



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Sistemática e Ecologia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia

**ESTRESSE OXIDATIVO EM *HIPPOCAMPUS REIDI* GINSBURG, 1933
(TELEOSTEI SYNGNATHIDAE): ESTUDO COMPORTAMENTAL**

Kassiano dos Santos Sousa

.

João Pessoa, Paraíba
Junho de 2015

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Sistemática e Ecologia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia

**ESTRESSE OXIDATIVO EM *HIPPOCAMPUS REIDI* GINSBURG, 1933
(TELEOSTEI SYNGNATHIDAE): ESTUDO COMPORTAMENTAL**

KASSIANO DOS SANTOS SOUSA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Zoologia.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Ierecê Maria de Lucena Rosa

João Pessoa, Paraíba
Junho de 2015

KASSIANO DOS SANTOS SOUSA

**ESTRESSE OXIDATIVO EM *HIPPOCAMPUS REIDI* GINSBURG, 1933
(TELEOSTEI SYNGNATHIDAE): ESTUDO COMPORTAMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Zoologia.

.

Data: _____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA:

Ierecê Maria de Lucena Rosa, Prof.^a Dr.^a, UFPB

Júlio Santos Rebouças, Prof. Dr., UFPB

Luiz Carlos Serrano Lopez, Dr., UFPB

S725e Sousa, Kassiano dos Santos.
 Estresse oxidativo em *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933
(Teleostei syngnathidae): estudo comportamental / Kassiano
dos Santos Sousa.- João Pessoa, 2015.
 99f.
 Orientadora: Ierecê Maria de Lucena Rosa
 Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN
 1. Zoologia. 2. Cavalo-marinho. 3. Comportamento.
 4. Porfirina. 5. Cultivo. 6. Água oxigenada.

UFPB/BC

CDU: 59(043)

*À minha família, pelo respeito, amor,
carinho e incentivo que sempre recebi e
por compreenderem as tantas vezes que
fui ausente. Sem vocês eu nada seria.*

AGRADECIMENTOS

Nunca fui bom com agradecimentos, mas isso não quer dizer que não tenho muito o que agradecer... tenho até demais. O problema é que traduzir sentimentos de minimamente dois anos, não é algo fácil.

Quero agradecer primeiramente a minha família, pais e irmãos (e um grupo no whatsapp com TODA a variedade possível de parentesco da minha família que ignoro há quase dois anos), vocês são demasiadamente importantes para mim. Vocês que me aguentaram quando nem eu mesmo me suportei. Pai e mãe, exemplos de desapego, amo vocês. Kalina, Kardec e Kathiane, irmãos amados, Livia, Cauã e Hélida, sobrinhos e cunhada, obrigado por tudo.

A Prof^a Ierecê, por ter me aceito no desafio de me tornar um mestre e por ter acreditado que eu seria capaz, junto com meus amigos do Lapec, de seguir adiante com tantas responsabilidades de se trabalhar com animais vivos, como também por todo o apoio financeiro sempre que necessário.

Ao prof^o. Júlio, por todos os ensinamentos, tarde e manhãs gastas tentando me fazer entender absorbância, molaridade, modelos multivariados e uma centena de outras coisas que não eram comuns à minha realidade acadêmica. Quero agradecer por toda paciência e me desculpar por tantas mensagens e e-mails. De fato, nada, nada disso seria possível sem sua ajuda também!

A Prof^a. Tacyana, que sempre me auxiliou e me ajudou quando precisei, por todos os bolos e cafés, por todas as conversas, científicas ou não! Muito, muito obrigado!

Ao prof^o Paulo, por todos os conselhos desde a graduação e por me ensinar o amor pela fisiologia, obrigado por tudo!

Ao prof^o. Wallace, que mesmo em meados de viajar ao exterior, aceitou o desafio de me auxiliar no que convém a testes estatísticos que não faziam parte da minha realidade, obrigado!

Ao pessoal do LAPEC (e é aqui que mais vou sentir falta), foram tantos momentos difíceis, momentos de que queríamos desistir de tudo e ir embora, coletas que deram errado, etc etc. No entanto, agora eu vejo o quanto crescemos quanto pessoas. Todos, TODOS são importantes para mim, obrigado.

Souto Neto, nem tenho palavras a agradecer a você, alguém que quero próximo a mim para sempre, você foi mais que um amigo, mais que um irmão... obrigado por tudo!

Lua e Ju, nosso rolo eterno durará mais que a eternidade viu (com redundância mesmo, porque sim!)? Não aceito menos que isso, porque como já foi dito certa vez, provavelmente sempre estaremos falando de dança.

Aline e Marianna, duas pessoas incríveis. Aline, obrigado por todas as conversas, dicas e desabafos e Mary, como te falei, não foi nós que nos conhecemos, foram nossas almas que se reconheceram (e pareciam ser velhas amigas). Obrigado por tudo!

Camys e Jessyca, Babys... NOOSSA, como sinto falta de vocês. Sinto falta até das nossas coletas! Sei que ainda nos veremos muito, muito MESMO. Finalmente “É HOJE (Ludmilla, 2015)”!

Lari, Livia e Thamara... entendam que quando não respondo no Whatapp não é porque não gosto de vocês, tá? Nossa, sinto muita falta de todos nós juntos, das festas e das conversas na pioneira e, principalmente, de praticarmos bullying com Livia. Obrigado mesmo!

Rebeca, Lais, Giovanna... não tenho como expressar meu agradecimento e apreço por vocês, sempre lembrarei de nossos momentos e sempre sentirei falta, mesmo dos mais difíceis. Obrigado por estarem presentes nessa minha jornada, obrigado.

E o que falar de vocês hein, Herta e Emmanuelle (Manu)? Minhas irmãs desde que o mundo é mundo, desde antes de eu me entender por gente. Nossa, crescemos juntos, enquanto pessoas e enquanto profissionais (apesar de Manu continuar com aquele apertão chato). E ainda cresceremos muito mais! Muito obrigado por tudo!

Aos Cavalos-Marinheiros, que me mostraram uma nova paixão... ainda que eu venha a trabalhar com mil outros animais, sempre lembrarei de onde tudo começou e o que devo lutar para conservar. Obrigado.

A todos os amigos que tive a oportunidade de fazer no PPGCB e na EAD nesses últimos dois anos, a convivência durante as disciplinas, os aperreios durante os prazos da coordenação e as comemorações que tivemos, levarei essas emoções para sempre comigo.

No final, a única coisa que tenho a dizer é que amo vocês, meus amigos, definitivamente... AMO VOCÊS!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	16
Cavalo-marinho: O Modelo	17
Desafios na Aquicultura	19
Hipóteses.....	20
Contribuições para a Ciência e Industria.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
CAPÍTULO I - DEGRADAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM CONDIÇÕES DE CULTIVO DE HIPPOCAMPUS REIDI	27
1. INTRODUÇÃO	27
2. OBJETIVOS.....	29
2.1. Geral:	29
2.2. Específicos:	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Qualidade da água.....	30
3.2. Estudo da decomposição do H ₂ O ₂	30
3.2.1. Procedimentos	30
3.2.2. Medição Óptica	31
3.3. Desenho Experimental	32
3.4. Análises Estatísticas.....	32
4. RESULTADOS	34
4.1. Comparação entre os tratamentos	36
5. DISCUSSÃO	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
CAPÍTULO II - REAÇÕES COMPORTAMENTAIS PARA A AVALIAÇÃO DO ESTRESSE EM HIPPOCAMPUS REIDI GINSBURG, 1933 (SYNGNATHIDAE) EXPOSTOS AO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM TRATAMENTOS POR IMERSÃO (BANHO).....	42
1. INTRODUÇÃO	42
1.1. Comportamento.....	43
2. OBJETIVOS.....	45
2.1. Geral:	45
2.2. Específicos:	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS	46

3.1. Qualidade da água.....	46
3.2. Desenho Experimental	46
3.3. Análise comportamental	48
3.4. Medição Óptica	51
3.5. Análises Estatísticas.....	51
4. RESULTADOS	52
4.1. Diferenças entre sexos	52
4.2. Diferenças entre os tratamentos (0ml/L, 5ml/L, 12.5ml/L, 13.75ml/L e 15ml/L)	54
5. DISCUSSÃO	59
5.1. Diferenças entre sexos	59
5.2. Diferenças entre os tratamentos (0ml/L, 5ml/L, 12.5ml/L, 13.75ml/L e 15ml/L)	60
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
CAPÍTULO III - ESTUDO INICIAL SOBRE A UTILIZAÇÃO DA PORFINATOMANGANÊS(III) (MNTE-2-PYP⁵⁺) COMO REGULADOR REDOX CATALÍTICO EM <i>HIPPOCAMPUS REIDI</i> GINSBURG, 1933 (TELEOSTEI SYNGNATHIDAE)	
73	
1. INTRODUÇÃO	73
1.1. O Estresse Oxidativo.....	74
2. OBJETIVOS.....	76
2.1. Geral:	76
2.2. Específicos:	76
3. MATERIAIS E MÉTODOS	77
3.1. Qualidade da água.....	77
3.2. Metodologia do Desenho Experimental: Matrizes Doehlert	77
3.3. Desenho Experimental	78
3.3. Análise comportamental	82
3.4. Medição Óptica	85
3.5. Análises Estatísticas.....	85
4. RESULTADOS	86
5. DISCUSSÃO	92
6. CONCLUSÃO	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1: Foto de <i>Hippocampus reidi</i> in situ.....	18
--	----

CAPÍTULO I

Figura 1: Degradação Total (A) e Degradação Média (B) de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água do mar na presença e ausência de luminosidade em ambiente controlado na ausência de <i>H. reidi</i> , LAPEC, Brasil, 2015. cl, Claro; es, Escuro.....	34
---	----

Figura 2. Degradação Total (A) e Degradação Média (B) de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água do mar na presença e ausência de aeração em ambiente controlado na ausência de <i>H. reidi</i> , LAPEC, Brasil, 2015. Ae, Aeração; Sae, Ausência de aeração.....	35
--	----

Figura 3. Degradação Total (A) e Degradação Média (B) de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água do mar em diferentes condições de área de contato da superfície da água/ar: 5cm ² e 20cm ² , em ambiente controlado na ausência de <i>H. reidi</i> , LAPEC, Brasil, 2015.....	35
---	----

Figura 4. Degradação Total (A) e Degradação Média (B) do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água do mar na presença e ausência de aeração em ambiente controlado e na presença e ausência de <i>H. reidi</i> (3 indivíduos), LAPEC, Brasil, 2015. Ani, Presença de Animais; SAni, Ausência de Animais.....	35
---	----

Figura 5. Degradação Total (A) e Degradação Média (B) de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água do mar entre os tratamentos com condições Claro (cl)/Escuro (es), Presença (Ae)/Ausência (Sae) de Aeração e Presença (Ani)/Ausência (SAni) de Animais (n = 9) em ambiente controlado, LAPEC, Brasil, 2015.....	36
--	----

CAPITULO II

Figura 1. Sistema experimental com recirculação contínua de água, utilizada para exposição de *H. reidi* a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. 1: saída de água do aquário; 2: entrada de água no aquário; 3: bomba de recirculação de água; 4: substrato de apoio; 5: Mesa; 6: cadeira para apoio do aquário com bomba de recirculação.....47

Figura 2. Gráficos dos comportamentos associados a locomoção, em ambos os sexos de *H. reidi* (5 machos + 5 réplicas e 5 fêmeas + 5 réplicas), machos (1) e fêmeas (2), em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015. A. Nados verticais; B. Movimentos natatórios totais.....54

Figura 3. Gráficos dos dados biométricos de *H. reidi* (n = 20) associados aos tratamentos com diferentes concentrações de H₂O₂ em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015. A. Ganho/perda de peso; B. Taxa de sobrevivência nas diferentes concentrações.....55

Figura 4. Gráficos dos comportamentos de *H. reidi* (n = 20) associados a diferentes concentrações de H₂O₂ em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015. A. Tempo em repouso; B. Tempo aderido ao substrato de apoio.....56

Figura 5. Gráficos dos comportamentos de *H. reidi* (n = 20) associados a diferentes concentrações de H₂O₂ em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015. A. Frequência de *Pipes*; B. Frequência de *Clicks*.....56

Figura 6: Gráficos dos comportamentos de *H. reidi* (n = 20) associados a diferentes concentrações de H₂O₂ em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015. A. Frequência de vezes que o animal enrolou a cauda na cabeça; B. Frequência do batimento opercular ao longo de 60min.....56

CAPITULO III

Figura 1. Cuboctaedro apresentando a localização dos pontos (13) experimentais para três diferentes fatores codificados (X_1 , X_2 e X_3). Foram obtidos: ao longo do eixo X_2 , em um trecho mediano, seis experimentos localizados nos vértices (2, 3, 5, 6, 8 e 11) e um no centro de um hexágono, em ambos os lados; três experimentos (4, 12 e 13) estão localizados no trecho superior e outros três experimentos (7, 9 e 10) em trecho menor.....78

Figura 2. Sistema experimental com recirculação contínua de água, utilizada para exposição de *H. reidi* a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio e MnP. 1: saída de água do aquário; 2: entrada de água no aquário; 3: bomba de recirculação de água; 4: substrato de apoio; 5: Mesa; 6: cadeira para apoio do aquário com bomba de recirculação; 7: Aquário menor para exposição ao MnP; 8: Aquário maior para exposição ao H_2O_281

Figura 3. Gráficos dos coeficientes de regressão para os experimentos utilizando H_2O_2 como estressor em *H. reidi* ($n = 14$) e a MnP como antioxidante em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.. A: Tempo de Nado; B: Tempo em Repouso; C: Frequência dos comportamentos totais de estresse.....86

Figura 4. Superfície de resposta e valores de MnP vs. H_2O_2 no Ganho/Perda de peso de *H. reidi* ($n = 14$) 30 dias após o experimento, em condições controladas. LAPEC, Brasil, 2015.....91

Figura 5. Superfície de resposta e valores de MnP vs. H_2O_2 no tempo gasto por *H. reidi* ($n = 14$) em repouso durante o experimento, em condições controladas. LAPEC, Brasil, 2015.....91

Figura 6. Superfície de resposta e valores de MnP vs. H_2O_2 na taxa respiratória de *H. reidi* durante o experimento, em condições controladas. LAPEC, Brasil, 2015.....91

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Sumário das condições experimentais: Claro/Escuro, Presença/Ausência de Aeração, Presença/Ausência de Animais e Superfície de Contato Água/Ar.....33

Tabela 2: Efeito das variáveis na degradação do H₂O₂.36

CAPÍTULO II

Tabela 1: Etograma dos dados comportamentais de estresse em *H. reidi*.....49

Tabela 2: Etograma dos dados comportamentais de manutenção em *H. reidi*.....50

Tabela 3. Aspectos biométricos sob condições de estresse por H₂O₂, em ambos os sexos de *H. reidi* (5 machos + 5 réplicas e 5 fêmeas + 5 réplicas) em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.....53

Tabela 4. Degradação do peróxido de hidrogênio em tratamentos experimentais, em ambos os sexos de *H. reidi* (5 machos + 5 réplicas e 5 fêmeas + 5 réplicas) em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.....53

Tabela 5. Dados comportamentais de manutenção, em ambos os sexos de *H. reidi* (5 machos + 5 réplicas e 5 fêmeas + 5 réplicas), sob condições de estresse por H₂O₂ em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.....53

Tabela 6: Dados comportamentais de estresse, em ambos os sexos de *H. reidi* (5 machos + 5 réplicas e 5 fêmeas + 5 réplicas), sob condições de estresse por H₂O₂ em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.....53

Tabela 7: Aspectos biométricos em *H. reidi* (n = 20), sob condições de estresse em variadas concentrações de tratamentos por H₂O₂ em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.....57

Tabela 8: Degradação Total do peróxido de hidrogênio na presença de *H. reidi* (n = 20), em variadas concentrações de tratamentos por H₂O₂ em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.....57

Tabela 9: Dados comportamentais de manutenção de *H. reidi* (n = 20), em variadas concentrações de tratamentos por H₂O₂ em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.....57

Tabela 10: Dados comportamentais de estresse em <i>H. reidi</i> (n = 20), em variadas concentrações de tratamentos por H ₂ O ₂ em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.....	58
--	----

CAPÍTULO III

Tabela 1: Valores originais e os valores correspondentes codificados para os experimentos com <i>H. reidi</i> em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.....	80
---	----

Tabela 2: Matriz experimental obtida pela metodologia de desenho experimental Doehlert por três fatores. Valores experimentais <i>H. reidi</i> em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.....	80
--	----

Tabela 3: Etograma dos dados comportamentais de estresse em <i>H. reidi</i>	83
--	----

Tabela 4: Etograma dos dados comportamentais de manutenção em <i>H. reidi</i>	84
--	----

Tabela 5: Os coeficientes dos modelos obtidos para os dados biométricos em <i>H. reidi</i> (n = 14) em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.....	89
---	----

Tabela 6: Os coeficientes dos modelos obtidos para os Movimentos de estresse e de cabeça para <i>H. reidi</i> (n = 14) em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.....	89
--	----

Tabela 7: Os coeficientes dos modelos obtidos para os percentuais de posição e locomoção de <i>H. reidi</i>	90
--	----

RESUMO

A utilização do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como forma de prevenção e controle de mortalidades associadas com infecções fúngicas, bacterianas, e de infestações parasitárias em diferentes espécies e ciclos de vida dos peixes é comum na aquicultura. Sabe-se que o H_2O_2 afeta a atividade de transcrição celular da base-redox, o controle a respostas inflamatórias e as respostas imunológicas, estando diretamente relacionados ao estresse. A grande vantagem do H_2O_2 é o impacto ambiental mínimo relacionado com a ausência de resíduos tóxicos; nesse sentido, estudos direcionados ao desenvolvimento de protocolos que se utilizem de produtos de baixo risco ambiental para o tratamento de patologias se fazem necessários. Adicionalmente, estudos que visam ampliar os conhecimentos etológicos como um método não-invasivo de avaliação do bem-estar animal são de grande importância na avaliação do estresse. Neste trabalho, foi realizado um estudo com *Hippocampus reidi*, visando ampliar o conhecimento a respeito do seu comportamento em condições normais e de estresse, bem como avaliar o impacto e implicações do uso de H_2O_2 no manejo/cultivo de cavalos-marinhos e possível forma de remediação/mitigação desses efeitos. Foi utilizado um total de 43 espécimes de *H. reidi*, provenientes da população estoque para cultivo experimental do LAPEC (Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação), Universidade Federal da Paraíba, Brasil. Observou-se que a presença de animais parece ser um fator decisivo na degradação do H_2O_2 , por acréscimo de matéria orgânica e bactérias ao sistema, como também pela própria absorção por parte dos animais. Foi constatado ainda que o H_2O_2 tem o potencial para ser usado em tratamento por imersão (banho) em *H. reidi*, tendo em vista que concentrações abaixo de 545 μM mostraram-se seguras em um período de 60 min de exposição para a espécie. Por outro lado, o peróxido de hidrogênio é tóxico em concentrações igual/superior a 599 μM e teve profundo impacto sobre o peso, comportamento e frequência respiratória em *H. reidi*. Foi testado também se Mn-porfirina MnTE-2-PyP⁵⁺ (MnP) é um potencial antioxidante catalítico para manutenção e cultivo de *H. reidi*, minimizando os impactos causados por tratamentos de altas concentrações de H_2O_2 . Os resultados iniciais obtidos mostraram que o MnP foi benéfico a *H. reidi*, uma vez que minimizou os impactos causados por tratamentos de altas concentrações de H_2O_2 a longo prazo, apresentando assim um amplo potencial a ser estudado nessa área.

Palavras-chave: Cavalo-marinho; Comportamento; Porfirina; Cultivo; Água Oxigenada.

ABSTRACT

Hydrogen peroxide (H_2O_2) is widely used in aquaculture; in order to prevent and control fish mortality, often associated with fungal, bacterial and others parasitic infections. H_2O_2 affects cellular transcriptional activity of redox-based; additionally, it controls inflammatory and immune responses, being directly related to stress. The main advantage in H_2O_2 's usage is the reduced environmental impact related to a lack of toxic waste. In this direction, research to develop protocols using products with low environment risks used in pathologies treatment is much needed. Equally important, studies aimed at expanding the ethological knowledge as a method non-invasive assessment of animal welfare are central in the evaluation of stress behavior. This study was conducted with *Hippocampus reidi* and aimed to understand it's behavior under normal and stressful conditions, to assess impact and implications of H_2O_2 's usage in management/culture of seahorses, as well as to work with mitigation ways that may be useful for developing protocols for culturing seahorses. It was used a total of 43 individuals of *H. reidi* from a population maintained under experimental culture at LAPEC (Laboratório de peixes –Ecologia e Conservação), Universidade Federal da Paraíba, Brasil. The presence of animals appeared to be a decisive factor in degrading H_2O_2 , by addition of organic matter and bacteria into the system, but also by the it's absorption by animals. It was also noticed that H_2O_2 has the potential to be used in treatment by immersion (bath) in *H. reidi*, considering that concentrations below 545 μM were considered safe for a period of 60 min exposure of specimens. It should be noted, however, that hydrogen peroxide was toxic at concentrations equal/greater than 599 μM and had a profound impact on weight, behavior and respiratory rate in *H. reidi*. We also tested if Mn-porphyrin MnTE-2-PyP⁵⁺ (MnP) is a catalytic antioxidant potential for maintenance and husbandry of *H. reidi*, minimizing impacts caused by treatments of high concentrations of H_2O_2 . Our initial results suggest that MnP has is beneficial to *H. reidi*, as it minimized impacts caused by long-term high concentrations of H_2O_2 treatment, thus presenting great potential to be studied in that context.

