969 (Cirripedia: Tetraclitidae) no litoral brasileiro

**Peter Prado Santana**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Dinâmica dos Oceanos e da Terra, Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ecologia Marinha.

Orientador: Dr. Fábio Bettini Pitombo

**Niterói**  
**Dezembro de 2019**

Ficha catalográfica automática – SDC/BIG  
Gerada com informações fornecidas pelo autor

S231e Santana, Peter Prado

Estudo sistemático de *Newmanella Ross*, 1969 (Cirripedia: Tetraclitidae) no litoral brasileiro / Peter Prado Santana; Fábio Bettini Pitombo, orientador. Niterói, 2019.

74 f.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2019.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/PPGDOT.2019.m.11543336710>

1. Cracas. 2. Curaçao. 3. Morfologia. 4. 12S rDNA. 5. Produção intelectual. I. Pitombo, Fábio Bettini, orientador. II. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Geociências. III. Título.

CDD -

Bibliotecária responsável: Yolle Vacariuc Bittencourt – CRB7/6040

**Peter Prado Santana**

**Estudo sistemático de *Newmanella* Ross, 1969 (Cirripedia: Tetraclitidae) no litoral brasileiro**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Dinâmica dos Oceanos e da Terra, Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ecologia Marinha.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Fábio Bettini Pitombo  
Deptº de Biologia Marinha - UFF  
(Presidente)

---

Profª. Dra. Cinthya Simone dos Santos  
Deptº de Biologia Marinha - UFF  
(Membro)

---

Prof. Dr. Daniel José Marcondes Lima  
Deptº de Biologia Marinha - UFF  
(Membro)

---

Prof. Dr. Bernardo Antonio Perez da Gama  
Deptº de Biologia Marinha - UFF  
(Suplente)

Niterói, dezembro de 2019

## Dedicatória

À minha família, cujo apoio foi fundamental: minha mãe Amélia, meu pai Rubem (*in memoriam*), e minhas irmãs, Lana e Sune.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Rubem (*in memoriam*) e Amélia, por terem investido tempo e energia em mim ao longo de todos esses anos. Sozinho eu jamais teria chegado até aqui. Ao meu pai, agradeço por ter me ensinado a ter força de trabalho e a cultura de sempre valorizar o conhecimento. Em especial, agradeço a minha mãe Amélia pelo apoio incondicional que me ofereceu, e por tamanha resiliência. Mãe, você é a maior fonte de motivação e inspiração que tenho na minha vida. Obrigado por existir e por ter dedicado o seu máximo para dar amor, carinho e educação. Agradeço também as minhas irmãs, Lana e Sune, que sempre estiveram do meu lado me apoiando e orientando, apesar das correrias da vida. Quero agradecer especialmente a minha namorada e companheira Beatriz por ter me apoiado incondicionalmente e por nunca ter titubeado em acreditar na minha capacidade. Agradeço também ao meu cunhado Túlio, cujas palavras me auxiliaram na resolução de diversas incertezas postas ao longo do caminho.

Agradeço profundamente ao meu orientador e grande amigo Fábio Pitombo. Você sempre confiou, acreditou e ajudou a transformar o meu potencial em realidade. Fábio, você foi uma das poucas pessoas que esteve ao meu lado mesmo no meu pior desempenho. Sou eternamente grato por isso. Nunca desacreditou e sempre me inspirou a acordar para a vida e a combater as mazelas que aparecem no decorrer da jornada. Seja no âmbito intelectual ou psicológico, sempre esteve ali por mim. Sou eternamente grato pela tua existência. Não há dinheiro no mundo que pague o quanto me ensinou e o que fizestes por mim. Você é muito mais que um amigo, te considero parte da minha família. Sempre te levarei comigo, és uma das minhas maiores inspirações nessa vida.

Agradeço, do fundo do meu coração, aos meus amigos Leandro Alves, Felipe Kasakewitch, Pedro Mello e Thais Valli. Estes, amigos de verdade, sempre ouviram meus desabafos, trocaram experiências e ajudaram na tomada das mais difíceis decisões. Sou muito grato por poder contar com vocês, e saibam que tudo entre nós é recíproco. Podem sempre contar comigo!

Aos meus amigos e grandes companheiros de trabalho: Filipe Schulz, Rodrigo D’Almeida, Rayssa Reis, Nivia Abreu e Maurício Scapolatempore. Vocês tornaram a rotina e todo processo de elaborar uma dissertação mais leve. Vocês são, de longe, a melhor equipe que eu poderia ter. Me orgulho demais em fazer parte da equipe craca, vocês são demais! O suporte e as experiências pessoais e profissionais compartilhadas foram de extrema valia para a conclusão desse trabalho.

Por fim, agradeço a todos os professores que contribuíram para minha formação. E, agradeço a Capes pela bolsa concedida para execução deste projeto.

# ÍNDICE

<b>1.</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Cirripedia.....	1
1.2.	Tetraclitidae .....	2
1.3.	<i>Newmanella</i> Ross, 1969.....	3
1.4.	Morfometria.....	7
1.5.	Biologia molecular .....	11
<b>2.</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>15</b>
2.1.	Objetivo geral.....	15
2.2.	Objetivos específicos .....	15
<b>3.</b>	<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>16</b>
3.1.	Material examinado .....	16
3.2.	Estrutura de tamanho.....	17
3.3.	Morfometria.....	17
3.4.	Biologia molecular .....	19
3.5.	Área de ocorrência .....	20
<b>4.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>21</b>
4.1.	Estrutura de tamanho.....	21
4.2.	Morfometria.....	23
4.3.	Biologia molecular .....	33
4.4.	Área de ocorrência .....	38
4.5.	Taxonomia .....	40
<b>5.</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>45</b>
5.1.	Estrutura de tamanho.....	45
5.2.	Morfometria.....	45
5.3.	Biologia molecular .....	47
5.4.	Área de ocorrência .....	49
<b>6.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>51</b>
<b>7.</b>	<b>Literatura Citada .....</b>	<b>52</b>

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Estrutura de tamanho dos espécimes de <i>Newmanella</i> sp. de três populações: Baía da Ribeira, Angra dos Reis - RJ; Parcel das Paredes, Caravelas – BA e Costão de Itaipu, Niterói – RJ. São fornecidos a média, desvio padrão, máximo e mínimo do comprimento basal, comprimento de abertura e altura; n= número de espécimes. ....	21
Tabela 2. Descrição dos marcos anatômicos estabelecidos nas placas operculares (tergo e escudo) para as análises morfométricas. ....	23
Tabela 3. Medidas das placas operculares (tergo e escudo) de <i>Newmanella</i> utilizadas, baseadas nas distâncias entre os marcos anatômicos. ....	24
Tabela 4. Valores das razões entre as diferentes medidas do tergo e escudo dos espécimes de <i>Newmanella</i> coletados no Brasil e Curaçao ( <i>Newmanella</i> sp.), Porto Rico ( <i>N. radiata</i> ), Panamá ( <i>N. kolosvaryi</i> ), e Taiwan ( <i>N. spinosus</i> ). Valores de tamanho amostral (n), média (x) e desvio padrão (s) estão fornecidos para cada espécie. ....	25
Tabela 5. Lista das espécies de <i>Newmanella</i> que tiveram o gene mitocondrial 12S rRNA amplificados no presente estudo. ....	33
Tabela 6. Estimativa da divergência evolutiva, usando o modelo Kimura 2-parâmetros, entre sequências de <i>Newmanella</i> sp. coletados em Angra dos Reis – RJ, Brasil (PNR002 até PNR040), Piscadera - Curaçao (PNR103 e PNR104) e Porto Belo, Panamá (PNR106 e PNR133). ....	34
Tabela 7. Lista das sequências do gene mitocondrial 12S rRNA de <i>Newmanella radiata</i> e <i>Newmanella spinosus</i> , disponibilizada no GenBank, com a localidade de coleta e o número de acesso no GenBank. ....	35
Tabela 8. Divergência evolutiva entre <i>Newmanella</i> sp. da Baía da Ribeira, Angra dos Reis – RJ, Brasil e demais espécies de <i>Newmanella</i> , utilizando sequências do gene mitocondrial 12S rRNA e baseada no modelo Kimura 2-parâmetros. Os valores de média, desvio padrão, máximos e mínimos, e número de espécimes estão fornecidos. ....	36
Tabela 9. Ocorrência de <i>Newmanella</i> sp. e <i>N. radiata</i> (sensu Young, 1995) no litoral brasileiro, obtidos a partir dos registros na coleção do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Cirripédia – UFF (CCUFF), Coleção do Museu Nacional – UFRJ e dados da literatura. ....	39

## Lista de Figuras

- Figura 1. Representação de *Lepas indiae orientalis ex violaceo radiata* (Martini & Chemnitz, 1785). Primeiro registro de *Newmanella* Ross, 1969 na literatura, anterior ao sistema binomial de Linnaeus (1758).....4
- Figura 2. Representação de *Newmanella hentscheli*, espécie descrita e publicada por Kolosváry, 1942. .... 16
- Figura 3. Medidas utilizadas para estimar a estrutura de tamanho de *Newmanella* sp. (A) visão superior, e (B) visão basal. ARC = abertura no eixo rostro-carenal, CRC = comprimento no eixo rostro-carenal. .... 17
- Figura 5. Estrutura de tamanho baseada no comprimento basal de espécimes de *Newmanella* sp. (n= 161) coletado no litoral brasileiro. .... 22
- Figura 6. Diagrama de dispersão entre o comprimento basal e o comprimento da abertura no eixo rostro-carenal de indivíduos de *Newmanella* sp. coletados no Brasil. .... 22
- Figura 7. Face interna das placas operculares escudo (A) e tergo (B) de *Newmanella* sp. do Brasil e Curaçao, com indicação dos marcos anatômicos utilizados nas análises morfométricas..... 23
- Figura 8. Box-plots das principais diferenças na placa opercular escudo entre as espécies de *Newmanella*. (A) razão segmento escudal da margem basal / largura do esporão; (B) razão crista articular / margem escudal; e (C) exemplos de cada uma das espécies analisadas acompanhadas de seus respectivos marcos anatômicos e indicações das estruturas morfológicas crista do adutor (C.Adr.), fenda articular (F.A.) e crista articular (C.A.)... 26
- Figura 9. Box-plots das principais diferenças na placa opercular tergo entre as espécies de *Newmanella*. (A) razão segmento escudal da margem basal / largura do esporão; (B) razão crista articular / margem escudal; (C) razão largura do esporão / margem basal; e (D) exemplos de cada uma das espécies analisadas acompanhadas de seus respectivos marcos anatômicos e indicações da estrutura morfológica margem escudal (M.E.). .... 27
- Figura 10. Análise de variáveis canônicas da placa opercular escudo entre os espécimes de *Newmanella* sp. do Brasil (estrela rosa), *Newmanella* sp. de Curaçao (círculo preto), *N. radiata* (quadrado vermelho), *N. kolosvaryi* (x azul) e *N. spinosus* (estrela preta)..... 28
- Figura 11. Grade de deformação apresentando as mudanças na forma evidenciadas pelo eixo significativo CV1, que distingue *N. spinosus* das demais espécies de *Newmanella* pelo comprimento da crista articular. .... 29



Figura 12. Grade de deformação apresentando as mudanças na forma evidenciadas pelo eixo significativo CV2, que separa os espécimes de <i>Newmanella</i> sp. (Brasil e Curaçao) e <i>N. spinosus</i> , de <i>N. kolosvaryi</i> e <i>N. radiata</i> .....	29
Figura 13. Análise canônica discriminante da placa opercular tergo entre os espécimes do Brasil (estrela rosa), Curaçao (círculo preto), <i>N. radiata</i> (quadrado vermelho), <i>N. kolosvaryi</i> (x azul) e <i>N. spinosus</i> (estrela preta).....	30
Figura 14. Grade de deformação representando as mudanças na forma evidenciadas pelo eixo significativo CV1, que separou os espécimes de <i>Newmanella</i> sp. das demais espécies do gênero, em função da largura do esporão.....	31
Figura 15. Grade de deformação representando as mudanças na forma evidenciadas pelo eixo significativo CV2. As diferenças na forma se deram em função da posição do ápice da crista articular, e separou <i>Newmanella</i> sp. e <i>N. radiata</i> das demais espécies analisadas. (A) diferença exibida por <i>N. kolosvaryi</i> ; e (B) diferença exibida por <i>N. spinosus</i> .....	32
Figura 16. Análise de similaridade, usando o modelo Kimura 2-parâmetros e o método de inferência máxima verossimilhança, usando fragmentos do gene mitocondrial 12S rRNA (244 pares de base) de <i>Newmanella</i> sp. coletada no Brasil (PNR002 – PNR040), e <i>Newmanella</i> sp. coletada em Curaçao (PNR103 e PNR104) e no Panamá (PNR106 e PNR133). Valores de bootstrap abaixo dos nós.....	34
Figura 17. Análise de similaridade baseada na máxima verossimilhança usando o modelo Kimura 2-parâmetros, usando fragmentos do gene mitocondrial 12S rDNA (244 bases) de <i>Newmanella radiata</i> e <i>N. spinosus</i> obtidos através do GenBank, e de <i>Newmanella</i> sp. (do Brasil), <i>Newmanella</i> sp. (Curaçao) e <i>Newmanella</i> sp. (Panamá), obtida na coleção do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Cirripédia - UFF. Valores de bootstrap abaixo dos nós.....	37
Figura 18. Mapa de distribuição de <i>Newmanella</i> para o litoral brasileiro, baseado nos registros encontrados nas coleções do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Cirripedia - UFF e Museu Nacional – UFRJ, e na literatura científica.....	38
Figura 19. Tergo e escudo de <i>Newmanella</i> . (A) <i>Newmanella radiata</i> (sensu Young, 1995); e (B) escudo e tergo de <i>Newmanella</i> sp. descrita no presente trabalho.....	40
Figura 20. Holótipo de <i>Newmanella</i> sp. nov., PNR021. (A) vista anterior da concha; (B) vista basal da concha, mostrando os túbulos parietais; (C) escudo direito, vista dorsal; (D) escudo esquerdo, vista dorsal; (E) escudo direito, vista ventral; (F) escudo esquerdo,	

vissta ventral; (G) tergo direito, vista dorsal; (H) tergo esquerdo, vista dorsal; (I) tergo direito, vista ventral; e (J) tergo esquerdo, vista ventral. Escalas = 4 mm. ....42

Figura 21. Comparação entre as placas operculares de *Newmanella*. (A, C, E e G) Escudos de *N. radiata*, *N. kolosvaryi*, *N. spinosus* e *N. hentscheli*, respectivamente; (B, D, F e H) Tergos de *N. radiata*, *N. kolosvaryi*, *N. spinosus* e *N. hentscheli*, respectivamente. *N. hentscheli* não possui escala. Escalas = 2 mm.....44

## RESUMO

O presente estudo descreve uma nova espécie de *Newmanella* Ross, 1969 (Thoracica: Tetracelitidae: Newmanellinae) para o Atlântico Sul Oriental e Caribe. Os espécimes previamente identificados como *Newmanella radiata* (Ross, 1969) no Brasil são aqui consideradas como *Newmanella* sp. nov.. As espécies desse gênero eram conhecidas por ocorrer somente no Atlântico, e recentemente uma nova espécie *Newmanella spinous* Chan & Cheang, 2016 foi descrita para o Pacífico oeste ampliando a área de ocorrência para o gênero. O presente estudo comparou morfológicamente e molecularmente *Newmanella radiata*., com outras quatro espécies do gênero. Os indivíduos de *Newmanella* possuem morfologia semelhante, mas através das análises de morfometria clássica e geométrica foi possível estabelecer distinções explícitas entre elas. *Newmanella* sp. nov. se distingue das demais espécies, atualmente reconhecidas, pela morfologia do escudo e do tergo. A caracterização das sequências do gene 12S rDNA mostrou divergência de 6% e 9% entre *Newmanella* sp. nov. e *N. radiata* e *Newmanella spinosus* respectivamente, indicando ser uma espécie distinta. A nova espécie possui ampla área de distribuição e ocorre do nordeste ao sul do Brasil, e em Curaçao, mas não é encontrada entre o estado da Paraíba, Brasil e a Guiana. Sua distribuição descontínua provavelmente está relacionada a escassez de estudos nessas regiões, dificuldade de avistamento em habitat natural e a carência de trabalhos que descrevam a morfologia e biologia molecular desse grupo.

**PALAVRAS-CHAVE:** cracas, Curaçao, morfologia, 12S rDNA, taxonomia

## ABSTRACT

The present study describes a new species of *Newmanella* Ross, 1969 (Thoracica: Tetraclitidae: Newmanellinae) from western South Atlantic and the Caribbean. Specimens previously identified as *Newmanella radiata* on Brazilian coast, are herein considered as *Newmanella* sp. nov.. Species of this genus were known to occur only in the Atlantic and recently a new species, *Newmanella spinosus*, were described, for the Pacific expanding the genus range. The present study compared morphologically and molecularly *Newmanella* sp. nov. with other four species of the genus. Individuals of *Newmanella* have similar morphology, but through classical and geometric morphometric analyzes it was possible to establish explicit distinctions between them. *Newmanella* sp. nov. is distinct from the presently know species of *Newmanella* by the morphology of the scutum and tergum. The characterization of the 12S rDNA gene sequences showed a 6% and 9% of divergence between *Newmanella* sp. nov. and *N. radiata* and *N. spinosus* respectively, indicating that it is a distinct species. The new species has a wide distribution area and occurs from northeast to southern Brazil, and in Curaçao, but is not found between the state of Paraíba, Brazil and Guiana. Its discontinuous distribution is related to the scarcity of studies in these regions, difficulty in sighting in natural habitat and the lack of studies that deeply describe the morphology and molecular biology of this group.

**KEYWORDS:** barnacles, Curaçao, morphology, 12S rDNA, taxonomy

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Cirripedia

A infraclasse Cirripedia constitui um grupo ancestral de crustáceos, com elevada diversidade e abundância. Seus representantes podem ser encontrados em praticamente todos os tipos de ecossistemas marinhos. Quando adultos, são sésseis e vivem aderidos a substrato consolidado, outros organismos e até mesmo estruturas artificiais criadas pelo homem, como cascos de navios ou estaleiros (Barazandeh et al., 2013). Possuem um manto que recobre o corpo inteiro e que, na maioria das vezes, secreta uma concha calcária (Newman & Ross, 1976; Newman & Abbott, 1980).

Existem três superordens em Cirripedia: Acrothoracica, Rhizocephala e Thoracica. A superordem Thoracica, conhecida também como “cracas verdadeiras”, é a que possui maior relevância ecológica devido a sua alta diversidade e conspicuidade nos habitats em que ocorre (Newman & Ross, 1976; Newman & Abbott, 1980). Esse grupo exibe uma imensa diversidade nos seus sistemas reprodutivos, incluindo sistemas como o hermafroditismo, dioícia e androdioícia. E, apesar da androdioícia aparentemente ser rara entre os animais, esta característica já foi descrita em mais de 30 espécies em Thoracica (Kelly & Sanford, 2010).

A ordem Sessilia está contida em Thoracica, e representa o grupo das cracas sésseis. Ainda, Sessilia está distribuída em três subordens: Brachylepadomorpha, Verrucomorpha e Balanomorpha (Darwin, 1851; Darwin, 1854; Newman & Ross, 1976; Newman & Abbott, 1980). Os membros destas subordens apareceram no Siluriano (a cerca de 400 milhões de anos), na metade do Cretáceo (cerca de 100 milhões de anos), e no final do Cretáceo (cerca de 70 milhões de anos), respectivamente (Newman & Ross, 1976).

A subordem Balanomorpha, ou as “cracas bolotas”, constitui um grupo de cirripédios não pedunculados, recobertos por uma carapaça praticamente cônica cuja base é firmemente aderida ao substrato. Além deste ser o grupo de cirripédios que contém a maior riqueza de espécies, também é um grupo muito importante e conspícuo para muitas comunidades marinhas (Newman & Ross, 1976; Newman & Abbott, 1980; Pérez-Losada et al., 2004; Pérez-Losada et al., 2014)). Por exemplo, esses animais podem se fixar tanto em animais vertebrados (tartarugas, baleias e serpentes marinhas) e invertebrados (moluscos, esponjas, corais, crustáceos e até mesmo outros cracas), como em plantas (árvores de mangue) e estruturas artificiais criadas pelo homem (Pérez-Losada et al., 2004; Pérez-Losada et al., 2014).

Apesar de existirem espécies que são capazes de habitar o mar profundo, são mais conhecidas por ocorrerem na região entre marés de costões rochosos. Quanto à morfologia, os

membros de Balanomorpha exibem bastante diversidade tanto nas partes duras (carapaça, placas da carapaça e placas operculares) como nas partes moles (corpo e apêndices) (Darwin, 1854; Newman & Jumars, 1976; Newman & Ross, 1976; Newman & Abbott, 1980; Høeg & Møller, 2006; Pérez-Losada et al., 2004).

Na maioria das espécies do grupo, a concha possui a forma semelhante a de um vulcão, e o número de placas na carapaça varia entre os grupos, podendo apresentar 4, 6 ou 8 placas e, até mesmo, não apresentar subdivisão na carapaça. Outra variação que pode ser percebida nesses animais ocorre na base, que pode ser membranosa ou calcária. Estruturas moles, como os apêndices alimentares, também exibem diversidade na forma (Darwin, 1854; Anderson, 1994; Chan & Cheang, 2016; Pitombo et al., 2017). A única característica que parece manter-se conservada entre as espécies de Balanomorpha, diz respeito a biologia reprodutiva. Diferente das cracas pedunculadas, as quais exibem muita variação em suas características reprodutivas, cracas balanomorfas possuem suas características reprodutivas mais conservadas, pois a vasta maioria das espécies apresenta o hermafroditismo (Darwin, 1854; Høeg & Møller, 2006; Kelly & Sanford, 2010).

## 1.2. Tetracitidae

Tetracitidae compreende um grupo de cracas balanomorfas que ocorrem em substrato duro rochoso na porção infralitoral da zona entremarés, em regiões tropicais de águas mornas. Seus membros são caracterizados por uma concha com quatro placas porosas e com base membranosa ou calcária. Nessa família estão contidas cerca de 60 espécies, distribuídas em 10 gêneros e 3 subfamílias (Ross, 1969; Newman & Ross, 1976; Ross & Perreault, 1999; Southward, 2001; Tsang *et al.*, 2015).

Os membros de Tetracitidae apresentam dois tipos de crescimento: monométrico e diamétrico. No crescimento monométrico há correlação direta entre a obsolescência do rádio (não tubífero), o preenchimento apical secundário de tubos parietais e, o alargamento da abertura por intemperismo. Em contrapartida, no crescimento diamétrico o alargamento da abertura se dá pelo crescimento do rádio tubífero, e os tubos parietais não possuem preenchimento secundário (Ross, 1969).

O crescimento monométrico caracteriza os gêneros *Tesseropora*, *Tetracitella* e *Tesseroplax* (fóssil). Ao passo que o crescimento diamétrico caracteriza *Tetracitella* e *Newmanella*. Outra característica importante que separa esses grupos é a alometria da carina, que ocorre apenas no primeiro grupo mencionado (Ross, 1969). As três subfamílias contidas

em Tetracelitidae são: Tetracelitinae Gruvel, 1903, Tetracelitellinae Newman & Ross, 1976 e Newmanellinae Ross & Perreault, 1999. Tetracelitinae possui paredes tubíferas, onde os tubos são preenchidos parcialmente por um material composto de calcário e quitina; seu rádio é sólido, estreito e obsoleto (Gruvel, 1903). Atualmente, três gêneros pertencem a Tetracelitinae: *Astroclita* Ren & Liu, 1979, *Tesseropora* Pilsbry, 1916 e *Tetracelita* Schumacher, 1817.

A subfamília Tetracelitellinae, que contém somente o gênero *Tetracelitella* Hiro, 1939, é caracterizada por paredes tubíferas; tubos não preenchidos; radio tubífero ou sólido, largo e bem desenvolvido. A subfamília Newmanellinae caracteriza-se por paredes discretas; tubos parietais em uma, duas ou mais linhas; radio largo, transparietal, cume oblíquo, bilamelar com divisórias ou cristas desenvolvidas de diversas formas entre as lâminas interna e externa; base calcária; escudo com cristas para o músculo depressor lateral; cristas para o músculo depressor do rostro presentes ou ausentes; articulação complexa entre o escudo e o tergo e; crista articular do tergo comumente sobrepondo a porção apical do escudo (Ross & Perreault, 1999). Newmanellinae compreende três gêneros: *Neonrosella* Jones, 2010, *Yamaguchiella* Ross & Perreault, 1999 e *Newmanella* Ross, 1969.

*Neonrosella* já foi considerado subgênero de *Yamaguchiella*, mas a partir de análises moleculares realizadas por Tsang *et al.* (2015) concluiu-se que *Yamaguchiella* e *Neonrosella* estão localizados em dois clados distintos dentro de Tetracelitidae. Baseado nessas informações, Chan & Cheang (2016) propuseram a elevação de *Neonrosella* ao status de gênero. *Neonrosella* é caracterizado por uma concha achatada e esticada, com orifício levemente denticulado; tubos parietais primários radialmente alongados; tubos secundários estendem-se até as superfícies laterais dos tubos primários. *Yamaguchiella* é caracterizado pelo orifício quase que completamente ocluído pelo escudo; escudo mais alto que largo, cristas para os músculos depressores laterais e rostrais numerosos e bem definidos; margem ocludente com 2 a 5 dentes largos, oblíquos e desarmônicos; cume articular do tergo sobrepondo levemente a porção apical do escudo e; órgão intromitente com ponto base-dorsal (Ross & Perreault, 1999).

### **1.3. *Newmanella* Ross, 1969**

*Newmanella radiata*, a espécie tipo do gênero, foi primeiramente descrita por Chemnitz (in Martini & Chemnitz, 1785). Antes do sistema binomial de Linnaeus (1758), *N. radiata* era nomeada como *Lepas indiae orientalis ex violaceo radiata*. O primeiro registo consiste numa breve descrição da espécie, utilizando apenas as partes duras (concha e placas operculares) e

uma ilustração da concha (Figura 1). O primeiro nome dentro do sistema de Linnaeus de *N. radiata* foi *Balanus radiatus* (Bruguière, 1789).



Figura 1. Representação de *Lepas indiae orientalis ex violaceo radiata* (Martini & Chemnitz, 1785). Primeiro registro de *Newmanella* Ross, 1969 na literatura, anterior ao sistema binomial de Linnaeus (1758).

Bruguière (1789) também fornece uma descrição: forma cônica, com base larga e oval; as valvas do cone formam triângulos desiguais, os quais a superfície é marcada com sulcos longitudinais e linhas violetas na mesma direção; a abertura é oval, levemente achatada na parte de trás; o opérculo possui quatro placas transversalmente estriadas; as duas posteriores são pontiagudas; a cor da concha é violeta claro; e ocorre no oceano Índico.

Apesar de Martini & Chemnitz (1785) e Bruguière (1789) terem registrado a distribuição dessa espécie como oceano Índico, eles não forneceram detalhes sobre sua localidade tipo. Também, não forneceram informação acerca da deposição da concha e placas operculares do holótipo em nenhum museu. Depois de Bruguière (1789), *Balanus radiata* passou por nomenclaturas distintas (Ross, 1969; Chan & Cheang, 2016).

Podemos encontrar registros dessa espécie como: *Lepas purpurea* (Spengler, 1790), *Lepas violacea* (Gmelin, 1791), *Balanus radiatus* (Ranzani, 1818; Lamarck, 1818; Ranzani, 1820; Jay, 1839;), *Conia lyonsii* (Sowerby, 1823), *Conia radiata* (Blainville, 1824; Blainville 1825; Blainville 1827; Deshayes, 1831) e *Tetraclita (Conia) radiata* (Gray, 1825). Na maioria destes trabalhos, podemos encontrar descrições sucintas da concha e placas operculares, mas nenhum descreveu suas partes moles. Alguns dos autores forneceram apenas ilustrações ou mencionaram o nome da espécie em seus catálogos, desacompanhadas de qualquer descrição. Também, muitos desses autores relatam uma cor roxa presente em sulcos longitudinais na carapaça dessa espécie, e reforçaram como sua área de ocorrência o oceano Índico.

Darwin (1854) também categorizou espécies de Tetraclitidae, e sugeriu a mudança de *Conia radiata* para *Tetraclita radiata*. O autor comenta sobre a complexidade da sinonímia



para essa espécie, devido as descrições insuficientes e confusas presentes na literatura. *T. radiata* foi citada por muitos pesquisadores (Weltner, 1897; Gruvel, 1903; Gruvel, 1905; Schmalz, 1906; Hoek, 1907; Pilsbry, 1916; Pilsbry, 1927; Pope, 1943; Pope, 1945; Pilsbry, 1953; Southward, 1962). Porém, somente no século XX foi que Ross (1969) publicou seus estudos sobre Tetraclitidae. Ross (1969) estabelece o gênero *Newmanella*, propõe *Tetraclita radiata* como espécie tipo, e fornece uma nova descrição. Assim, *T. radiata* passa a pertencer ao gênero *Newmanella*, sendo chamada de *N. radiata*.

Ross (1969) caracterizou *Newmanella* como apresentando uma concha relativamente larga, cônica e com cristas; compartimentos discretos; paredes com duas ou mais linhas de tubos irregulares; radio largo, cume oblíquo, tubos se abrindo na superfície articular; base calcária, sólida, escudo triangular, com a presença de cristas para os músculos depressores; tergo estreito com um esporão separado pelo ângulo base-escudo. Mandíbula com quatro dentes, pente basal, e sua parte inferior parecida com espinhos; maxila I com mais de doze espinhos abaixo do nó subapical.

Ross & Perreault (1999) sugeriram que *Newmanella* estaria restrito ao oeste do Atlântico, ao passo que *Yamaguchiella* seria restrito ao oeste do Pacífico. Mas, Chan & Cheang (2016) descreveram uma nova espécie de *Newmanella* ocorrendo no pacífico, *Newmanella spinosus* Chan & Cheang, 2016. Atualmente, *Newmanella* contém quatro espécies: *N. radiata*, *N. hentscheli* (Kolosváry, 1942), *N. kolosvaryi* Ross & Perreault, 1999 e *N. spinosus* Chan & Cheang, 2016.

*Newmanella kolosvaryi* foi descrita a partir de um material encontrado rolado na praia, lavado após uma tempestade, e que não possuía mais as partes moles. Seus espécimes foram encontrados na zona oeste do Golfo de los Mosquitos, Panamá, e este é o único registro na literatura para a espécie. Seus indivíduos foram encontrados incrustados por algas coralíneas, associados com vermetídeos e cracas do gênero *Megabalanus* (Ross & Perreault, 1999).

*Newmanella hentscheli* foi sucintamente descrita por Kolosváry (1942), que registrou como local de ocorrência Puerto Cabello, Venezuela. Ross & Perreault (1999) reportaram *N. hentscheli* a sudeste do Golfo de Paria, Trinidad, sobre estruturas de um campo petrolífero, e em Colon Bay, Panamá. Estes são os únicos registros de *N. hentscheli*. Além disso, Ross & Perreault (1999) mencionaram que não conseguiram localizar o holótipo de *N. hentscheli* no local de deposição indicado por Kolosváry (1942).

A única espécie de *Newmanella* conhecida por ocorrer no Pacífico é *Newmanella spinosus*. Esta espécie foi descrita por Chan & Cheang (2016), onde os autores forneceram uma

descrição da morfologia da concha, placas operculares, cirros e apêndices bucais. Os autores foram os únicos na literatura a fornecer dados moleculares e fotografias para *Newmanella*. Além disso, os autores designaram um neótipo, neoparátipos e uma descrição detalhada de *N. radiata* e o sequenciamento do gene rDNA 12S.

Das espécies que ocorrem no Atlântico, *N. kolosvaryi* e *N. hentscheli* estão restritas à província caribenha, e *N. radiata* é a única conhecida por ocorrer fora do Caribe, apresentando uma distribuição disjunta da Flórida ao Brasil (Pilsbry, 1916; Ross, 1969 e; Young, 1991). *N. radiata* está restrita ao Atlântico Oeste, e pode ser encontrada no litoral da Flórida, Bahamas, Cuba, Trinidad e Tobago, Porto Rico, Dominica, Venezuela, Curaçao, Bonaire e Brasil (Ross, 1969; Southward, 1975; Bacon, 1976; Newman & Ross, 1976; Young, 1987; Young, 1991). Dessa forma, *N. radiata* é a única espécie de *Newmanella* conhecida por ocorrer no litoral brasileiro.

No Brasil, *N. radiata* ocorre de norte a sul, podendo ser encontrada em Pernambuco, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina (Lacombe, 1977; Lacombe & Rangel, 1978; Young, 1991; Severino & Resgalla Jr., 2005; Farrapeira, 2009; Lira et al., 2010; Klôh *et al.*, 2013). Essa espécie pode ser encontrada em costões rochosos e recifes coralíneos. Nos costões rochosos, os indivíduos de *N. radiata* podem ser encontrados na franja do infralitoral e infralitoral raso, geralmente associados a ambientes com alto hidrodinamismo, podendo chegar a 10 metros de profundidade (Ross, 1969; Bacon, 1976; Young, 1991). Alguns autores relataram a espécie como epibionte dos cirripédios *Balanus trigonus* Darwin, 1854 e *Megabalanus tintinnabulum* (Linnaeus, 1758), do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), do cnidário *Gorgonia flabellum* Linnaeus, 1758, e da ostra *Dendostrea folium* (Linnaeus, 1758) (Pilsbry, 1916; Bacon, 1976; Lacombe & Rangel, 1978; Carlton & Ruiz, 2015).

O interesse no estudo de *Newmanella* no litoral brasileiro deve-se ao fato de que ainda hoje há instabilidade na sistemática do grupo. A primeira espécie desse gênero foi registrada para o Oceano Índico (Martini & Chemnitz, 1785). Mas, após Darwin (1854) ter registrado *T. radiata* para o Caribe, nunca mais tivemos registros do gênero fora do Atlântico. Até que Chan & Cheang (2016) descreveram *N. spinosus* para Taiwan, a oeste do Pacífico. O primeiro registro de *N. radiata* para o litoral brasileiro foi realizado por Lacombe (1977). Posteriormente, tivemos vários outros registros de *N. radiata* na literatura (Lacombe, 1977; Lacombe & Rangel, 1978; Young, 1991; Severino & Resgalla Jr., 2005; Farrapeira, 2009; Lira et al., 2010; Klôh *et al.*, 2013). Nenhum desses autores forneceu uma descrição morfológica desses animais.

Portanto, isto desperta o interesse para o estudo dos espécimes de *Newmanella* que ocorrem em nosso litoral.

Outros fatores também contribuem para o interesse por *Newmanella*: (1) não existem trabalhos que abordem a biologia molecular dos indivíduos de *Newmanella* encontrados no Brasil; (2) nenhum trabalho descreve a morfologia da *Newmanella* da costa brasileira; (3) são indivíduos frequentemente encontrados em comunidades incrustantes; (4) possuem ampla distribuição geográfica no Atlântico Oeste; (5) enquanto espécies de regiões temperadas e subtropicais são bastante estudadas, o mesmo não é verdade para espécies de cracas em ambientes tropicais; e (6) apesar desses organismos serem considerados componentes principais da fauna entremarés, não recebem a atenção adequada tanto biologicamente quanto taxonomicamente (Ross, 1969; Lacombe, 1977; Lacombe & Rangel, 1978; Young, 1991; Cai *et al.*, 2005; Farrapeira, 2009; Farrapeira, 2010).

#### **1.4. Morfometria**

Estima-se que o estudo da forma seja um dos temas mais antigos pesquisados na biologia (Marcus *et al.*, 1996; Monteiro & Reis, 1999; Zelditch *et al.*, 2004). A variação nos processos biológicos que ocorre ao longo do desenvolvimento ontogenético, doenças, mudanças ambientais e outros fatores, produz diferenças na forma entre os indivíduos ao longo do tempo. O estudo dessas diferenças tem se mostrado de grande importância na compreensão da biologia evolutiva dos organismos (Cavalcanti & Lopes, 1991; Zelditch *et al.*, 2012).

A expressão “morfologia” só surgiu no século XVIII, e foi publicada pela primeira vez num manual médico pelo anatomista Karl Friedrich Burdach (1776-1847), onde ele relatava detalhes sobre a forma humana e seus desvios patológicos. E na mesma época, o poeta e naturalista alemão Johan Wolfgang von Goethe (1749-1832) empregou o termo indicando seu significado como: “estudo de todas as formas orgânicas, internas e externas, e o desenvolvimento das estruturas ao longo do desenvolvimento do organismo” (Richards, 2008).

A variação e a mudança na forma biológica como um termo formal, só veio a ser objeto de uma discussão biométrica na obra de D’Arcy W. Thompson, publicada em 1917 e intitulada “*On Growth and Form*”. Mas o autor não teve muito sucesso, porque não conseguiu propor um método estatístico que pudesse demonstrar seus conceitos (Monteiro & Reis, 1999). Por outro lado, a biometria surgiu ao fim do século XIX a partir dos trabalhos de Francis Galton (1822-1911), W. F. R. Weldon (1860-1906) e Karl Pearson (1857-1936), os quais estudaram a variação na forma dos organismos através de correlações entre medidas de distâncias em

estruturas biológicas (Marcus *et al.*, 1965). Nessa época, baseada nas ideias desses autores, começava a surgir a escola biométrica (Monteiro & Reis, 1999).

O termo “morfometria” propriamente dito só foi formulado em 1965 por Robert E. Blackith. Na época, esse conceito fazia referência aos métodos que serviam para medir a diferença de forma entre espécies, para então, permitir a construção de fenogramas (Monteiro & Reis, 1999). Todos os conceitos sobre medições e estatística elaborados nessa época tornaram-se a base de análises multivariadas desenvolvidas ao longo do século (Monteiro & Reis, 1999; Elewa, 2010). E, com o passar dos anos, os estudos morfométricos passaram a incorporar essas técnicas multivariadas (Elewa, 2010).

Dessa forma, a morfometria clássica (ou tradicional), cunhada pela escola biométrica, consiste num conjunto de métodos estatísticos multivariados. Seus dados podem conter medidas lineares de tamanho, como comprimento e largura, ou ângulos e razões, estimados de partes ou do todo de um organismo. Sua aplicação tem sido relacionada a alometria (mudança na forma em decorrência do tamanho) e a correção do tamanho (para permitir o estudo de diferenças na forma entre amostras de organismos ajustados a um tamanho comum). E, seus resultados podem ser expressos na maioria das vezes graficamente ou numericamente, em termos de combinações lineares das variáveis medidas (Rohlf & Marcus, 1993).

Desde 1980 uma série de publicações (Bookstein, 1984; Kendall, 1984; Goodall, 1991; Rohlf & Marcus, 1993; Marcus *et al.*, 1996; Adams *et al.*, 2004) sobre o estudo da forma foram realizadas, e a partir daí é que se considera o aparecimento da área de pesquisa denominada morfometria geométrica. Este período foi conhecido como a “revolução na morfometria” e trouxe de forma geral os pressupostos deste novo campo, constituindo uma área de pesquisa na fronteira entre biologia, estatística e geometria (Rohlf & Marcus, 1993; Marcus *et al.*, 1996; Rohlf, 1998; Monteiro & Reis, 1999; Richtsmeier *et al.*, 2002; Adams *et al.*, 2004; Zelditch *et al.*, 2004; Mitteroecker & Gunz, 2009; Fornel & Cordeiro-Estrela, 2012).

A morfometria geométrica foi definida por Slice (2005) como “um conjunto de métodos de aquisição, processamento e análise de variáveis de forma que preserva toda a informação geométrica contida nos dados originais”. Na morfometria geométrica os dados não são baseados em medidas, ângulos ou razões, mas em coordenadas cartesianas chamadas de “marcos anatômicos” (em inglês, *landmarks*). A vantagem é que os marcos anatômicos preservam sua posição relativa, permitindo a reconstrução da forma após análises estatísticas (Marcus, 1990). Além disso, uma das grandes diferenças entre a morfometria clássica e a geométrica é que todas as análises dos marcos anatômicos são necessariamente multivariadas (Zelditch *et al.*, 2004).

Portanto, é através dos *landmarks* que as estruturas biológicas homólogas são amostradas. A homologia é considerada fundamental para comparação dos *landmarks*, onde o importante é a correspondência relacionando pontos a pontos, e não partes a partes, sendo que um ponto é uma estrutura mais facilmente definida que uma parte estrutural (Bookstein, 1990; Bookstein, 1991; Monteiro & Reis, 1999;). Esse conceito de correspondência dos *landmarks* é essencial para teoria matemática da forma, e torna possível a identificação das variações da forma e a comparação destas variações entre os diferentes espécimes de um determinado estudo. Ademais, outra ideia importantíssima que temos que ter em mente é que não comparamos cada *landmark* separadamente, mas uma configuração de *landmarks*. Um *landmark* isolado não pode ser utilizado, pois não se encaixa na definição de forma (Zelditch, 2012).

Existem três categorias de *landmarks*: tipo 1, tipo 2 e tipo 3 (Bookstein, 1991). Os *landmarks* do tipo 1 são considerados ótimos, e consistem em pontos localizados em justaposições de tecidos. Além disso, podem ser claramente distinguidos como pontos cujas definições referem somente a estruturas próximas ao ponto (Bookstein, 1991; Monteiro & Reis, 1999; Zelditch et al., 2012). Em contrapartida, os *landmarks* do tipo 3, nem ao menos deveriam ser considerados *landmarks*. Estes são totalmente opostos aos *landmarks* do tipo 1 e sua definição depende de estruturas distantes do *landmark*. Já os *landmarks* do tipo 2 são considerados intermediários entre esses dois extremos. São localmente definidos, mas não tanto quanto os *landmarks* do tipo 1. Geralmente, envolvem pontos de máxima curvatura ou outros processos morfogenéticos locais (Bookstein, 1991; Monteiro & Reis, 1999; Zelditch et al., 2012).

A definição de forma faz parte do núcleo da morfometria geométrica, que a define como: toda a informação geométrica que resta quando efeitos de tamanho, orientação e posição são removidos de um objeto (Kendall, 1977; Rohlf, 1999). Para além disso, a medida de tamanho utilizada pela morfometria geométrica é o tamanho do centroide. Esta seria a única variável de tamanho independente da forma, já que é obtida a partir da média das coordenadas dos *landmarks* (Zelditch et al., 2012).

As coordenadas cartesianas brutas não são usadas nos estudos comparativos de morfometria geométrica. Isto ocorre porque elas têm embutidos efeitos de tamanho, posição e orientação. Assim, é preciso filtrar esses efeitos de um objeto (Bookstein, 1989). Para tal, devem ser utilizados métodos de sobreposição das configurações de *landmarks*, como a sobreposição de Procrustes. Com a sobreposição, as coordenadas são transformadas em

variáveis de forma. Tais variáveis são utilizadas em análises estatísticas para analisar as diferenças na forma de organismos biológicos (Zelditch *et al.*, 2012).

Para morfometria geométrica, as formas são representadas a partir de pontos num espaço curvo, idealizado por Kendall (1984). A quantificação da forma é realizada pela distância de Procrustes, que nada mais é do que a distância entre dois pontos no espaço de Kendall. Pela falta de linearidade do espaço de Kendall, a forma é trabalhada em um espaço tangente euclidiano. Isto é feito pela projeção dos indivíduos do espaço forma de Kendall, no espaço forma tangente euclidiano. Isto é realizado para que o espaço seja linearizado, pois a maioria das análises estatísticas é realizada a partir de espaços lineares (Rohlf, 1999; Zelditch *et al.*, 2012).

Esta nova abordagem, permite a descrição da variabilidade da forma usando análises estatísticas robustas, bem como a utilização de *thin-plate spline* (TPS). Nem sempre a mudança que ocorre na forma é óbvia, muitas vezes torna-se difícil rastrear as mudanças que ocorrem entre todos os *landmarks*. Para detectar essas mudanças, é necessário examinar todos os vetores envolvendo os *landmarks* de cada configuração. Dessa forma, a TPS possui duas principais funções em análises morfométricas: (1) é usada como ferramenta para visualizar as mudanças na forma através de grades de deformação; e (2) fornece um sistema de coordenadas para o espaço tangente de Kendall, o que é especialmente importante para os *landmarks*, cujos dados fornecidos estão em 2D (Bookstein, 1989; Zelditch, 2012).

Devemos ter em mente que a morfometria pode fornecer dois tipos de dados: distâncias e coordenadas. As distâncias são mais comuns, e são aquelas frequentemente utilizadas em estudos de morfometria clássica. Já as coordenadas, representam pontos numa grade, descritos por X e Y (2D) e, as vezes um Z (3D) também. Assim, os equipamentos podem variar de réguas e paquímetros (no caso de distâncias) até sistemas de vídeo, mesas de digitalização e scanners (para as coordenadas) (Fink, 1990; Monteiro & Reis, 1999).

Podemos perceber até então, que as técnicas utilizadas em morfometria geométrica são, na verdade, métodos preliminares para a geração de dados a serem estudados por análises multivariadas. Com propriedades diferentes das simples distâncias dos sistemas convencionais, os dados morfométricos são sempre multivariados, pois são constituídos por coordenadas bidimensionais. Por esse motivo, os resultados de todas as análises preliminares acabam sendo imprescindivelmente analisados por métodos multivariados (Monteiro & Reis, 1999).

Finalmente, existem diversas análises que podem ser feitas a partir de dados morfométricos. O sistema de coordenadas não nos obriga a abandonar os testes estatísticos

convencionais, como a análise de componentes principais (PCA) e a análise canônica da variação (CVA) (Zelditch et al., 2012). Todos os métodos e testes estatísticos convencionais podem ser aplicados a coordenadas da forma e tamanho do centroide. Destarte, esses métodos estatísticos são utilizados para explorar padrões nos dados, com a esperança de que os resultados possam sugerir os fatores responsáveis pela variação entre os indivíduos ou grupos estudados (Reyment, 1985; Monteiro & Reis, 1999; Zelditch et al., 2012).

### **1.5. Biologia molecular**

O DNA barcoding foi proposto por Hebert et al. (2003a) como uma solução para a identificação de espécies. Essa abordagem consiste num novo sistema de identificação, baseado em citocromo c oxidase subunidade I (COI), o qual permite a distinção de espécies através da análise de pequenos segmentos do genoma. Ao longo das últimas décadas, o sequenciamento genômico tem se tornado uma ferramenta eficiente para investigação de um amplo espectro de sistemas biológicos. Suas aplicações englobam áreas de estudo de identificação de espécies, biodiversidade, reconstrução da história evolutiva e até mesmo a origem de novos microrganismos patogênicos. (Kumar et al., 2018). O conceito de “biodiversidade” é amplo, abstrato e muito presente no contexto científico, mas reverbera socialmente, politicamente e economicamente (Radulovici et al., 2010).

Uma crise na biodiversidade tem emergido continuamente. Atualmente nos deparamos com altas taxas de extinção induzidas pelo homem, nunca vistas desde a formação da sociedade humana (Pimm et al., 1995; Radulovici et al., 2010). As maiores ameaças a biodiversidade marinha incluem sobre-exploração de recursos, degradação de habitats, poluição, aquecimento global, acidificação dos oceanos, invasões biológicas e estresses antrópicos (Gray, 1997; Worm et al., 2006; Molnar et al., 2008). Medidas que mitiguem esses impactos são fundamentais, mas tornam-se difíceis devido a imensa biodiversidade existente e a distribuição espacial dos organismos vivos.

Uma etapa primordial para proteger a biodiversidade é a pesquisa científica, que geralmente estuda a diversidade no nível de espécies. Na literatura, muitos autores concordam que apenas uma pequena fração de todas as espécies existentes foi formalmente descrita: cerca de 1.5 milhão de uma estimativa de 5 a 11 milhões (Winston, 1999; Wilson, 2003; Chapman, 2009). Se considerarmos organismos pequenos como parasitas específicos e organismos habitat-específicos como mites, besouros e nematoides, essa estimativa chega até 50 milhões de espécies. Mesmo considerando uma estimativa otimista (5 milhões de espécies) apenas 36%

de toda a biodiversidade existente é conhecida. E na estimativa mais pessimista (50 milhões) conhecemos apenas 3% da biodiversidade (Winston, 1999).

De todas as espécies descritas pela ciência, cerca de 300.000 são plantas, 70.000 são fungos e 87.000 são protistas. O restante das espécies conhecidas (cerca de 1 milhão) consiste em metazoários como insetos, aracnídeos, moluscos, crustáceos e vertebrados, e estes são os maiores grupos conhecidos (Barnes, 1989; Hawksworth, 1991; Pimm et al., 1995).

A diversidade no ambiente marinho inclui cerca de 300.000 espécies descritas (Gray, 1997), um número muito menor quando comparado ao ambiente terrestre (cerca de 1,1 milhão de espécies conhecidas). A importância da biodiversidade marinha inclui aspectos econômicos e ecológicos, como fonte de recursos alimentares, biotecnologia, minerais, substratos para agricultura, indicadores de qualidade ambiental e o funcionamento de toda a teia alimentar. Dos táxons descritos no ambiente marinho, aproximadamente 17% consistem em espécies do subfilo Crustacea. Esse subfilo é muito diverso, e apresenta grande variedade morfológica, de habitats e de ecologias. Tal diversidade está representada em seus grupos: são 6 classes, 48 ordens, 849 famílias e cerca de 52.000 espécies (Martin & Davis, 2001).