Keywords: Seahorse; Behavior; Porfiryn; Husbandry; Oxygenated water.

INTRODUÇÃO GERAL

O manuseio dos peixes para diversos fins, como a medição, amostragem, marcação e transporte na aquicultura é comum e frequentemente induzem uma resposta primária de estresse, marcada pelo crescimento do cortisol plasmático e concentrações de glicose, podendo levar a imunossupressão e ao retardo do crescimento (GRUTTER e PANKURST, 2000; TREVES-BROWN, 2000; ROTLLANT et al, 2001; WEBER et al, 2009; HEO e SHIN, 2010). O estresse pode ser considerado como um estado que põe em risco a homeostase e que pode se restabelecer através de um conjunto complexo de respostas adaptativas (CHROUSOS, 1998). Barton *et al.* (1986) e Flos *et al.* (1988) sugerem um efeito aditivo ou uma resposta fisiológica cumulativa ao estresse.

Para além dos fatores já citados, a utilização do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como forma de prevenção e controle de mortalidades associadas com infecções fúngicas (HOWE et al. 1999; RACH et al. 2004), bacterianas (SPEARE e ARSENAULT 1997; LUMSDEN et al. 1998; RACH et al. 2000b, 2003; GAIKOWSKI et al. 2003), e de infestações parasitárias (RACH et al. 2000a; MONTGOMERY-BROCK et al. 2001; POWELL e CLARK 2004) em diferentes espécies e ciclos de vida dos peixes (YANONG, 2008), pode estar relacionada ao estresse. Sabe-se, que o peróxido de hidrogênio, juntamente com outras espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio (superóxido, radical hidroxila, peroxinitrito, óxido nítrico, dióxido de nitrogênio, entre outras) são amplamente reconhecidos como sinalizadores, pelo fato de afetarem a atividade de transcrição celular da base-redox, o controle a respostas inflamatórias e as respostas imunológicas. Essas espécies estão diretamente relacionadas ao estresse oxidativo primário e aumentam o estresse oxidativo secundário (BARTESAGHI et al, 2007; BONELLO et al, 2007; DU et al, 2008; HIDALFO e DONOSO, 2008; LI et al, 2007; RUBBO e RADI, 2008; SALVMINI et al, 2006; SOUZA et al, 2008; WINTERBOURN, 2008; WINTERBOURN e HAMPTO, 2008). A U.S. Food and Drug Administration (FDA - EUA) aprovou a utilização de produtos à base de peróxido de hidrogênio para aquicultura (U.S. Food and Drug Administration, 2002), aumentando assim o interesse em seu uso. Contudo, ainda não há estudos sobre o impacto e implicações do estresse oxidativo associado ao uso de H₂O₂ no manejo/cultivo de cavalos-marinhos – peixes mundialmente comercializados para fins ornamentais e para os quais se busca desenvolver protocolo de cultivo (ROSA, 2005;

KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010; VINCENT et al, 2011; DIAS NETO, 2011) - e possível forma de remediação/mitigação desses efeitos.

Nesse sentido, Mn-porfirinas (MnP) têm se destacado em estudos pré-clínicos como uma das classes mais importantes classes de reguladores redox catalíticos (Batinić-Haberle, 2010); estudos *in vivo* em diversos modelos animais de fisiopatologias de caráter oxidativo têm mostrado excelentes resultados (ASLAN et al, 2001; PIGANELLI et al, 2002; BENOVA et al, 2005; CROW et al, 2005; CSONT et al, 2005; WU et al, 2007; GAUTER-FLECKENSTEIN et al, 2008; REBOUÇAS et al, 2008b; SOMPOL et al, 2008).

Cavalo-marinho: O Modelo

O gênero *Hippocampus* engloba peixes ósseos vulgarmente conhecidos como cavalos-marinhos. O grupo tem distribuição mundial e, juntamente com gêneros de dragões-marinhos, cavalos-cachimbo e peixes-cachimbo, constitui a família *Syngnathidae* (KUITER, 2000; LOURIE et al., 1999; 2004).

Praticamente todas as espécies de cavalos-marinhos figuram na Lista Vermelha da *World Conservation Union* (IUCN), o que reflete o status de ameaça global desses animais, decorrente do comércio internacional, da degradação de seus ambientes e das capturas diretas e incidentais a que se encontram submetidos (LOURIE et al., 2004). Não menos relevante, todo o gênero *Hippocampus* figura no Apêndice II da CITES (*Convention on the International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna*), instrumento legal que requer a demonstração por parte dos países exportadores de cavalos-marinhos de que o comércio não é prejudicial às populações naturais. O Brasil participa ativamente do comércio internacional de cavalos-marinhos, sendo um dos maiores exportadores de indivíduos vivos para fins de aquarismo no mundo, e o maior da América Latina (BAUM; VINCENT, 2005), no qual o comércio destes animais vivos incide sobre a espécie *Hippocampus reidi* (**Fig. 1**). Essa espécie de cavalo-marinho tem suas densidades mais altas registradas, predominantemente, nas regiões Norte e Nordeste do litoral brasileiro (ROSA et al., 2007).

Os maiores desafios para o cultivo de cavalos-marinhos nos países em desenvolvimento são de ordem técnica, como o manejo e as doenças, uma vez que esse

cultivo enfrenta os mesmos problemas que a maioria das monoculturas intensivas de peixes, como a manutenção de uma infraestrutura de cativeiro que diminua as altas densidades de estocagem e os níveis elevados de estresse. A alimentação inadequada e as doenças são as principais fontes de mortalidade desses animais em cativeiro, (WILSON; VINCENT, 1998) que, em alguns casos, surgem em consequência de uma nutrição deficiente (CASTRO et al., 2008) e ao estresse em que são submetidos. O fornecimento de dietas apropriadas a uma equilibrada taxa de crescimento/custo viável e questões ambientais (KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010; JENNINGS et al, 2001), como, por exemplo, o destino dos efluentes, requerem ainda estudos. Além desses fatores, a indisponibilidade de substratos de apoio, o transporte e a circulação de água inadequada, bem como a manutenção desses animais em aquários comunitários com espécies mais ágeis e agressivas, levam à debilitação e/ou mortalidade de cavalos-marinhos. Destaca-se a ocorrência de doenças, tais como infecções bacterianas, fúngicas, parasitoses, embolia gasosa, entre outras (ALCAIDE et al, 2001; VINCENT; CLIFTON-HADLEY, 1989; KOLDEWEY, 2005; VINCENT; KOLDEWAY, 2006; ROSA et al, 2005, 2006); tais enfermidades estão entre os principais fatores que impedem o pleno desenvolvimento da piscicultura. Tendo em vista a forte exploração comercial e as dificuldades de manutenção *ex-situ* de cavalos-marinhos, estudos voltados para os seus aspectos biológicos e fisiológicos podem contribuir diretamente para o estabelecimento de protocolos de cultivo bem definidos que forneçam alternativas à extração desses organismos no ambiente natural.



Fonte:
Acervo LAPEC.

Desafios na Aquicultura

A aquicultura é geralmente considerada como a exploração ou a criação de organismos aquáticos para fins comerciais (LANDAU, 1992) e da aquicultura mundial (peixes para alimentação e plantas aquáticas) tem crescido significativamente durante a metade do século passado (KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010). Enquanto a maior parte da produção aquícola no mundo inteiro é dedicada à produção de alimentos, a produção de peixes ornamentais é um componente importante da aquicultura industrial em várias nações, e este setor da indústria mostra um crescimento rápido (TLUSTY, 2002).

Em geral, os benefícios da aquicultura são considerados por ter aumentado a produção mundial de alimentos, diminuído os impactos sobre as populações selvagens, atingido uma produção mais eficiente, e pelo apoio econômico às comunidades costeiras menores, através da produção de exemplares jovens e de tamanho comercial de uma ampla variedade de espécies de peixes por ano (LANDAU, 1992; NEW, 1996; OLSEN, 1996; PILLAY, 1996; WABNITZ et al., 2003; ALVES et al, 2013). No entanto, as monoculturas intensivas de peixes enfrentam problemas como: surtos de doenças devido ao aumento da vulnerabilidade à infecção causada por altas densidades de estocagem e níveis de estresse elevados; fornecimento de dietas apropriadas a uma equilibrada taxa de crescimento/custo viável; e questões ambientais (WILSON; VINCENT, 1998; KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010; JENNINGS et al, 2001), como, por exemplo, o destino dos efluentes. Para além destes, o transporte de espécimes vivos para sustentar o comércio ainda é um desafio. Por vezes, os animais ficam expostos a resíduos de excreção, à diminuição do oxigênio dissolvido, a superlotação e fome (IGUCHI et al, 2002; PATERSON et al., 2003; WRIGHT et al, 2007). Embora geralmente não estudados, a maioria desses benefícios e os riscos se aplicam à aquicultura de espécies ornamentais (KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010).

No Brasil, além desses, o uso indiscriminado de produtos considerados de elevado risco ecológico no tratamento de doenças, e a escassez de estudos direcionados à modificação dessa realidade, produzindo tratamentos de baixo risco ambiental ainda compõem o cenário da aquicultura no país (CRUZ et al., 2005; MAXIMINIANO et al., 2005; LUVIZOTTO-SANTOS et al., 2009; SILVA et al., 2009). De alguma forma, os aquicultores devem equilibrar inúmeros fatores para propiciar um ambiente ideal para o

organismo do seu interesse (ANDERSON, 2009). Manter esses benefícios e, ao mesmo tempo, minimizar todas essas problemáticas de cultivo é um dos principais desafios dos estudos atuais voltados à aquicultura.

Hipóteses

O peróxido de hidrogênio, utilizado comumente na indústria da aquicultura, demora quanto tempo para se degradar na água salgada? Aeração, luminosidade e animais influenciam nessa degradação? Qual seria a quantidade ideal, não letal, para o início de estudos utilizando tratamento de patologia por peróxido de hidrogênio em *H. reidi*? Teria o H_2O_2 algum impacto na saúde dos peixes, comportamento e fisiologia? Qual a viabilidade da utilização da Mn-porfirina - Mn(III) meso-tetraquis(N-etilpiridínio-2-il)porfirina - na manutenção da estabilidade celular através de sua ação antioxidante, utilizando o H_2O_2 como modelo ao estresse oxidativo?

Contribuições para a Ciência e Indústria

Essa dissertação aborda questões importantes para a etologia e aquicultura de maneira geral, se mostrando necessário para o desenvolvimento de um protocolo de manejo eficiente e exequível para criação em cativeiro de Cavalos-Marinho no Brasil. Estabelecer um protocolo para tratamento de enfermidades e mitigar o estresse a que esses animais são submetidos é um dos pontos mais delicados desse processo. Sendo assim, antigas abordagens necessitam ser adaptadas e novas abordagens precisam ser testadas.

Nesse contexto, estudos envolvendo o peróxido de hidrogênio, utilizado amplamente na aquicultura para manter a estabilidade da água dos aquários (combatendo principalmente fungos e cianobactérias), como também no tratamento de algumas enfermidades que atingem peixes (bactérias e parasitas), associado a utilização de um biomimético da enzima superóxido dismutase (SOD) que poderá vir a diminuir o impacto associado ao estresse oxidativo a que esses animais são submetidos são relevantes e necessários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCAIDE, E.; GIL-SANZ, C.; SANJUAN, E.; AMARO, C.; SILVEIRA, L. , 2001. **Vibrio harveyi causes disease in seahorse, *Hippocampus* sp.** Journal of Fish Diseases, 24, 311-313;
- ALVES, R. R. N., OLIVEIRA, T. P. R., ROSA, I. M. L., 2013. **Wild animals used as food and medicine in Brazil.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v 2013, p. 1-12;
- ANDERSON, P. A., 2009. **The functions of sound production in the lined seahorse, *hippocampus erectus*, and effects of loud ambient noise on its behavior and physiology in captive environments.** Dissertation to the graduate school, University of Florida. 190pp;
- ASLAN, M.; RYAN, T. M.; ADLER, B.; TOWNES, T. M.; PARKS, D. A.; THOMPSON, J. A.; TOUSSON, A.; GLADWIN, M. T.; TARPEY, M. M.; PATEL, R. P.; BATINIĆ-HABERLE, I.; WHITE, C. R.; FREEMAN, B. A., 2011. **Oxygen radical inhibition of nitric-oxide dependent vascular function in sickle cell disease.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:15215–15220;
- BARTESAGHI, S.; FERRER-SUETA, G.; PELUFFO, G.; et al., 2007. **Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments.** Amino Acids 32: 501–515;
- BARTON, B.A.; SCHRECK, C. B.; SIGISMONDI, L.A., 1986. **Multiple acute disturbances evoke cumulative physiological responses in juvenile chinook salmon.** Trans. Am. Fish. Sot., 115: 245-251;
- Batinić-Haberle, I.; Rebouças, J. S.; Spasojević, I., 2010. **Superoxide Dismutase Mimics: Chemistry, Pharmacology, and Therapeutic Potential.** Antioxidants & Redox Signaling. Jullho, 13(6): 877-918.
- BAUM, J. K. VINCENT, A. C. J., 2005. **Magnitude and inferred impacts of the seahorse trade in Latin America.** Environmental Conservation, v. 32, p. 305-319;
- BENOV, L.; BATINIĆ-HABERLE, I. 2005. **A manganese porphyrin SOD mimic suppresses oxidative stress and extends the life span of streptozotocin-diabetic rats.** Free Radic. Res. 38:81–88;
- BONELLO, S., ZHRINGER, C., BELAIBA, R.S., et al., 2007. **Reactive oxygen species activate the HIF-1a promoter via a functional NFkB site.** Arterioscl Thromb Vasc Biol 27: 755–761;
- BRASIL - MMA. Instrução normativa nº5, de 21 de maio de 2004. **Diário Oficial da União** - seção 1, nº 102, sexta-feira, 28 de maio de 2004;
- CASTRO, A.L.C; DINIZ, A.F.; MARTINS, I.Z.; VENDEL, A.L.; OLIVEIRA, T.P.R.; ROSA, I.L. 2008. **Assessing diet composition of seahorses in the wild using a non-destructive method: *Hippocampus reidi* (Teleostei: Synhnathidae as a study-case.** Neotropical Ichthyology, v.6, n.4, p.637-644.

- CHROUSOS, G. P. 1998. **Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response.** Ann. N.Y. Acad. Sci. 851:311–335;
- CROW, J. P. et al, 2005. **Manganese Porphyrin Given at Symptom Onset Markedly Extends Survival of ALS Mice.** Ann Neurol;58:258–265;
- CRUZ, C.; FUJIMOTO, R.Y.; LUZ, R.K.; et al., 2005. **Toxicidade aguda e histopatologia do fígado de larvas de trairão (*Hoplias lacerdae*) expostas à solução aquosa de formaldeído a 10%.** Pesticidas: r. Ecotoxicol. e meio ambiente. Curitiba. 15: 21-28;
- CSONT, T.; VIAPPIANI, S.; SAWICKA, J.; SLEE, S.; ALTAREJOS, J. Y.; BATINIĆ-HABERLE, I.; SCHULZ, R., 2005. **The involvement of superoxide and iNOS-derived NO in cardiac dysfunction induced by pro-inflammatory cytokines.** J. Mol. Cell. Cardiol. 39:833–840;
- DIAS NETO, J. (org.), 2011. **Proposta de Plano Nacional de Gestão para o uso sustentável de cavalos-marinhos do Brasil.** Brasília: Ibama. 104p.
- DU, W.; ADAM, Z.; RANI, R.; et al., 2008. **Oxidative stress in Fanconi anemia hematopoiesis and disease progression.** Antioxid Redox Signal 10: 1909–1921;
- FLOS, R., REIG, L., TORRES, P. AND TORT, L. 1988. **Primary and secondary stress responses to grading and handling in rainbow trout, *Salmo gairdneri*.** Aquaculture. 71: 99-106;
- GAIKOWSKI, M., A. JOHNSON, J. J. RACH, AND S. M. SCHLEIS, 2003. **Efficacy of hydrogen peroxide in controlling mortality associated with external columnaris on walleye and channel catfish fingerlings.** American Journal of Aquaculture 65:300–305;
- GAUTER-FLECKENSTEIN, B.; FLECKENSTEIN, K.; OWZAR, K.; JIAN, C.; BATINIĆ-HABERLE, I.; VUJASKOVIĆ, Ž., 2008. **Comparison of two Mn porphyrin-based mimics of superoxidedismutase (SOD) in pulmonary radioprotection.** Free Radic. Biol. Med. 44:982–989;
- GRUTTER, A. S.; PANKURST N. W. 2000. **The effects of capture, handling, confinement and ectoparasite on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish *Hemigymnus melapterus*.** J Fish Biol. 57, 391–401;
- HOWE, G. E., W. H. GINGERICH, V. K. DAWSON, AND J. J. OLSON. 1999. **Efficacy of hydrogen peroxide for treating saprolegniasis in channel catfish.** Journal of Aquatic Animal Health 11:222–230;
- HEO, G.J.; SHIN, G.2010. **Efficacy of benzocaine as an anaesthetic for Crucian carp (*Carassius carassius*).** Vet. Anaesth. Analg., 37, pp. 132–135;
- HIDALFO, C. e DONOSO P., 2008. **Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications.** Antioxid Redox Signal 10: 1275–1312;
- IGUCHI, K., ITO, F., OGAWA, K., MATSUBARA, N., YODO, T. & YAMASAKI, T., 2002. **Reduction of transport stress of ayu by obligated schooling.** Fisheries Science 68, 849–853;

IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened. Version 2010.4. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>, acessado em 16 de Junho de 2015;

JENNINGS, S.; KAISER, M. J.; REYNOLDS, J. D., 2001. **Marine Fisheries Ecology**. Blackwell Sciences, London;

KOLDEWEY, H. J., 2005. **Seahorse Husbandry in Public Aquariums: 2005 Manual, with Chapter Contributed by Members of the Syngnathid Discussion Group**. ZSL, London, UK. 137 pp.;

KOLDEWEY, H. J.; MARTIN-SMITH K. M., 2010. **A global review of seahorse aquaculture**. Aquaculture. Volume 302, Issues 3–4, Pages 131–152;

KUITER, R. H., 2000. **Seahorses, Pipefishes and their Relatives: A Comprehensive Guide to Syngnathiformes**. Chorleywood: TMC Publishing, 240pp.;

LANDAU, M., 1992. **Introduction to Aquaculture**. Wiley, New York. 440 pp.;

LI, F.; SONVEAUX, P. P.; RABBANI, Z. N.; et al., 2007. **Regulation of HIF-1 α stability through S-nitrosylation**. Mol Cell 26: 63–74;

LOURIE, S. A.; FOSTER, S. J.; COOPER, E. W. T.; VINCENT, A. C. J., 2004. **A Guide to the Identification of Seahorses**. Project Seahorse and TRAFFIC North America. Washington D.C.: University of British Columbia and World Wildlife Fund, 114p.;

LOURIE, S. A., VINCENT, A. C. J., HALL, H. J., 1999. **Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation**. Project Seahorse, London, UK, 214pp.;

LUMSDEN, J. S., V. E. OSTLAND, AND H. W. FERGUSON, 1998. **Use of hydrogen peroxide to treat experimentally induced bacterial gill disease in rainbow trout**. Journal of Aquatic Animal Health 10:230–240;

LUVIZOTTO-SANTOS, R.; ELER, M.N.; ESPINDOLA, E.L.G; VIEIRA, E.M., 2009. **O uso de praguicidas nas pisciculturas e pesqueiros situados na bacia do rio Mogi-Guaçu**. B. Inst. Pesca, São Paulo. 35(3): 343 – 358;

MAXIMINIANO, A.A.; et al., 2005. **Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental**. Ciência e Saúde Coletiva. 10(2): 483-491;

MONTGOMERY-BROCK, D., V. T. SATO, J. A. BROCK, AND C. S. TAMARU, 2001. **The application of hydrogen peroxide as a treatment for the ectoparasite *Amyloodinium ocellatum* (Brown 1931) on the Pacific threadfin *Polydactylus sexfilis***. Journal of the World Aquaculture Society 32:250–254;

NEW, M., 1996. **Sustainable global aquaculture**. World Aquac. 27, 4–6;

OLSEN, J.H.T., 1996. **Developing sustainable aquaculture**. World Aquac. 27, 16–17;

PATERSON, B. D., RIMMER, M. A., MEIKLE, G. M. & SEMMENS, G. L., 2003. **Physiological responses of the Asian sea bass, *Lates calcarifer*, to water quality**

deterioration during simulated live transport: acidosis, red-cell swelling and levels of ions and ammonia in the plasma. *Aquaculture* 218, 717–728;

PIGANELLI, J. D.; FLORES, S. C.; CRUZ, C.; KOEPP, J.; YOUNG, R.; BRADLEY, B.; KACHADOURIAN, R.; BATINIĆ-HABERLE, I.; HASKINS, K. A., 2002. **Metalloporphyrin superoxide dismutase mimetic (SOD mimetic) inhibits autoimmune diabetes.** *Diabetes* 51:347–355;

PILLAY, T.V.R., 1996. **Aquaculture and the Environment.** Fishing News Books, Oxford. 189 pp.;

POWELL, M. D., CLARK, G. A., 2004. **Efficacy and toxicity of oxidative disinfectants for the removal of gill amoebae from the gills of amoebic gill disease affected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in freshwater.** *Aquaculture Research* 35:112–123;

RACH, J. J., M. P. GAIKOWSKI, AND R. T. RAMSAY. 2000a. **Efficacy of hydrogen peroxide to control mortalities associated with bacteria gill disease infections on hatchery-reared salmonids.** *Journal of Aquatic Animal Health* 12:119–127;

RACH, J. J., M. P. GAIKOWSKI, AND R. T. RAMSAY. 2000b. **Efficacy of hydrogen peroxide to control parasitic infections on hatchery-reared fish.** *Journal of Aquatic Animal Health* 12:267–273;

RACH, J. J., J. J. VALENTINE, T. M. SCREIER, M. P. GAIKOWSKI, AND T. G. CRAWFORD. 2004. **Efficacy of hydrogen peroxide to control saprolegniasis on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) eggs.** *Aquaculture* 238:135–142;

REBOUÇAS, J.S.; DEFREITAS-SILVA, G.; SPASOJEVIC, I.; et al. , 2008. **The impact of electrostatics in redox modulation of oxidative stress by Mn porphyrins: Protection of SOD-deficient *Escherichia coli* via alternative mechanism where Mn porphyrin acts as a Mn-carrier.** *Free Radic. Biol. Med.* 45: 201–210;

ROSA, I. L., ALVES, R. R. N., 2007. **Pesca e comércio de cavalos-marinhos (Syngnathidae: Hippocampus) no Norte e Nordeste do Brasil: subsídios para a conservação e manejo.** *Povos e Paisagens*. Recife: Núcleo de populações em ecologia e etnobotânica aplicada, p. 115-134.

ROSA, I. L., 2005. **National Report - Brazil.** In: Bruckner, A.W.; Fields, J.D.; Daves, N. (eds) **The Proceedings of the International Workshop on CITES Implementation for Seahorse Conservation and Trade.** NOAA Technical Memorandum NMFS-OPR-35. 1 ed. vol 1. Silver Spring, p46-53.

ROSA, I. L.; ALVES, R. R. N.; BONIFÁCIO, K. M.; MOURÃO, J. S.; OSÓRIO, F. M.; OLIVEIRA, T. P. R.; NOTTINGHAM, M. C. , 2005. **Fishers' knowledge and seahorse conservation in Brasil.** *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 1, n. 12;

ROSA, I. L.; SAMPAIO, C. L.; BARROS, A. T., 2006. **Collaborative monitoring of the ornamental trade of seahorses and pipefishes (Teleostei: Syngnathidae) in Brazil: Bahia state as a case study.** *Neotropical Ichthyology*. V. 4, n. 2, p. 247-252;

- ROTLANT, J.; BALM, P.H.M, PEREZ-SANCHEZ, J. et al. 2001. **Pituitary and internal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., *Teleostei*) after handling and confinement stress.** *Gen Comp Endocrinol.* 121, 333–342;
- RUBBO, H. e RADI, R., 2008. **Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury.** *Biochim Biophys Acta* 1780:1318–1324;
- SALVEMINI, D.; DOYLE, T.M.; CUZZOCREA, S., 2006. **Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation.** *Biochem Soc Trans* 34: 965–970;
- SILVA, A.L.; MARCASSI ALVES, F.C.; ANDRADE TALMELLI, E.F.; et al., 2009. **Utilização de cloreto de sódio, formalina e a associação destes produtos no controle de ectoparasitas em larvas de tilápia (*Oreochromis niloticus*).** *B. Inst. Pesca, São Paulo.* 35(4): 597-608;
- SOUZA, J.M.; PELUFFO, G.; RADI, R., 2008. **Protein tyrosine nitration: functional alteration or just a biomarker?** *Free Radic Biol Med* 45: 357–366;
- SOMPOL, P.; ITTARAT, W.; TANGPONG, J.; CHEN, Y.; DOUBINSKAIA, I.; BATINIĆ-HABERLE, I.; ABDUL, H. M.; BUTTERFIELD, A.; ST. CLAIR, D. K., 2008. **A neuronal model of Alzheimer's disease: an insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury.** *Neuroscience* 153:120–130;
- SPEARE, D. J., AND G. J. ARSENAULT. 1997. **Effects of intermitente hydrogen peroxide exposure on growth and columnaris disease prevention of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54:2653–2658;
- TLUSTY, M., 2002. **The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade.** *Aquaculture* 205, 203–219;
- TREVES-BROWN, K. M. **Anaesthesia.** In: *Anaesthetics in Applied Fish Pharmacology*. Treves-BrownKM (ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 2000. pp. 206–217;
- VINCENT, A. C. J. e CLIFTON-HADLEY, R. S., 1989. **Parasitic infection of the seahorse (*Hippocampus erectus*) – a case report.** *Journal of Wildlife Diseases.* 25, 404-406.
- VINCENT, A. C. J.; FOSTER, S. J.; KOLDEWEY, H. J., 2011. **Conservation and management of seahorses and others Syngnathidae,** *Journal of Fish Biology*, v. 78, p. 1681-1724.
- VINCENT, A. C. J; KOLDEWEY, H. J., 2005. **An uncertain future for seahorse aquaculture in conservation and economic contexts.** *Proceedings of the Regional Technical Consultation on Stock Enhancement of Species Under International Concern.* Southeast Asian Fisheries Development Center. Iloilo, Panay, Philippines;
- WABNITZ, C., TAYLOR, M., GREEN, E., RAZAK, T., 2003. **From Ocean to Aquarium.** UNEP–WCMC, Cambridge, UK.
- WEBER, R. A.; PELETEIRO, J.B.; GARCÍA MARTÍN, L. O.; ALDEGUNDE, M. 2009. **The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as**

anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). Aquaculture, 288, pp. 147–150;

WILSON, M. J.; VINCENT; A. C. J., 1998. **Preliminary success in closing the life cycle of exploited seahorse species, *Hippocampus* spp., in captivity.** Aquarium Sci. Cons. v. 2n. 4, p. 179-196;

WINTERBOURN, C.C., 2008. **Reconciling the chemistry and biology of reactive species.** Nat Chem Biol 4: 278–286;

WINTERBOURN, C.C. e HAMPTON, M.B., 2008. **Thiol chemistry and specificity in redox signaling.** Free Radic Biol Med 45: 549–561;

WRIGHT, K. A.; WOODS, C. M. C.; GRAY, B. E.; LOKMAN, P. M.; 2007. **Recovery from acute, chronic and transport stress in the pot-bellied seahorse *Hippocampus abdominalis*.** Journal of Fish Biology. 70, 1447–1457;

WU, T. J.; KHOO, N. H.; ZHOU, F.; DAY, B. J.; PARKS, D. A., 2007. **Decreased hepatic ischemiareperfusion injury by manganese-porphyrin complexes.** Free Radic. Res. 41:127–134;

YANONG, R. P. E., 2014. **Use of Hydrogen Peroxide in Finfish Aquaculture.** Fisheries and Aquatic Sciences in the School of Forest Resources and Conservation, UF/IFAS;

U.S. Food and Drug Administration. 2002. Title 21 Code of Federal Regulations Part 530 (21 CFR 530). Available: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?CFRPart=530> (Junho, 2015);

CAPÍTULO I - DEGRADAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *HIPPOCAMPUS REIDI*

1. INTRODUÇÃO

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um importante intermediário nos processos redox aquáticos, reagindo com metais vestigiais e poluentes, agindo como um forte agente oxidante em sistemas químicos e biológicos (PETASNE e ZIKA, 1997; O'SULLIVAN et al, 2005; CLARK et al, 2008). Tem sido amplamente utilizado em aquicultura como tratamento por imersão (banho) contra muitos organismos causadores de doenças em diferentes espécies e fases da vida de peixes (YANONG, 2014). Muito embora publicações que abordem metodologias que empregam o uso do peróxido no tratamento de doenças e profilaxia em sistemas de cultivo sejam muito escassas, é notável um consenso para o uso do mesmo pelos aquaristas e criadores de peixes.

O peróxido de hidrogênio é eficaz contra parasitas (RACH et al. 2000a; MONTGOMERY-BROCK et al. 2001; POWELL e CLARK 2004), fungos (HOWE et al. 1999; RACH et al. 2004), vírus e bactérias (SPEARE e ARSENAULT 1997; LUMSDEN et al. 1998; RACH et al. 2000b, 2003; GAIKOWSKI et al. 2003), apresentando geralmente, uma maior atividade contra as bactérias gram-negativas do que contra as bactérias gram-positivas (RUSSO et al, 2007). O aumento dos níveis de atividade de catalase, quando as bactérias são cultivadas sob determinadas condições, tais como a presença de peróxido ou até à fase estacionária, tem sido relatado (STORTZ, TARTAGLIA e AMES 1990; GONZALEZ-FLECHA e DEMPLÉ, 1997; LOEWEN 1997). Adicionalmente, Angel et al (1999) demonstraram que mesmo níveis baixos de peróxido de hidrogênio (100 nM) causam estresse oxidativo para bactérias em águas costeiras, baseado no aumento da concentração de enzima catalase na coluna d'água. No entanto, a sua toxicidade apresenta valores iniciais e sensibilidade espécie específica, tanto para microrganismos como para peixes (RUSSO et al, 2007; YANONG, 2014), sendo, portanto, inexistentes na literatura dados que demonstrem tais valores para o gênero *Hippocampus*.

Uma grande vantagem do H_2O_2 é o impacto ambiental mínimo relacionado com a ausência de resíduos tóxicos, representando uma alternativa mais amigável ao ambiente (KIEMER e BLACK, 1997). Em água, o H_2O_2 se decompõe em $\text{H}_2\text{O}_2(\ell) \rightarrow \text{H}_2\text{O}(\ell) + \frac{1}{2} \text{O}_2(\text{g})$, e que também tem sido usado como uma fonte de oxigênio, durante o transporte de peixe vivo ou em lagos ornamentais (TAYLOR e ROSS, 1988). Em aquicultura ornamental de água doce, o uso de doses menores de medicamentos por períodos de tempo mais longos pode se mostrar favoráveis em algumas situações. O peróxido de hidrogênio em concentrações baixas como tratamento pode ser aplicado, por exemplo, em tanques de criações e lagoas, onde uma troca de água pode não ser uma opção (YANONG, 2014; RUSSO et al, 2007).

O peróxido de hidrogênio parece degradar-se relativamente rápido na presença de matéria orgânica e de aeração e, na água do mar, esse processo de degradação tem sido atribuído à decomposição biológica envolvendo enzimas peroxidase de plâncton e bactérias marinhas (COOPER e ZEPP, 1990; MOFFETT e ZAFIRIOU, 1993; PETASNE e ZIKA, 1997; YANONG, 2014). Outros dissipadores potenciais incluem decomposição catalítica mediada por metais de transição, halogenetos e partículas, decomposição fotoquímica e um mix de dinâmicas físicas (MOFFETT e ZAFIRIOU, 1993; PETASNE e ZIKA, 1997).

Nesse sentido, estudos para compreender a estabilidade do peróxido de hidrogênio, em diferentes tratamentos e condições ambientais estáveis para o cultivo de *Hippocampus reidi*, se fazem necessários para mensurar o tempo e a frequência dessa degradação em um sistema controlado, uma vez que a exposição excessiva ao H_2O_2 e a sua utilização de forma imprópria pode resultar em toxicidade para *H. reidi*.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Avaliar a taxa e o tempo de degradação de peróxido de hidrogênio em condições controladas para o cultivo de *H. reidi*.

2.2. Específicos:

- Mensurar a degradação total e média do peróxido de hidrogênio em água salgada, ao longo de 24 horas, em um sistema controlado com diferentes condições de luminosidade e aeração;
- Avaliar a degradação total e média do peróxido de hidrogênio em água salgada, ao longo de 24 horas, na presença e ausência de exemplares de *H. reidi*.
- Identificar os fatores que regulam as taxas de decomposição do peróxido de hidrogênio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Qualidade da água

As variáveis físico-químicas dos aquários de populações estoque, bem como dos demais aquários onde foram realizados os experimentos, foram controladas constantemente. As variáveis de temperatura, salinidade e pH foram mantidas em 25°C, 27 ppm e 8,2 respectivamente. Os demais parâmetros químicos da água NH_3 , NH_4^+ foram monitorados diariamente e não excederam os limites adequados para cavalos-marinhos variando entre: 0 – 0,25mg/l (KOLDEWEY, 2005). Foi estabelecido também um fotoperíodo de 10L : 14E, utilizando luz branca fria acima dos tanques, com intensidade luminosa de cerca de 500lx na superfície da água.

3.2. Estudo da decomposição do H_2O_2

3.2.1. Procedimentos

Foram preparadas duas soluções (A e B) para o método I_3^- de acordo com a fórmula usual (Allen et al, 1952).

- Solução “A” - Consiste de 33 g de KI, 1 g de NaOH, e 0,1 g de molibdato de amônio tetrahidratado diluído com 500 mL com água. A solução foi agitada durante ~10 min para a dissolução do molibdato sendo seu pH final de 12,7. A solução foi armazenada no escuro total para inibir a oxidação do I^- .
- Solução “B” – É um tampão aquoso, contém 10g de KHP por 500mL de água, e pH de 4,04;

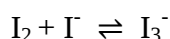
O método I_3^- consiste em misturar volumes iguais das soluções A e B, seguido pela adição em igual proporção da solução de H_2O_2 . A absorbância da solução resultante foi medida a 351.0 nm em uma cubeta, para se ter uma absorbância de ~0.9 (a depender da concentração de H_2O_2 na solução).

Para se obter a absorbância do branco, foi calculado a absorbância esperada para a diluição da mistura A/B com água pura e, posteriormente, foram misturados volumes

iguais da solução “A”, “B” e da água do mar (sem H₂O₂), assumindo que a diferença entre as soluções foi devido a I₃⁻ fortuito.

Para os valores de ϵ_{max} (I₃⁻) a 351 nm foram assumidos os valores de Klassen et al (1994).

A reação de H₂O₂ acidificada com KI para produzir I₂, seguido da Iodometria com tiosulfato de sódio padrão, é chamado de método de Kingzett (REICHERT et al, 1939; SCOTT, 1939; KINGZETT, 1880). Em altas concentrações de KI, o equilíbrio entre I₂, I⁻ e I₃⁻ é fortemente em favor de I₃⁻. A medição de I₃⁻ pela sua absorção óptica constitui a base do método I₃⁻ (KLASSEN et al, 1994).



3.2.2. Medição Óptica

Um espectrofotômetro BEL Photonics SP 1105, que mede a 0.001 unidade de absorbância, foi utilizado. Os espectros apresentados no presente estudo tiveram o Branco subtraído. As medições de absorbância foram feitas ~4 minutos após a colocação da cubeta no espectrofotômetro, a fim de permitir que a temperatura das soluções se igualem às do espectrofotômetro. Todas as medições de absorbância foram feitas dentro da faixa de 24-25°C.

A absorbância é proporcional à concentração de moléculas absorvedoras de luz na amostra e ao caminho óptico da substância através da qual a luz viaja. Sendo assim, a Lei de Beer expressa a dependência da absorbância (A) em relação ao caminho óptico (b) e a concentração (c):

$$A = \epsilon bc$$

3.3. Desenho Experimental

Foram selecionados nove animais com altura média 19.1 cm (± 2.3) e peso úmido 15,3 g ($\pm 0,3$), respectivamente, provenientes da população estoque para cultivo experimental do LAPEC (Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação), Universidade Federal da Paraíba, Brasil. Os animais tiveram o comprimento estimado com auxílio do software gratuito UTHSCSA *Image Tool* (WILCOX et al., 2002) e o peso aferido com uma balança milesimal (Bel M-333).

Os experimentos foram feitos em quatro diferentes condições controladas (**Tabela 1**). Para os ensaios envolvendo animais, utilizou-se um aquário de 21 x 36 x 30 cm (20 L), onde três animais, por vez, foram expostos a uma solução de H_2O_2 a 3% de ingrediente ativo (Rioquímica) e concentração de 882 mM; os outros ensaios foram realizados em *beckers* de 1 L e 2 L respectivamente, sem presença de animais. Para cada condição experimental foram realizados três experimentos com uma réplica cada. As concentrações testadas foram baseadas em informações empíricas e arbitradas a partir da literatura (SAMUILOV et al, 2001; DRABKOVA et al, 2007; LARS-FLEMMING et al, 2010; 2012). Foi definido o valor de 0,25 ml de H_2O_2 à 3% por 1 L de água salgada, quantidade comumente utilizada na indústria para combate ao surgimento e a proliferação de algas (DRABKOVA et al, 2007).

O H_2O_2 foi adicionado às 18:00 (h:m) de cada dia de experimento, sob as três diferentes condições (claro/escuro, presença/ausência de aeração e presença/ausência de animais). Foi retirada uma alíquota, por hora, de cada recipiente e submetido à determinação espectrofotométrica de H_2O_2 por iodometria. Toda a água utilizada no experimento passou por filtração mecânica (Manta Acrílica – Perlon e Malha 150 μm) e ultravioleta (Filtro UV Atman-36W), utilizado comumente para controle de organismos planctônicos e microrganismos em sistemas de cultivo fechado.

3.4. Análises Estatísticas

Os resultados referentes às frequências e taxas de degradação do peróxido obtidas por tratamento foram mensurados por meio da Análise de Variância (ANOVA), sendo verificados para normalidade pelo Teste de Shapiro-Wilk (*W-test*). Diferenças significativas apresentadas foram então analisadas com o teste *a posteriori* de Duncan, diferenciando o(s) grupo(s) formados com as médias mais significativas. O Teste-t de

Student foi aplicado para verificar a existência de correlação entre as variáveis mensuradas. A ferramenta estatística utilizada foi o STATISTICA 8 (Statsoft). Todos os testes foram considerados significativos quando seus resultados demonstraram um nível de $p < 0,05$. Dados referentes às análises são apresentados na forma de porcentagem $\pm$ erro padrão.

Tabela 1: Sumário das condições experimentais em ambiente controlado, LAPEC, Brasil, 2015.: Claro/Escuro, Presença/Ausência de Aeração, Presença/Ausência de Animais e Superfície de Contato Água/Ar

Condições	Observações	
Claro/Escuro	Claro	Experimento submetido a condições normais de fotoperíodo (10L : 14E) ao longo de 24 horas;
	Escuro	Experimento submetido a condições de escuro constante, ao longo de 24 horas;
Presença/Ausência de Aeração	Presença	Experimento submetido a condições normais de fotoperíodo (10L : 14E) e aeração constante, ao longo de 24 horas. A aeração consiste na utilização de uma bomba compressora Boyu (D-200; 1,5 W) para aerar a água;
	Ausência	Experimento submetido a condições normais de fotoperíodo (10L : 14E) e sem aeração, ao longo de 24 horas;
Presença/Ausência de Animais	Presença	Experimento submetido a condições normais de fotoperíodo (10L : 14E) e aeração constante, com a presença de 3 cavalos-marinho ao longo de 24 horas;
	Ausência	Experimento submetido a condições normais de fotoperíodo (10L : 14E) e aeração constante, sem cavalos-marinho ao longo de 24 horas;
Área de contato da superfície da água/ar	5cm ²	Experimento submetido a condições normais de fotoperíodo (10L : 14E) e aeração constante ao longo de 24 horas, onde a superfície de contato Água/Ar é de 5cm ² ;
	20cm ²	Experimento submetido a condições normais de fotoperíodo (10L : 14E) e aeração constantee aeração constante ao longo de 24 horas, onde a superfície de contato Água/Ar é de 20cm ² ;

4. RESULTADOS

Neste experimento, os valores de concentração do H_2O_2 ($\sim 220,5 \mu\text{M}$) se mantiveram constantes na primeira hora de experimento para todos os tratamentos. Após 15 horas, os tratamentos claro/escuro haviam perdido, respectivamente, $18,4 \pm 0,5/15,3 \pm 0,4 \%$; os tratamentos presença/ausência de aeração haviam perdido $4,2 \pm 0,1/7 \pm 0,6 \%$ e os tratamentos presença/ausência de animais haviam perdido $79,2 \pm 4,9/14,9 \pm 1 \%$ de sua concentração inicial de H_2O_2 , respectivamente. Ao final das 24 horas, os tratamentos claro/escuro e presença/ausência de aeração ainda possuíam $6,8-6,5$ e $10,8-0,2 \mu\text{M}$ de H_2O_2 , enquanto que ambos os tratamentos da condição presença/ausência de animais já haviam degradado todo o H_2O_2 .

A partir do Teste-t de Student realizado com todas as variáveis analisadas (taxa e frequência de degradação) para cada situação experimental, não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos para as condições claro/escuro (**Fig. 1**), presença/ausência de aeração (**Fig. 2**) e condição área de contato da superfície da água/ar (**Fig. 3**). Apenas para a condição presença/ausência de animais (**Fig. 4**) foi observada diferença significativa a partir da análise, no que se refere apenas a taxa de degradação ($t = 2.74$; $p = 0.01$).