Em Crustacea, níveis taxonômicos elevados, como classe e subclasse, ainda não estão totalmente estabilizados (Martin & Davis, 2001). Apesar dos estudos morfológicos e moleculares realizados, essas classificações permaneceram praticamente constantes nas últimas décadas. Porém, nos níveis de família, gênero e espécie, a sistemática tem sido ampliada (Browne et al., 2007; Hou et al., 2007; Tsang et al., 2015; Chan & Cheang, 2016; Pitombo et al., 2017).

Para melhor entendermos a sistemática, precisamos conhecer também tanto a organização, como o tamanho das ramificações das árvores filogenéticas. Nesse contexto, tanto os métodos baseados em morfometria clássica e/ou geométrica quanto as análises moleculares de DNA são importantes. Isto pois, a morfologia dos seres vivos é essencialmente, a manifestação de seu genoma, proteoma e transcriptoma (Patwardhan et al., 2014).

A variabilidade genética é a base dos estudos em biodiversidade molecular. É através de tal variabilidade, que tornamos possível a comparação de indivíduos, populações e a diferenciação de espécies. Existem diversas técnicas para estimar tal diversidade, como as aloenzimas, polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA (RFLP), polimorfismo amplificado pela reação em cadeia da polimerase (AP-PCR ou RAPDs), microssatélites e o DNA *barcoding* (Avice, 2004). Este último em particular deflagrou um amplo debate sobre o status atual e futuro da taxonomia tradicional.



O DNA *barcoding* é um sistema de identificação de espécies fundamentado em sequências baseadas em DNA. A abordagem molecular para o diagnóstico dos táxons explora a diversidade entre as sequências de DNA para identificar os organismos. Essas sequências podem ser vistas como códigos de barra que estão presentes no material genético da célula. Nessa abordagem, uma pequena sequência de DNA é utilizada como marcador padrão para identificação de espécies de animais: o gene citocromo c oxidase subunidade I (COI) (Hebert et al., 2003a; Hebert et al., 2003b). A sequência genética obtida para cada espécie desconhecida é comparada com um catálogo de sequências referência, derivadas de espécies já conhecidas pela sistemática tradicional. Mas é claro que tal catálogo precisa ser atualizado constantemente para que essa abordagem possa, de fato, acelerar a identificação de espécies conhecidas e a descoberta de novas espécies (Witt et al., 2003; Hajibabaei et al., 2007).

Muitos trabalhos demonstraram que outros marcadores genéticos são superiores ao COI para a identificação de espécies de certos táxons. Também, a amplificação do COI para algumas espécies não é atingida com sucesso (Tobe et al., 2010; Xia et al., 2012; Lv et al., 2014; Zheng et al., 2014). Além do COI, existem outros marcadores moleculares, como o gene mitocondrial 12S e 16S rRNA (Lv et al., 2014). Esses diferentes marcadores moleculares apresentam diferentes taxas evolutivas/substituição. Portanto, a escolha desses marcadores deve ser feita de forma adequada a fim de estudar corretamente a identificação de indivíduos, a diferenciação de espécies crípticas e até mesmo a formulação de hipóteses em filogenia (Avice, 2004).

O genoma mitocondrial compreende um DNA circular, e codifica dois rRNAs, o 12S e o 16S rRNA. Esses rRNAs são necessários para a síntese proteica, uma vez que a mitocôndria possui seus próprios mecanismos para replicação, transcrição e tradução do DNA. Geralmente, se trata de um material genético com alta taxa de mutação, e de alta economia organizacional, com raros segmentos não codificáveis (Ashwell & Work, 1970; Attardi & Schatz, 1988). Essa alta taxa de evolução do DNA mitocondrial de metazoários significa que uma grande quantidade de variação pode ser observada em espécies de grupos próximos. Tal fato torna o genoma mitocondrial de muita valia para a identificação de espécies animais (Yang et al., 2014).

As dissimilaridades dessas sequências de DNA indicam a divergência genética como resultado da evolução molecular ao longo da história. Enquanto a abordagem clássica preocupava-se somente com a morfologia dos organismos, a abordagem molecular depende das sequências de RNA e/ou DNA determinadas por técnicas robustas (Patwardhan et al., 2014). Na última década, dados moleculares têm sido extremamente úteis e extensivamente usados para elucidar

relações filogenéticas entre grupos de crustáceos (Cai *et al.*, 2005). Ademais, técnicas de biologia molecular têm sido efetivas para estudos populacionais e filogenéticos de cracas (Pérez-Losada *et al.*, 2004; Zardus & Hadfield, 2005; Cai *et al.*, 2005; Abreu *et al.*, 2016; Pitombo *et al.*, 2017).

Até 2016 os critérios utilizados para a classificação dos membros de *Newmanella* consistiam apenas na morfologia. Tais ranqueamentos taxonômicos são um critério indispensável para o julgamento da habilidade do DNA barcoding em fornecer um posicionamento taxonômico apurado (Costa *et al.*, 2007).

Os trabalhos que mencionam *N. radiata* para o litoral brasileiro não acompanham descrição de sua morfologia, nem de sua biologia molecular (Lacombe, 1977; Lacombe, 1978; Young, 1991, 1998; Severino & Resgala Jr., 2005; Farrapeira, 2009; Klôh *et al.*, 2013). Assim, o presente estudo buscou comparar molecularmente *Newmanella* sp. da costa brasileira com *N. radiata*, *N. spinosus* e *N. kolosvaryi*. Além disso, através da morfometria geométrica, comparamos a morfologia de *Newmanella* sp. da Coleção do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Cirripedia - UFF com *N. kolosvaryi*, *N. spinosus* e *N. radiata*. Por fim, fornecemos a descrição morfológica das partes duras (carapaça e placas operculares) e o sequenciamento do gene mitocondrial 12S rRNA de *Newmanella* sp. do Brasil.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

- Realizar um estudo sistemático de *Newmanella* do litoral brasileiro

### **2.2. Objetivos específicos**

- Descrever a estrutura de tamanho de *Newmanella* sp. no Brasil;
- Descrever a morfologia das placas operculares de *Newmanella* sp. no Brasil;
- Comparar pela morfometria clássica e geométrica *Newmanella* sp. do litoral brasileiro com *N. radiata*, *N. kolosvaryi*, *N. spinosus* e *N. hentscheli*;
- Caracterizar geneticamente *Newmanella* sp. por meio do sequenciamento do gene de rDNA 12S;
- Comparar as sequências de rDNA 12S, por meio de análises moleculares, de *Newmanella* sp. com *N. radiata* e *N. spinosus*.
- Caracterizar a área de ocorrência de *Newmanella* sp. na costa brasileira.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Material examinado

Foram utilizados espécimes de *Newmanella* sp. presentes na coleção do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Cirripedia – UFF (LSEC). Os indivíduos foram catalogados numa lista chamada de “Peter *Newmanella radiata*” (PNR). Como material comparativo foram utilizados indivíduos de: *N. kolosvaryi*, *N. radiata* e *N. spinosus*. Esses indivíduos foram obtidos a partir dos trabalhos de Ross & Perreault, 1999 (*N. kolosvaryi*) e Chan & Cheang, 2016 (*N. radiata* e *N. spinosus*). *Newmanella hentscheli* não possui dados de tamanho na literatura. Portanto, a comparação com essa espécie foi feita, quando possível, pela observação visual da ilustração fornecida na descrição original (Kolosváry, 1942).

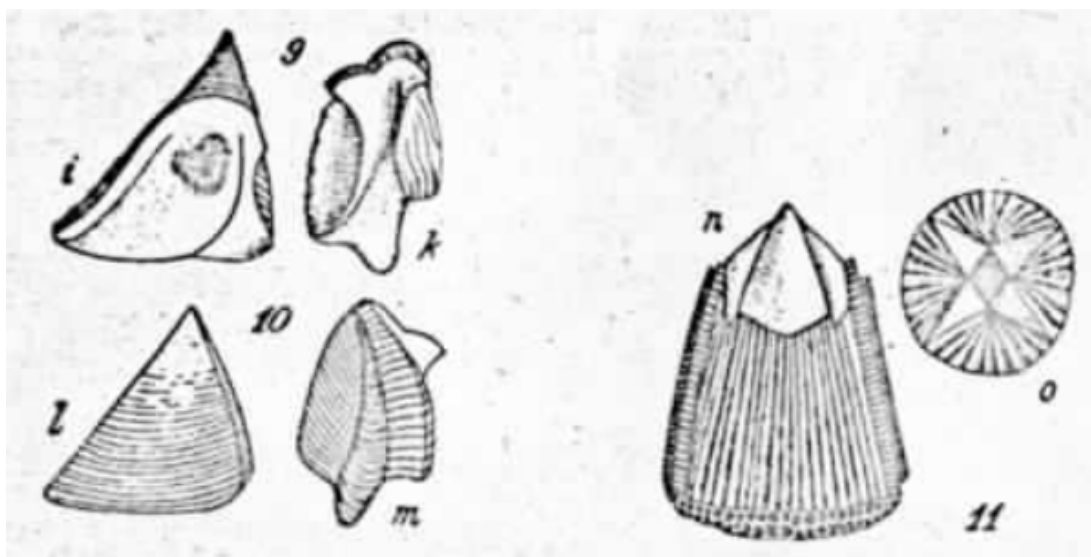


Figura 2. Representação de *Newmanella hentscheli*, espécie descrita e publicada por Kolosváry, 1942.

A identificação dos espécimes foi realizada utilizando microscópio estereoscópico para auxiliar a visualização de características diagnósticas do gênero, utilizando a descrição de Ross (1969). Então, as partes moles (corpo, apêndices e cone oral) foram removidas da carapaça e acondicionadas em microtubos tipo eppendorf, assim como a carapaça e as placas operculares. Cada espécime utilizado no estudo morfológico e molecular foi armazenado num tubo Falcon, embebido em álcool 90°GL para preservação, e recebeu uma identificação individual. Assim, foi possível o estudo em conjunto utilizando essas técnicas.

Para preparação do material para a extração, amplificação, purificação e sequenciamento de DNA, foi utilizado uma pinça para coletar parte do prossoma e então, o material foi armazenado em microtubos eppendorf e enviado para uma empresa de análises genômicas, a Helixxa (Paulínia, Brasil). E, a manipulação das amostras foi realizada em placas de Petri previamente autoclavadas, com pinças lavadas em solução 1M de hidróxido de sódio.

### 3.2. Estrutura de tamanho

Para descrever a estrutura de tamanho de *Newmanella* no Brasil foram utilizadas medidas de comprimento de base, abertura (Figura 3) e altura da carapaça. Todos os indivíduos utilizados nessa seção foram obtidos na coleção do LSEC. Então, os espécimes foram medidos no sentido rostro-carenal. As medições foram realizadas com auxílio de um paquímetro digital com sensibilidade de 10  $\mu$ m, e todas as medidas foram obtidas em milímetros.

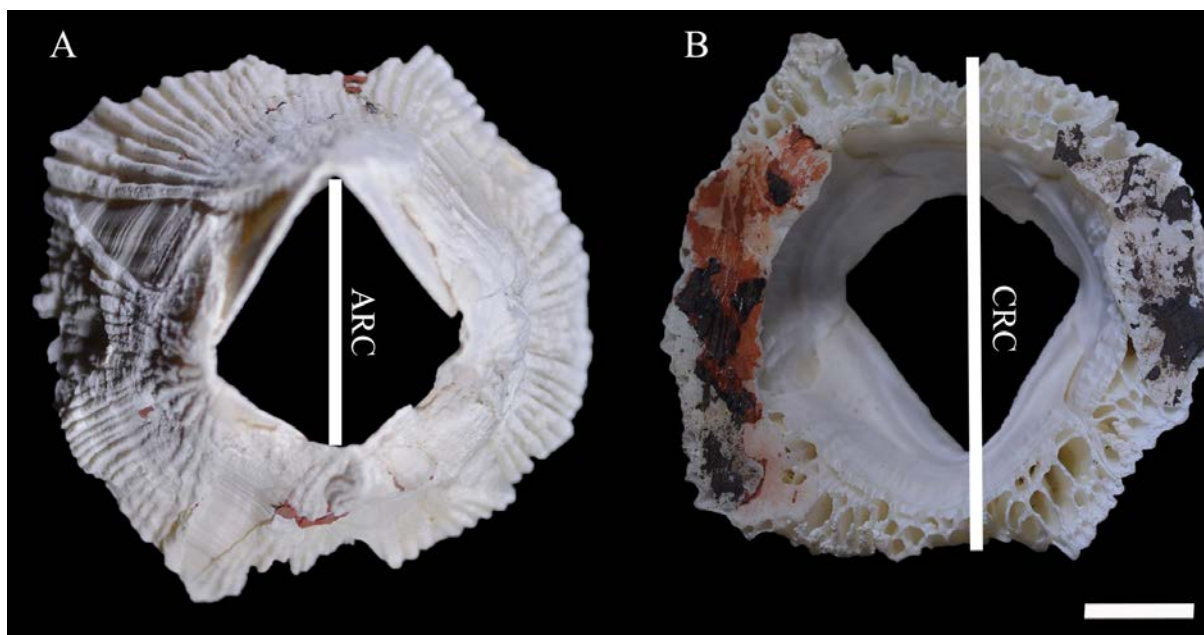


Figura 3. Medidas utilizadas para estimar a estrutura de tamanho de *Newmanella* sp. (A) visão superior, e (B) visão basal. ARC = abertura no eixo rostro-carenal, CRC = comprimento no eixo rostro-carenal.

Foram calculados os valores mínimos, máximos e médios para todas as carapaças analisadas. Também, foram estabelecidos o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) e o de determinação ( $r^2$ ). Para a análise dos dados e elaboração dos gráficos de histograma e de dispersão foram utilizados os programas de computador PAleontological STatistics (PAST; Hammer et al., 2001) e Microsoft Office Excel 365.

### 3.3. Morfometria

Foram utilizadas tanto técnicas de morfometria clássica (ou tradicional) quanto de morfometria geométrica. Para o estudo da variação da forma pela morfometria clássica, indivíduos que apresentaram placas operculares (tergo e escudo) íntegras, tiveram essas placas mensuradas em diferentes sentidos (Figura 8; Figura 9). Para realizar as medições, foram utilizados os marcos anatômicos gerados pela morfometria geométrica. Através dos marcos anatômicos as medições puderam ser tomadas, e as razões elaboradas, para a descrição das diferentes estruturas morfológicas dessas placas.

Todas as análises morfométricas (clássica e geométrica) aqui realizadas utilizaram sempre as faces internas das placas operculares. E, as placas operculares utilizadas foram sempre o escudo esquerdo e o tergo direito. *Newmanella* sp. da coleção do LSEC foi comparada com *N. spinosus*, *N. radiata* e *N. kolosvaryi*. *Newmanella hentscheli* não foi utilizada nessas comparações morfométricas pois não existem medidas de tamanho ou fotografias da espécie na literatura, existem apenas ilustrações desacompanhadas de uma escala de tamanho (Figura 2) no trabalho que a descreveu (Kolosváry, 1942).

Os 2 espécimes coletados em Piscadera, Curaçao são idênticos morfologicamente a *Newmanella* sp. coletada no Brasil. Portanto, trataremos *Newmanella* sp. do Brasil e de Curaçao como a mesma espécie. Os representantes de *N. radiata* e *N. spinosus* utilizados para comparação foram obtidos no trabalho de Chan & Cheang (2016), e foram coletados em Porto Rico e Taiwan, respectivamente. O holótipo de *N. kolosvaryi* foi retirado de Ross & Perreault (1999) e foi coletado no Panamá. O holótipo de *N. hentscheli*, retirado de Kolosváry (1942) não foi utilizado na morfometria, pois não estava acompanhado de escala. Mas, serviu para comparação visual.

Para caracterização da forma pela morfometria geométrica, as placas operculares (tergo e escudo) dos espécimes de *Newmanella* sp. foram fotografadas com equipamento digital (Nikon D7100), acoplado ao microscópio estereoscópico. Cada fotografia foi acompanhada de uma escala. As fotografias foram utilizadas para o posterior estabelecimento dos marcos anatômicos para cada uma das placas operculares.

O software tpsUtil v1.76 (Rohlf, 2018) foi utilizado inicialmente, com o intuito de compilar as fotografias, para posterior marcação dos marcos anatômicos pelo software tpsDig v2.31 (Rohlf, 2017). O programa tpsDig v2.31 (Rohlf, 2017), foi utilizado para transformação dos *landmarks* em coordenadas cartesianas (X, Y), e para delimitar a escala de todas as fotografias.

As análises subsequentes foram realizadas através do pacote estatístico Integrated Morphometrics Package 8 (IMP8) [H. D. Sheets – sheets@canisius.edu, Dept. of Physics, Canisius College, 2001 Main St. Buffalo, NY 14208]. O IMP8 consiste num conjunto de programas de computador, cada um performando um tipo específico de análise morfométrica. É um pacote gratuito e encontra-se disponível em: <http://www.philadb.com/an-behav/imp/>.

Dos programas presentes no IMP8, foram utilizados os softwares Coordgen e CVAGen (Sheets, 2014). O primeiro foi utilizado para remover os efeitos de tamanho, orientação e posição das coordenadas cartesianas, através da sobreposição de Procrustes nos marcos

anatômicos. O CVAGen foi o programa utilizado para realizar a análise de variáveis canônicas (CVA) da forma, seguida de um teste de significância.

A CVA é um método para encontrar a combinação linear de variáveis que permite a melhor discriminação possível entre dois ou mais grupos. Esse método primeiro computa *scores* para as grades de deformação em relação a uma forma referência e então realiza uma análise multivariada da variância (MANOVA). Por fim, é realizado um teste de significância baseado em Wilks' Lambda. Além disso, o CVAGen tornou possível a visualização dos resultados da CVA em gráficos de grades de deformação.

### **3.4. Biologia molecular**

A extração, amplificação, purificação e sequenciamento das amostras foi realizada pela Helixxa (Paulínia, Brasil). A extração do DNA foi realizada a partir do kit ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System, Promega© e o DNA quantificado no equipamento NanoDrop 2000/2000c (ThermoFisher Scientific). As amplificações foram realizadas utilizando GoTaq® Green Master Mix, Promega©, com anelamento à 58°C.

O fragmento amplificado foi purificado a partir do gel de agarose 1% e os sequenciamentos foram realizados utilizando o kit BigDye Terminator V3.1 (ThermoFisher Scientific), de acordo com protocolo standard do fabricante com volume final da reação de 10 µL. A termociclagem da reação de sequenciamento foi realizada no equipamento Veriti Thermo Cycler (ThermoFisher Scientific). A corrida de sequenciamento foi realizada no equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific), utilizando o polímero POP-7 (ThermoFisher Scientific) de acordo com o protocolo standard do fabricante.

As amplificações do gene mitocondrial 12S rRNA, por meio da PCR, foram desenvolvidas utilizando os iniciadores forward (GAAACCAGGATTAGATACCC3) 5'-3' e reverse (TTTCCCGCGAGCGACGGGCG3) 3'-5' (Mokady et al., 1994). A reação foi incubada no termociclador a 96°C por 1 min., seguido por 35 ciclos de 96°C por 15 seg., 50°C por 15 seg. e 60°C por 4 min.. Análises moleculares foram conduzidas para examinar a divergência entre as sequências genômicas da região 12S de *Newmanella* sp. presentes na coleção do LESC, e sequências de *N. radiata* e *N. spinosus* depositadas no GenBank por Chan & Cheang (2016).

Para a caracterização molecular, foram utilizados dois softwares: BioEdit (Hall, 1999) e o Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Mega X; Kumar, 2018). Com o BioEdit, as sequências foram tratadas e as regiões com erros de leitura foram removidas. Com o MEGA X as sequências de nucleotídeos foram alinhadas com o algoritmo Clustal W, e a divergência evolutiva entre elas foi estimada utilizando a distância par-a-par, baseada no modelo de substituição Kimura dois-parâmetros (K2P). As árvores filogenéticas foram estimadas pelo método estatístico de máxima verossimilhança, baseada no modelo K2P, com o método de inferência “Nearest-Neighbor-Interchange” (NNI). Por fim, para minimizar o efeito do baixo tamanho amostral, foi realizada uma reamostragem de 100 réplicas por bootstrap.

### **3.5. Área de ocorrência**

Para caracterizar a área de ocorrência de *Newmanella* foram realizadas buscas na literatura. Para complementar, foi realizada uma vistoria na coleção do LSEC a fim de separar e catalogar todos os indivíduos de *Newmanella* sp.. Com esses dados em mãos, foram elaboradas tabelas com o auxílio do programa de computador Microsoft Office Word 365.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estrutura de tamanho

Um total de 161 indivíduos de *Newmanella* sp. do litoral brasileiro foram analisados: 125 da Ilha do Brandão, Baía da Ribeira – RJ, 25 do Parcel das Paredes, Abrolhos – BA e 11 do Costão de Itaipu, Niterói – RJ. Os valores máximos, mínimos, média e desvio padrão encontrados estão apresentados na Tabela 1. O comprimento de base variou de 7,1 até 31,1 mm, mas houve a predominância de indivíduos com até 18 mm, os quais contribuíram com 71% das amostras (Figura 5). O menor (7,1 mm) e o maior (31,5 mm) comprimento basal foram registrados em Angra dos Reis - RJ. Em relação à média do comprimento basal, o maior e o menor valor foram registrados para Niterói - RJ (22,6 mm) e Abrolhos - BA (13,5 mm), respectivamente.

A correlação entre o comprimento basal e o comprimento da abertura sugere o crescimento isométrico, com alometria positiva ( $r = 0,9$ ). Tal resultado evidencia forte associação linear entre as duas variáveis, sugerindo que há uma manutenção no comprimento da abertura conforme o crescimento do comprimento da base. A reta de regressão obtida foi:  $y = 0,3992x + 1,1$  (Figura 6). O coeficiente de determinação encontrado foi  $R^2 = 0,84$ , indicando que o comprimento da base pode ser utilizado para prever o comprimento da abertura.

Tabela 1. Estrutura de tamanho dos espécimes de *Newmanella* sp. de três populações: Baía da Ribeira, Angra dos Reis - RJ; Parcel das Paredes, Caravelas – BA e Costão de Itaipu, Niterói – RJ. São fornecidos a média, desvio padrão, máximo e mínimo do comprimento basal, comprimento de abertura e altura; n= número de espécimes.

Local de coleta	Comp. basal	Comp. abertura	Altura
	média $\pm$ desv. mín. – máx.	média $\pm$ desv. mín. – máx.	média $\pm$ desv. mín. – máx.
Baía da Ribeira (n=125)	16,5 $\pm$ 6 7,1 – 31,5	7,7 $\pm$ 2,7 2,8 – 14,6	9 $\pm$ 3,9 3,1 – 21,8
Parcel das Paredes (n=25)	13,5 $\pm$ 2,7 7,2 – 17,8	6,6 $\pm$ 1,3 3,1 – 9,5	7,2 $\pm$ 1,6 4 – 9,6
Costão de Itaipu (n= 11)	22,6 $\pm$ 2,6 18,1 – 28,6	10,1 $\pm$ 1,4 8,5 – 13,5	10,1 $\pm$ 1,7 7,2 – 12,8

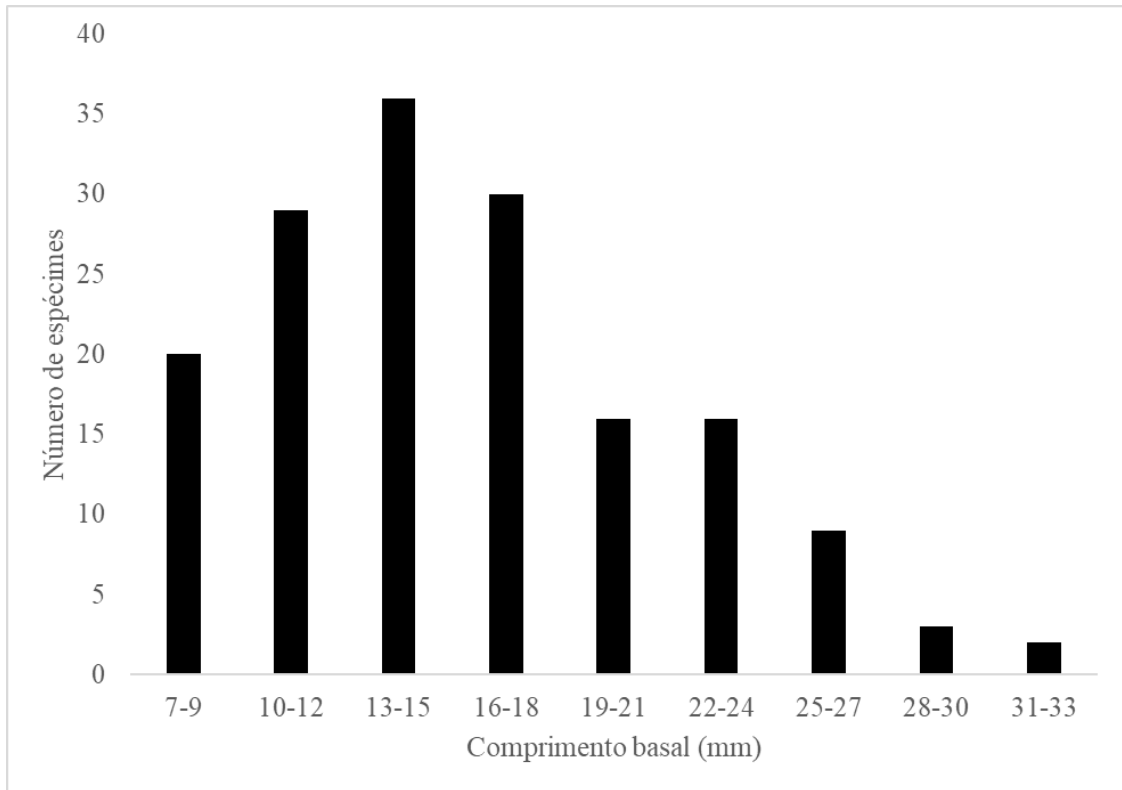


Figura 4. Estrutura de tamanho baseada no comprimento basal de espécimes de *Newmanella* sp. (n= 161) coletado no litoral brasileiro.