Figura 1. Degradação Total (A) e Degradação Média (B) de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água do mar na presença e ausência de luminosidade em ambiente controlado na ausência de *H. reidi*, LAPEC, Brasil, 2015. cl, Claro; es, Escuro.

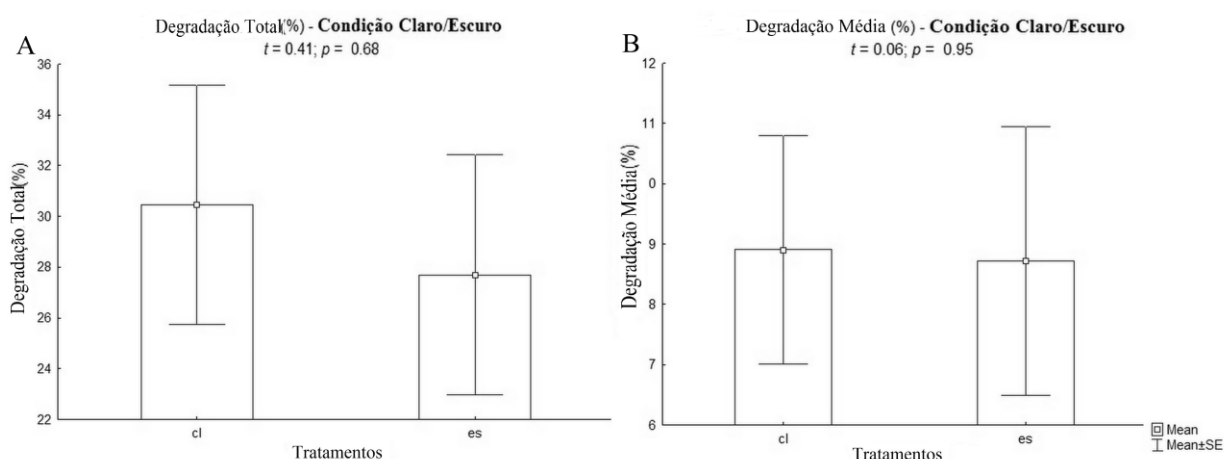


Figura 2. Degradação Total (A) e Degradação Média (B) de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água do mar na presença e ausência de aeração em ambiente controlado na ausência de *H. reidi*, LAPEC, Brasil, 2015. Ae, Aeração; Sae, Ausência de aeração.

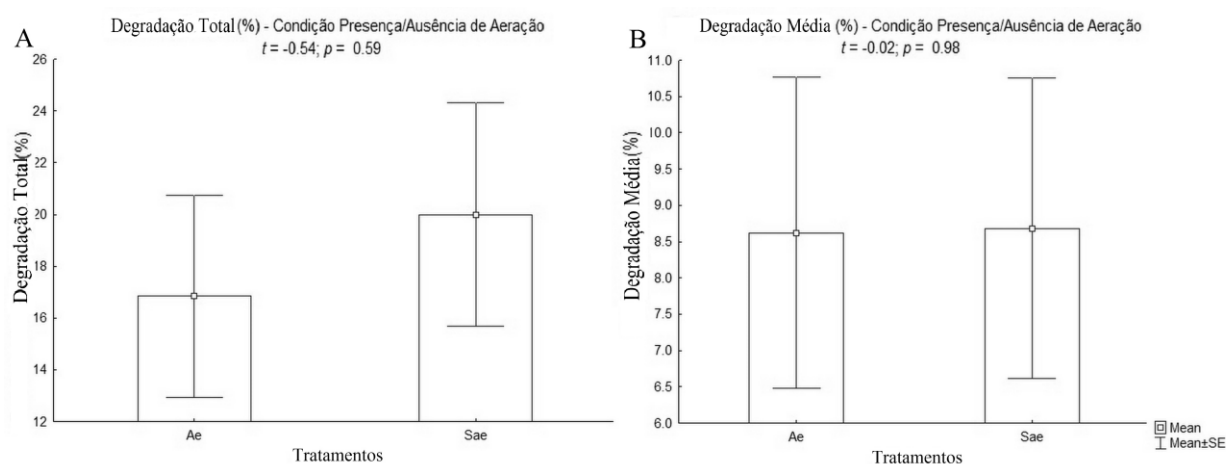


Figura 3. Degradação Total (A) e Degradação Média (B) de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água do mar em diferentes condições de área de contato da superfície da água/ar: 5cm² e 20cm², em ambiente controlado na ausência de *H. reidi*, LAPEC, Brasil, 2015.

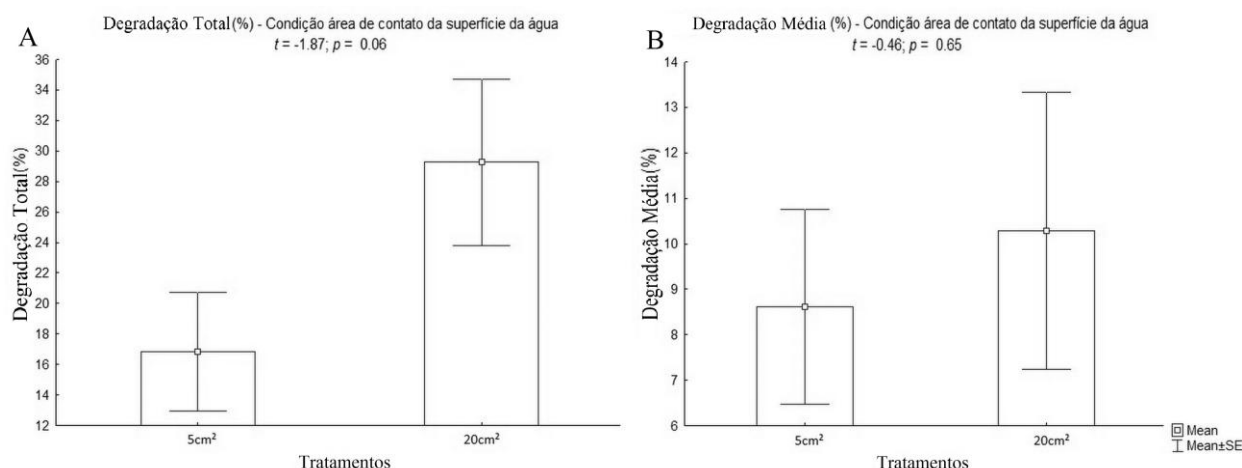
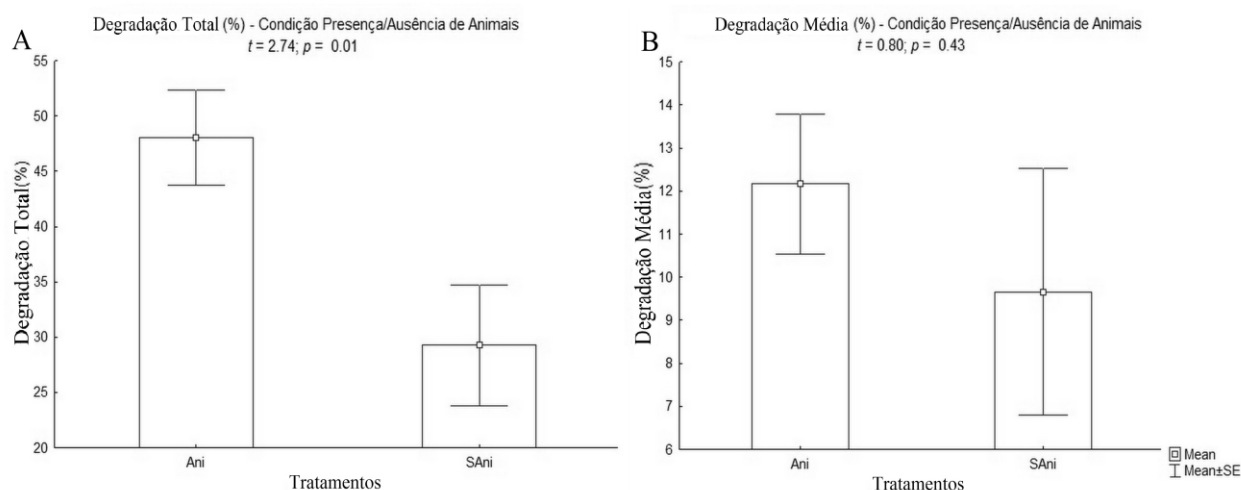


Figura 4. Degradação Total (A) e Degradação Média (B) do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água do mar na presença e ausência de aeração em ambiente controlado e na presença e ausência de *H. reidi* (3 indivíduos), LAPEC, Brasil, 2015. Ani, Presença de Animais; SAni, Ausência de Animais.



4.1. Comparação entre os tratamentos

A taxa de degradação do H_2O_2 ao longo de 24 horas apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($F_{5,289} = 6.1766$, $p < 0.01$). A Frequência de Degradação do peróxido não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (**Tabela 2**). A partir do teste *a posteriori* de Duncan foi observada a formação de dois grupos distintos (G1 = Ani, G2 = demais tratamentos) (**Fig. 5**).

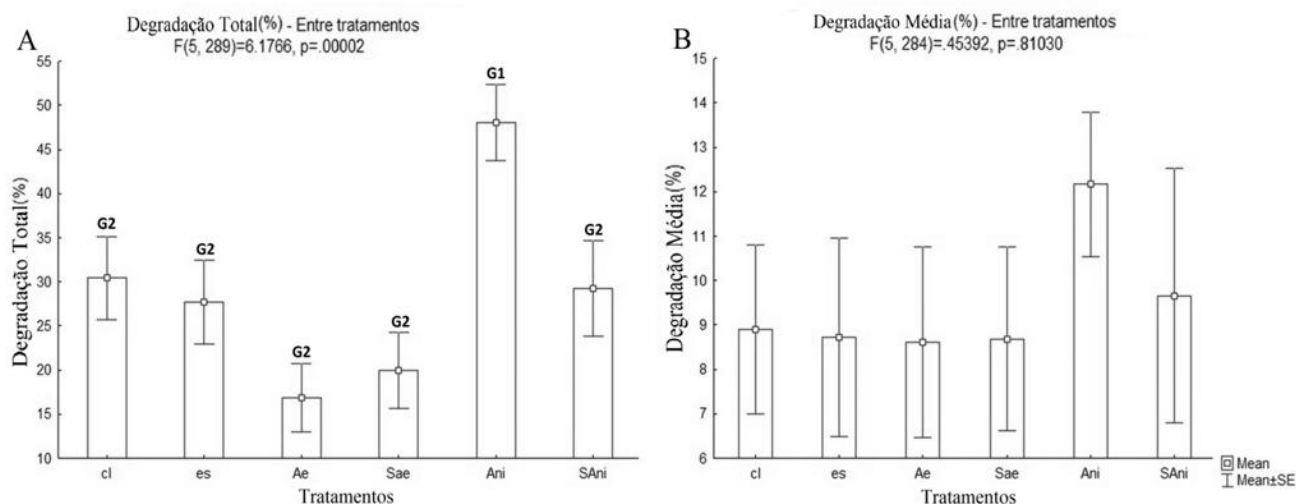
Tabela 2: Efeito das variáveis na degradação do H_2O_2 .

Variáveis	Claro/Escuro (%)		Presença/ Ausência de Aeração (%)		Presença/ Ausência de Animais (%)	
	Cl	Es	Ae	Sae	Ani	SAni
Taxa de Degradação (%)	33.2 ± 0.2	30.6 ± 0.8	20.2 ± 1.1	21.6 ± 1.6	47.2 ± 1.7*	29.3 ± 0.3
Freq. de degradação (%)	8.9 ± 0.1	8.72 ± 0.1	8.62 ± 0.0	8.69 ± 0.0	12.19 ± 0.4	9.65 ± 0.0

Valores com asterisco (*) denotam diferença significativa.

Cl, Claro; Es, Escuro; Ae, Presença de Aeração; Sae, Ausência de Aeração; Ani, Presença de Animais; SAni, Ausência de animais.

Figura 5. Degradação Total (A) e Degradação Média (B) de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água do mar entre os tratamentos com condições Claro (cl)/Escuro (es), Presença (Ae)/Ausência (Sae) de Aeração e Presença (Ani)/Ausência (SAni) de Animais (n = 9) em ambiente controlado, LAPEC, Brasil, 2015.



5. DISCUSSÃO

Os dados apresentados no presente estudo demonstram que as concentrações de peróxido de hidrogênio podem sofrer alterações variadas ao longo do tempo, como consequência de diversas condições abióticas e principalmente decorrente de fatores bióticos, tais como a presença de microrganismos e de outros organismos, como peixes ornamentais - cavalos-marinhos no caso deste trabalho. Os resultados obtidos corroboram o que vem sendo apresentado na literatura: Russo e colaboradores (2007), por exemplo, também observou que as concentrações de H_2O_2 se mantiveram constantes durante a primeira hora de experimento para todas as condições testadas, e que alterações nas taxas de degradação de peróxido foram mais elevadas e divergiram na presença de cinco espécies de peixes ornamentais testadas.

Segundo Yanong (2014), certo número de diferentes elementos, enzimas e compostos, bem como luz, calor e pH elevado, todos, aceleraram a degradação do peróxido de hidrogênio. Tort et al. (2003) achou algo parecido em seus experimentos, onde as concentrações de peróxido de hidrogênio iniciais de 10 e 100 mg/L em tanques de cultivo não foram mensuráveis após 2-3 dias na presença de aeração e/ou de matéria orgânica, no entanto, sob condições de água estática, sem aeração ou matéria orgânica, as concentrações foram reduzidas para metade até 6 dias e se tornaram imensuráveis após 10 dias. Os dados disponíveis na literatura são, de certa forma, ainda limitados para fins comparativos, tendo em vista que, as diferentes condições e parâmetros testados são bastante divergentes e abordam diversas espécies e/ou sua eficácia contra diferentes patógenos.

Ao contrário do que se acreditava, o efeito da luminosidade e da aeração parece estar, portanto, muito mais relacionado ao aumento da degradação do peróxido pela presença de matéria orgânica e bactérias que se aproveitem dos efeitos benéficos destas variáveis (Ex.: FUJIOKA et al, 1981) do que diretamente daqueles dois parâmetros.

. Experiências de filtração indicam que partículas ou micro-organismos desempenham o papel principal na determinação do tempo de vida do H_2O_2 na água do mar (PETASNE e ZIKA, 1997). Spotte e Buck (1981) mostraram uma diminuição na contagem de bactérias (> 75% de redução) em água do mar, após passagem por filtro de irradiação UV. Neste sentido, o fato de não observarmos diferença significativa entre

nenhuma variável para os tratamentos Presença/Ausência de Aeração, Claro/escuro e Área de Contato da Superfície da Água, pode estar relacionado ao tratamento dado à água anteriormente aos experimentos, uma vez que a filtração mecânica e ultravioleta (comumente utilizadas em sistemas fechados para espécies ornamentais) elimina/retira grande parte da matéria orgânica e possivelmente dos microrganismos presentes anteriormente na água.

Spotte e Buck (1981) demonstraram que as fezes dos animais, e adicionalmente porções de alimento ofertado (peixe cru), contribuem para contagens mais elevadas de bactérias na água do mar em lagos artificiais, mesmo após a passagem pela irradiação UV. No nosso caso, os animais não foram alimentados durante os experimentos, porém podemos sugerir que a simples presença de exemplares de *H. reidi* no aquário experimental e a excreção de compostos nitrogenados com consequente aumento da matéria orgânica dissolvida podem ter gerado um aumento na quantidade de microrganismos que secundariamente degradem o peróxido.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que, para as variáveis testadas, a presença de animais parece ser um fator decisivo na degradação do H_2O_2 , seja por acréscimo de matéria orgânica e bactérias ao sistema, como também pela possível absorção por parte dos animais e, contrariamente ao esperado, a luminosidade, aeração e área de superfície de contato água/ar possuem uma influência muito mais secundária, do que direta nessa degradação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, A. O.; DAVIS, T. W.; ELMORE, G.; GHORMLEY, J. A.; HAINES, B. M.; HOCHANADEL, C. J. 1949. Oak Ridge Natl. Lab. Publ., ORNL 130;
- ANGEL, D.L., FIEDLER, U., EDEN, N., KRESS, N., ADELUNG, D., HERUT, B., 1999. **Catalase activity in macro- and micro-organisms as an indicator of biotic stress in coastal waters of the eastern Mediterranean Sea.** Helgoland Mar. Res. 53, 209–218;
- CLARK, C. D., DE BRUYN, W. J., JAKUBOWSKI, S. D., GRANT, S. B., 2008. **Hydrogen peroxide production in marine bathing waters: Implications for fecal indicator bacteria mortality.** Marine Pollution Bulletin 56, 397–401;
- COOPER, W.J., ZEPP, R.G., 1990. **Hydrogen peroxide decay in water with suspended soils: evidence for biologically mediated processes.** Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47, 888–893;
- DRABKOVA, M.; ADMIRAAL, W.; MARSALEK, B., 2007. **Combined exposure to hydrogen peroxide and light : Selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms.** American Chemical Society, Washington, DC, EUA. Vol. 41, n^o1, pp. 309–314;
- GAIKOWSKI, M., A. JOHNSON, J. J. RACH, AND S. M. SCHLEIS, 2003. **Efficacy of hydrogen peroxide in controlling mortality associated with external columnaris on walleye and channel catfish fingerlings.** American Journal of Aquaculture 65:300–305.
- GONZALEZ-FLECHA, B., DEMPLE, B., 1997. **Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing Escherichia coli.** J. Bacteriol. 47, 382–388;
- HOWE, G. E., W. H. GINGERICH, V. K. DAWSON, AND J. J. OLSON. 1999. **Efficacy of hydrogen peroxide for treating saprolegniasis in channel catfish.** Journal of Aquatic Animal Health 11:222–230.
- KIEMER, M.C.B., BLACK, K.D., 1997. **The effects of hydrogen peroxide on the gill tissues of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.** Aquaculture 153, 181–189;
- KINGZETT, C. T. Journal of the Chemical Society. 1880, 37,792;
- KLASSEN, N. V., MARCHINGTON, D., MCGOWANT, H. C. E., 1994. **H₂O₂ Determination by the I₃⁻ Method and by KMnO₄ Titration.** Anal. Chem., 66, 2921–2925;
- KOLDEWEY, H. J., 2005. **Syngnathid Husbandry in Public Aquariums: 2005 Manual, With Chapters Contributed by Members of the Syngnathidae Discussion Group.** Project Seahorse and Zoological Society of London. 137pp;
- LOEWEN P.C., 1997. **Bacterial catalases.** In: **Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses.** Ed. by J.G. Scandalios, pp. 273–308. Cold Spring Harbor Press, 5 Woodbury, NY, USA;

- LUMSDEN, J. S., V. E. OSTLAND, AND H. W. FERGUSON, 1998. **Use of hydrogen peroxide to treat experimentally induced bacterial gill disease in rainbow trout.** *Journal of Aquatic Animal Health* 10:230–240;
- MOFFETT, J.W., ZAFIRIOU, O.C., 1993. **The photochemical decomposition of hydrogen peroxide in surface waters of the Eastern Caribbean and Orinoco River.** *J. Geophys. Res.* 98, 2307–2313;
- MONTGOMERY-BROCK, D., V. T. SATO, J. A. BROCK, AND C. S. TAMARU, 2001. **The application of hydrogen peroxide as a treatment for the ectoparasite *Amyloodinium ocellatum* (Brown 1931) on the Pacific threadfin *Polydactylus sexfilis*.** *Journal of the World Aquaculture Society* 32:250–254;
- O’SULLIVAN, D.W., NEALE, P.J., COFFIN, R.B., BOYD, T.J., OSBURN, C.L., 2005. **Photochemical production of hydrogen peroxide and methylhydroperoxide in coastal waters.** *Mar. Chem.* 97, 14–33;
- PETASNE, R.G., ZIKA, R.G., 1997. **Hydrogen peroxide lifetimes in south Florida coastal and offshore waters.** *Mar. Chem.* 56, 215–225;
- PEDERSEN, LARS-FLEMMING; GOOD, C. M.; PEDERSEN, P. B., 2012. **Low-Dose Hydrogen Peroxide Application in Closed Recirculating Aquaculture Systems.** *North American Journal of Aquaculture* 74:100–106;
- PEDERSEN, LARS-FLEMMING; PEDERSEN, P. B., 2010. **Hydrogen Peroxide: Disinfectant For Recirculating Aquaculture Systems.** Global Aquaculture Alliance;
- POWELL, M. D., AND G. A. CLARK. 2004. **Efficacy and toxicity of oxidative disinfectants for the removal of gill amoebae from the gills of amoebic gill disease affected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in freshwater.** *Aquaculture Research* 35:112–123;
- RACH, J. J., M. P. GAIKOWSKI, AND R. T. RAMSAY. 2000a. **Efficacy of hydrogen peroxide to control parasitic infections on hatchery-reared fish.** *Journal of Aquatic Animal Health* 12:267–273;
- RACH, J. J., M. P. GAIKOWSKI, AND R. T. RAMSAY. 2000b. **Efficacy of hydrogen peroxide to control mortalities associated with bacteria gill disease infections on hatchery-reared salmonids.** *Journal of Aquatic Animal Health* 12:119–127;
- RACH, J. J., S. M. SCHLEIS, M. P. GAIKOWSKI, AND A. JOHNSON, 2003. **Efficacy of hydrogen peroxide in controlling mortality associated with external columnaris on walleye and channel catfish fingerlings.** *North American Journal of Aquaculture* 4:300–305.
- RACH, J. J., J. J. VALENTINE, T. M. SCREIER, M. P. GAIKOWSKI, AND T. G. CRAWFORD. 2004. **Efficacy of hydrogen peroxide to control saprolegniasis on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) eggs.** *Aquaculture* 238:135–142;
- REICHERT, J. S.; MCNEIGHT, S. A.; RUDEL, H. W., 1939. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 11, 194;