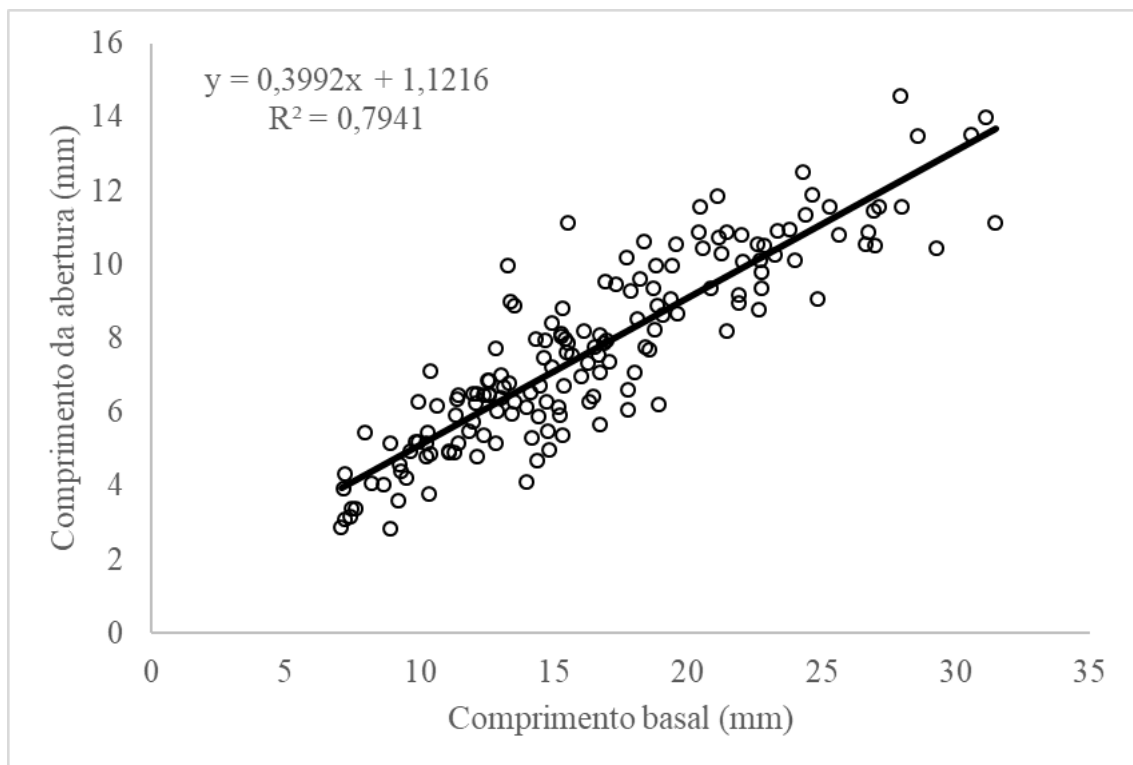


Figura 5. Diagrama de dispersão entre o comprimento basal e o comprimento da abertura no eixo rostro-carenal de indivíduos de *Newmanella* sp. coletados no Brasil.

## 4.2. Morfometria

Para as análises de morfometria clássica e geométrica do escudo, um total de 139 espécimes foram utilizados. Sendo 100 de Angra dos Reis – RJ, 23 de Parcel das Paredes, Abrolhos – BA, 10 do Costão de Itaipu, Niterói – RJ, 2 de Piscadera, Curaçao, 1 do Panamá, 1 de Vieques Sound, Porto Rico e 2 de Taiwan. E, para as análises de morfometria clássica e geométrica do tergo, um total de 166 espécimes foram utilizados. Sendo 124 da região de Angra dos Reis – RJ, 25 do Parcel das Paredes, Abrolhos – BA, 11 do Costão de Itaipu, Niterói – RJ, 2 de Piscadera, Curaçao, 1 do Porto Belo, Panamá, 1 de Vieques Sound, Porto Rico e 2 de Taiwan.

Com as técnicas de morfometria geométrica foram estabelecidos 7 marcos anatômicos para o tergo e 7 para o escudo de *Newmanella* (Figura 7). Os marcos foram escolhidos com base no estudo de Pitombo *et al.* (2017), buscando seguir os princípios dos marcos anatômicos dos tipos I e II (Bookstein, 1991; Zelditch *et al.*, 2012). A descrição dos pontos escolhidos pode ser observada na Tabela 2.

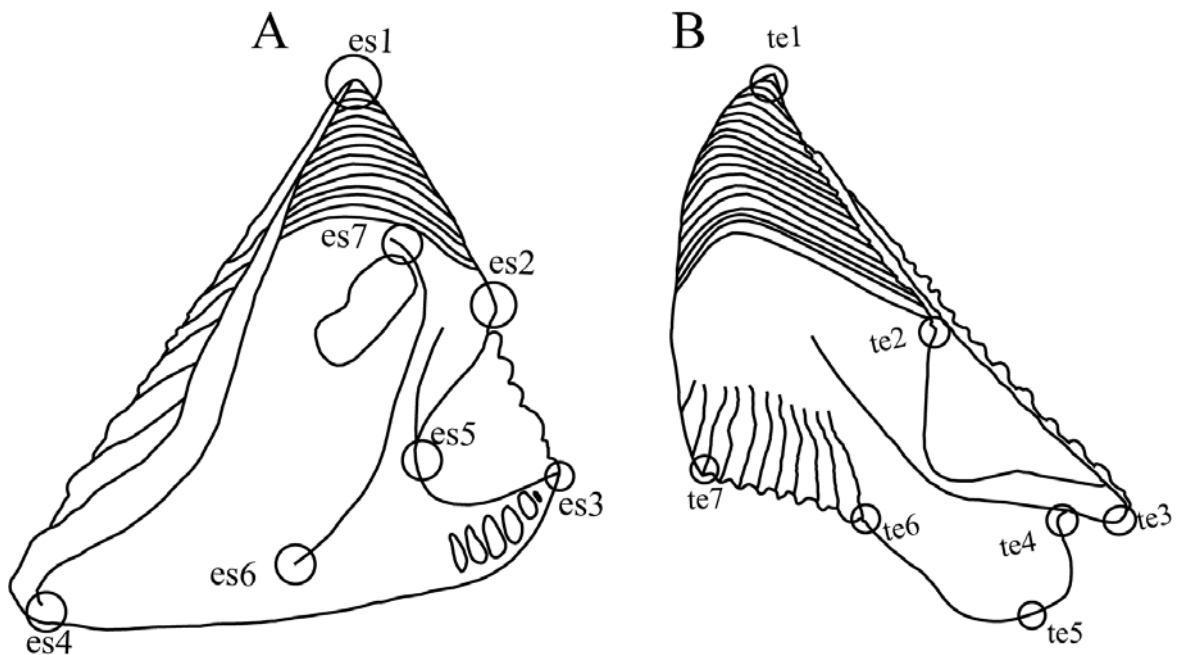


Figura 6. Face interna das placas operculares escudo (A) e tergo (B) de *Newmanella* sp. do Brasil e Curaçao, com indicação dos marcos anatômicos utilizados nas análises morfométricas.

Tabela 2. Descrição dos marcos anatômicos estabelecidos nas placas operculares (tergo e escudo) para as análises morfométricas.

Marcos Anatômicos	Descrição
es1	Ponto de máxima curvatura do ápice do escudo.
es2	Ponto de máxima curvatura da crista articular do escudo.
es3	Limite entre margem basal e tergal do escudo, marcado pela inflexão das linhas de crescimento para a face interna do escudo.

es4	Limite entre margem basal e ocludente do escudo, delimitado pelo encontro da margem ocludente interna com a margem basal.
es5	Ápice da curvatura da crista articular
es6	Ápice da crista do adutor
es7	Ponto da crista do adutor mais próximo à margem basal
te1	Ápice do tergo.
te2	Encontro da crista articular e a margem escudal do tergo.
te3	Limite da margem basal e escudal do tergo.
te4	Encontro entre a margem basal contígua a margem escudal e a margem do esporão.
te5	Ponto de máxima curvatura do esporão.
te6	Encontro entre a margem basal oposto a margem ocludente e contíguo a margem do esporão.
te7	Limite entre a margem basal e carenal do tergo estabelecido pela posição mais distal da crista de inserção do músculo depressor do tergo.

A partir dos marcos anatômicos, foram tomadas medidas de tamanho, sete para o escudo e oito para o tergo. A descrição dessas medidas está apresentada na Tabela 3. A partir dessas medições foram estabelecidas razões que pudessem ser utilizadas para distinguir morfometricamente *Newmanella* sp., de *N. radiata*, *N. kolosvaryi* e *N. spinosus*. No total, foram elaboradas seis razões para o tergo e cinco para o escudo (Tabela 4). Duas das cinco razões estabelecidas para o escudo, e três das seis razões do tergo, permitiram discriminar *Newmanella* sp. das outras espécies de *Newmanella*.

Tabela 3. Medidas das placas operculares (tergo e escudo) de *Newmanella* utilizadas, baseadas nas distâncias entre os marcos anatômicos.

Medida	Distância entre os marcos anatômicos
<b>Escudo</b>	
Comprimento da margem ocludente	es1-es4
Comprimento da margem tergal	es1-es3
Crista articular	es1-es2
Margem basal	es3-es4
Crista do adutor	es6-es7
Largura da fenda articular	es3-es5
Altura da fenda articular	es2-es3
<b>Tergo</b>	
Altura, sem esporão	te1-te4
Altura, com esporão	te1-te5
Segmento escudal da margem basal	te3-te4
Largura do esporão	te4-te6
Altura do esporão	te5-te6
Comprimento da margem basal	te3-te7
Comprimento da margem escudal	te1-te3
Comprimento da crista articular	te1-te2

No escudo, a razão crista do adutor/margem tergal e a crista articular/margem tergal podem ser usadas para discriminação dessas espécies (Tabela 4). Os gráficos box-plot para essas razões estão apresentados na Figura 8. A razão crista do adutor/margem tergal de *Newmanella* sp. e *N. spinosus* apresentaram os menores valores ( $\bar{x}0,5 \pm 0,09$  e  $\bar{x}0,3 \pm 0,01$ , respectivamente). *N. kolosvaryi* e *N. radiata* possuem os maiores tamanhos para essa razão ( $\bar{x}0,87 \pm 0$  e  $\bar{x}0,92 \pm 0$ , respectivamente), e ambas espécies têm a crista do adutor proeminente e bem demarcada. Em *N. kolosvaryi* e *N. hentscheli* a crista do adutor toca a margem basal, e isso quase acontece em *N. radiata*. Em *Newmanella* sp. e *N. spinosus* a crista do adutor não é tão bem desenvolvida e não toca a margem basal. *N. spinosus* possui a porção apical da crista do adutor fundida com a crista articular, é a única espécie do gênero a apresentar essa característica.

A relação da crista articular/margem tergal do escudo de *N. spinosus* é a menor do gênero (Tabela 4). Em *N. radiata*, *N. kolosvaryi* e *Newmanella* sp. a crista articular estende-se para um pouco além da metade do comprimento da margem tergal. Em contrapartida, a crista articular de *N. spinosus* estende-se apenas 1/3 do comprimento da margem tergal. Essa relação serviu para diferenciar *Newmanella* sp. ( $\bar{x}0,59 \pm 0,04$ ) de *N. spinosus* ( $\bar{x}0,31 \pm 0,02$ ), mas não foi útil para diferenciar *N. radiata* e *N. kolosvaryi* de *Newmanella* sp.

A morfometria clássica não detectou uma diferença morfológica significativa na fenda articular das diferentes espécies, mas pela observação visual pudemos fazer tal diferenciação (Figura 8). A fenda articular de *Newmanella* sp. e *N. spinosus* é mais larga em relação a *N. radiata*, *N. kolosvaryi* e *N. hentscheli*.

Tabela 4. Valores das razões entre as diferentes medidas do tergo e escudo dos espécimes de *Newmanella* coletados no Brasil e Curaçao (*Newmanella* sp.), Porto Rico (*N. radiata*), Panamá (*N. kolosvaryi*), e Taiwan (*N. spinosus*). Valores de tamanho amostral (n), média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (s) estão fornecidos para cada espécie.

Descrição da razão	<i>Newmanella</i> sp.	<i>N. radiata</i>	<i>N. kolosvaryi</i>	<i>N. spinosus</i>
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
Escudo (n = 139)	(N= 135)	(N = 1)	(N = 1)	(N = 2)
Margem basal / margem escudal	0,79 ± 0,06	0,73 ± 0	0,84 ± 0	0,70 ± 0,04
Margem basal / margem tergal	0,95 ± 0,09	1,01 ± 0	1,14 ± 0	0,85 ± 0,01
Crista articular / margem tergal	0,59 ± 0,04	0,58 ± 0	0,55 ± 0	0,31 ± 0,02
Largura fenda articular / margem basal	0,37 ± 0,04	0,27 ± 0	0,29 ± 0	0,44 ± 0,04
Crista do adutor / margem tergal	0,50 ± 0,09	0,87 ± 0	0,92 ± 0	0,31 ± 0,01
Tergo (n = 166)	(N = 162)	(N = 1)	(N = 1)	(N = 2)
Segmento escudal, margem basal / largura do esporão	0,23 ± 0,06	1,11 ± 0,08	0,72 ± 0	0,47 ± 0,16
Crista articular / margem escudal	0,50 ± 0,03	0,34 ± 0,01	0,36 ± 0	0,33 ± 0,02
Altura do esporão / largura do esporão	0,53 ± 0,07	1,13 ± 0,07	0,92 ± 0	0,73 ± 0,17

Largura do esporão / margem basal	$0,48 \pm 0,04$	$0,30 \pm 0,04$	$0,37 \pm 0$	$0,35 \pm 0,02$
Altura / margem basal	$1,19 \pm 0,08$	$1,12 \pm 0,24$	$1,11 \pm 0$	$1,06 \pm 0,04$
Margem basal / margem escudal	$0,79 \pm 0,05$	$0,8 \pm 0,11$	$0,84 \pm 0$	$0,84 \pm 0,02$

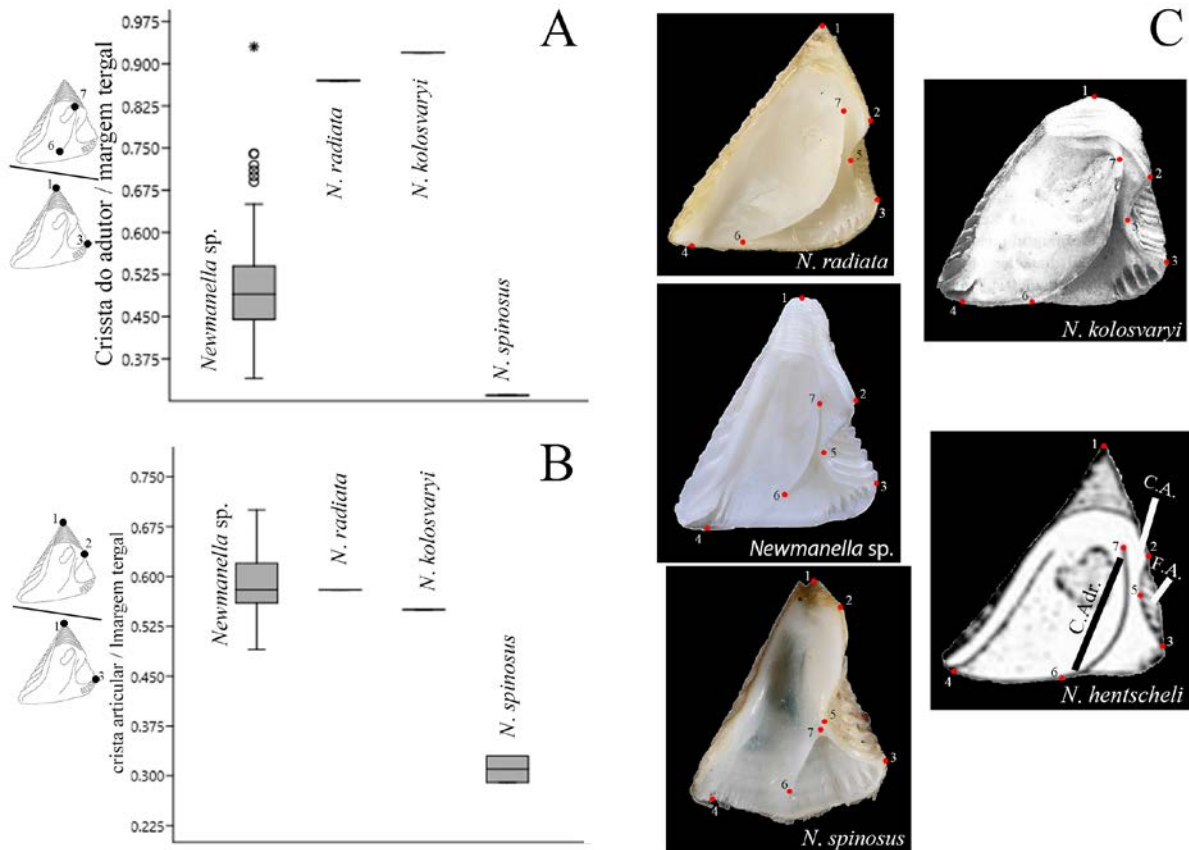


Figura 7. Box-plots das principais diferenças na placa opercular escudo entre as espécies de *Newmanella*. (A) razão segmento escudal da margem basal / largura do esporão; (B) razão crista articular / margem escudal; e (C) exemplos de cada uma das espécies analisadas acompanhadas de seus respectivos marcos anatômicos e indicações das estruturas morfológicas crista do adutor (C.Adr.), fenda articular (F.A.) e crista articular (C.A.).

Para o tergo, o segmento escudal da margem basal (SEMB) de *Newmanella* sp. é o menor dentre todas as espécies, e equivale a  $\bar{x}0,23 \pm 0,06$  da largura do esporão (LE; Tabela 4). *N. radiata* possui a maior relação dessas medidas, seu SEMB é equivalente a 1,11 da largura do esporão. *Newmanella kolosvaryi* e *N. spinosus* apresentam a razão SEMB/LE igual a 0,72 e 0,47, respectivamente. A crista articular de *Newmanella* sp. é a que mais se estende na margem escudal, ocupando cerca de metade do seu comprimento ( $\bar{x}0,5 \pm 0,03$ ). Nas outras espécies a proporção dessas medidas é muito semelhante, sendo  $\bar{x}0,34 \pm 0,01$ ,  $\bar{x}0,36 \pm 0$ , e  $\bar{x}0,33 \pm 0,02$  para *N. radiata*, *N. kolosvaryi* e *N. spinosus*, respectivamente. Os gráficos box-plots para essas razões estão apresentados na Figura 9.

A relação largura do esporão/margem basal é maior em *Newmanella* sp. ( $\bar{x}0,48 \pm 0,04$ ). Nas outras espécies, o esporão ocupa uma menor porção da margem basal, sendo  $\bar{x}0,30 \pm 0,04$ ,  $\bar{x}0,37 \pm 0$  e  $\bar{x}0,35 \pm 0,02$  para *N. radiata*, *N. kolosvaryi* e *N. spinosus*, respectivamente. Ainda sobre o esporão, sua altura em *Newmanella* sp. equivale à metade da sua largura ( $\bar{x}0,53 \pm 0,07$ ). Em *N. kolosvaryi* e *N. spinosus* a altura do esporão é parecida com a largura, com a razão altura/largura igual a  $\bar{x}0,92 \pm 0$  e  $\bar{x}0,73 \pm 0,17$ , respectivamente. *Newmanella radiata* é a única espécie em que o esporão é mais alto que largo. Sua altura equivale a  $\bar{x}1,13 \pm 0,07$  da largura. Por fim, uma característica muito importante que não foi avaliada morfometricamente é a presença de denticulos na margem escudal do tergo (Figura 9). Essa característica pode ser observada em *Newmanella* sp. e *N. spinosus*, mas é ausente em *N. kolosvaryi*, *N. radiata* e *N. hentscheli*.

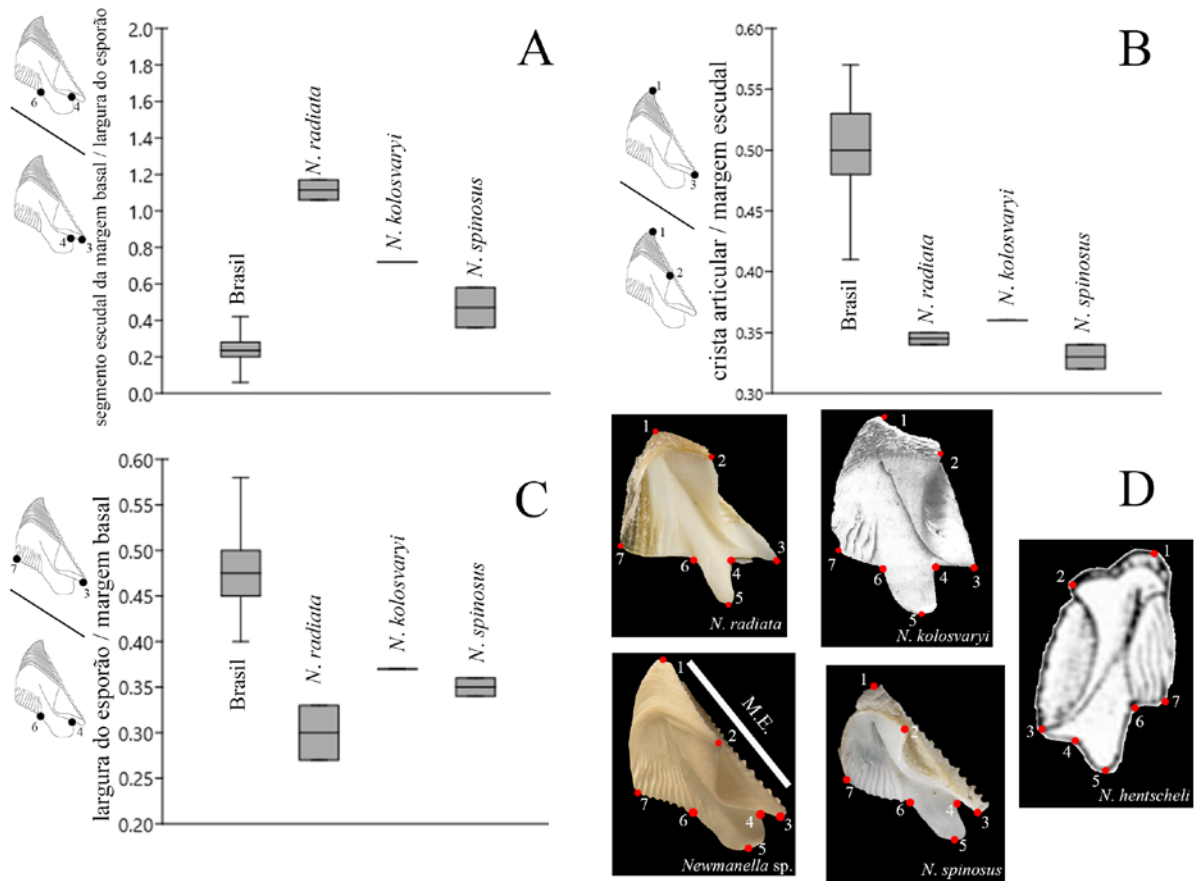


Figura 8. Box-plots das principais diferenças na placa opercular tergo entre as espécies de *Newmanella*. (A) razão segmento escudal da margem basal / largura do esporão; (B) razão crista articular / margem escudal; (C) razão largura do esporão / margem basal; e (D) exemplos de cada uma das espécies analisadas acompanhadas de seus respectivos marcos anatômicos e indicações da estrutura morfológica margem escudal (M.E.).