- RUSSO, R., E. W. CURTIS, AND R. P. E. YANONG. 2007. **Preliminary investigations of hydrogen peroxide treatment of selected ornamental fishes and efficacy against external bacteria and parasites in green swordtails.** Journal of Aquatic Animal Health 19:121–127;
- SAMUILOV, V. D.; BEZRYADNOV, D. B.; GUSEV, M. V.; KITASHOV, A. V.; FEDORENKO, T. A., 2001. **Hydrogen Peroxide Inhibits Photosynthetic Electron Transport in Cells of Cyanobacteria.** Biochemistry, Moscow. Volume 66, Issue 6, pp 640-645;
- SCOTT, W. W., 1939. **In Standard Methods of Chemical Analysis**, 5th ed.; Furman, N. H., Ed.; Van Nostrand New York, Vol. 2, p 2180;
- SPEARE, D. J., AND G. J. ARSENAULT. 1997. **Effects of intermitente hydrogen peroxide exposure on growth and columnaris disease prevention of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 54:2653–2658.
- SPOTTE, S. E BUCK, J. D. 1981. **The efficacy of UV irradiation in the microbial disinfection of marine mammal water.** Journal of Wildlife Diseases Vol. 17, No. 1, January,
- STORTZ G., TARTAGLIA L.A. & AMES B.N., 1990. **Transcriptional regulation of oxidative stress inducible genes: direct activation by oxidation.** Science 248, 189–194;
- TAYLOR, N. I., AND L. G. ROSS., 1988. **The use of hydrogen peroxide as a source of oxygen for the transportation of live fish.** Aquaculture 70:183–192;
- TORT, J.M., WOOSTER, G.A., BOWSER, P.R., 2003. **Effects of hydrogen peroxide on hematology and blood chemistry parameters of walleye *Stizostedion vitreum*.** J. World Aquacult. Soc. 34 (2), 236–242;
- YANONG, R. P. E., 2014. **Use of Hydrogen Peroxide in Finfish Aquaculture.** Fisheries and Aquatic Sciences in the School of Forest Resources and Conservation, UF/IFAS;
- WILCOX, D.; DOVE, B.; MCDAVID, D. ; GREER, D, 2002. **UTHSCSA ImageTool Program, version 3.0.** University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas. Disponível em: <ftp:maxrad6.uthscsa.edu>

CAPÍTULO II - REAÇÕES COMPORTAMENTAIS PARA A AVALIAÇÃO DO
ESTRESSE EM *HIPPOCAMPUS REIDI* GINSBURG, 1933 (SYNGNATHIDAE)
EXPOSTOS AO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM TRATAMENTOS POR
IMERSÃO (BANHO)

1. INTRODUÇÃO

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), comumente utilizado como um desinfetante para assepsia de ferimentos de maneira geral, tem sido amplamente utilizado em aquicultura como tratamento por imersão (banho) contra muitos organismos causadores de doenças e como forma de prevenção e controle de mortalidades associadas com infecções fúngicas (HOWE et al. 1999; RACH et al. 2004), bacterianas (SPEARE e ARSENAULT 1997; LUMSDEN et al. 1998; RACH et al. 2000b, 2003; GAIKOWSKI et al. 2003), e de infestações parasitárias (RACH et al. 2000a; MONTGOMERY-BROCK et al. 2001; POWELL e CLARK 2004) em diferentes espécies e ciclos de vida dos peixes (YANONG, 2008). Muitos agentes patogênicos (incluindo bactérias anaeróbias) não produzem catalase e superóxido dismutase, o que os tornam mais sensíveis ao composto, já que não podem quebrar os componentes do peróxido (KEYER e IMLAY, 1996; IMLAY 2002, 2003). No Brasil, essas enfermidades estão entre os principais fatores que impedem o pleno desenvolvimento da piscicultura, uma vez que, no tratamento de doenças, o uso indiscriminado de produtos considerados de elevado risco ecológico, e a escassez de estudos direcionados a produtos de baixo risco ambiental ainda compõem o cenário da aquicultura no país (CRUZ et al., 2005; MAXIMINIANO et al., 2005; LUVIZOTTO-SANTOS et al., 2009; SILVA et al., 2009).

Uma grande vantagem do H_2O_2 é o impacto ambiental mínimo relacionado com a ausência de resíduos tóxicos, representando uma alternativa mais amigável ao ambiente (KIEMER e BLACK, 1997). No entanto, fatores como a concentração do produto, o tempo de exposição e a temperatura da água pode levar o peróxido de hidrogênio a se tornar tóxico, resultando em danos como morbidade (por exemplo, danos nas brânquias) ou mesmo mortalidade, dependendo do tamanho do peixe (JOHNSON et al. 1993; THOMASSEN 1993; CLAYTON e SUMMERFELT 1996; KIEMER e BLACK 1997; RACH et al. 1997; GAIKOWSKI et al. 1999; POWELL e

CLARK 2004). Além disso, sua toxicidade apresenta valores iniciais de exposição e sensibilidade espécie específica, tanto para microrganismos como para peixes (RUSSO et al, 2007; YANONG, 2014).

Inexiste na literatura, dados que demonstrem tais valores para o gênero *Hippocampus*. Uma vez que as doenças estão entre uma das principais fontes de mortalidade desses animais em cativeiro (WILSON e VINCENT, 1998), estudos direcionados ao desenvolvimento de protocolos que se utilizem de produtos de baixo risco ambiental (como o H_2O_2) para o tratamento de patologias se fazem necessários.

1.1. Comportamento

O peróxido de hidrogênio, juntamente com outras espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio (superóxido, radical hidroxila, peroxinitrito, óxido nítrico, dióxido de nitrogênio, entre outras) são amplamente reconhecidos como sinalizadores, pelo fato de afetarem a atividade de transcrição celular da base-redox, o controle a respostas inflamatórias e as respostas imunológicas (BARTESAGHI et al, 2007; BONELLO et al, 2007; DU et al, 2008; HIDALFO e DONOSO, 2008; LI et al, 2007; RUBBO e RADI, 2008; SALVEMINI et al, 2006; SOUZA et al, 2008; WINTERBOURN, 2008; WINTERBOURN e HAMPTON, 2008;).

O H_2O_2 , bem como a manipulação, pode gerar uma resposta primária de estresse, marcada pelo crescimento do cortisol plasmático e concentrações de glicose (HEO e SHIN, 2010). Dependendo da intensidade e duração do stress, podem ocorrer ainda respostas secundárias de estresse, que incluem alterações no plasma, nos níveis dos metabólitos, nos íons dos tecidos, nas características hematológicas e nas proteínas de choque térmico ou de tensão (PCT), todas relacionadas com os ajustes fisiológicos, como o metabolismo, a respiração, o estado ácido-base, equilíbrio hidromineral, função imune e respostas celulares (PICKERING, 1981; IWAMA *et al.*, 1997, 1998; MOMMSEN *et al.*, 1999) e respostas terciárias como alterações no crescimento, condição resistência total à doença, o escopo para a atividade metabólica, comportamento, e em última análise, a sobrevivência, resumidamente, aspectos do desempenho de todo o animal (WEDEMEYER e MCLEAY, 1981; WEDEMEYER *et*

al., 1990). Essas respostas afetam os peixes em todos os níveis de organização, desde molecular e bioquímica à população e comunidade (ADAMS, 1990).

Após a exposição a um estressor, a adrenalina aumenta rapidamente (WENDELAAR BONGA, 1997) e eleva as catecolaminas em circulação (principalmente noradrenalina e adrenalina) que estão associadas tanto com a hipoventilação como com a hiperventilação em uma ampla variedade de vertebrados, quer através de mecanismos reflexos periféricos ou centrais (PEYRAUD-WAITZENEGGER, 1979; FOLGERING, 1980; FOLGERING et al., 1982; ELDRIDGE et al., 1985; JANSEN et al., 1986; TAYLOR e RANDALL, 1990; RANDALL e TAYLOR, 1991). As injeções de catecolaminas na corrente sanguínea do peixe podem resultar num aumento da ventilação branquial em peixes (PEYRAUD-WAITZENEGGER, 1979; TAYLOR e WILSON, 1989; MCKENZIE, 1990; RANDALL e TAYLOR, 1991).

A frequência respiratória tem sido empregada como indicador indireto da condição de estresse oxidativo em peixes (BARRETO e VOLPATO, 2006; AURÉLIO, 2012), bem como a outros vertebrados, a exemplo dos roedores (GAUTER-FLECKENSTEIN, 2010). O comportamento é tanto uma sequência de ações quantificáveis, operando através dos sistemas nervosos central e periférico, como uma manifestação cumulativa de processos genéticos, bioquímicos e fisiológicos essenciais à vida (alimentação, reprodução e fuga de predadores) (DUBE e HOSETTI, 2010), oferecendo uma perspectiva única que liga a fisiologia e ecologia de um organismo e seu ambiente, servindo, portanto, como biomarcadores de estresse (BEITINGER, 1990; LITTLE e BREWER, 2001). Apesar de métodos comportamentais possuírem seus inconvenientes, como a inconsistência de resposta, períodos de formação excessivamente longos, e estímulos estressantes (KENYON et al., 1998), a frequência ventilatória vem se mostrando uma forma eficaz para avaliar o estresse, principalmente porque é um método não-invasivo que concorda, em certo grau, com as medições de cortisol, evitando assim técnicas dolorosas ou estressantes para serem usadas na avaliação de estresse, tais como colheita de sangue (BARRETO e VOLPATO, 2004; 2006). Além disso, é um parâmetro barato e facilmente mensurável, já que podem ser contadas visualmente, de modo que não requer equipamento sofisticado (BARRETO e VOLPATO, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Determinar a toxicidade aguda do peróxido de hidrogênio, com referência aos seus efeitos sobre o peso, comportamento e a disfunção do consumo de oxigênio para *Hippocampus reidi*.

2.2. Específicos:

- Avaliar a segurança da utilização do H_2O_2 como um tratamento químico externo em *H. reidi*;
- Descrever comportamentos que possam vir a ser bons sinalizadores de estresse em *H. reidi*;
- Verificar se a frequência respiratória de *H. reidi* é alterada em função das concentrações de peróxido de hidrogênio (estressor);
- Observar se há diferenças no comportamento entre machos e fêmeas de *H. reidi*, quando em situação de estresse agudo;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Qualidade da água

As variáveis físico-químicas dos aquários de populações estoque, bem como dos demais aquários onde foram realizados os experimentos, foram controladas constantemente. As variáveis de temperatura, salinidade e pH foram mantidas em 25°C, 27 ppm e 8,2 respectivamente. Os demais parâmetros químicos da água NH_3 , NH_4^+ foram monitorados diariamente e não excederam os limites adequados para cavalos-marinhos variando entre: 0 – 0,25mg/l (KOLDEWEY, 2005). Foi estabelecido também um fotoperíodo de 10L : 14E, utilizando luz branca fria acima dos tanques, com intensidade luminosa de cerca de 500lx na superfície da água.

3.2. Desenho Experimental

Foram selecionados 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) com altura média e peso úmido equivalente a 18,5 g ($\pm 2,6$) e 14,1 g ($\pm 3,6$), respectivamente, provenientes da população estoque para cultivo experimental do LAPEC (Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação), Universidade Federal da Paraíba, Brasil. Os animais tiveram o comprimento estimado com auxílio do software gratuito UTHSCSA *Image Tool* (WILCOX et al., 2002) e o peso aferido com uma balança milesimal (Bel M-333).

Os tratamentos e durações foram concebidos com base em protocolos que podem ser facilmente aplicadas em explorações agrícolas comerciais (Gaikowski et al. 1999; A U.S. Food and Drug Administration – EUA, 2002; Yanong, 2014): 60 minutos de imersão em altas concentrações de H_2O_2 . Este tipo de tratamento, com uma concentração mais elevada de H_2O_2 , pode ser adaptado a reservatórios de interiores, em que todo o volume de água pode ser facilmente alterado.

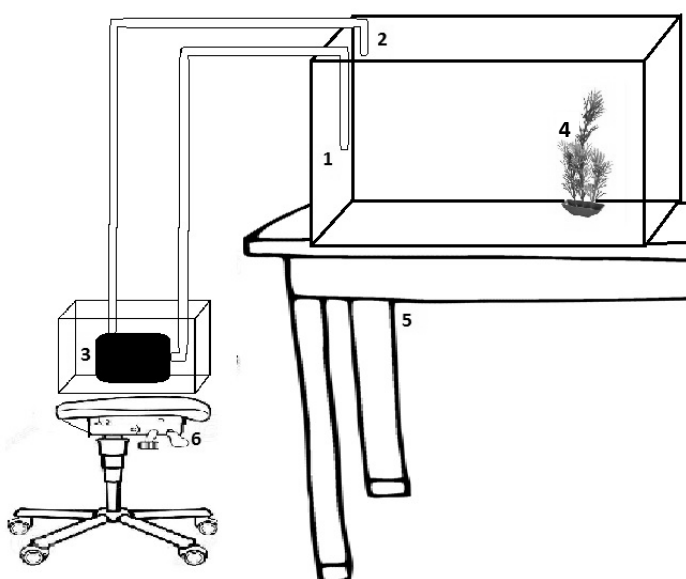
Foi preparado um sistema de exposição que consiste em 1 aquários de 20L (21 x 36 x 30 cm) com recirculação contínua da água (Submersible Pump SP-2500, Boyu), para homogeneização do peróxido de hidrogênio e constante oxigenação, e um substrato de apoio (**Fig. 1**). Todos os experimentos ocorreram entre as 11:00 am e 18:00 pm, uma

vez que sabe-se que a frequência respiratória em peixes se alteram ao longo do dia (BARRETO e VOLPATO, 2006).

Os animais foram expostos, um por vez, a quatro concentrações de tratamento por H_2O_2 (218 μM , 545 μM , 599 μM , 654 μM) e um controle sem qualquer interferência química (0 μM), com uma repetição/concentração, para cada sexo testado, durante 60min de exposição. A mais alta concentração testada foi determinada com base em métodos padrão de toxicidade aguda, utilizado para estimar dose críticas em ensaios de dose-resposta (BLISS, 1935; PELTIER e WEBER, 1985, VALADARES, 2006). Observações de aspectos biométricos, saúde e comportamento dos animais foram observados. Foi retirada uma alíquota de água, no início e no final de cada experimento e medido a sua absorvância em um período máximo de 40 minutos, seguindo o método I_3^- de acordo com a fórmula e procedimento usual (ALLEN et al, 1952; KLASSEN et al, 1994).

Foi utilizada uma solução de H_2O_2 a 3% de ingrediente ativo (Rioquímica) e concentração de 882 mM. Toda a água utilizada no experimento passou por filtragem mecânica (Manta Acrílica – Perlon e Malha 150 μm) e ultravioleta (Filtro UV Atman-36W), utilizado comumente para controle de organismos planctônicos e microrganismos em sistemas de cultivo fechado, antes de cada experimento.

Figura 1. Sistema experimental com recirculação contínua de água, utilizada para exposição de *H. reidi* a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. 1: saída de água do aquário; 2: entrada de água no aquário; 3: bomba de recirculação de água; 4: substrato de apoio; 5: Mesa; 6: cadeira para apoio do aquário com bomba de recirculação.



3.3. Análise comportamental

Os experimentos foram realizados com uma população de *H. reidi* clinicamente saudável (ou seja, sem parasitas externos na pele, nadadeiras e brânquias; sem lesões externas; com comportamento e alimentação normais; nenhuma mortalidade ou morbidade conhecida ou observada). Os animais foram filmados (HDR-XR160, Sony) e monitorados em todo o experimento para análise comportamental e posterior contagem dos batimentos operculares por minuto (BARRETO e VOLPATO, 2006; TANTARPALE et al, 2012; AURÉLIO, 2012), utilizando-se de métodos não invasivos para mensurar o estresse oxidativo. Além disso, a cada 10 min durante o período do experimento (60min), o número total do tempo que os peixes passaram no fundo, em natação, em repouso, em exaustão e preso no substrato foi mensurado, bem como a frequência total de movimentos natatórios horizontais, no fundo, verticais e totais, a frequência de *clicks* e *gapes* (em ambos, a cabeça do animal se inclina para cima e o hióide se sobressai, no *click* é instantâneo e no *gape* é feito de forma lenta) e a frequência de batimentos operculares/min foram aferidos. Movimentos típicos de estresse em peixes também foram observados.

As medidas comportamentais foram escolhidas para análise com base nos trabalhos de Øverli e colaboradores (2002), Barreto e Volpato (2006), Faleiro e colaboradores (2008), Anderson e colaboradores (2011); são elas:

- A proporção do tempo gasto por cada animal, na parte inferior do tanque;
- A proporção do tempo gasto por cada animal nadando;
- A proporção de tempo gasto por cada animal em repouso (estacionário);
- A proporção de tempo gasto pelo animal aderido ao substrato (segurando/preso sobre apoio) contra o tempo total que o animal estava em repouso;
- A proporção do tempo gasto por cada animal em exaustão;
- A frequência de movimentos de natação (horizontal, vertical e no fundo do aquário);
- A frequência de comportamentos característicos de estresse em peixes;
- Número de *Clicks*;
- Número de *Pipes* (quando o focinho do animal rompe a superfície da água);

- Número de *Gapes*;
- Número de Batimentos Operculares por minuto.

Comportamentos que ocorreram tanto na ausência de qualquer estímulo externo (adição de H_2O_2) como na presença, foram classificados como comportamento de manutenção (**Tab. 2**), são eles: presença dos animais na parte inferior do aquário, comportamentos de nado (horizontal, vertical e no fundo), repouso (estacionário) do animal no fundo do aquário e/ou aderido ao substrato (segurando/preso sobre apoio), *Clicks* e *Gapes*. Para este caso, foi medida a alteração do tempo gasto realizando estas ações e/ou sua frequência em relação aos animais controle. A posição é um artifício de confinamento e não é traduzível para o comportamento do cavalo-marinho em estado selvagem; porém, em um ambiente de aquário, cavalos-marinhos podem posicionar-se em zonas mais calmas (ANDERSON et al, 2011). Por essa razão, foi incluída, quantificada e analisada.

Os comportamentos que só ocorreram na presença do peróxido de hidrogênio, foram categorizados como comportamentos de estresse (**Tab. 1**) para *H. reidi*, com base na literatura de comportamentos semelhantes descrito para outras espécies de peixes (FRANCIS-FLOYD, 1988; BARRETO e VOLPATO, 2006; DUBE e HOSETTI, 2010; ANDERSON et al, 2011).

Tabela 1: Etograma dos dados comportamentais de estresse em *H. reidi*.

Etograma de cavalo-marinho <i>Hippocampus reidi</i>	
Comportamento de estresse	
Posição	Posição do animal em relação ao tanque
Exaustão	Quando ocorre à perda da capacidade de realização de ações, onde o animal fica a deriva no aquário.
Locomoção	Posturas enquanto em locomoção
Nados irregulares	Os animais demonstram movimentos de natação irregulares, erráticos e dardejantes, seguidos de perda de equilíbrio, podendo ou não serem acompanhados do peixe ficar "pendurado" verticalmente na água.
Movimentos da cabeça	Movimentos da cabeça e suas partes
Pipe	O focinho do animal rompe a superfície da água enquanto os movimentos operculares continuam.
Cauda enrolada na cabeça	O animal enrola, insistentemente, a cauda na cabeça e/ou partes da mesma.

Tabela 2: Etograma dos dados comportamentais de manutenção em *H. reidi*.

Etograma de cavalo-marinho <i>Hippocampus reidi</i>	
Comportamento manutenção	
Posição	Posição do animal em relação ao tanque
Topo	Quando o corpo do animal localiza-se em sua maior porção, na metade superior da altura vertical do tanque;
Fundo	Quando o animal está localizado, em sua maior porção, na metade inferior da altura vertical do tanque;
Estacionário	Posturas enquanto estiver parado
Empoleirado	O animal está em repouso no tanque, aderido ao substrato.
Sentado	O animal está em repouso no fundo do tanque, livre do substrato. Cabeça e tronco estão em uma posição vertical.
Locomoção	Posturas enquanto em locomoção
Nado horizontal	Animal se desloca na horizontal, lateralmente, através da água em uma posição vertical ou horizontal, nadadeira peitoral e barbatanas dorsais em movimento ondulatório. A cauda pode ser ondulado ou para a frente, estendendo-se abaixo ou atrás do animal.
Nado vertical	Animal se desloca na vertical, através da coluna d'água em uma posição vertical, nadadeira peitoral e barbatanas dorsais em movimento ondulatório. A cauda pode ser ondulado ou para a frente, estendendo-se abaixo ou atrás do animal.
Nado no fundo	O animal atravessa o fundo do tanque com o tronco em posição vertical ou obliquamente na posição vertical, nadadeira peitoral e barbatanas dorsais em movimento ondulatório. A cauda arrasta na parte inferior, estendida por trás do animal.
Movimentos da cabeça	Movimentos da cabeça e suas partes
Click	A cabeça se inclina para cima instantaneamente, o hióide se sobressai e a boca está aberta. Associado a um som de clique.
Gape	O animal abre a boca lentamente, com a cabeça um pouco inclina para cima e o hióide se projeta. Não há som de clique.