Na morfometria geométrica do escudo, a análise das variáveis canônicas (CVA; Figura 10) apresentou dois eixos significativos (CV1: Wilk's  $\lambda = 0,1900$ ,  $df = 40$  e  $p < 0,001$ ; CV2:

Wilk's  $\lambda = 0,5247$ ,  $df = 27$  e  $p < 0,001$ ) com autovalores de 1,76 e 0,72, respectivamente. A CVA do escudo evidenciou o agrupamento dos espécimes brasileiros com os de Curaçao nos dois eixos, CV1 e CV2. A CV1 (Figura 11) diferenciou, em função da crista articular, *N. spinosus* das demais espécies. Dentre todas as espécies, a crista articular de *N. spinosus* é a que menos se estende na margem tergal. A CV2 agrupou *N. radiata* e *N. kolosvaryi* e as separou de *N. spinosus* e *Newmanella* sp. (Brasil e Curaçao). A CV2 indicou diferença significativa na largura da fenda articular, que é mais estreita em *N. radiata* e *N. kolosvaryi* (Figura 12).

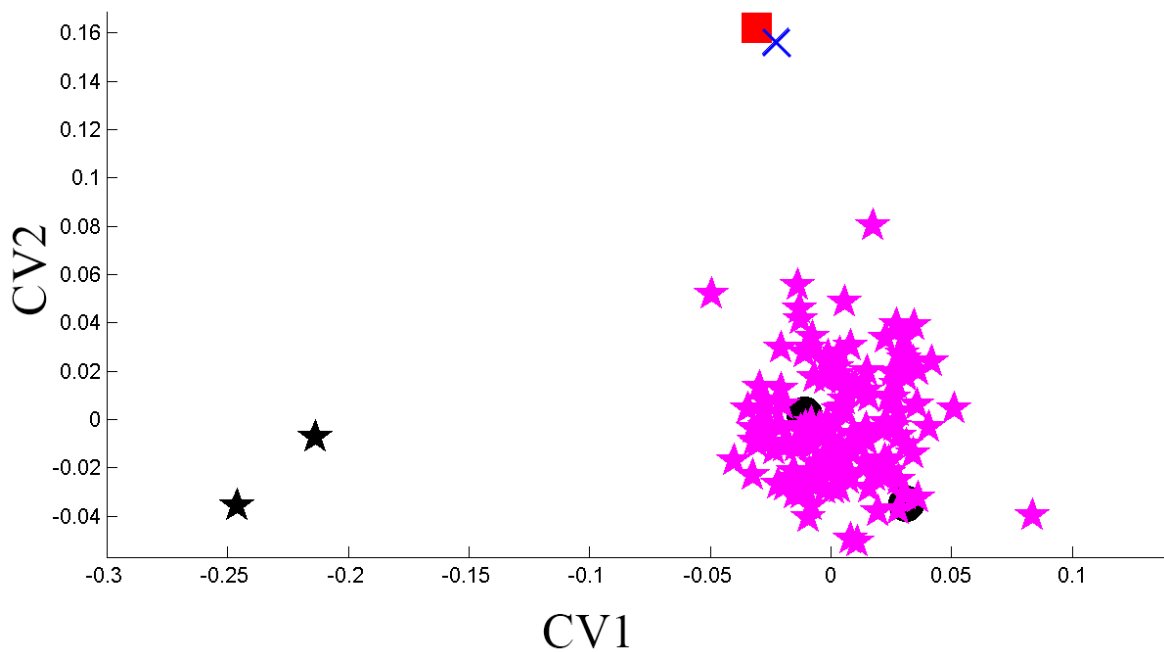


Figura 9. Análise de variáveis canônicas da placa opercular escudo entre os espécimes de *Newmanella* sp. do Brasil (estrela rosa), *Newmanella* sp. de Curaçao (círculo preto), *N. radiata* (quadrado vermelho), *N. kolosvaryi* (x azul) e *N. spinosus* (estrela preta).



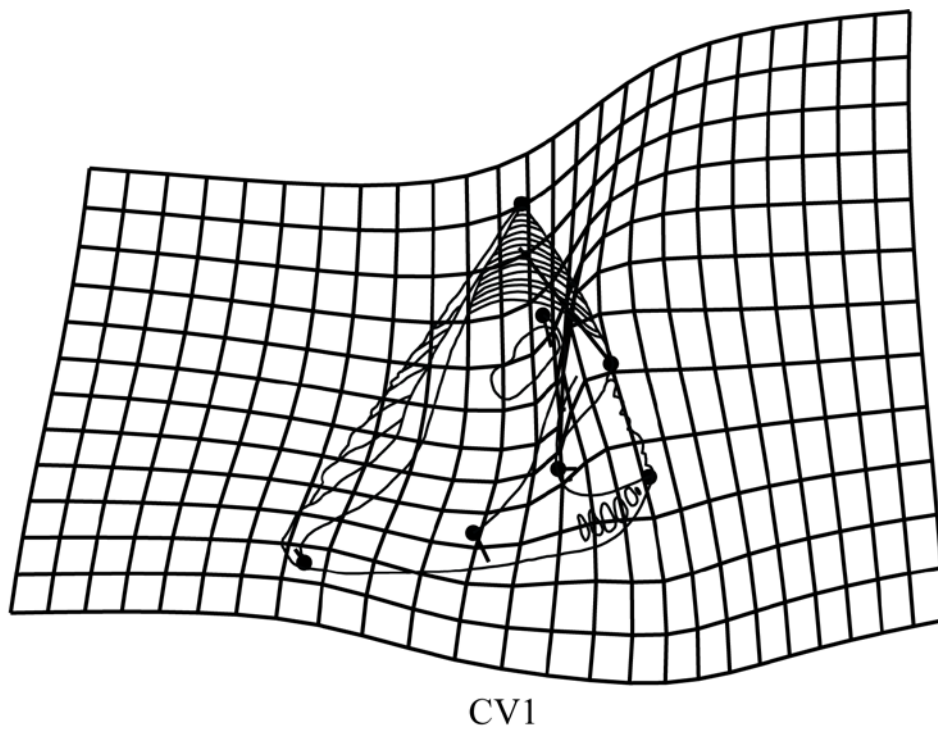


Figura 10. Grade de deformação apresentando as mudanças na forma evidenciadas pelo eixo significativo CV1, que distingue *N. spinosus* das demais espécies de *Newmanella* pelo comprimento da crista articular.

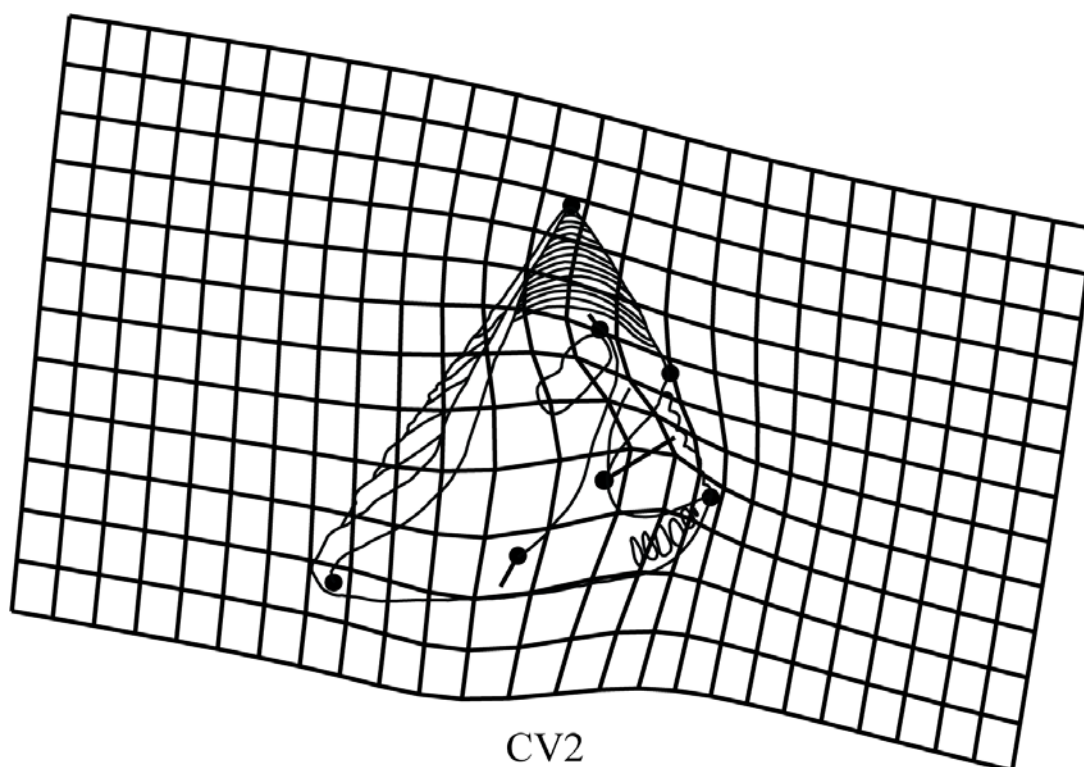


Figura 11. Grade de deformação apresentando as mudanças na forma evidenciadas pelo eixo significativo CV2, que separa os espécimes de *Newmanella* sp. (Brasil e Curaçao) e *N. spinosus*, de *N. kolosvaryi* e *N. radiata*.

Na análise de morfometria geométrica do tergo, a análise canônica da variação (CVA; Figura 13) revelou dois eixos significativos (CV1: Wilk's  $\lambda = 0,15$ ,  $df = 40$  e  $p < 0,001$ ; CV2: Wilk's  $\lambda = 0,47$ ,  $df = 27$  e  $p < 0,001$ ) com autovalores de 2,12 e 0,81, respectivamente. Em ambos os eixos não foram encontradas diferenças na forma entre *Newmanella* sp. do Brasil e Curaçao. A CV1 separou, pela largura do esporão, *Newmanella* sp. das demais espécies. O esporão de *Newmanella* sp. é o mais alargado dentre os membros de *Newmanella*, isto está ilustrado pela grade de deformação na Figura 14. A CV2 não diferenciou *Newmanella* sp. de *N. radiata*, e as separou de *N. kolosvaryi* e *N. spinosus*. A CV2 aponta diferença na posição do ápice da crista articular. Em *N. kolosvaryi* ela se afasta da margem escudal, posicionando-se além dela (Figura 15A), mas em *N. spinosus* vemos que esse afastamento ocorre na direção oposta (Figura 15B). *N. radiata* e *Newmanella* sp. apresentam uma crista, em relação a *N. kolosvaryi* e *N. radiata*, posicionada intermediariamente.

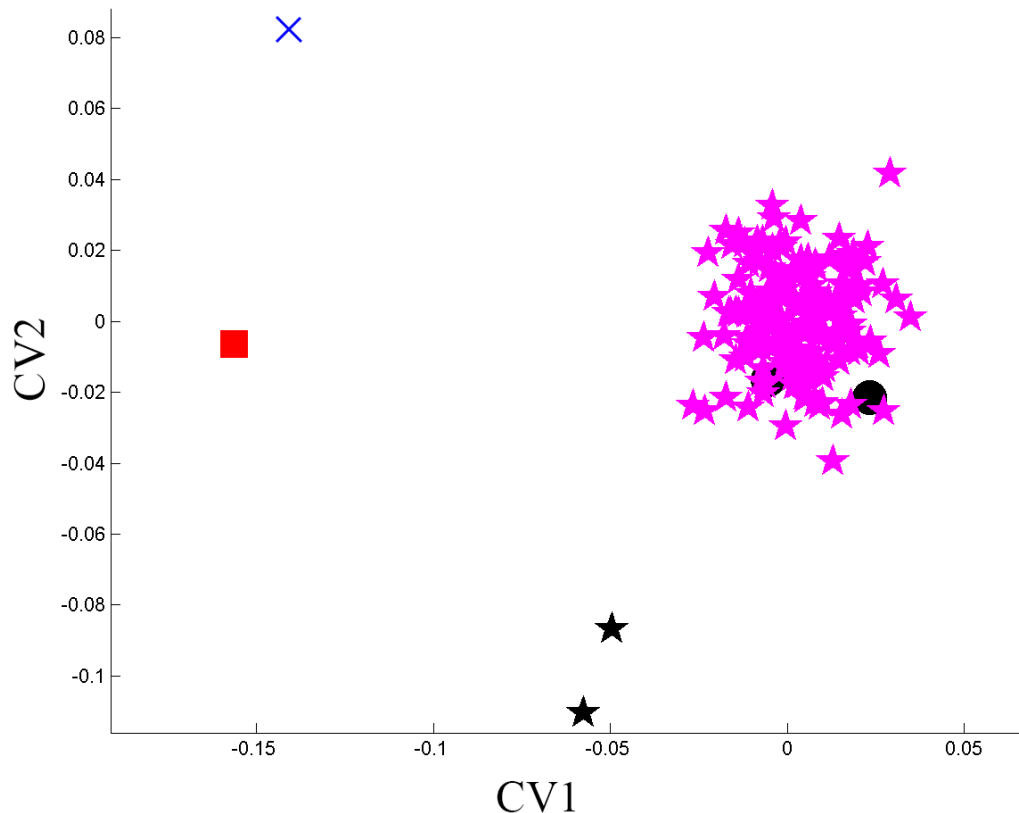


Figura 12. Análise canônica discriminante da placa opercular tergo entre os espécimes do Brasil (estrela rosa), Curaçao (círculo preto), *N. radiata* (quadrado vermelho), *N. kolosvaryi* (x azul) e *N. spinosus* (estrela preta).

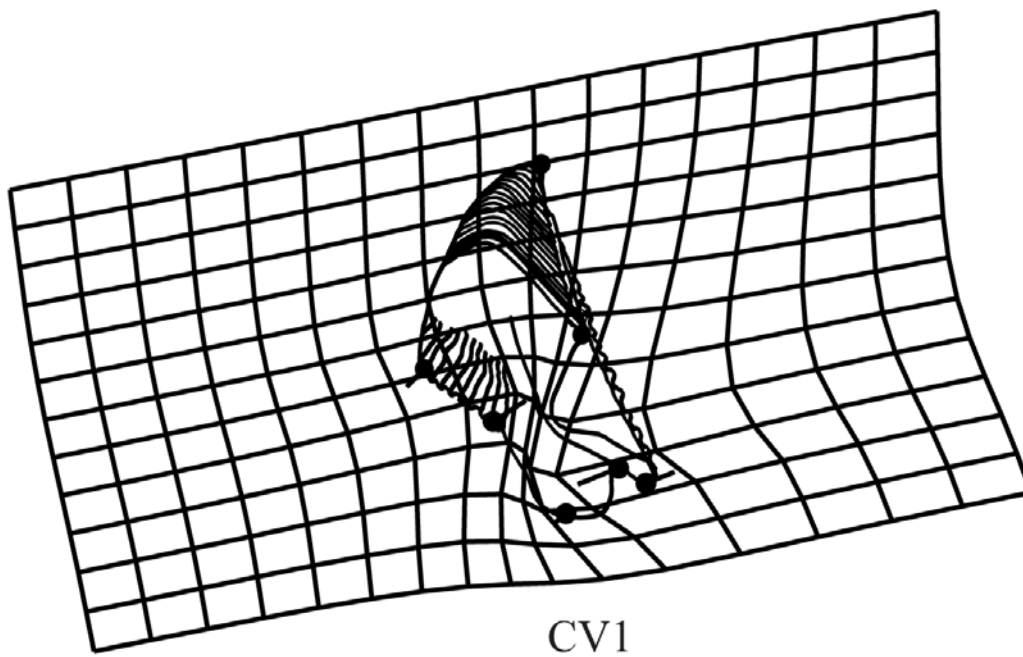


Figura 13. Grade de deformação representando as mudanças na forma evidenciadas pelo eixo significativo CV1, que separou os espécimes de *Newmanella* sp. das demais espécies do gênero, em função da largura do esporão.

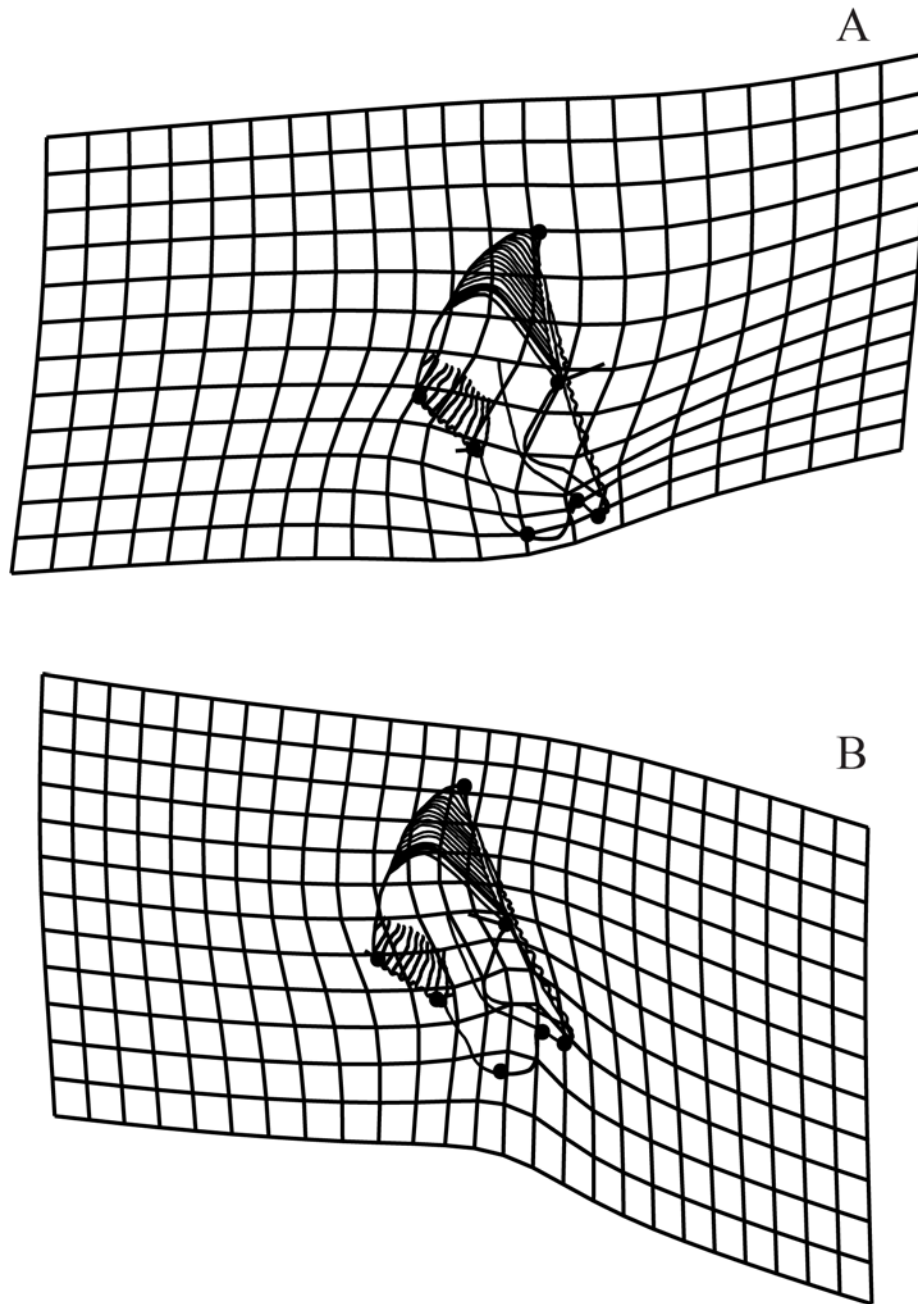


Figura 14. Grade de deformação representando as mudanças na forma evidenciadas pelo eixo significativo CV2. As diferenças na forma se deram em função da posição do ápice da crista articular, e separou *Newmanella* sp. e *N. radiata* das demais espécies analisadas. (A) diferença exibida por *N. kolosvaryi*; e (B) diferença exibida por *N. spinosus*.

### 4.3. Biologia molecular

Foram obtidas novas sequências do gene 12S para 9 espécimes de *Newmanella* sp.: cinco de Angra dos Reis – RJ, Brasil; duas de Piscadera, Curaçao e duas de Porto Belo, Panamá (Tabela 5). Após regiões com erros terem sido removidas pelo alinhamento, sequências do gene mitocondrial 12S rRNA com 244 pares de bases foram obtidas. As frequências médias dos pares de bases foram T= 33, C= 13, A = 32 e G= 22.

Tabela 5. Lista das espécies de *Newmanella* que tiveram o gene mitocondrial 12S rRNA amplificados no presente estudo.

Espécie	Local	Código
<i>Newmanella</i> sp.	Angra dos Reis, Brasil	PNR002
<i>Newmanella</i> sp.	Angra dos Reis, Brasil	PNR003
<i>Newmanella</i> sp.	Angra dos Reis, Brasil	PNR004
<i>Newmanella</i> sp.	Angra dos Reis, Brasil	PNR005
<i>Newmanella</i> sp.	Angra dos Reis, Brasil	PNR040
<i>Newmanella</i> sp.	Piscadera, Curaçao	PNR103
<i>Newmanella</i> sp.	Piscadera, Curaçao	PNR104
<i>Newmanella</i> sp.	Porto Belo, Panamá	PNR106
<i>Newmanella</i> sp.	Porto Belo, Panamá	PNR133

Foi estimada a divergência evolutiva entre as sequências de nucleotídeos, baseada no modelo Kimura 2-parâmetros. A partir da matriz de divergência evolutiva (Tabela 6), pudemos perceber que: *Newmanella* sp. apresenta apenas 1% de divergência quando comparada a *Newmanella* sp. de Curaçao (PNR103 e PNR104), indicando que são a mesma espécie. Por outro lado, *Newmanella* sp. mostrou 6 e 7% de divergência em relação aos indivíduos do Panamá (PNR106 e PNR133). Os espécimes coletados no Panamá e Curaçao também apresentaram divergência de 6 e 7% entre si. Através da análise de máxima verossimilhança entre esses organismos, foi obtido o cladograma da Figura 16, onde os indivíduos do Brasil e Curaçao ficaram agrupados, e divergiram de *Newmanella* sp. coletada no Panamá.

Tabela 6. Estimativa da divergência evolutiva, usando o modelo Kimura 2-parâmetros, entre sequências de *Newmanella* sp. coletados em Angra dos Reis – RJ, Brasil (PNR002 até PNR040), Piscadera - Curaçao (PNR103 e PNR104) e Porto Belo, Panamá (PNR106 e PNR133).

	PNR002	PNR003	PNR004	PNR005	PNR040	PNR103	PNR104	PNR106	PNR133
PNR002	0								
PNR003	0	0							
PNR004	0	0	0						
PNR005	0	0	0	0					
PNR040	0	0	0	0	0				
PNR103	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0			
PNR104	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,004	0		
PNR106	0,065	0,065	0,065	0,065	0,065	0,056	0,060	0	
PNR133	0,070	0,070	0,070	0,070	0,070	0,061	0,065	0,004	0

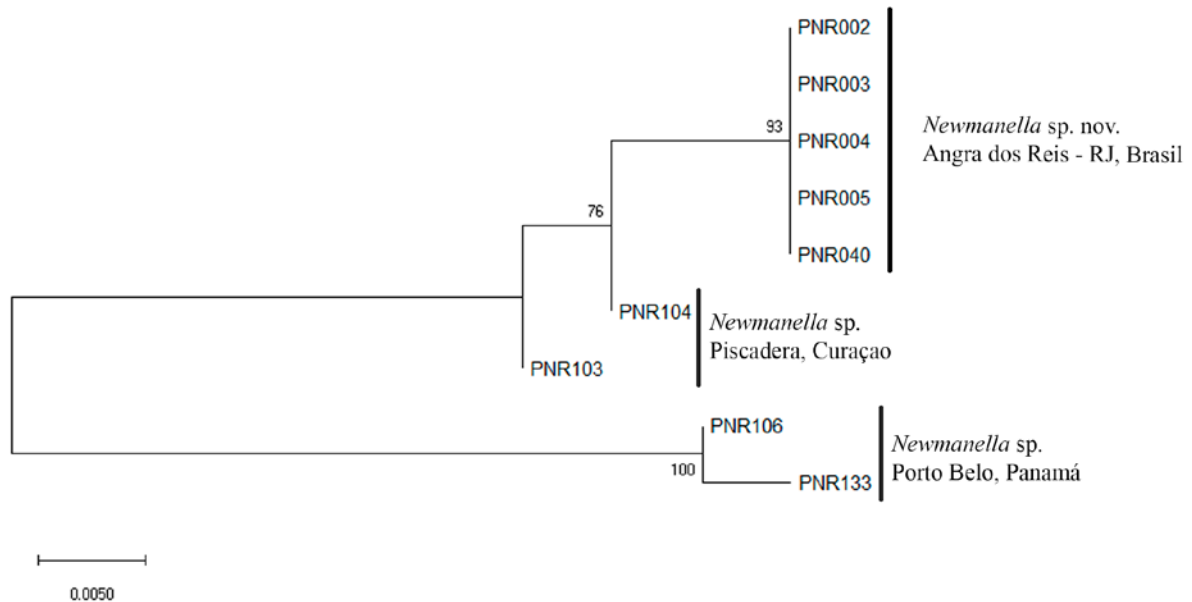


Figura 15. Análise de similaridade, usando o modelo Kimura 2-parâmetros e o método de inferência máxima verossimilhança, usando fragmentos do gene mitocondrial 12S rRNA (244 pares de base) de *Newmanella* sp. coletada no Brasil (PNR002 – PNR040), e *Newmanella* sp. coletada em Curaçao (PNR103 e PNR104) e no Panamá (PNR106 e PNR133). Valores de bootstrap abaixo dos nós.

Para comparação com *Newmanella* sp., foram utilizadas 34 sequências de espécies do gênero disponíveis no GenBank: 9 de *Newmanella radiata* (2 de Porto rico, 1 Dominica, 6 das Bahamas) e 25 sequências de *Newmanella spinosus* (3 das Filipinas e 22 de Taiwan) (Tabela 7). Não existem dados moleculares para *Newmanella hentscheli* e *Newmanella kolosvaryi*, inviabilizando sua comparação. No total, foram utilizadas 43 sequências do gene 12S para a comparação das diferentes espécies de *Newmanella*. Sendo 5 de *Newmanella* sp. (Brasil), 4 de *Newmanella* sp. (Curaçao e Panamá), 9 de *N. radiata* e 25 de *N. spinosus* (Tabela 5 e Tabela 7). Após regiões com erros terem sido removidas pelo alinhamento, sequências do gene

mitocondrial 12S rDNA com 244 pares de bases foram obtidas. As frequências médias dos pares de bases foram T= 33, C= 14, A = 33 e G= 20. A partir desse novo conjunto de sequências foi estimada a distância evolutiva entre elas, baseada no modelo Kimura 2-parâmetros. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 7. Lista das sequências do gene mitocondrial 12S rRNA de *Newmanella radiata* e *Newmanella spinosus*, disponibilizada no GenBank, com a localidade de coleta e o número de acesso no GenBank.

Espécie	Localidade	Nº Acesso GenBank
<i>Newmanella radiata</i>	Vieques Sound, Porto rico	KU359094
<i>Newmanella radiata</i>	Scotts Head Bay, Dominica	KU359095
<i>Newmanella radiata</i>	Bimini, Bahamas	KU359096
<i>Newmanella radiata</i>	Bimini, Bahamas	KU359097
<i>Newmanella radiata</i>	Bimini, Bahamas	KU359098
<i>Newmanella radiata</i>	Bimini, Bahamas	KU359099
<i>Newmanella radiata</i>	Bimini, Bahamas	KU359100
<i>Newmanella radiata</i>	Bimini, Bahamas	KU359101
<i>Newmanella radiata</i>	Vieques Sound, Porto Rico	KU359102
<i>Newmanella spinosus</i>	Shih-Ti-Ping, Hualien, Taiwan	KU359072
<i>Newmanella spinosus</i>	Shih-Ti-Ping, Hualien, Taiwan	KU359073
<i>Newmanella spinosus</i>	Shih-Ti-Ping, Hualien, Taiwan	KU359074
<i>Newmanella spinosus</i>	Shih-Ti-Ping, Hualien, Taiwan	KU359075
<i>Newmanella spinosus</i>	Cheng Gong, Taitung, Taiwan	KU359076
<i>Newmanella spinosus</i>	Cheng Gong, Taitung, Taiwan	KU359077
<i>Newmanella spinosus</i>	Cheng Gong, Taitung, Taiwan	KU359078
<i>Newmanella spinosus</i>	Cheng Gong, Taitung, Taiwan	KU359079
<i>Newmanella spinosus</i>	Cheng Gong, Taitung, Taiwan	KU359080
<i>Newmanella spinosus</i>	Kuei-Shan Island, Yilan, Taiwan	KU359081
<i>Newmanella spinosus</i>	Citou, Penghu, Taiwan	KU359082
<i>Newmanella spinosus</i>	He-Ping Island, Keelung, Taiwan	KU359083
<i>Newmanella spinosus</i>	He-Ping Island, Keelung, Taiwan	KU359084
<i>Newmanella spinosus</i>	He-Ping Island, Keelung, Taiwan	KU359085
<i>Newmanella spinosus</i>	He-Ping Island, Keelung, Taiwan	KU359086
<i>Newmanella spinosus</i>	He-Ping Island, Keelung, Taiwan	KU359087
<i>Newmanella spinosus</i>	He-Ping Island, Keelung, Taiwan	KU359088
<i>Newmanella spinosus</i>	He-Ping Island, Keelung, Taiwan	KU359089
<i>Newmanella spinosus</i>	Shih-Ti-Ping, Hualien, Taiwan	KU359090
<i>Newmanella spinosus</i>	Shih-Ti-Ping, Hualien, Taiwan	KU359091
<i>Newmanella spinosus</i>	Shih-Ti-Ping, Hualien, Taiwan	KU359092
<i>Newmanella spinosus</i>	Shih-Ti-Ping, Hualien, Taiwan	KU359093
<i>Newmanella spinosus</i>	Puerto Galera, Filipinas	KU359069
<i>Newmanella spinosus</i>	Puerto Galera, Filipinas	KU359070
<i>Newmanella spinosus</i>	Puerto Galera, Filipinas	KU359071

Tabela 8. Divergência evolutiva entre *Newmanella* sp. da Baía da Ribeira, Angra dos Reis – RJ, Brasil e demais espécies de *Newmanella*, utilizando sequências do gene mitocondrial 12S rRNA e baseada no modelo Kimura 2-parâmetros. Os valores de média, desvio padrão, máximos e mínimos, e número de espécimes estão fornecidos.

Espécime/localidade	N	Mín.	Máx.	Média	Desvio Padrão
<i>Newmanella radiata</i>	9	0,06	0,06	0,06	0
<i>Newmanella spinosus</i>	25	0,09	0,10	0,10	0
<i>Newmanella</i> sp. (Curaçao)	2	0,01	0,01	0,01	0
<i>Newmanella</i> sp. (Panamá)	2	0,06	0,07	0,07	0

Na Tabela 8 podemos ver que as sequências nucleotídicas de *Newmanella* sp. do Brasil divergiram 6 e 10% de *N. radiata* e *N. spinosus*, respectivamente. As relações entre as espécies foram obtidas por meio das sequências 12S utilizando o método de inferência filogenética *Maximum Likelihood* baseado no modelo Kimura 2-parâmetros (Figura 17). Foram obtidos dois grupos: o primeiro com os espécimes de *Newmanella spinosus* e segundo com os demais espécimes de *Newmanella*. O segundo grupo apresenta dois subgrupos: um com os espécimes do Brasil e Curaçao; e o outro com os espécimes de *Newmanella radiata* das Bahamas, Dominica e Porto Rico junto com os espécimes do Panamá. Os resultados obtidos indicam que os espécimes de *Newmanella* sp. do Brasil e de Curaçao são a mesma espécie, e devem ser considerados uma espécie distinta de *Newmanella radiata*.



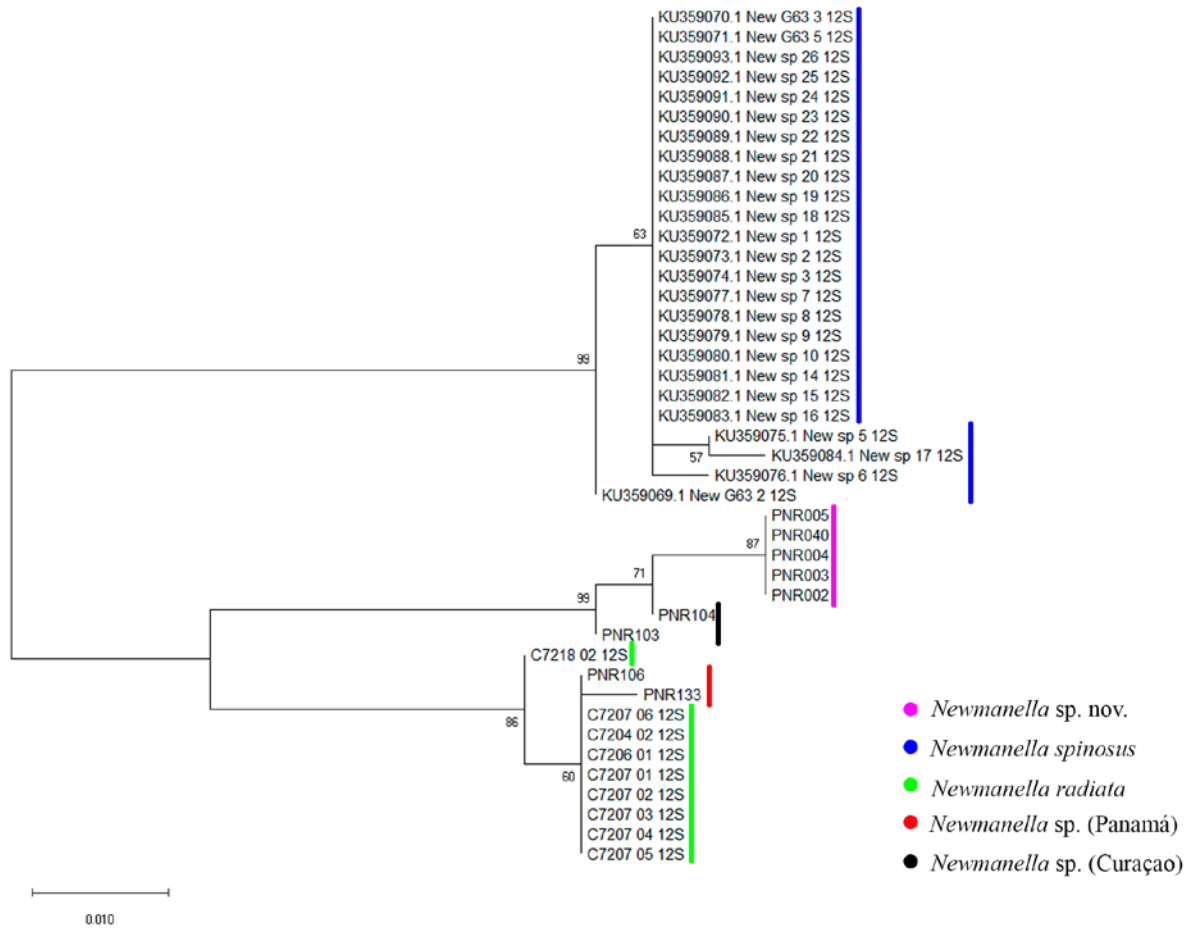


Figura 16. Análise de similaridade baseada na máxima verossimilhança usando o modelo Kimura 2-parâmetros, usando fragmentos do gene mitocondrial 12S rDNA (244 bases) de *Newmanella radiata* e *N. spinosus* obtidos através do GenBank, e de *Newmanella sp.* (do Brasil), *Newmanella sp.* (Curaçao) e *Newmanella sp.* (Panamá), obtida na coleção do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Cirripédia - UFF. Valores de bootstrap abaixo dos nós.

#### 4.4. Área de ocorrência

A partir dos registros no Brasil de *Newmanella* sp. na coleção do LESC, e de *N. radiata* (sensu Young, 1995) no Museu Nacional – UFRJ e na literatura científica, foi elaborado um mapa de distribuição e uma tabela contendo os registros encontrados (Figura 18; Tabela 9). *Newmanella* possui ampla distribuição no litoral brasileiro, sendo reportado de Pernambuco até Santa Catarina. Além disso, dois exemplares de *Newmanella* sp. coletados em Curaçao foram identificados, pelas análises morfológicas e moleculares, como a mesma espécie, ampliando sua área de ocorrência para o Caribe.



Figura 17. Mapa de distribuição de *Newmanella* para o litoral brasileiro, baseado nos registros encontrados nas coleções do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Cirripedia - UFF e Museu Nacional – UFRJ, e na literatura científica.

Tabela 9. Ocorrência de *Newmanella* sp. e *N. radiata* (sensu Young, 1995) no litoral brasileiro, obtidos a partir dos registros na coleção do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Cirripédia – UFF (CCUFF), Coleção do Museu Nacional – UFRJ e dados da literatura.

Localidade	Estado	Fonte bibliográfica	No Coleção	Data de coleta
Recife	PE	Farrapeira, 2009		2009
Porto da Barra, Salvador	BA		CCUFF257	10/02/2009
Parcel dos Abrolhos	BA		CCUFF268	03/02/2003
Costão sudoeste da Ilha de Gamba, Piúma	ES		CCUFF894	28/09/2011
Ubú, Anchieta	ES	Klôh et al., 2013		2013
Praia de João Fernandinho, Búzios	RJ		CCUFF348	26/05/2009
Arraial do Cabo	RJ	Lacombe, 1978		
Bacia de Campos, plataforma 55/47, Arraial do Cabo	RJ	?	CCUFF171	13/09/2007
Itaipuaçu, Maricá	RJ		CCUFF241	04/01/2008
Arquipélago de Maricás, Maricá	RJ		CCUFF238	12/03/2010
Praia de Itacoatiara, Niterói	RJ		CCUFF783	31/08/2015
Itaipu, Niterói	RJ		CCUFF041	04/05/2004
Canal de Camboinhas, Niterói	RJ		CCUFF777	31/08/2015
Juruçuba, Niterói	RJ		CCUFF080	28/04/2008
Praia Adão e Eva, Niterói	RJ		CCUFF891	30/09/2016
Ilha da mãe, Niterói	RJ		CCUFF028	27/10/2003
Costão da Praia Vermelha, Niterói	RJ		CCUFF725	20/09/2011
Praia da Boa Viagem, Niterói	RJ		CCUFF753	03/08/2015
Molhe nordeste da Marina da Glória	RJ		CCUFF806	20/04/2016
Ilha do Brandão, Angra dos Reis	RJ		CCUFF	2013/2014
Ilha rapada, Baía de Paraty	RJ		CCUFF034	20/11/2003
Ponta da Mesa, Paraty	RJ		CCUFF039	16/10/2003
Ilha dos Meros, Paraty	RJ		CCUFF240	18/11/2003
São Sebastião	SP	Young, 1991		
Praia do Baleeiro, Ilha Bela	SP		MNRJ2408	04/12/1994
Enseada do Itapocoroy	SC	Severino & Resgalla Jr., 2005	MNRJcarcino MNRJ12379	01/06/1998

#### 4.5. Taxonomia

É aqui proposto, tanto pelas diferenças morfológicas como moleculares, que os espécimes de *Newmanella* do litoral brasileiro, incluindo Curaçao, sejam consideradas uma espécie nova. Nas ilustrações de *N. radiata* fornecidas por Young (1995), pudemos perceber que o autor analisou espécimes idênticos a mesma espécie que está descrita na Figura 20, sugerindo que *N. radiata* na verdade é *Newmanella* sp. nov.. Os espécimes de *N. radiata* depositados em museus não foram avaliados nesse estudo, impedindo maiores generalizações. A despeito disso, sugerimos que os registros de *N. radiata* no Brasil, sejam considerados como *Newmanella* sp. nov.. A seguir, é fornecida uma descrição da nova espécie. Devido a exigência do código de nomenclatura zoológica, uma dissertação não pode ser considerada um veículo para uma descrição formal, e desta forma, não será aqui proposto um nome para esse táxon.

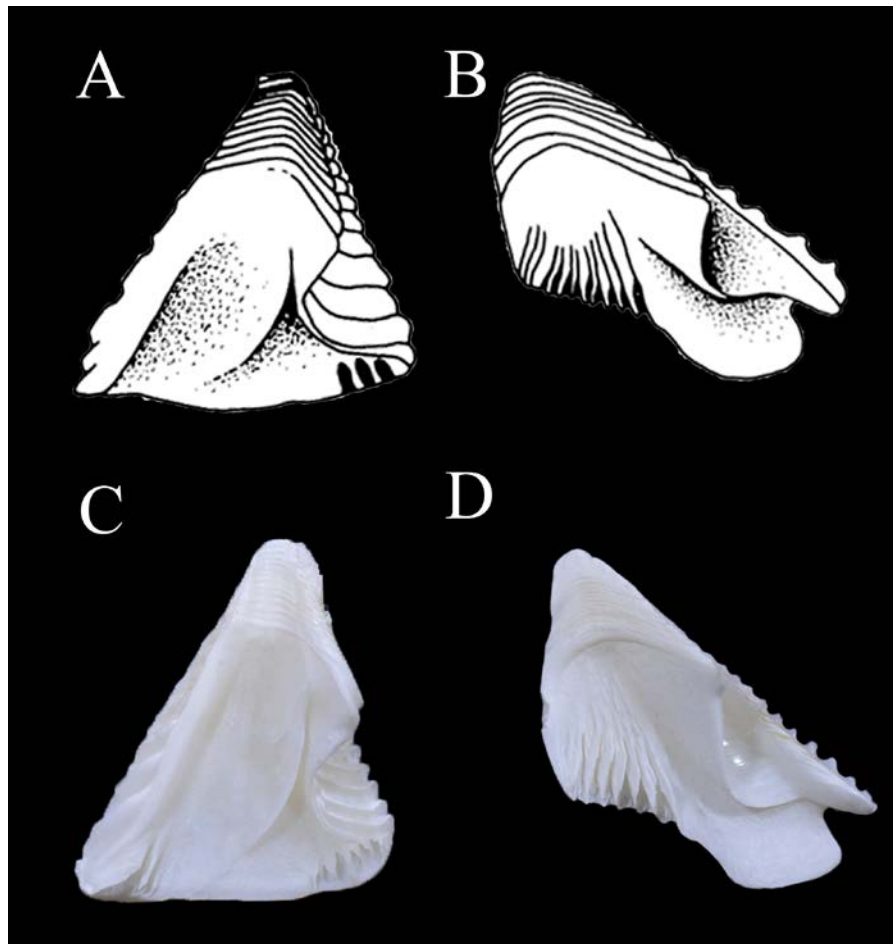


Figura 18. Tergo e escudo de *Newmanella*. (A) *Newmanella radiata* (sensu Young, 1995); e (B) escudo e tergo de *Newmanella* sp. descrita no presente trabalho.

Ordem Sessilia Lamarck, 1818  
Subordem Balanomorpha Pilsbry, 1916  
Superfamília Tetracitoidea Gruvel, 1903  
Família Tetracitidae Gruvel, 1903  
Subfamília Newmanellinae Ross & Perreault, 1999  
*Newmanella* Ross, 1969  
*Newmanella* sp. nov.

*Newmanella radiata*: Lacombe, 1977; Lacombe, 1978; Young, 1991, 1998; Severino & Resgalla Jr., 2005; Farrapeira, 2009; Klôh et al., 2013 [non *Newmanella radiata* (Bruguière, 1789)]

**Material tipo.** Holótipo: Adulto, PNR021. Ilha do Brandão, Angra dos Reis – RJ. Coletado por F.B. Pitombo, P.P. Santana e R.S.P. D’Almeida, outubro/2014. Parátipos. 15 indivíduos adultos. Coletados em dezembro/2014: PNR002, PNR003, PNR004; outubro/2014: PNR005, PNR006, PNR007, PNR008, PNR009, PNR010, PNR017, PNR018, PNR019, PNR020 e PNR075; e julho/2014: PNR040. Todos com a mesma localidade e coletores que o holótipo.

**Diagnóstico:** escudo com fenda articular larga; cristas do depressor lateral profundas e bem demarcadas; crista do adutor não toca a margem basal e não é fundida com a crista articular. Tergo com crista articular projetando-se cerca de 1/2 do comprimento da margem escudal; fenda articular larga; margem escudal com dentículos conspícuos e segmento escudal da margem basal com aproximadamente 1/4 da largura do esporão.

**Descrição.** Baseada no holótipo (Figura 20), suplementada com medições realizadas nos 10 parátipos. Carapaça com comprimento basal variando de 12,6 a 30,6 mm ( $\bar{x}$ 23,8  $\pm$ 4,8 mm), abertura variando de 6,8 a 14,6 mm ( $\bar{x}$ 10,9  $\pm$ 1,7 mm). Concha cônica, branca, com quatro placas, compartimentos discretos. Superfície rugosa, com costelas suaves, linhas que se estendem até a base. Abertura da concha pentagonal, em forma de diamante. Rádio largo, margem superior oblíqua; parede tubífera formada pela presença de septos longitudinais irregulares, conectando a margem externa e a margem interna, septos com dentículos transversais; face externa com estrias longitudinais. Ala larga com margem superior oblíqua, sólida. Placas parietais formadas por várias fileiras de tubos irregulares não preenchidos; base calcária, sólida.

Escudo triangular, com os ângulos da margem basal levemente arredondados. Fenda articular bem desenvolvida, ocupando cerca de 1/3 do comprimento da margem basal. Fenda

articular se estende até o final das cristas do músculo depressor lateral. Crista articular bem desenvolvida, projetada para fora, sendo possível, em alguns casos, ver parte da crista articular pela vista dorsal dessa placa. Crista articular se estende até um pouco mais da metade ( $\bar{x}0,58 \pm 0,03$  mm;) da margem tergal. Cristas do músculo depressor rostral discretas. Crista do adutor encerrando-se antes de tocar a margem basal.

Tergo triangular, um pouco mais alto que largo, com razão entre a margem basal e a altura de  $\bar{x}0,9 \pm 0,2$  mm. Fenda articular larga e bem desenvolvida. Crista articular se estende até metade da margem escudal ( $\bar{x}0,49 \pm 0,03$  mm). Esporão com base reta, levemente arredondada bilateralmente, ocupando 1/2 ( $\bar{x}0,5 \pm 0,03$ ) do comprimento da margem basal. Segmento escudal da margem basal equivale a 1/3 da largura do esporão. Esporão e margem basal formam um ângulo quase reto (do lado escudal) e um obtuso (do lado carenal).

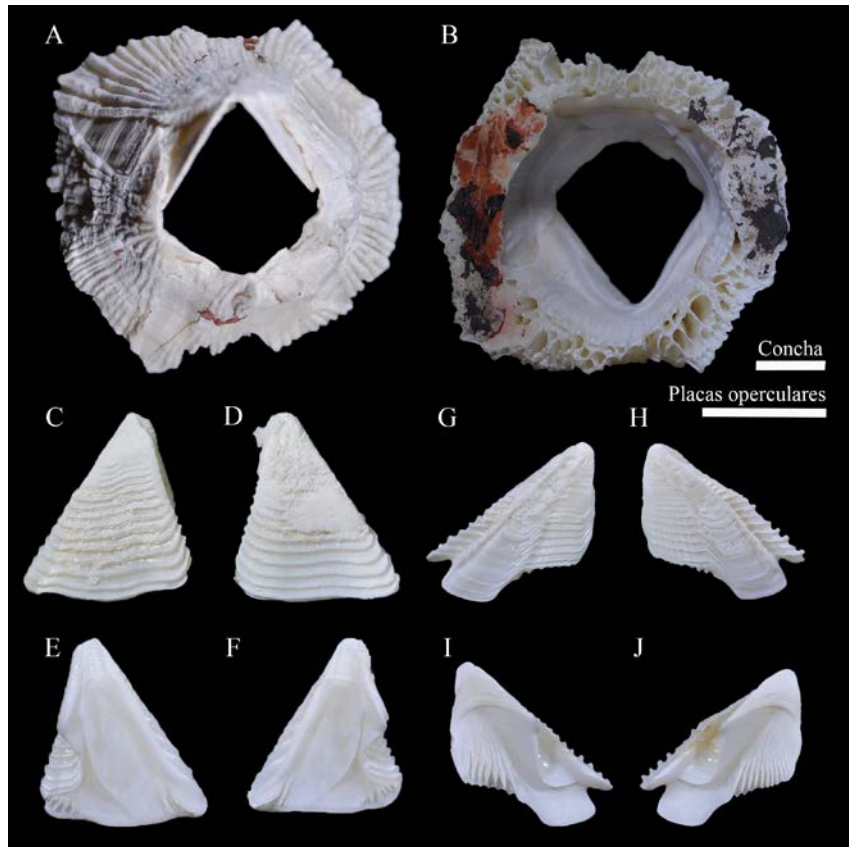


Figura 19. Holótipo de *Newmanella* sp. nov., PNR021. (A) vista anterior da concha; (B) vista basal da concha, mostrando os túbulos parietais; (C) escudo direito, vista dorsal; (D) escudo esquerdo, vista dorsal; (E) escudo direito, vista ventral; (F) escudo esquerdo, vista ventral; (G) tergo direito, vista dorsal; (H) tergo esquerdo, vista dorsal; (I) tergo direito, vista ventral; e (J) tergo esquerdo, vista ventral. Escalas = 4 mm.