3.4. Medição Óptica

Um espectrofotômetro BEL Photonics SP 1105, que mede a 0.001 unidade de absorbância, foi utilizado. Os espectros apresentados no presente estudo tiveram o Branco subtraído. As medições de absorbância foram feitas ~4 minutos após a colocação da cubeta no espectrofotômetro, a fim de permitir que a temperatura das soluções se igualem as do espectrofotômetro. Todas as medições de absorbância foram feitas dentro da faixa de 24-25°C.

A absorbância é proporcional à concentração de moléculas absorvedoras de luz na amostra e ao caminho óptico da substância através da qual a luz viaja. Sendo assim, a Lei de Beer expressa a dependência da absorbância (A) em relação ao caminho óptico (b) e a concentração (c):

$$A = \epsilon bc$$

3.5. Análises Estatísticas

Os resultados referentes ao Peso Inicial, Peso Inicial/Final, Sobrevivência, Degradação do H₂O₂ (Deg. H₂O₂), Tempos no Fundo, Nadando, em Exaustão, Repouso e Substrato, Frequência de nados Horizontais (FNH), no fundo (FNF), Verticais (FNV) e totais (FNT), bem como a frequência de movimentos típicos de estresse como Focinho para Fora da água, Cauda enrolada na cabeça, Nados Irregulares e Movimento totais de estresse, Frequência de Clicks e Gapes e Batimento Opercular, obtidas por tratamento foram mensurados por meio da Análise de Variância (ANOVA), sendo verificados para normalidade pelo Teste de Shapiro-Wilk (*W-test*). A fim de normalizar os dados (quando necessário) os valores foram elevados a raiz quadrada. Diferenças significativas apresentadas foram então analisadas com o teste *a posteriori* de Duncan, diferenciando o(s) grupo(s) formado(s) com as médias significativas. O Teste-t de Student foi aplicado para verificar a existência de correlação entre as variáveis mensuradas. A ferramenta estatística utilizada foi o STATISTICA 8 (Statsoft).

Todos os testes foram considerados significativos quando seus resultados demonstraram um nível de $p < 0,05$. Dados referentes às análises são apresentados na forma de média $\pm$ erro ou porcentagem $\pm$ erro padrão.

4. RESULTADOS

A toxicidade aguda do peróxido de hidrogênio para a espécie *Hippocampus reidi*, durante um período de imersão (banho) de 60 minutos, foi verificada em 15ml/L, ou $12781 \pm 80 \mu\text{M}$, onde houve mortalidade de 100%. As concentrações de $11606 \pm 73 \mu\text{M}$ (13,75 ml/L) apresentaram nível subletal, com mortalidade de 50%. Para concentrações iguais/inferiores a $10474 \pm 54 \mu\text{M}$ (12,5 ml/L), não houve mortalidade em nenhum dos experimentos, mostrando-se seguras nas condições experimentais.

Entre os comportamentos observados, 4 deles só ocorreram na presença do H_2O_2 ($t = -2.84$, $p = 0,01$) (**Tab. 2**), são eles: exaustão, nados irregulares, *pipe* e cauda enrolada na cabeça. Este último, não descrito até o momento para o gênero *Hippocampus*, foi expresso principalmente quando os indivíduos foram expostos a concentrações letais e subletais do peróxido de hidrogênio (**Tab. 10**). *H. reidi* enrolava a cauda preênsil no focinho/cabeça, variando o tempo de duração do movimento (de 0 a 3 minutos), onde o animal parecia inferir alguma força no movimento.

4.1. Diferenças entre sexos

O Teste-t de Student foi realizado com as variáveis peso inicial/final, sobrevivência (**Tab. 3**), nadando, em exaustão, repouso e substrato, frequência de nados no fundo (FNF), verticais (FNV) e totais (FNT), bem como a frequência de movimentos típicos de estresse como cauda enrolada na cabeça, nados Irregulares e movimento totais de estresse, frequência de *clicks*, não mostrando diferença significativa em nenhum dos casos (**Tab. 5**). Para as variáveis peso inicial (**Tab. 3**), degradação do H_2O_2 (Deg. H_2O_2) (**Tab. 4**), tempos no fundo, frequência de nados horizontais (FNH), verticais (FNV) e totais (FNT), frequência de *gapes* e batimento opercular (**Tab. 5**) e frequência de movimentos típicos de estresse como frequência de *pipes* (**Tab. 6**), foi realizado o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, onde apenas as variáveis frequência dos nados verticais ($U = 23.5$, $p < 0.05$) (**Fig. 2 - A**) e nados totais ($U = 20.5$, $p = 0.03$) (**Fig. 2 - B**) apresentaram diferença significativa.

Tabela 3: Aspectos biométricos sob condições de estresse por H₂O₂, em ambos os sexos de *H. reidi* (5 machos + 5 réplicas e 5 fêmeas + 5 réplicas) em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.

Aspectos biométricos				
Variável	Sexo		Teste Estatístico	P
	Macho	Fêmea		
Peso Inic. - Final (mg)	-209.1 ± 191.6	-473.7 ± 322.1	t-value = 0.65	0.53
Sobrevivência (%)	70 ± 14.5	70 ± 15.5	t-value = 0	1.00

Tabela 4: Degradação do peróxido de hidrogênio em tratamentos experimentais, em ambos os sexos de *H. reidi* (5 machos + 5 réplicas e 5 fêmeas + 5 réplicas) em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.

Degradação do H ₂ O ₂				
Variável	Sexo		Teste Estatístico	P
	Macho	Fêmea		
Deg. H ₂ O ₂ (%)	2 ± 0.5	3 ± 0.6	U = 37.0	0.33

Tabela 5: Dados comportamentais de manutenção, em ambos os sexos de *H. reidi* (5 machos + 5 réplicas e 5 fêmeas + 5 réplicas), sob condições de estresse por H₂O₂ em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.

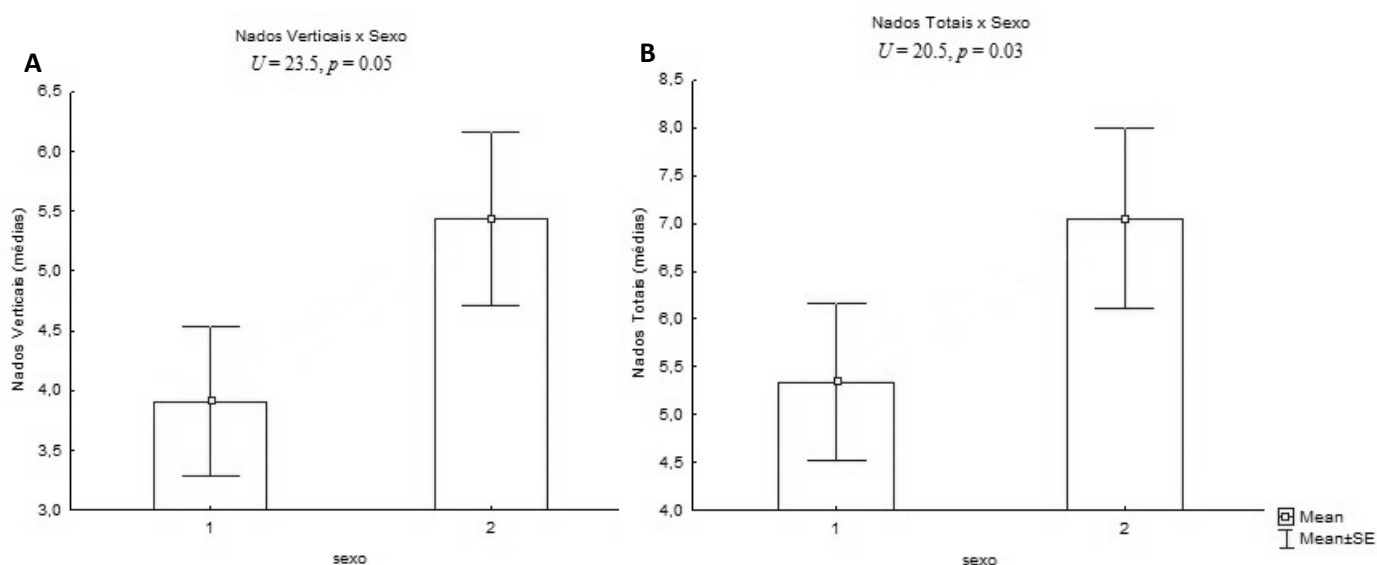
Dados comportamentais de manutenção				
Variável	Sexo		Teste Estatístico	P
	Macho	Fêmea		
T. no Fundo (%)	76.7 ± 6.3	66 ± 6.3	U = 36.5	0,31
T. de Nado (%)	46.8 ± 9	51.9 ± 7.9	t-value = -1.41	0,69
T. de Repouso (%)	53.2 ± 9	34.8 ± 8	t-value = 1.45	0,16
T. no Substrato (%)	17.4 ± 7.9	14.6 ± 9.2	t-value = 0.23	0,82
FNH	9 ± 2.5	10.9 ± 2.4	U = 41.5	0,52
FNF	6.7 ± 2.1	12.5 ± 2.9	t-value = -1.56	0,14
FNV	18.8 ± 3.6	34.3 ± 5.5	U = 23.5	0,05
FNT	34.5 ± 6.1	57.8 ± 9.8	U = 20.5	0,03
Click	3.2 ± 0.8	2.5 ± 0.6	t-value = 0.59	0,57
Gape	0	0.5 ± 0.1	U = 21.0	0,65
Btm. Opercular	49.4 ± 2.4	44.8 ± 2.2	U = 32	0,17

Tabela 6: Dados comportamentais de estresse, em ambos os sexos de *H. reidi* (5 machos + 5 réplicas e 5 fêmeas + 5 réplicas), sob condições de estresse por H₂O₂ em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.

Dados comportamentais de estresse				
Variável	Sexo		Teste Estatístico	P
	Macho	Fêmea		
T. de Exaustão (%)	0	13.3 ± 6.5	t-value = -1.94	0,07
Nados irregulares	3.5 ± 1.2	3 ± 1.3	t-value = 0.27	0,79
Pipe	0.9 ± 0.3	2.5 ± 0.7	U = 28.5	0,10
Cauda enrolada cabeça	1.7 ± 0.7	3.2 ± 1.3	t-value = -0.96	0,35
Mov. Estresse totais	9.8 ± 2.5	8.7 ± 2.7	t-value = 0.30	0,77

Deg. H₂O₂, Degradação do peróxido em durante os 60 min de experimento; FNH, Frequência de Nado na Horizontal; FNF, Frequência de Nados no Fundo; FNV, Frequência de Nados na Vertical; FNT, Frequência de Movimentos Natatórios Totais.

Figura 2. Gráficos dos comportamentos associados a locomoção, em ambos os sexos de *H. reidi* (5 machos + 5 réplicas e 5 fêmeas + 5 réplicas), machos (1) e fêmeas (2), em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015. A. Nados verticais; B. Movimentos natatórios totais.



4.2. Diferenças entre os tratamentos com H_2O_2 (0 μM , 218 μM , 545 μM , 599 μM e 654 μM)

H. reidi expostos ao H_2O_2 tiveram perda de peso ($-656,9 \pm 190,2$ mg) em relação aos animais que não foram expostos ($447,3 \pm 40,1$ mg), sendo a perda de peso maior para as maiores concentrações de H_2O_2 ($F_{4, 15} = 11.7, p < 0.00$) (**Fig. 3 – A**). A sobrevivência apresentou também diferença significativa entre os tratamentos ($F_{4, 15} = 19.0, p < 0.00$) (**Tab. 7**). A partir do teste *a posteriori* de Duncan foi observada a formação de dois grupos distintos (G1 = 599 μM e 654 μM , G2 = demais tratamentos) (**Fig. 3 - A**) para a variável peso inicial/final e de três grupos distintos (G1 = 599 μM , G2 = 654 μM e G3 = demais tratamentos) para a sobrevivência (**Fig. 3 - B**).

A Degradação do peróxido durante o experimento não apresentou diferença significativa entre tratamentos (**Tab. 8**).

Para os dados de comportamento, foi observado que animais em aquários contendo H_2O_2 passavam um tempo muito maior nadando ($58,6 \pm 4,8$ %) do que os animais em ausência total do peróxido ($12,3 \pm 10,1$ %, $F_{4, 15} = 4.99, p < 0.01$), e consequentemente, menos tempo em repouso ($F_{4, 15} = 6.48, p = 0.003$). Foi encontrada diferença significativa também entre frequência de nados horizontais ($F_{4, 15} = 3.6, p = 0.03$), verticais ($F_{4, 15} = 3.68, p < 0.03$) e totais ($F_{4, 15} = 4.44, p = 0.01$), as frequências de

comportamentos que só apareceram em situações com H_2O_2 e que são descritas na literatura, em sua maioria como estresse, como nados irregulares ($F_{4, 15} = 7.52$, $p < 0.002$), frequência de *pipes* ($F_{4, 15} = 7.76$, $p = 0.001$) (**Fig. 5 - A**), frequências de *clicks* ($F_{4, 15} = 3.97$, $p = 0.02$) (**Fig. 5 - B**), frequência que o animal enrolou a cauda na cabeça ($F_{4, 15} = 3.97$, $p = 0.02$) (**Fig. 6 - A**), os mov. de estresse totais ($F_{4, 15} = 19.7$, $p < 0.00$) e o batimento opercular ($F_{4, 15} = 9.27$, $p < 0.001$) (**Fig. 6 - B**). O teste *a posteriori* de Duncan, mostrando a formação de grupos para cada variável entre os tratamentos com diferentes concentrações de H_2O_2 , pode ser observado na (**Tab. 9 e 10**).

Apesar de não ter sido encontrada diferença entre os tempos gastos pelos animais presos ao substrato entre os tratamentos, quando considerado apenas presença/ausência do H_2O_2 , baixos níveis de atividade foram observados em condições de ausência do peróxido de hidrogênio ($F_{4, 15} = 6.48$, $p < 0.00$), formando dois grupos distintos ($G1 = 0 \mu M$, $G2 =$ demaiss tratamentos) (**Fig. 4 - A**), passando mais tempo aderidos ao substrato de apoio ($t = 3.00$, $p = 0.01$) (**Fig. 4 - B**).

Figura 3. Gráficos dos dados biométricos de *H. reidi* ($n = 20$) associados aos tratamentos com diferentes concentrações de H_2O_2 em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015. A. Ganho/perda de peso; B. Taxa de sobrevivência nas diferentes concentrações.

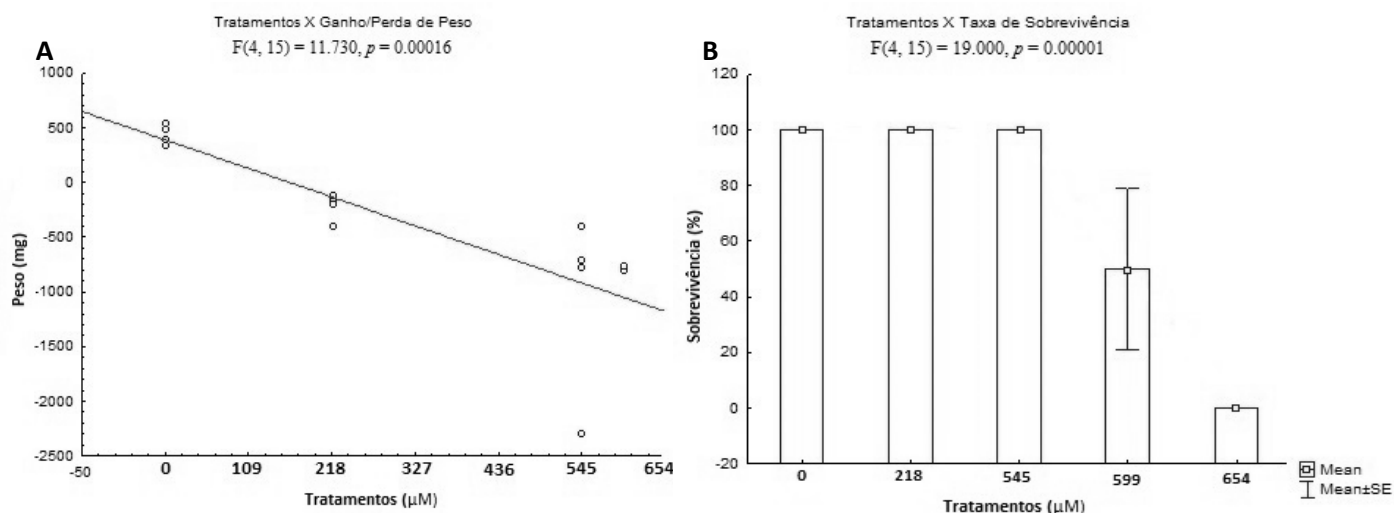


Figura 4. Gráficos dos comportamentos de *H. reidi* (n = 20) associados a diferentes concentrações de H_2O_2 em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015. A. Tempo em repouso; B. Tempo aderido ao substrato de apoio.

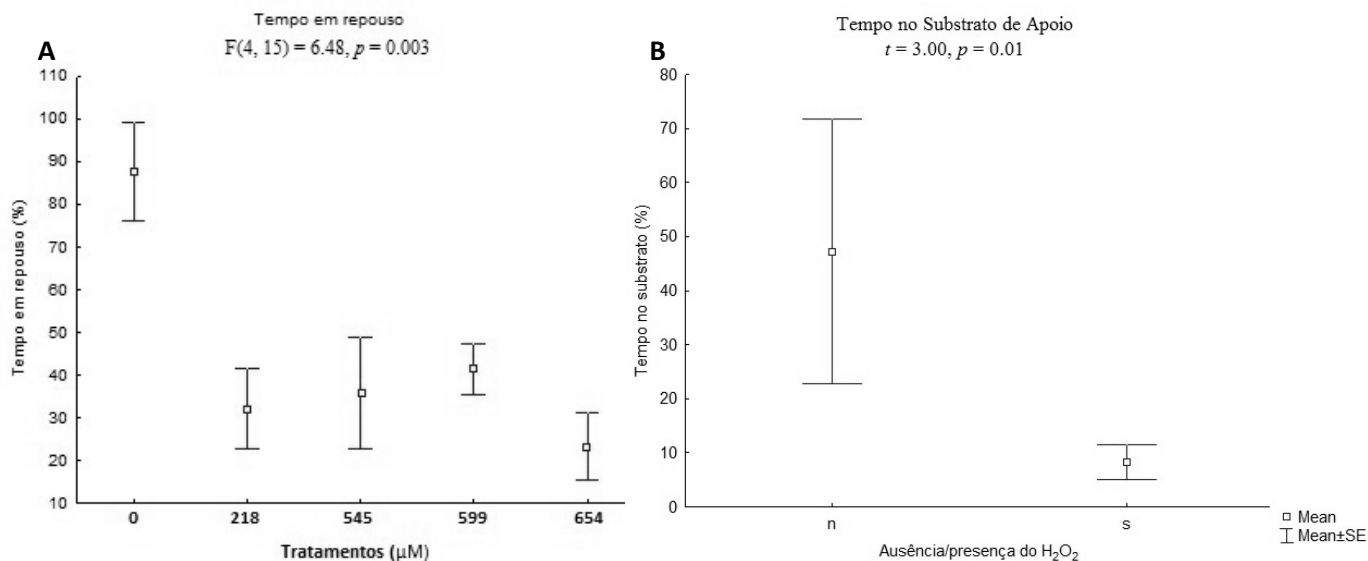


Figura 5. Gráficos dos comportamentos de *H. reidi* (n = 20) associados a diferentes concentrações de H_2O_2 em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015. A. Frequência de Pipes; B. Frequência de Clicks.

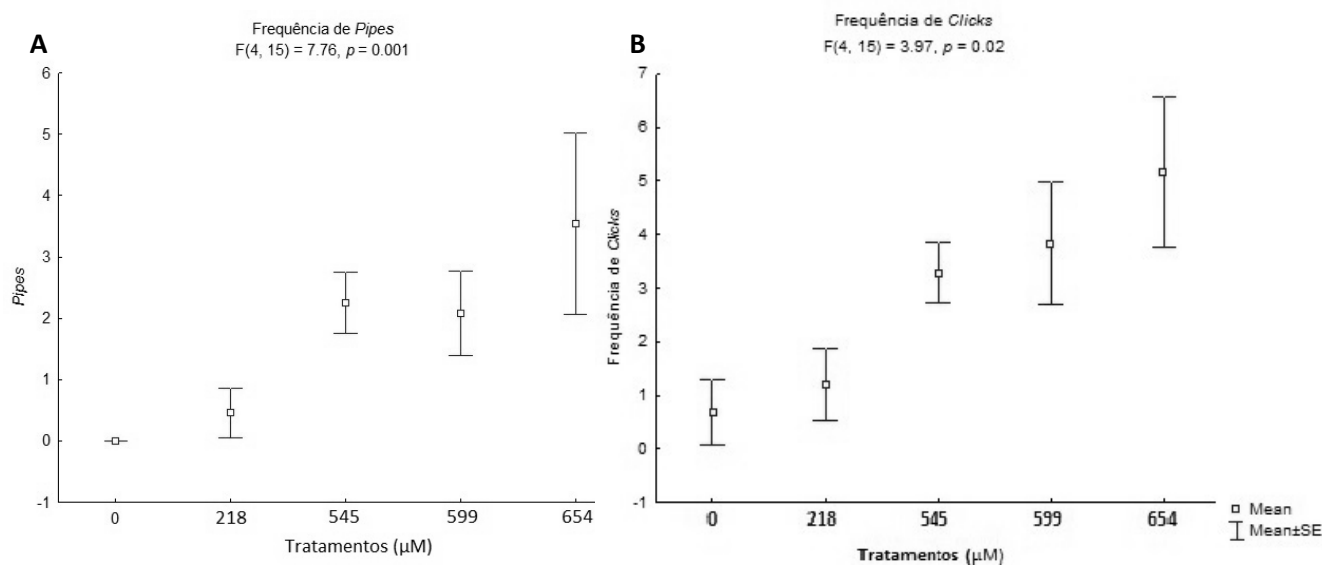


Figura 6: Gráficos dos comportamentos de *H. reidi* (n = 20) associados a diferentes concentrações de H_2O_2 em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015. A. Frequência de vezes que o animal enrolou a cauda na cabeça; B. Frequência do batimento opercular ao longo de 60min.

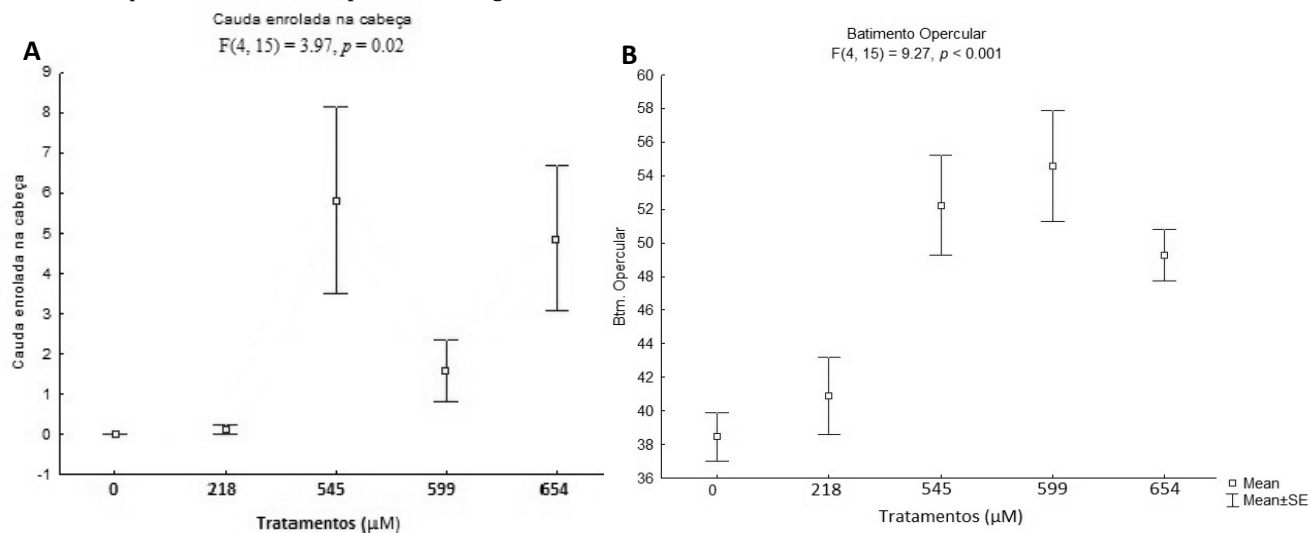


Tabela 7: Aspectos biométricos em *H. reidi* (n = 20), sob condições de estresse em variadas concentrações de tratamentos por H₂O₂ em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.

Biometria						
Variável	0 µM (0 ml/L)	218 µM (5 ml/L)	545 µM (12,5 ml/L)	599 µM (13,7 ml/L)	654 µM (15 ml/L)	P
Peso Inic./Final (mg)	447.3 ± 40	-214.25 ± 55	-1040 ± 368.3 ^a	-776 ± 13.4 ^a	-	0,01
Sobrevivência (%)	100	100	100	50 ± 25 ^a	0 ^b	0,00

Tabela 8: Degradação Total do peróxido de hidrogênio na presença de *H. reidi* (n = 20), em variadas concentrações de tratamentos por H₂O₂ em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.

Degradação do H ₂ O ₂						
Variável	0 µM (0 ml/L)	218 µM (5 ml/L)	545 µM (12,5 ml/L)	599 µM (13,7 ml/L)	654 µM (15 ml/L)	p
Deg. H ₂ O ₂ (%)	-	2.5 ± 0.2	2.7 ± 0.8	3.5 ± 1.1	3.8 ± 0.2	0,60

Tabela 9: Dados comportamentais de manutenção de *H. reidi* (n = 20), em variadas concentrações de tratamentos por H₂O₂ em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.

Comportamento de manutenção						
Variável	0 µM (0 ml/L)	218 µM (5 ml/L)	545 µM (12,5 ml/L)	599 µM (13,7 ml/L)	654 µM (15 ml/L)	p
T. no Fundo (%)	96.9 ± 2.5	70.3 ± 5.2	55.7 ± 11.8	67.4 ± 6.3	66.5 ± 9.1	0,08
T. de Nado (%)	12.3 ± 10.1	68 ± 8.2 ^a	43.7 ± 13.7 ^a	58.6 ± 5 ^a	64.2 ± 2.2 ^a	0,01
T. de Repouso (%)	87.7 ± 10.1	32 ± 8.2 ^a	35.7 ± 11.4 ^a	41.4 ± 5 ^a	23.2 ± 6.8 ^a	0,00
T. no Substrato (%)	47.2 ± 21.2	13.8 ± 9.9	11.7 ± 5	6.4 ± 2.7	0.8 ± 0.4	0,13
FNH	2.4 ± 2	16.3 ± 3.9 ^a	8.9 ± 4 ^a	13.2 ± 2.6 ^a	9.1 ± 2.6 ^a	0,03
FNF	3.9 ± 3.1	15.7 ± 4.4	5.9 ± 2.3	9.6 ± 4.4	13 ± 3.3	0,30
FNV	11.4 ± 9.6	35.2 ± 5 ^a	18.4 ± 5	38.3 ± 7.8 ^a	29.5 ± 4 ^a	0,03
FNT	17.7 ± 14.7	67.2 ± 12.5 ^a	33.3 ± 7.2	61 ± 11.9 ^a	51.6 ± 3.8 ^a	0,01
Click	0.7 ± 0.5 ^d	1.2 ± 0.6 ^{cd}	3.3 ± 0.5 ^{bcd}	3.8 ± 1 ^{ac}	5.2 ± 1.2 ^{ab}	0,02
Gape	0.2 ± 0.1	0,0	0,0	0,0	0.2 ± 0.1	0,26
Btm. Opercular	38.5 ± 1.3	40.9 ± 2.0	52.3 ± 2.6 ^a	54.6 ± 2.8 ^a	49.3 ± 1.3 ^a	0,00

Valores com letras iguais denotam diferença não significativa entre elas.

Deg. H₂O₂, Degradação do peróxido em durante os 60 min de experimento; FNH, Frequência de Nado na Horizontal; FNF, Frequência de Nados no Fundo; FNV, Frequência de Nados na Vertical; FNT, Frequência de Movimentos Natatórios Totais.

Tabela 10: Dados comportamentais de estresse em *H. reidi* (n = 20), em variadas concentrações de tratamentos por H₂O₂ em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.

Variável	Comportamento de estresse					P
	0 µM (0 ml/L)	218 µM (5 ml/L)	545 µM (12,5 ml/L)	599 µM (13,7 ml/L)	654 µM (15 ml/L)	
T. de Exaustão (%)	0,0	0,0	20.5 ± 13.7	0,0	12.6 ± 6.3	0,25
Nados irregulares	0 ^c	0.3 ± 0.3 ^c	6.1 ± 1.9 ^a	1.9 ± 0.7 ^{bc}	7.8 ± 1.4 ^a	0,00
Pipe	0,0	0.5 ± 0.4	2.3 ± 0.4 ^a	2.1 ± 0.6 ^a	3.5 ± 1.3 ^a	0,00
Cauda enrolada cabeça	0 ^c	0.1 ± 0.1 ^c	5.8 ± 2 ^{ab}	1.6 ± 0.7 ^{bc}	4.9 ± 1.6 ^{ab}	0,02
Mov. Estresse totais	0,0	1.5 ± 0.3	17.5 ± 1.8 ^b	9.3 ± 2.1 ^a	17.9 ± 2.5 ^b	0,00

Valores com letras iguais denotam diferença não significativa entre elas.

Deg. H₂O₂, Degradação do peróxido em durante os 60 min de experimento; FNH, Frequência de Nado na Horizontal; FNF, Frequência de Nados no Fundo; FNV, Frequência de Nados na Vertical; FNT, Frequência de Movimentos Natatórios Totais.

5. DISCUSSÃO

No Brasil, *Hippocampus reidi* é a espécie de cavalo-marinho que tem suas densidades mais altas registradas, predominantemente, nas regiões Norte e Nordeste do litoral brasileiro (ROSA et al., 2007). Uma proposta de Plano Nacional de Gestão para o Uso Sustentável dos Cavalos-Marinhos foi publicada em 2011 (DIAS NETO, 2011), devido a sua inclusão na Lista Nacional de Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Sobre-Exploradas ou Ameaçadas de Sobre-Exploração, de acordo com a Instrução Normativa nº 05, de 21 de maio de 2004, do Ministério do Meio Ambiente, instrumento legal que prevê a elaboração de um Plano de Gestão. Sendo assim, é necessário evoluir em direção à construção do Plano propriamente dito.

O estudo atual é o primeiro a observar respostas comportamentais de estresse agudo sob diferentes concentrações de H_2O_2 em *H. reidi*, para a utilização em tratamento por imersão (banho) (YANONG, 2014).

5.1. Diferenças entre sexos

Ambos os sexos apresentaram comportamentos parecidos sob as variadas situações experimentais, no entanto, os machos mostraram significativamente menos atividade locomotora que as fêmeas. Não se sabe, até então, o mecanismo fisiológico responsável pela diferença sexual observada na resposta locomotora ao estresse. Øverli et al (2006) encontraram um comportamento semelhante em Truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em seus experimentos, onde também houve uma diferença significativa na atividade locomotora entre os sexos, porém, foram as fêmeas que apresentaram uma menor atividade locomotora. No mesmo estudo, não foi encontrada diferença para os níveis de cortisol entre os sexos, o que pode indicar que, isoladamente, a variável não é representativa para esse parâmetro. Para peixes salmonídeos, sabe-se que o cortisol, hormônios de crescimento e outras substâncias de sinal central e periférico, como o fator de liberação da corticotropina (CRF), 5-hidroxitriptamina (5-HT, ou serotonina), podem afetar a atividade locomotora (WINBERG et al, 1993; ØVERLI et al, 2002; CLEMENTS et al, 2003; JOHANSSON et al, 2004; JOHANSSON et al, 2005). Entretanto, para muitas espécies de peixes ornamentais,

incluindo as do gênero *Hippocampus*, ainda há uma lacuna em relação ao funcionamento de tais mecanismos e respostas fisiológicas ao estresse entre indivíduos de sexo diferentes.

É, portanto, de grande interesse notar que, entre os indivíduos machos e fêmeas e, conseqüentemente, na população como um todo, não houve distinção dos comportamentos associados restritamente ao estresse, nem tampouco aos níveis de tolerância ao H_2O_2 .

5.2. Diferenças entre os tratamentos com H_2O_2 (0 μ M, 218 μ M, 545 μ M, 599 μ M e 654 μ M)

O cortisol é conhecido por diminuir a ingestão de alimentos em animais expostos, reduzindo assim seu peso (STEVENS, 1972; GREGORY e WOOD, 1999). *H. reidi* tiveram perda de peso quando expostos ao H_2O_2 e ganho de peso nos tratamentos controle, o ganho de peso é inversamente proporcional à concentração do peróxido de hidrogênio ao qual foram expostos (**Fig. 3 - A**). Muito embora, utilizando um estressor diferente em seu trabalho (estresse sonoro), Anderson e colaboradores (2011) encontraram resultados semelhantes aos nossos para a espécie *H. erectus* onde animais expostos a tanques com ruído (estressor), tiveram perda de peso ($\Delta Wt = -2.23 \pm 0.30$ g) e em tanques sem ruído a perda de peso foi significativamente menor ($\Delta Wt = -1.44 \pm 0.28$ g).

Sabendo que a ingestão de toxinas, aglomeração, cor do tanque e confinamento são fatores estressantes que tem provocado uma diminuição nas taxas de crescimento entre peixes expostos (PICKERING e POTTINGER, 1987; LUMBERTDACHA et al., 1995; PROCARIONE et al., 1999; POTTINGER et al., 2002; COTTER et al., 2005) e que neste experimento, todos os animais, após os três primeiros dias, já se alimentavam normalmente, equivalente ao apresentado por Anderson e colaboradores (2011). Isso sugere que, provavelmente, a perda de peso não ocorreu pela não ingestão de alimentos, mas sim por um maior gasto energético do animal para recuperar a homeostase.

Os comportamentos de manutenção observados foram similares aos encontrados para *H. guttulatus* (FALEIRO et al, 2008) e *H. erectus* (ANDERSON et al, 2011). Faleiro e colaboradores (2008) observaram que os peixes submetidos a um estresse

social, em tanques com maior densidade populacional, passavam menos tempo presos ao substrato, em repouso ($U = 3935.00$, $N1 = 120$, $N2 = 80$, $p < 0.05$). Anderson e colaboradores (2011) submeteram espécimes de *H. erectus* a um estresse sonoro e não identificaram diferença para o tempo gasto pelos animais em repouso nos tanques com ruído e sem ruído ($F_{3,88} = 3.96$, $p = 0.011$); em ambos os casos, os animais passavam 94 ± 1 % em repouso, porém, na primeira semana, o número de ajustes no substrato nos tanques com ruído (69 ± 18 %) foi significativamente maior que nos tanques sem ruído (27 ± 7 %, $F_{1,120} = 7.40$, $p < 0.01$), sugerindo assim algum desconforto no animal. *H. reidi* apresentou comportamento semelhante a *H. guttulatus*, onde animais em aquários contendo H_2O_2 passaram um tempo muito maior nadando (58.6 ± 4.8 %) do que os animais em ausência total do peróxido (12.3 ± 10.1 %); ou seja, consequentemente, animais expostos ao H_2O_2 passaram muito menos tempo em repouso (**Fig. 4 - A**). Øverli e colaboradores (2006), em um estudo com *Oncorhynchus mykiss*, observaram uma forte correlação entre atividade locomotora em testes de estresse agudo e estresse induzido pelo cortisol. Especificamente, o tratamento agudo de cortisol (1h) aumentou natação e agressividade em peixe submetido a um teste de intrusão territorial, mas nenhum efeito foi observado no comportamento de peixes sem tratamento (ØVERLI et al, 2002). Tais dados nos mostram que mesmo as espécies agrupadas no gênero *Hippocampus* sejam consideradas espécies com baixa motilidade natatória em relação às demais espécies de peixe (FOSTER e VINCENT, 2004), tal comportamento merece uma atenção relevante num contexto experimental *ex-situ*.

Clicks em cavalos-marinhos já foram descritos em vários contextos, incluindo agressão/competição (VINCENT, 1994; OLIVEIRA et al, 2014) e alimentação (COLSON et al., 1998; OLIVEIRA et al, 2014). Anderson e colaboradores (2011) observaram um aumento no número de *clicks* em tanques com ruídos altos, que vai ao encontro dos índices fisiológicos de aumento do estado de estresse. Esse comportamento já havia sido relatado por Fish (1953), que observou *clicks* de *H. erectus* em resposta a transferências para novos recipientes de água do mar e a uma transferência rápida entre duas massas de água que diferiam na temperatura de 12 °C, o que pode ter representado estressores agudos. *H. reidi* mostrou um comportamento similar quando em contato com H_2O_2 , onde os tratamentos com altas concentrações apresentaram significativamente um aumento no número de *clicks*, indicando assim um maior nível de estresse (**Fig. 5 - B**). No contexto ambiental, os *clicks* podem servir

como uma vocalização de aflição (*distress*) em um ambiente não favorável (Anderson et al, 2011). Em mamíferos e aves, esse tipo de vocalização pode ser percebido em momentos de predação, onde os animais encontram-se nas garras/boca de um predador (HOGSTEDT, 1983), quando animais sociais são separados de seus pares ou mães e para anunciar sua localização para indivíduos da mesma espécie, foi associado como a resposta ao estresse fisiológico (NORCROSS e NEWMAN, 1999; STAHL et al., 2002; FELTENSTEIN et al., 2003). A maioria das espécies de cavalos-marinhos (incluindo *H. reidi*) apresenta comportamentos de animais sociais; pode ser monogâmica (VINCENT e SADLER, 1995; KVARNEMO et al., 2000; VINCENT et al., 2005) ou poligâmica (LOURIE et al., 1999; WOODS, 2000; KVARNEMO et al., 2000; FOSTER e VINCENT, 2004; SILVEIRA, 2005), ou seja, estes animais podem manter o mesmo parceiro ao longo de pelo menos uma estação reprodutiva (FOSTER e VINCENT, 2004); uma vocalização de angústia poderia servir como alerta e ser reforçada sob estresse (ANDERSON et al, 2011).

Os comportamentos que ocorreram apenas na presença do estressor (H_2O_2) são similares aos encontrados para outros peixes em estudos de estresse agudo. Foi observada a presença de nados irregulares, semelhante ao registrado em *Labeo rohita* por Dube e Hosetti (2010), onde foi testada a toxicidade do cianeto de sódio. Assim como para *L. rohita*, *H. reidi* apresentou momentos de letargia, chegando à exaustão nos níveis de concentração mais altos de H_2O_2 ($12781 \pm 80 \mu M$ e $11606 \pm 73 \mu M$) (**Tab. 10**), seguidos intermitentemente por hiperanimação em alguns exemplares, resultando em movimentos erráticos. Selye (1973) descreveu um estágio de alarme inicial, a fase seguinte de resistência e fase final de exaustão, onde esta última pode ser alcançada se as condições estressantes são graves e/ou suficientemente prolongadas. Nos mamíferos, esta fase é caracterizada por diminuição dos níveis de cortisol, depleção de glicogênio no fígado, imunossupressão, e outras alterações que diminuam a sobrevivência dos organismos (HONTELA et al, 1992).

Outro comportamento é o que Anderson e colaboradores (2011) descrevem como *Pipe*, que é o ato do animal pôr o focinho para fora d'água, este comportamento é provavelmente similar em função ao que, pra outros peixes, é descrito como *Gulping*. Ambos podem ajudar a evitar o contato direto com o meio tóxico e também melhorar a

hipóxia, fazendo uso de uma fina camada de água rica em oxigênio na superfície, aliviando o stress respiratório (FRANCIS-FLOYD, 1988; DUBE e HOSETTI, 2010).

O *Pipe* foi observado para *H. reidi* em todos os tratamentos onde houve presença de peróxido de hidrogênio, aumentando gradativamente à medida que aumentou sua concentração (**Fig. 5 - A**), o que pode indicar um estresse/desconforto respiratório nos níveis de maior concentração do H_2O_2 . Em consonância a este, registrou-se o aumento da frequência respiratória que, similar ao ocorrido para o número de *pipes*, também teve um aumento de sua frequência em concentrações mais altas de H_2O_2 (**Fig. 6 - B**) em *H. reidi*, esse aumento pode ser atribuído ao desconforto respiratório, como consequência do comprometimento do metabolismo oxidativo (DUBE e HOSETTI, 2010). A atividade respiratória de um peixe é muitas vezes a primeira resposta fisiológica a ser afetada pela presença de contaminantes no ambiente aquático (DUBE e HOSETTI, 2010), uma vez que as brânquias são os principais órgãos respiratórios dos peixes e todas as vias metabólicas dependem de sua eficiência para o fornecimento de energia, nesse contexto, danos a estes órgãos vitais causam uma cadeia de eventos que, em última análise, levam ao estresse respiratório (MAGARE e PATIL, 2000). Barreto e Volpato (2006) em seus estudos com *Oreochromis niloticus*, mostraram um contexto onde a frequência respiratória pode distinguir entre os efeitos estressores adequadamente pela quantificação não invasiva.