**Comentários:** No escudo, a crista do adutor serve prontamente para distinguir *Newmanella* sp. nov. das demais espécies (Figura 20, Figura 21). Em *Newmanella* sp. nov. a crista do adutor não é proeminente e bem demarcada como em *N. kolosvaryi*, *N. hentscheli* e *N. radiata*, e não se funde com a crista articular como ocorre em *N. spinosus*. Ademais, em *N. kolosvaryi* e *N. hentscheli* a crista do adutor toca a margem basal, isto não é observado em nenhuma das outras espécies. No tergo, a relação entre o segmento escudal da margem basal (SEMB) e a crista articular separam *Newmanella* sp. nov. das outras espécies. Na nova espécie, a relação SEMB/largura do esporão é a menor do gênero (equivale a 0,25 da largura do esporão). Em *N. radiata*, *N. kolosvaryi* e *N. hentscheli* tal relação equivale a 1,1, 0,75 e 0,5, respectivamente. A crista articular do tergo na nova espécie estende-se até 1/2 da margem escudal, e em *N. radiata*, *N. kolosvaryi* e *N. spinosus*, estende-se aprox. 1/3. A fenda articular da nova espécie é larga em relação a *N. kolosvaryi*, *N. hentscheli* e *N. radiata*. O esporão de *Newmanella* sp. nov., *N. kolosvaryi* e *N. spinosus* é mais largo que alto (razão altura/largura  $\bar{x}$ 0,53,  $\bar{x}$ 0,92 e  $\bar{x}$ 0,73, respectivamente). Mas isso não é verdade para *N. radiata*, que é a única espécie a possuir o esporão mais alto que largo, com razão altura/largura de  $\bar{x}$ 1,13. Existe apenas uma ilustração da margem interna do tergo de *Newmanella hentscheli* em sua descrição original, que indica um esporão mais estreito que o de *Newmanella* sp. nov.. A presença de dentículos na margem escudal do tergo de *Newmanella* sp. nov., também presente em *N. spinosus*, distingue essas duas espécies de *N. radiata*, *N. kolosvaryi* e *N. hentscheli*.

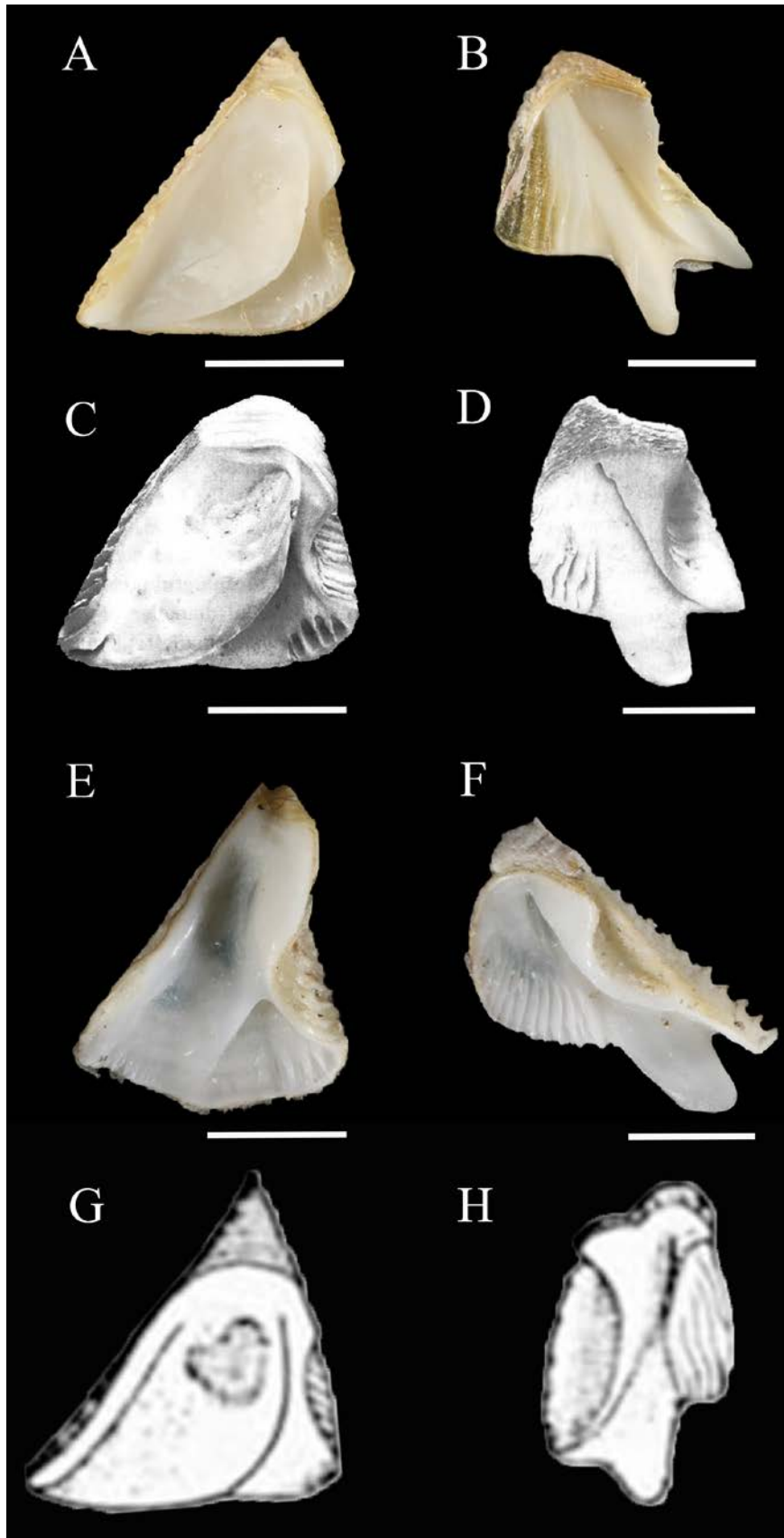


Figura 20. Comparação entre as placas operculares de *Newmanella*. (A, C, E e G) Escudos de *N. radiata*, *N. kolosvaryi*, *N. spinosus* e *N. hentscheli*, respectivamente; (B, D, F e H) Tergos de *N. radiata*, *N. kolosvaryi*, *N. spinosus* e *N. hentscheli*, respectivamente. *N. hentscheli* não possui escala. Escalas = 2 mm.



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Estrutura de tamanho

Não existem registros sobre a estrutura de tamanho de *N. hentscheli* e *N. spinosus*. Ross & Perreault (1999) registraram para *N. kolosvaryi* um comprimento basal no eixo rostro-carenal (CRC) máximo de 12,9 mm. O CRC de *Newmanella* sp. nov. é o maior (31,5 mm) registrado para todo o grupo. Seguido de *N. radiata* que exibiu CRC máximo de 31,3 mm (Ross, 1969). O CRC médio de *Newmanella* sp. nov. coletada na Baía da Ribeira, Angra dos Reis – RJ, Parcel das Paredes, Abrolhos - BA e Costão de Itaipu, Niterói – RJ é de 16,5 mm, 13,5 mm, e 22,6 mm, respectivamente.

Outros membros de Tetraclitidae apresentam comprimento semelhante com registros de comprimento basal médio de 20 mm no gênero *Tetraclitella* (Ross, 1971). Outros registros relatam tamanho basal médio de 2,6 mm e máximo de 10 mm para *Tesseropora atlantica* (Newman & Ross, 1977; Costa & Jones, 2000). Skinner et al. (2007) relatou para Cabo Frio – RJ membros de *Tetraclita stalactifera* com comprimento basal máximo de 16,7 mm. *Tesseropora rosea* apresenta o maior CRC em Tetraclitidae. Newman & Ross (1977) forneceram medidas de CRC máximo de 30 e 40 mm para *T. rosea* e *T. wireni*, respectivamente.

Dados de comprimento de abertura ou altura da carapaça para *Newmanella* são inexistentes, limitando maiores comparações. Como observado acima, a despeito da carência de informações, podemos afirmar que *Newmanella* sp. nov. está entre os tetraclitídeos com maior tamanho. As descrições das espécies de cirripédios geralmente não apresentam dados de estrutura de tamanho (Kolosváry, 1942; Foster, 1980; Zullo, 1992), mas vale ressaltar que quanto mais informações estiverem disponíveis, maior será a nossa compreensão do grupo. Informações precisas e explícitas são fundamentais para futuras classificações e inferências sobre a taxonomia desses animais.

### 5.2. Morfometria

A descrição e comparação da morfologia das placas operculares, em conjunto com técnicas de morfometria clássica, são usadas correntemente na literatura para a classificação de espécies de cirripédios. Temos como exemplo o próprio Darwin (1854), que baseado na morfologia e morfometria da concha e placas operculares, reorganizou e reclassificou diversos grupos de cirripédios. Além disso, autores como Ross (Ross, 1969), Newman (Newman & Ross, 1976; Araya & Newman, 2018) e Pitombo (Pitombo, 2004; Pitombo et al., 2017), também fizeram estudos de cirripédios através da morfologia e da morfometria. Os resultados aqui encontrados mostraram a eficiência da técnica, a morfometria geométrica, que mesmo com o

baixo número de amostras caribenhas aqui utilizadas, foi possível perceber as distinções morfológicas entre os diferentes táxons comparados. Embora essa abordagem metodológica ainda não seja muito utilizada em cirripédios, sua aplicação na compreensão da variação da forma já foi feita em *Megabalanus* (Pitombo et al., 2017)

Tanto as técnicas de morfometria clássica, quanto as de morfometria geométrica, foram ferramentas valiosas para compreensão e distinção dos indivíduos de *Newmanella*. A taxonomia desse grupo ainda reflete o histórico da descrição da primeira espécie do gênero que além de ser muito simples, não fornece registros sobre sua deposição em museus, e registra como habitat as Índias Orientais (Bruguière, 1789). Diversos autores citaram *N. radiata*, geralmente em catálogos e registros de ocorrência, e poucos acompanhavam uma descrição morfológica. (Martini & Chemnitz, 1785; Bruguière, 1789; Ranzani, 1818; Ranzani, 1820; Weltner, 1897; Gruvel, 1903; Gruvel, 1905; Schmalz, 1906; Hoek, 1907; Pilsbry, 1916; Pilsbry, 1927; Pope, 1943; Pope, 1945; Pilsbry, 1953; Southward, 1962).

Darwin (1854) foi o primeiro a registrar *N. radiata* para o Caribe fornecendo uma descrição morfológica. No Brasil, temos registros de *Newmanella* sp. nov. desde Lacombe (1977), mas nenhum dos trabalhos que estudaram *Newmanella* no litoral brasileiro forneceram uma descrição morfológica detalhada (Lacombe, 1977; Lacombe & Rangel, 1978; Young, 1991; Severino & Resgalla Jr., 2005; Farrapeira, 2009; Lira et al., 2010; Klôh et al., 2013).

A ausência de trabalhos com descrições morfológicas e morfométricas detalhadas, trouxe muita confusão para a compreensão da taxonomia das espécies de *Newmanella*. Inclusive, tal confusão é um problema que vem desde a descrição original da espécie-tipo do gênero, que não estabeleceu nenhum holótipo e que acompanhava sucinta descrição morfológica (Bruguière, 1789). Apesar de existirem vários trabalhos na literatura registrando a ocorrência de *N. radiata* no Brasil, esses autores não puderam encontrar diferenças entre os espécimes do Brasil e das demais localidades. Principalmente pela falta de uma descrição morfológica adequada das placas operculares de *N. radiata* (Lacombe, 1977; Lacombe & Rangel, 1978; Young, 1991; Young, 1995; Young, 1998; Severino & Resgalla Jr., 2005; Farrapeira, 2009; Farrapeira, 2010; Klôh et al., 2013). Foi somente com o trabalho de Chan & Cheang (2016) que imagens dos espécimes de *N. radiata* descritos por Ross (1969) foram disponibilizadas, tornando possível a comparação com os espécimes brasileiros. Além disso, os autores estabeleceram um neótipo e neoparátipos para *N. radiata*, fornecendo descrição morfológica detalhada com fotografias dos espécimes.

Nas comparações morfológicas podemos ver que tanto o tergo quanto o escudo de *Newmanella* sp. nov. possuem características que os diferem de *N. radiata* (Figura 22). Isto foi mostrado tanto pela análise de morfometria clássica quanto pela geométrica. O tergo de *N. radiata* possui um esporão estreito, enquanto os espécimes aqui descritos apresentam esporão largo. No escudo, a crista do adutor de *N. radiata* é bem demarcada e praticamente toca a margem basal, fato que não ocorre nos espécimes brasileiros. Sua fenda articular é estreita, ocupando um pequeno espaço do interior da placa, enquanto no Brasil a fenda se estende proporcionalmente mais. Esses resultados sugerem que *N. radiata* não ocorre no Brasil, e como dito por Ross (1969), ela está restrita ao Caribe.

*Newmanella radiata*, *N. kolosvaryi* e *N. hentscheli* possuem características morfológicas semelhantes, que indicam uma proximidade dessas espécies. Só há um registro de *N. kolosvaryi*, que foi o trabalho que a descreveu (Ross & Perreault, 1999). O material utilizado por Ross & Perreault (1999) foi encontrado lavado, rolado na praia, após um período de tempestades, e não possuíam mais suas partes moles. Para *N. hentscheli* existem dois registros, o primeiro consiste no trabalho que a descreveu (Kolosváry, 1942). O segundo foi Ross & Perreault (1999), os autores fizeram uma comparação dos espécimes identificados por eles como *N. hentscheli* com as demais espécies do gênero. Os autores comentaram que não encontraram o holótipo de *N. hentscheli* que foi supostamente depositado no museu de Hamburgo, Alemanha. O espécime de *N. hentscheli* utilizado para comparação foi identificado baseada apenas na descrição sucinta e nas ilustrações fornecidas por Kolosváry (1942), o que pode ter comprometido a identificação.

Através dos fatos supracitados, podemos perceber como a escassez de estudos morfológicos robustos, e fotografias acompanhadas de escala, limitam nossa compreensão da biodiversidade de cirripédios e outros animais. Os poucos registros de *N. kolosvaryi* e *N. hentscheli* impedem maiores generalizações acerca da validade taxonômica dessas espécies. Futuras publicações, acompanhadas de descrição morfológica/morfométrica e fotografias, possibilitarão comparações que demonstrem com mais clareza as diferenças morfológicas entre as espécies de *Newmanella*.

### **5.3. Biologia molecular**

O presente estudo é o primeiro a realizar o sequenciamento genético de espécimes de *Newmanella* do litoral brasileiro. Através das análises para caracterização molecular, pudemos observar a variação do gene mitocondrial 12S de *Newmanella*. Os resultados mostraram que *Newmanella* sp. nov. é molecularmente distinta de *N. radiata* e *N. spinosus*, com valores de divergência de 7 e 10%, respectivamente. Apesar da quantidade de variação ainda ser um

critério subjetivo para distinguir espécies, os resultados moleculares estão de acordo com os encontrados para a morfometria clássica e geométrica. Além disso, Chan & Cheang (2016) relataram 7% de divergência evolutiva entre *N. spinosus* e *N. radiata*. E, aliada a morfologia, os autores consideraram tal divergência suficiente para classificar *N. spinosus* como uma nova espécie (Chan & Cheang, 2016). Isso evidencia como a caracterização morfológica continua indispensável para o estudo taxonômico, pois tais se complementam.

O baixo número de espécies de *Newmanella* caracterizadas molecularmente, aliado a inexistência de sequências depositadas no GenBank para *N. kolosvaryi* e *N. hentscheli*, é um fator limitante para realizar a identificação desse grupo pelas análises moleculares. Todavia, apesar da semelhança da carapaça entre as espécies, com a caracterização molecular foi observado clara distinção de *Newmanella* sp. nov. em relação as sequências genômicas de *N. radiata* e *N. spinosus*. Isto indica que investir maiores esforços para caracterizar geneticamente espécimes de *Newmanella* seria valioso para maior precisão na definição taxonômica desses animais.

O DNA *barcoding* foi proposto por Hebert (2003a) como solução para identificação de espécies. Existem trabalhos publicados que utilizaram apenas a caracterização molecular para a classificação de táxons (Schubart et al., 2000; Ward et al., 2005; Feng et al., 2011). Ebach & Holdrege (2005) afirmam que utilizar somente critérios moleculares para classificar espécies não é a proposta do *barcoding*. Quando esses critérios não são acompanhados da morfologia, frequentemente observamos erros de identificação. Cawthorn et al. (2012), depois de avaliarem diferentes marcadores moleculares para identificação de espécies de peixes, concluíram que sequências do gene 12S e 16S rRNA foram adequadas para identificação das espécies examinadas a nível de gênero. Porém, os autores relataram que, para identificação a nível específico, esses marcadores foram pouco úteis para fornecer uma identificação clara. Whitworth et al. (2007) demonstraram que o marcador citocromo *c* oxidase I (COI) não foi eficaz para identificação de 60% das 12 espécies congêneres de borboletas avaliadas.

No presente estudo vimos que combinar descrições morfológicas e moleculares, espécimes depositados formalmente em museus, fotografias, localidade tipo e outras informações, é um bom caminho a ser seguido para atingir maior sucesso nas inferências taxonômicas. O *barcoding* é importante no sentido de complementar e reforçar a validade dos táxons existentes, e é importante frisar que não devemos usar essa técnica como substituta do sistema de classificação de Linnaeus. Isto pois não encontramos marcadores moleculares que sejam totalmente eficazes para as mais variadas espécies existentes. Ao invés de refutar a

abordagem morfológica da taxonomia, o *barcoding* a complementa e serve como uma técnica para confirmar os táxons conhecidos. A partir dos resultados expostos, observamos que ambas técnicas são fundamentais para o entendimento da biodiversidade e da relação entre os grupos. Até porque, na maior parte da história da ciência, estudiosos utilizaram apenas a morfologia para criar e sugerir a maioria dos grupos que conhecemos hoje.

#### 5.4. Área de ocorrência

No litoral brasileiro podemos observar ampla distribuição de *Newmanella* sp. nov., que ocorre do Nordeste até o Sul do Brasil. Young (1991) comenta que *N. radiata* (= *Newmanella* sp. nov.), parece ser rara para o litoral brasileiro, e adverte sobre a ausência de registros ao norte do Espírito Santo, sugerindo uma distribuição disjunta para essa espécie entre o Sudeste do Brasil e o Caribe. Recentemente, a área de ocorrência para essa espécie foi ampliada para o litoral brasileiro (Severino & Resgalla Jr., 2005; Farrapeira, 2009; Farrapeira, 2010; Klôh et al., 2013), indicando que essa espécie é mais comum ao nosso litoral do que Young (1991, 1995) achava. Além disso, com o estudo da ecologia reprodutiva de *Newmanella* sp. nov. feito por Santana (2016) num período de 2 anos, podemos perceber que se trata de uma espécie comum na região e com reprodução contínua na Baía da Ribeira, Angra dos Reis – RJ.

Nas análises moleculares e morfológicas, foi indicado que os espécimes de *Newmanella* coletados em Curaçao são *Newmanella* sp. nov., indicando que a distribuição da espécie se estende de Curaçao a Santa Catarina, Brasil. Apesar de a nova espécie ocorrer em Curaçao, não existem registros de ocorrência do gênero entre o estado da Paraíba (8°S) e a Guiana (8° N). A ausência de registros para as latitudes acima de 8°S não significa que a distribuição seja disjunta, pois pode haver populações não amostradas devido a carência de estudos nessas regiões. Como observado para outras espécies de Cirripedia, muitas apresentam uma distribuição do Caribe ao Brasil como: *Chthamalus proteus* Dando & Southward, 1980, e *Amphibalanus eburneus* (Gould, 1841), que ocorrem no Golfo do México, Caribe e Brasil (Dando & Southward, 1980; Southward et al., 1980; Southward et al., 1998; Zabin et al., 2007; Carlton et al. 2011).

No Panamá podemos encontrar três espécies do grupo ocorrendo em simpatria: *N. radiata*, *N. kolosvaryi* e *N. hentscheli*. Vale ressaltar que o Panamá é o único local onde *N. kolosvaryi* foi encontrada. Assim, a sobreposição na ocorrência das três espécies no Panamá, somado ao único registro de *N. kolosvaryi*, e a semelhança entre as três espécies despertam ainda mais interesse sobre sua validade taxonômica. Ademais, ao compararmos a morfologia das placas operculares dessas três espécies pudemos observar bastante semelhança. Tais fatos

reforçam a instabilidade taxonômica de *Newmanella*, e é possível que estudos futuros demonstrem que as relações desses táxons são diferentes das estabelecidas atualmente.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É indicado que *N. radiata* do Brasil é sinônimo júnior de *Newmanella* sp. nov., e que *N. radiata* não ocorre no Brasil, mas está restrita às províncias caribenhas. Foi demonstrado que ferramentas de morfometria clássica e geométrica são valiosas para discriminação dos membros de *Newmanella*. Mesmo com o baixo número amostral de algumas espécies.

O uso de marcadores moleculares de forma isolada não é um substituto para a taxonomia, pois a abordagem morfológica fornece conhecimento acerca dos organismos e o reconhecimento de um limite taxonômico, muitas vezes subjetivo, é mais bem definido quando avaliado pelo prisma de diversas áreas do conhecimento como a biologia molecular, morfologia e ecologia.

A distribuição dessas espécies demonstrada na literatura ainda está distante de contemplar a realidade. Isto é observado pela escassez de estudos sobre sua identificação, descrição e distribuição. São necessários mais estudos para uma caracterização adequada de sua área de ocorrência. O baixo número de espécimes de *N. radiata*, *N. kolosvaryi* e *N. hentscheli* são fator limitante para maiores generalizações sobre o status taxonômico dessas espécies. Mais análises, com maiores conjuntos amostrais e uma variedade de organismos com tamanhos distintos tornarão mais claro o entendimento das mudanças ontogênicas que ocorrem com a forma desse grupo.

## 7. LITERATURA CITADA

- Abreu, N.M.N.; Marçal, I.; Duarte, A.B.; Pitombo, F.B.; Vilasboa, A. & Gusmão, J. 2016. Microsatellite markers for barnacle studies: Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the invasive barnacle *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854) and its cross-amplification in the Southern Atlantic endemic species *Megabalanus vesiculosus* (Darwin, 1854). *Biochem. Syst. Ecol.*, 66: 224-228.
- Adams, C.D.; Rohlf, F.J. & Slice, D.E. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Ital. J. Zool.* 71: 5-16.
- Anderson, D.T. *Barnacles: structure, function, development and evolution*. London: Chapman & Hall, 1994.
- Araya, J.F. & Newman, W.A. A new deep-sea balanomorph barnacle (Cirripedia: Thoracica: Bathylasmatidae) from Chile. *PLoS ONE*, 13(6): e0197821.
- Ashwell, M. & Work, T.S. 1970. The Biogenesis of Mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.*, 39: 251-290.
- Attardi, G. 1988. Biogenesis of Mitochondria. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 4: 289-333.
- Avise, J.C. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Volume 2. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2004.
- Bacon, P.R. 1976. The Cirripedia of Trinidad. *Stud. Fauna Curaçao Carib. Is.*, 50(1): 1-55.
- Barazandeh, M.; Davis, C. S.; Neufeld, C. J.; Coltman, D. W. & Palmer, A. R. 2013. Something Darwin didn't know about barnacles: spermcast mating in a common stalked species. *Proc. R. Soc. B*, 280:1-6.
- Barnes, R.D. 1989. Diversity of Organisms: How Much Do We Know? *Am. Zool.*, 29: 1075-1084.
- Blackith, R.E. 1957. Polymorphism in Some Australian Locusts and Grasshoppers. *Biometrics*, 13(2): 183-196.
- Blainville, H.M.D. 1824. Nematopoda. *Dict. Sci. Nat.*, 32: 1-567.
- Blainville, H.M.D. 1825-1827. *Manual de malacology et de conchyliologie*. Volume 1. Paris: F.G. Levrault, 1825-1827.
- Bookstein, F.L. 1984. A Statistical Method for Biological Shape Comparisons. *J. theor. Biol.*, 107: 475-520.
- Bookstein, F.L. 1989. "Size and Shape": A Comment on Semantics. *Syst. Zool.*, 38(2): 173-180.



- Bookstein, F.L. Introduction to methods for landmark data. In: *Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop*. Special Publication, n. 2. Ann Arbor, Michigan: University of Michigan, Museum of Zoology, 1990.
- Bookstein, F.L. *Morphometric tools for landmark data: Geometry and biology*. United Kingdom: Cambridge University Press, 1991.
- Browne, W.E.; Haddock, S.H.D. & Martindale, M.Q. 2007. Phylogenetic analysis of lineage relationships among hyperiid amphipods as revealed by examination of the mitochondrial gene, *cytochrome oxidase I (COI)*. *Intgr. Comp. Biol.*, 47(6): 815-830.
- Bruguère, M. Balanite. In: *Encyclopedie methodique: histoire naturelle des vers*, Volume 1. Panckoucke, Paris, 1789.
- Cai, Y.; Berger, M.S. & Stillman, J. 2005. PIMS Fellowship Completion Report. *Pacific Institutes of Marine Science*, p. 1-9.
- Carlton, J.T.; Newman, W.A. & Pitombo, F.B. Barnacle Invasions: Introduced, Cryptogenic, and Range Expanding Cirripedia of North and South America. In: *In the wrong place – alien marine crustaceans: distribution, biology and impact*. New York: Springer, 2011.
- Carlton, J.T. & Ruiz, G.M. Anthropogenic Vectors of Marine and Estuarine Invasions: an Overview Framework. In: *Biological Invasions in Changing Ecosystems: Vectors, Ecological impacts, Management and Predictions*. Berlin: De Gruyter Open Ltd., 2015.
- Cavalcanti, M.J. & Lopes, P.R.D. 1991. Morfometria comparada de *Ctenosciaena gracilicirrhus*, *Paralonchurus brasiliensis* e *Micropogonias furnieri* (Teleostei: SCIAENIDAE) pela análise multivariada de redes de treliças. *Rev. Bras. de Zool.*, 7(4): 627-635.
- Cawthorn, D.; Steinman, H.A. & Witthuhn, R.C. 2012. Evaluation of the 16S and 12S rRNA genes as universal markers for the identification of commercial fish in South Africa. *Gene*, 491: 40-48.
- Chan, B.K.K. & Cheang, C.C. 2016. First discovery of a new species of *Newmanella* Ross, 1969 (Balanomorpha: Tetraclitidae) in the western Pacific, with a note on the new status of *Neonrosella* Jones, 2010. *Zootaxa*, 4098(2): 201-226.
- Chapman, A.D. *Numbers of Living Species in Australia and the World*. Volume 2. Canberra, Australia: Australian Biological Resources Study, 2009.
- Costa, A.C. & Jones M.B. 2000. The genus *Tesseropora* (Cirripedia:Tetraclitidae) from São Miguel, Azores. *Arquipélago*, 2:71-78.

- Costa, F.O.; deWaard, J.R.; Boutillier, J.; Ratnaasingham, S.; Dooh, R.T.; Hajibabaei, M. & Hebert, P.D.N. 2007. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 64: 272-295.
- Dando, P.R. & Southward, A.J. 1980. A new species of *Chthamalus* (Crustacea: Cirripedia) characterized by enzyme electrophoresis and shell morphology: with a revision of other species of *Chthamalus* from the western shores of the Atlantic Ocean. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, 60: 787-831.
- Darwin, C.R. *A monograph on the sub-class Cirripedia, with figures of all the species, The Lepadidae: or, pedunculated cirripedes*. Volume 1. London: The Ray Society, 1851.
- Darwin, C.R. *Living Cirripedia, The Balanidae (or sessile cirripedes): the Verrucidae*. Volume 2. London: The Ray Society, 1854.
- Deshayes, G.P. 1831. *Considérations Générales Sur Les Mollusques: Extrait Du Tome II De L'Histoire Naturelle Des Vers De L'Encyclopédie Méthodique*. Agasse, p. 257-258.
- Ebach, M.C. & Holdrege, C. 2005. DNA barcoding is no substitute for taxonomy. *Nature*, 434: 697.
- Elewa, A.M.T. *Morphometrics for Nonmorphometricians*. Berlin: Springer, 2010.
- Farrapeira, C.M.R. 2009. Barnacles (Crustacea: Cirripedia) of the estuarine and marine areas of the port of Recife (Pernambuco, Brazil). *Cah. Biol. Mar.*, 50: 119-129.
- Farrapeira, C.M.R. 2010. Shallow water Cirripedia of the northeastern coast of Brazil: The impact of life history and invasion on biogeography. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 392: 210-219.
- Fink, W.L. Data acquisition for morphometrics analysis in systematic biology. In: *Proceedings of the Michigan morphometrics workshop*. Special Publication, n. 2. Ann Arbor, Michigan: University of Michigan, Museum of Zoology, 1990.
- Feng, Y.; Li, Q.; Kong, L. & Zheng, X. DNA barcoding and phylogenetic analysis of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) based on mitochondrial COI and 16SS rRNA genes. *Mol. Biol. Rep.*, 38: 291-299.
- Fornel, R. & Cordeiro-Estrela, P. Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. In: *Temas em Biologia: Edição comemorativa aos 20 anos do Curso de Ciências Biológicas e aos 5 anos do PPH-Ecologia da URI Campus de Erechim*. 1 ed. Erechim: EDIFAPES, 2012.
- Foster, B.A. 1980. Further records and classification of scalpellid barnacles (Cirripedia: Thoracica) from New Zealand. *New Zeal. J. Zool.*, 7(4): 523-531.

- Gmelin, J.F. 1791. *Systema naturae per regna tri naturae...editio decima tertia, aucta, reformata. Leipzig*, 1(6) 3021-3909.
- Goodall, C.R. 1991. Procrustes methods in the statistical analysis of shape. *J. Royal Stat. Soc.: Series B*, 53(2): 285-339.
- Gray, J.E. 1825. A synopsis of the genera of cirripedes arranged in natural families, with a description of some new species. *Ann. Philos.*, 10(2): 97-107.
- Gray, J.S. 1997. Marine biodiversity: patterns, threats and conservation needs. *Biodivers. Conserv.*, 6: 153-175.
- Gruvel, A. 1903. Revision des cirrhipedes appartenant a la collection du Muséum D'Histoire Naturelle. *Nouv. Arch. Mus. D'Hist. Nat.*, ser. 4, t. 5, p. 95-170.
- Gruvel, A. 1905. *Monographie des cirrhipedes ou thecostraces*. Paris, Masson et Cie, 1905.
- Hajibabaei, M.; Singer, G.A.C.; Hebert, P.D.N. & Hickey, D.A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet.*, 23(4): 167-172.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Hammer, Ø.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electronica*, 4(1): 9.
- Hawksworth, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.*, 95(6): 641-655.
- Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L. & Waard, J.R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270: 313-321.
- Hebert, P.D.N.; Ratnasingham, S. & Waard, J.R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270: S96-S99.
- Higgins, D.; Thompson, J.; Gibson, T.; Thompson, J.D.; Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 22: 4673-4680.
- Høeg, J.T. & Møller, O.S. 2006. When similar beginnings lead to different ends: Constraints and diversity in cirripede larval development. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 49(3): 125-142.
- Hoek, P.P.C. *The Cirripedia of the Siboga-Expedition: A. Cirripedia pedunculata*. Volume 31. Leiden: E.J. Brill, 1907.

- Hou, Z.; Fu, J. & Li, S. 2007. A molecular phylogeny of the genus *Gammarus* (Crustacea: Amphipoda) based on mitochondrial and nuclear gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 45: 596-611.
- Jay, J.C. *A catalogue of the shells, arranged according to the Lamarckian System, together with descriptions of new or rare species, contained in the collection of John C. Jay, M. D.* New York, Wiley and Putnam, 1839.
- Kelly, M.W. & Sanford, E. 2010. The evolution of mating systems in barnacles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 392: 37-45.
- Kendall, D.G. 1977. The Diffusion of Shape. *Adv. Appl. Probab.*, 9(3): 428-430.
- Kendall, D.G. 1984. Shape manifolds, Procrustean metrics, and Complex projective spaces. *Bull. London Math. Soc.*, 16: 81-121.
- Klôh, A.S.; Farrapeira, C.M.R.; Rigo, A.P.R. & Rocha, R.M. 2013. Intertidal native and introduced barnacles in Brazil: distribution and abundance. *Mar. Biodivers. Rec.*, 6: 1-8.
- Kolosváry, G. 1942. Studien an Cirripedien. *Zool. Anz.*, 137: 138-150.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C. & Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 35(6): 1547-1549.
- Lamarck, J.B.P.A. de M. ch. De. *Histoire naturelle des animaux sans vertebres*. Volume 5. Deterville, Paris, 1818.
- Lacombe, D. 1977. Cirripédios da Baía da Ribeira, Angra dos Reis – Rio de Janeiro, Brasil. *Publ. Inst. Pesq. Marinha*, 109: 1-10.
- Lacombe, D. & E.F. Rangel. 1978. Cirripédios de Arraial do Cabo, Cabo Frio. *Publ. Inst. Pesq. Marinha*, 129: 1-12.
- Linnaeus, C. *Systema naturae*. Edição 10, volume 1. Holminae, 1758.
- Lira, S.M.A.; Farrapeira, C.M.R.; Amaral, F.M.D. & Ramos, C.A.C. 2010. Sessile and sedentary macrofauna from the Pirapama Shipwreck, Pernambuco, Brazil. *Biota Neotrop.*, 10(4): 155-166.
- Lv, J.; Wu, S.; Zhang, Y.; Chen, Y.; Feng, C.; Yuan, X.; Jia, G.; Deng, J.; Wang, C.; Wang, Q.; Mei, L. & Lin, X. 2014. Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). *Parasit. Vectors*, 7: 93.

- Marcus, L.F. Traditional morphometrics. In: *Proceedings of the Michigan morphometrics workshop*. Special Publication, n. 2. Ann Arbor, Michigan: University of Michigan Museum of Zoology, 1990.
- Marcus, L.F.; Corti, M.; Loy, A.; Naylor, G.J.P.; Slice, D.E. *Advances in Morphometrics*. Volume 284. Italy: Springer Science & Business Media, 1996.
- Martini, F.H.W. & Chemnitz, J.H. 1785. *Neue Systematische Conchylien-cabinet*, 8: 294-347, pls. 96-100.
- Martin, J.W. & Davis, G.E. *An Updated Classification of the Recent Crustacea*. Volume 39. Los Angeles, California: Natural History Museum of Los Angeles County. 2001.
- Mitteroecker, P. & Gunz, P. 2009. Advances in Geometric Morphometrics. *Evol. Biol.*, 36: 235-247.
- Mokady, O; Rozenblatt, S.; Graur, D. & Loya, Y. 1994. Coral-host specificity of Red Sea Lithophaga bivalves: interspecific and intraspecific variation in 12S mitochondrial ribosomal RNA. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3(3): 158-164.
- Molnar, J.L.; Gamboa, R.L.; Revenga, C. & Spalding, M.D. 2008. Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Front. Ecol. Environ.*, 6(9): 485-492.
- Monteiro, L.R. & Reis, S.F. *Princípios de Morfometria Geométrica*. Ribeirão Preto: Holos, 1999.
- Newman, W.A. & Jumars, P.A. 1976. Diversity Trends in Coral-Inhabiting Barnacles (Cirripedia, Pyrgomatinae). *Micronesica*, 12(1): 69-82.
- Newman, W. A. & Ross, A. 1976. Revision of the balanomorph barnacles; including a catalog of the species. *Mem. San Diego Soc. Nat. Hist.*, 9: 1-109.
- Newman, W.A. & Ross, A. 1977. A living *Tesseropora* (Cirripedia; Balanomorpha) from Bermuda and the Azores; first records from the Atlantic since the Oligocene. *Trans. San Diego Nat. Hist.*, 18(12):207-216.
- Newman, W.A. & Abbott, D.P. Cirripedia: the barnacles. In: *Intertidal Invertebrates of California*, p. 504-535. Stanford: Stanford University Press, 1980.
- Patwardhan, A.; Ray, S. & Roy, A. 2014. Molecular Markers in Phylogenetics Studies – A Review. *J. Phylogen. Evolution Biol.*, 2: 131.
- Pérez-Losada, M.; Høeg, J.T. & Crandall, K.A. 2004. Unraveling the Evolutionary Radiation of the Thoracican Barnacles Using Molecular and Morphological Evidence: A Comparison of Several Divergence Time Estimation Approaches. *Syst. Biol.*, 53(2): 244-264.

- Pérez-Losada, M.; Høeg, J.T.; Simon-Blecher, N.; Achituv, Y.; Jones, D. & Crandall, K.A. 2014. Molecular phylogeny, systematics and morphological evolution of the acorn barnacles (Thoracica: Sessilia: Balanomorpha). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 81: 147-158.
- Pilsbry, H.A. 1916. The sessile barnacles (Cirripedia) contained in the collections of the U.S. National Museum: including a monograph of the American species. *Bull. U. S. Natl. Mus.*, 93: 1-366.
- Pilsbry, H.A. 1927. Cirripedia of Curacao. *Bijdr. Dierk.*, 25: 37-38.
- Pilsbry, H.A. 1953. Notes on Floridan Barnacles (Cirripedia). *Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia*, 105: 13-28.
- Pitombo, F.B. 2004. Phylogenetic analysis of the Balanidae (Cirripedia, Balanomorpha). *Zool. Scr.*, 33: 261-276.
- Pitombo, F.B.; Gobin, J; Abreu, N.M.N. & Jute, A. 2017. A Cryptic Invasion in the Western Atlantic: Presence of the Fouling Barnacle *Megabalanus zebra* (Darwin, 1854) (Crustacea, Cirripedia) in the Caribbean Sea. *Zootaxa*, 4237(1): 131-153.
- Pimm, S.L.; Russell, G.J.; Gittleman, J.L. & Brooks, T.M. 1995. The Future of Biodiversity. *Science*, 269: 347-350.
- Pope, E.C. 1943. Animal and plant communities of the coastal rock platform at Long Reef, New South Wales. *Proc. Linn. Soc. N. S. W.*, 68(5-6): 221-254.
- Pope, E.C. 1945. A simplified key to the sessile barnacles found on the rocks, boats, wharf piles and other installations in Port Jackson and adjacent waters. *Rec. Aust. Mus.*, 21(6): 351-372.
- Radulovici, A.E.; Archambault, P. & Dufresne, F. 2010. DNA Barcodes for Marine Biodiversity: Moving Fast Forward? *Diversity*, 2(4): 450-472.
- Ranzani, C. 1818. Osservazioni su i Balanidi. *Opusc. Sci.*, 2: 63-93.
- Ranzani, C. 1820. Osservazioni su i Balanidi. *Mem. Storia. Nat.*, deca prima, p. 13-57.
- Reyment, R.A. 1985. Multivariate morphometrics and analysis of shape. *Math. Geol.*, 17(6): 591-609.
- Richards, R.J. *The tragic sense of life: Erns Haeckel and the struggle over evolutionary thought*. Chicago: University of Chicago Press, 2008.
- Richtsmeier, J.T.; Deleon, V.B.; Lele, S.R. 2002. The Promise of Geometric Morphometrics. *Yearb. Phys. Anthropol.*, 45: 63-91.
- Rohlf, F.J. & Marcus, L.F. 1993. A revolution in Morphometrics. *Trends Ecol. Evol.*, 8(4): 129-132.

- Rohlf, F.J. 1998. On Applications of Geometric Morphometrics to Studies of Ontogeny and Phylogeny. *Syst. Biol.*, 47(1): 147-158.
- Rohlf, F.J. 1999. Shape Statistics: Procrustes Superimpositions and Tangent Spaces. *J. Classif.*, 16: 197-223.
- Rohlf, F. J. 2017. tpsDig2, digitize landmarks & outlines from image files, scanner or video. Version 2.31. Department of Ecology & Evolution and Anthropology, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf, F.J. 2018. tps Utility program. Version 1.76. Department of Ecology & Evolution and Anthropology, State University of New York at Stony Brook.
- Ross, A. 1969. Studies on the Tetraclitidae (Cirripedia: Thoracica). Revision of *Tetraclita*. *Trans. San Diego Soc. Nat. Hist.*, 15(5): 237-251.
- Ross, A. 1971. Studies On The Tetraclitidae Cirripedia Thoracica A New Tetraclitellian From India. *Trans. San Diego Nat. Hist.*, 16:215-224.
- Ross, A. & Perreault, R.T. 1999. Revision of the Tetraclitellinae and description of a new species of *Newmanella* Ross from the tropical western-Atlantic Ocean (Cirripedia: Tetraclitoidea). *Sess. Org.*, 15(2): 1-8.
- Santana, P.P. 2016. Estudo populacional de *Newmanella radiata* (Bruguière, 1789) (Crustacea, Cirripedia) na Baía da Ribeira - RJ. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biologia) – Universidade Federal Fluminense.
- Schmalz, C. *Die ordnung der Cirripedien*. Bauer & Raspe, Nürnberg, 1906.
- Schubart, C.D.; Cuesta, J.A.; Diesel, R. & Felder, D.L. 2000. Molecular Phylogeny, Taxonomy, and Evolution of Nonmarine Lineages within the American Grapsoid Crabs (Crustacea: Brachyura). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 15(2): 179-190.
- Schultz, M.P.; Bendick, J.A.; Holm, E.R. & Hertel, W.M. 2011. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling*, 27(1): 87-98.
- Severino, A. & Resgalla Jr., C. 2005. Descrição dos estágios larvais de *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854) e sua variação temporal na enseada de Itapocoroy (Santa Catarina, Brasil). *Atlântica (Rio Grande)*, 27(1): 5-16.
- Sheets, H.D. 2014. Integrated Morphometrics Package (IMP) 8.
- Skinner, L.F.; Siviero, F.N. & Coutinho, R. 2007. Comparative growth of intertidal barnacle *Tetraclita stalactifera* (Thoracica: Tetraclitidae) in sites influenced by upwelling and tropical conditions at the Cabo Frio region, Brazil. *Rev. Biol. Trop.*, 55:71-78.

- Slice, D.E. *Modern Morphometrics in Physical Anthropology*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2005.
- Southward, A.J. 1962. On the behavior of barnacles. IV: The influence of temperature on cirral activity and survival of some warm-water species. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 42: 163-177.
- Southward, A.J. 1975. Intertidal and shallow water Cirripedia of the Caribbean. *Stud. Fauna Curaçao Carib. Is.*, 46(1): 1-53.
- Southward, A.J.; Burton, R.S.; Coles, S.L.; Dando, P.R.; DeFelice, R.; Hoover, J.; Parnell, P.E.; Yamaguchi, T. & Newman, W.A. 1998. Invasion of Hawaiian shores by an Atlantic barnacle. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 165: 119-126.
- Southward, A.J. 2001. Cirripedia – non-parasitic Thoracica, In: *European register of marine species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification*. Paris: Muséum national d’histoire naturelle, Collection Patrimoines Naturels, 50: 280-283.
- Sowerby, G.B. *The genera of fossil and recent shells, for the use of students in conchology and geology*. London: G.B. Sowerby, 1823.
- Spengler, L. 1790. Beskrivelse og Oplysning over den hidindtil lidet udarbejdede Slaegt af mangesk allede Konchylier, som Linnaeus har daldet Lepas, med tilfoiede nye of ubeskrevne Arter. (Om Conchylie-Slaegten Lepas). *Skrift. Naturhist. Selsk.*, 1(1): 158-212.
- Tobe, S.S.; Kitchener, A.C. & Linacre, A.M.T. 2010. Reconstructing Mammalian Phylogenies: A Detailed Comparison of the Cytochrome *b* and Cytochrome Oxidase Subunit I Mitochondrial Genes. *PLoS ONE*, 5(11): e14156.
- Tsang, L.M.; Chu, K.H.; Achituv, Y. & Chan, B.K.K. 2015. Molecular phylogeny of the acorn barnacle family Tetraclitidae (Cirripedia: Balanomorpha: Tetraclitoidea): Validity of shell morphology and arthropodal characteristics in systematics of Tetraclitid barnacles. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 82: 324-329.
- Ward, R.D.; Zemlak, T.S.; Innes, B.H.; Last, P.R. & Hebert, P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia’s fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 360: 1847-1857.
- Weltner, W. 1897. Verzeichnis der bisher beschriebenen recenten Cirripedenarten. *Arch. F. Naturgesch*, 1(3): 227-280.



- Whitworth, T.L.; Dawson, R.D.; Magalon, H. & Baudry, E. 2007. DNA barcoding cannot readily identify species of the blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). *Proc. R. Soc. B*, 274: 1731-1739.
- Wilson, E.O. 2003. The encyclopedia of life. *Trends Ecol. Evol.*, 18(2): 77-80.
- Winston, J.E. Describing Species: Practical Taxonomic Procedure for Biologists. New York: Columbia University Press, 1999.
- Witt, J.D.S.; Blinn, D.W.; Hebert, P.D.N. 2003. The recent evolutionary origin of the phenotypically novel amphipod *Hyaella montezuma* offers an ecological explanation for morphological stasis in a closely allied species complex. *Mol. Ecol.*, 12: 405-413.
- Worm, B.; Barbier, E.B.; Beaumont, N.; Duffy, J.E.; Folke, C.; Halpern, B.S.; Jackson, J.B.C.; Lotze, H.K.; Micheli, F.; Palumbi, S.R.; Sala, E., Selkoe, K.A.; Stachowicz, J.J. & Watson, R. 2006. Impacts of Biodiversity Loss on Ocean Ecosystem Services. *Science*, 314: 787-790.
- Xia, Y.; Gu, H.; Peng, R.; Chen, Q.; Zheng, Y.; Murphy, R.W. & Zeng, X. 2012. COI is better than 16S rRNA for DNA barcoding Asiatic salamanders (Amphibia: Caudata: Hynobiidae). *Mol. Ecol. Resour.*, 12: 48-56.
- Yang, L.; Tan, Z.; Wang, D.; Xue, L.; Guan, M.; Huang, T. & Li, R. 2014. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. *Sci. Rep.*, 4: 4089.
- Young, P.S. *Taxonomia e distribuição da subclasse Cirripedia no Atlântico Sul Ocidental*. 1987. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Young, P.S. 1991. The Superfamily Coronuloidea Leach (Cirripedia: Balanomorpha) from Brazilian Coast, with redescription of *Stomatolepas* species. *Crustaceana*, 61(2): 189-212.
- Young, P.S. New interpretations of South American patterns of barnacle distribution. In: *New Frontiers in Barnacle Evolution*, p. 229-253. Crustacean Issues 10. The Netherlands: Rotterdam & Brookfield, 1995.
- Young, P.S. *Catalogue of Crustacea of Brazil*. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 1998.
- Zabin, C.J.; Zardus, J.; Pitombo, F.B.; Fread, V. & Hadfield, M.G. 2007. A tale of three seas: consistency of natural history traits in a Caribbean-Atlantic barnacle introduced to Hawaii. *Biol. Invasions*, 9: 523-544.
- Zardus, J.D. & Hadfield, M.G. 2005. Multiple origins and incursions of the Atlantic barnacle *Chthamalus proteus* in the Pacific. *Mol. Ecol.*, 14: 3719-3733.

- Zelditch, M.L.; Swiderski, D.L.; Sheets, H.D. & Fink, W.L. *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. New York and London: Elsevier Academic Press, 2004.
- Zelditch, M.L.; Swiderski, D.L. & Sheets, H.D. *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. New York and London: Elsevier Academic Press, 2012.
- Zheng, L.; Jinru, H.E.; Yuanshao, L.I.N.; Wenqing, C.A.O. & Wenjing, Z. 2014. 16S rRNA is a better choice than COI for DNA barcoding hydrozoans in the coastal waters of China. *Acta Oceanol. Sin.*, 33(4): 55-76.
- Zullo, V.A. 1992. Revision of the Balanid Barnacle Genus *Concavus* Newman, 1982, with the Description of a New Subfamily, Two New Genera, and Eight New Species. *J. Paleontol.*, 66(6): 1-46.