O movimento de enrolar a cauda na cabeça (**Fig. 6 - A**), possibilitado pelas características peculiares dos representantes inclusos no gênero *Hippocampus*, como a posição da cabeça formando um ângulo reto em relação ao eixo do corpo, uma cauda preênsil, utilizada geralmente para se prender a substratos de apoio como algas, corais e plantas de mangue (ROBINS; RAY, 1986; SMITH, 1997; LOURIE et al., 2004; KUITER, 2009), ainda não havia sido descrito para os cavalos-marinhos. Similarmente, quando exposto a uma situação de manuseio por um período prolongado, *H. reidi* expressa o mesmo comportamento de enrolar a cauda na cabeça (observação pessoal), o que pode representar um comportamento agonístico.

Comportamentos de natação irregulares, hiperexcitação, disfunção respiratória, *Piping* e natação na superfície da água foram observados durante a exposição ao H_2O_2 . Trabalhos anteriores sobre outras espécies de peixe indicam a recuperação total entre 24 horas e 7 dias (TORT et al., 2003), enquanto no presente trabalho o tempo de

recuperação foi de três dias. Em *Salmo salar* (Salmão do Atlântico) exposto ao H_2O_2 , o cortisol permaneceu elevado entre 6 e 12 horas pós-tratamento e voltou para estado de normal após 24 horas (BOWERS et al., 2002). No entanto, para *Dicentrarchus labrax*, após esse período os níveis de cortisol continuavam altos (ROQUE et al, 2010). Essa diferença pode ser explicada pelo tempo de exposição a que *Salmo salar* (20 min) e *Dicentrarchus labrax* (60 min) a que foram expostos ao H_2O_2 , este último com tempo de exposição igual a este estudo. Mansell e colaboradores (2005) sugerem ainda que os efeitos agudos do banho contendo peróxido de hidrogênio são menos prejudiciais para o peixe do que os efeitos de infecção crônica persistente.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo utilizando como modelo cavalos-marinhos indicaram que H_2O_2 tem potencial para ser usado em tratamento por imersão (banho) em *H. reidi*, tendo em vista que concentrações abaixo de 12.5ml/L mostraram-se seguras em um período de 60 min de exposição para a espécie. Trabalhos com outras espécies de peixes ornamentais mostraram que concentrações de H_2O_2 acima de 3,1ml/L podem ser utilizadas para tratar bactérias externas e concentrações superiores a 6,5ml/L, podem ser utilizadas no tratamento de *Ichthyobodo spp.* (parasita externo). Entretanto, os efeitos tóxicos do H_2O_2 , para *H. reidi*, podem ter causado as mortalidades observadas nas concentrações iguais/superiores a 13.75ml/L nos tratamentos. Essas concentrações devem ser evitadas, embora mais testes sejam justificados.

Para além dos resultados específicos obtidos neste estudo, destaca-se a importância do comportamento animal como ferramenta relevante e útil para o aprimoramento da aquicultura. As alterações registradas no presente trabalho mostraram que o peróxido de hidrogênio é tóxico e que teve profundo impacto sobre o peso, comportamento e frequência respiratória em *H. reidi*, nas concentrações letais e subletais.

Nessa mesma direção, a disfunção registrada de comportamento e respiração é um sinal importante e visualmente observável, como método não invasivo, do índice de toxicidade por H_2O_2 . Assim, estudos etológicos mostram-se como importantes aliados para ampliar a compreensão acerca do estresse oxidativo provocado pelo H_2O_2 no metabolismo dos peixes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, S. M., 1990. **Biological indicators of stress in fish**. Am. Fish. Soc. Symp. Ser.
- ANDERSON, P. A., BERZINS, I. K., FOGARTY, F., HAMLIN, H. J., GUILLETTE JR, L. J., 2011. **Sound, stress, and seahorses: The consequences of a noisy environment to animal health**. Aquaculture 311, 129–138;
- ALLEN, A. O.; DAVIS, T. W.; ELMORE, G.; GHORMLEY, J. A.; HAINES, B. M.; HOCHANADEL, C. J. Oak Ridge Natl. Lab. Publ. 1949, ORNL 130;
- AURÉLIO, M. L., 2012. **Physiological and behavioral responses of temperate seahorses (*Hippocampus guttulatus*) to environmental warming**. Departamento de Biologia Animal, Universidade de Lisboa;
- BARRETO, R. E.; VOLPATO, G. L., 2004. **Caution for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish**. Behavioural Processes 66 (2004) 43–51;
- BARRETO, R. E.; VOLPATO, G. L., 2006. **Ventilatory frequency of Nile tilapia subjected to different stressors**. Journal of Experimental Animal Science 43, 189–196;
- BARTESAGHI, S.; FERRER-SUETA, G.; PELUFFO, G.; et al., 2007. **Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments**. Amino Acids 32: 501–515;
- BEITINGER, T. L., 1990. **Behavioral reactions for the assessment of stress in fishes**. J. Great Lakes Res. 16(4):495-528
- BONELLO, S., ZAHNINGER, C., BELAIBA, R.S., ET AL., 2007. **Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NF κ B site**. Arterioscl Thromb Vasc Biol 27: 755–761;
- Bowers, J. M., Speare, D. J., Burka, J. F., 2002. **The effects of hydrogen peroxide on the stress response of Atlantic Salmon (*Salmo salar*)**. J. Vet. Pharmacol. Therap. 25, 311–313;
- BLISS, C. I. 1935. **The calculator of the dosage-mortality curve**. Annals of Applied Biology. v.22, p. 134-167.
- COLSON, D. J., PATEK, S. N., BRAINERD, E. L., LEWIS, S. M., 1998. **Sound production during feeding in *Hippocampus seahorses* (Syngnathidae)**. Environ. Biol. Fish. 51, 221–229;
- COTTER, P. A., HARRIS, J. O., MCLEAN, E., CRAIG, S., SCHWARZ, M., RASMUSSEN, M. R., 2005. **The effect of tank color upon growth performance and stress response of summer flounder *Paralichthys dentatus***. Poster. Aquaculture America 2005, 17–21 Jan 2005, New Orleans, LA;
- CLAYTON, R. D., AE SUMMERFELT, R. C., 1996. **Toxicity of hydrogen peroxide to fingerling walleyes**. Journal of Applied Aquaculture 6:39–49;
- CLEMENTS, S., MOORE, F. L., SCHRECK, C. B., 2003. **Evidence that acute serotonergic activation potentiates the locomotor-stimulating effects of corticotropinreleasing hormone in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)**. Horm Behav, 43:214–21;
- CRUZ, C.; FUJIMOTO, R.Y.; LUZ, R.K.; et al., 2005. **Toxicidade aguda e histopatologia do fígado de larvas de trairão (*Hoplias lacerdae*) expostas à solução aquosa de formaldeído a 10%**. Pesticidas: r. Ecotoxicol. e meio ambiente. Curitiba, 15: 21-28;

- DIAS NETO, J. (org.) 2011. **Proposta de Plano Nacional de Gestão para o uso sustentável de cavalos-marinhos do Brasil**. Brasília: Ibama. 104p;
- DU, W.; ADAM, Z.; RANI, R.; et al., 2008. **Oxidative stress in Fanconi anemia hematopoiesis and disease progression**. Antioxid Redox Signal 10: 1909–1921;
- DUBE, P.N.; HOSETTI, B.B., 2010. **Behaviour surveillance and oxygen consumption in the fresh water fish labes rohita exposed to sodium cyanide**. Biotechnology in Animal husbandary, 26(1-2), p. 91-103.
- FALEIRO, F., NARCISO, L. E VICENTE, L., 2008. **Seahorse behaviour and aquaculture: How to improve *Hippocampus guttulatus* husbandry and reproduction?** Aquaculture 282, 33–40;
- FELTENSTEIN, M. W., LAMBDIN, L. C., WEBB, H. E., WARNICK, J. E., KHAN, S. I., KHAN, I. A., ACEVEDO, E. O., SUFKA, K. J., 2003. **Corticosterone response in the chick separation-stress paradigm**. Physiol. Behav. 78, 489–493.
- FRANCIS-FLOYD, R., 1988. **Behavioral diagnosis**. Vet. Clin. N. Am.-Small Anim. Pract. 18 (2), 305–316;
- FISH, M. P., 1953. **The production of underwater sound by the northern seahorse, *Hippocampus hudsonius***. Copeia 1953, 98–99;
- FOSTER, S. J. E VINCENT, A. C. J., 2004. **Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management**. Journal of Fish Biology, v.65, p. 1-61;
- GAIKOWSKI, M., A. JOHNSON, J. J. RACH, AND S. M. SCHLEIS, 2003. **Efficacy of hydrogen peroxide in controlling mortality associated with external columnaris on walleye and channel catfish fingerlings**. American Journal of Aquaculture 65:300–305;
- GAIKOWSKI, M. P., J. J. RACH, AND R. T. RAMSAY, 1999. **Acute toxicity of hydrogen peroxide treatments to selected lifestages of cold-, cool-, and warmwater fish**. Aquaculture, 178:191–207;
- GAUTER-FLECKENSTEIN, B.; FLECKENSTEIN, K.; OWZAR, K.; et al., 2010. **Early and late administration of MnTE-2-PyP⁵⁺ in mitigation and treatment of radiation-induced lung damage**. Free Radic. Biol. Med. 48: 1034-1043;
- GREGORY, T. R., WOOD, C. M., 1999. **The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout**. Physiol. Biochem. Zool. 72 (3), 286–295;
- HEO, G.J.; SHIN, G., 2010. **Efficacy of benzocaine as an anaesthetic for Crucian carp (*Carassius carassius*)**. Vet. Anaesth. Analg., 37, pp. 132–135;
- HIDALFO, C. e DONOSO P., 2008. **Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications**. Antioxid Redox Signal 10: 1275–1312;
- HÖGSTEDT, G., 1983. **Adaptation unto death: function of fear screams**. Am. Nat. 121 (4), 562–570;
- HONTELA, A., RASMUSSEN, J. B., AUDET, C. E CHEVALIER, G., 1992. **Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs, and mercury**. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 22:278-285;

- HOWE, G. E., W. H. GINGERICH, V. K. DAWSON, AND J. J. OLSON. 1999. **Efficacy of hydrogen peroxide for treating saprolegniasis in channel catfish.** *Journal of Aquatic Animal Health* 11:222–230;
- IMLAY, J. A., 2002. **How oxygen damages microbes: oxygen tolerance and obligate anaerobiosis.** *Advances in Microbial Physiology* 46:111–153;
- IMLAY, J. A., 2003. **Pathways of oxidative damage.** *Annual Review of Microbiology* 57:395–418.
- IWAMA, G.K., PICKERING, A.D., SUMPTER, J.P., SCHRECK, C.B. (Eds.), 1997. **Fish stress and health in aquaculture.** *Society for Experimental Biology Seminar Series* 62, Cambridge University Press, Cambridge, 278pp.
- IWAMA, G. K.; VIJAYAN, M. M.; FORSYTH, R. B.; ACKERMAN, P. A., 1998. **Heat shock proteins and physiological stress in fish.** *American Zoologist*, 39: 901-909.
- JOHNSON, S. C., J. M. CONSTIBLE, AND J. RICHARD; 1993. **Laboratory investigations on the efficacy of hydrogen peroxide against the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and its toxicological and histopathological effects on Atlantic salmon *Salmo salar* and Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*.** *Diseases of Aquatic Organisms* 17:197–204.
- JOHANSSON V., WINBERG S., BJÖRNSSON B. T., 2005. **Growth hormone-induced stimulation of swimming and feeding behaviour of rainbow trout is abolished by the D1 dopamine antagonist SCH23390.** *Gen Comp Endocrinol*, 141:58–65;
- JOHANSSON, V., WINBERG, S., JONSSON, E., HALL, D., BJÖRNSSON, B. T., 2004. **Peripherally administered growth hormone increases brain dopaminergic activity and swimming in rainbow trout.** *Horm Behav*, 46:436–43;
- KENYON, T.N., LADICH, F., YAN, H.Y., 1998. **A comparative study of hearing ability in fishes: the auditory brainstem response approach.** *J. Comp. Physiol. A* 182, 307-318
- KEYER, K., AND J. A. IMLAY, 1996. **Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93:13635–13640.
- KIEMER, M.C.B., BLACK, K.D., 1997. **The effects of hydrogen peroxide on the gill tissues of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.** *Aquaculture* 153, 181–189;
- KLASSEN, N. V., MARCHINGTON, D., MCGOWANT, H. C. E., 1994. **H₂O₂ Determination by the I₃⁻ Method and by KMnO₄ Titration.** Institute for National Measurement Standards, Ionizing Radiation Standards, National Research Council, Canada. *Anal. Chem.*, 66, 2921-2925;
- KOLDEWEY, H. J., 2005. **Syngnathid Husbandry in Public Aquariums: 2005 Manual, With Chapters Contributed by Members of the Syngnathidae Discussion Group.** Project Seahorse and Zoological Society of London. 137pp.
- KUITER, R. H., 2009. **Seahorses and their relatives.** Seaford: Aqua Photographics. 334 p.
- KVARNEMO, C., MOORE, G. I., JONES, A. G., NELSON, W. S. E AVISE J. C., 2000. **Monogamous pair bonds and mate switching in the western Australian seahorse *Hippocampus subelongatus*.** *J. Evol. Biol.*, v. 13, p. 882- 888;
- LORIE, S. A., VINCENT, A. C. J. E HALL, H. J., 1999. **Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation.** Project Seahorse, London, UK. 224 p;

- LOURIE, S. A. et al., 2004. **A Guide to the Identification of Seahorses**. Project Seahorse and TRAFFIC North America. Washington D.C.: University of British Columbia and World Wildlife Fund;
- LI, F.; SONVEAUX, P. P.; RABBANI, Z. N.; et al., 2007. **Regulation of HIF-1 α stability through S-nitrosylation**. Mol Cell 26: 63–74;
- LITTLE E.E., BREWER S.K., 2001. **Neurobehavioral toxicity in fish**. Schlenk, D. and Benson, W.H. (Ed.), Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleost New Perspectives: Toxicology and the Environment, Taylor and Francis, London and New York. 2, 139-174;
- LUMLERTDACHA, S., LOVELL, R. T., SHELBY, R. A., LENZ, S. D., KEMPPAINEN, B. W., 1995. **Growth, hematology, and histopathology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed toxins from *Fusarium moniliforme***. Aquaculture 130, 201–218;
- LUMSDEN, J. S., V. E. OSTLAND, AND H. W. FERGUSON, 1998. **Use of hydrogen peroxide to treat experimentally induced bacterial gill disease in rainbow trout**. Journal of Aquatic Animal Health 10:230–240;
- LUVIZOTTO-SANTOS, R.; ELER, M.N.; ESPINDOLA, E.L.G; VIEIRA, E.M. , 2009. **O uso de praguicidas nas pisciculturas e pesqueiros situados na bacia do rio Mogi-Guaçu**. B. Inst. Pesca, São Paulo, 35(3): 343 – 358;
- MAGARE S. R., PATIL H. T., 2000. **Effect of pesticides on oxygen consumption, red blood cell count and metabolites of a fish, *Puntius ticto***. Environ. Ecology. 18, 891-894;
- MANSELL, B., POWELL, M. D., ERNST, I., NOWAK, B. F., 2005. **Effects of the gill monogenean *Zeuxapta seriolae* (Merserve 1938) and treatment with hydrogen peroxide on pathophysiology of kingfish, *Seriola lalandi* Valenciennes, 1833**. J. Fish Dis. 28, 253–262;
- MAXIMINIANO, A.A.; et al. , 2005. **Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental**. Ciência e Saúde Coletiva, 10(2): 483-491;
- MOMMSEN, T. P., VIJAYAN, M. M., MOON, T. W., 1999. **Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation**. Reviews on Fish Biology and Fisheries, 9: 211–268;
- MONTGOMERY-BROCK, D., V. T. SATO, J. A. BROCK, AND C. S. TAMARU, 2001. **The application of hydrogen peroxide as a treatment for the ectoparasite *Amyloodinium ocellatum* (Brown 1931) on the Pacific threadfin *Polydactylus sexfilis***. Journal of the World Aquaculture Society 32:250–254;
- NORCROSS, J. L., NEWMAN, J. D., 1999. **Effects of separation and novelty on distress vocalizations and cortisol in the common marmoset (*Callithrix jacchus*)**. Am. J. Primatol. 47, 209–222;
- OLIVEIRA, T. P. R., LADICH, F., ABED-NAVANDI, D., SOUTO, A. S., ROSA, I. L., 2014. **Sounds produced by the longsnout seahorse: a study of their structure and functions**. Journal of Zoology, The Zoological Society of London.
- ØVERLI Ø., SØRENSEN, C., NILSSON, G. E., 2006. **Behavioral indicators of stress-coping style in rainbow trout: Do males and females react differently to novelty?** Physiology & Behavior 87, 506 – 512;

- ØVERLI Ø., KOTZIAN S., WINBERG S., 2002. **Effects of cortisol on aggression and locomotor activity in rainbow trout.** *Horm Behav*, 42:53–61;
- PELTIER, W.H., WEBER, C.I., 1985. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms.** US Environmental Protection Agency EPA 600/r-85-013, Cincinnati, OH, 216 pp;
- PICKERIN, A.D., 1981. **Stress and fish.** Academic P&S, London, 367 pp.
- POWELL, M. D., AND G. A. CLARK. 2004. **Efficacy and toxicity of oxidative disinfectants for the removal of gill amoebae from the gills of amoebic gill disease affected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in freshwater.** *Aquaculture Research* 35:112–123;
- PICKERING, A. D., POTTINGER, T. G., 1987. **Crowding causes prolonged leucopenia in salmonid fish, despite interrenal acclimation.** *J. Fish Biol.* 30, 701–712;
- POTTINGER, T. G., CARRICK, T. R., YEOMANS, W. E., 2002. **The three-spined stickleback as an environmental sentinel: effects of stressors on whole-body physiological indices.** *J. Fish Biol.* 61, 207–229;
- PROCARIONE, L. S., BARRY, T. P., MALISON, J. A., 1999. **Effects of high rearing densities and loading rates on the growth and stress responses of juvenile rainbow trout.** *N. Am. J. Aquac.* 61, 91–96;
- RACH, J. J., M. P. GAIKOWSKI, AND R. T. RAMSAY. 2000a. **Efficacy of hydrogen peroxide to control mortalities associated with bacteria gill disease infections on hatchery-reared salmonids.** *Journal of Aquatic Animal Health* 12:119–127;
- RACH, J. J., M. P. GAIKOWSKI, AND R. T. RAMSAY. 2000b. **Efficacy of hydrogen peroxide to control parasitic infections on hatchery-reared fish.** *Journal of Aquatic Animal Health* 12:267–273;
- RACH, J. J., T. M. SCHREIER, G. E. HOWE, AND S. D. REDMAN, 1997. **Effect of species, life stage, and water temperature on the toxicity of hydrogen peroxide to fish.** *Progressive Fish-Culturist* 59:41–46;
- RACH, J. J., S. M. SCHLEIS, M. P. GAIKOWSKI, AND A. JOHNSON, 2003. **Efficacy of hydrogen peroxide in controlling mortality associated with external columnaris on walleye and channel catfish fingerlings.** *North American Journal of Aquaculture* 4:300–305;
- RACH, J. J., J. J. VALENTINE, T. M. SCREIER, M. P. GAIKOWSKI, AND T. G. CRAWFORD. 2004. **Efficacy of hydrogen peroxide to control saprolegniasis on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) eggs.** *Aquaculture* 238:135–142;
- ROBINS, C. R.; RAY, G. CARLETON. 1986. **A field guide to Atlantic coast fishes.** Boston: Houghton Mifflin Company, 354p;
- ROQUE, A., YILDIZ, H. Y., CARAZO, I., DUNCAN, N., 2010. **Physiological stress responses of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to hydrogen peroxide (H₂O₂) exposure.** *Aquaculture* 304, 104–107;
- ROSA, I. L., ALVES, R. R. N., 2007. **Pesca e comércio de cavalos-marinhos (Syngnathidae: Hippocampus) no Norte e Nordeste do Brasil: subsídios para a conservação e manejo.** In: ALBUQUERQUE, U. P. de; ALVES, A. G. C.; ARAÚJO, T. A. de S. (Org.). *Povos e Paisagens*. Recife: Núcleo de populações em ecologia e etnobotânica aplicada, p. 115-134;
- RUBBO, H. e RADI, R., 2008. **Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury.** *Biochim Biophys Acta* 1780:1318–1324;

- Russo, R., E. W. Curtis, and R. P. E. Yanong. 2007. **Preliminary investigations of hydrogen peroxide treatment of selected ornamental fishes and efficacy against external bacteria and parasites in green swordtails.** *Journal of Aquatic Animal Health* 19:121–127;
- SALVEMINI, D.; DOYLE, T.M.; CUZZOCREA, S., 2006. **Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation.** *Biochem Soc Trans* 34: 965–970;
- Selye, H., 1973. **The evolution of stress concept.** *Am. Sci.* 61, 692–699;
- SILVA, A.L.; MARCASSI ALVES, F.C.; ANDRADE TALMELLI, E.F.; et al. , 2009. **Utilização de cloreto de sódio, formalina e a associação destes produtos no controle de ectoparasitas em larvas de tilápia (*Oreochromis niloticus*).** *B. Inst. Pesca, São Paulo*, 35(4): 597-608;
- SILVEIRA, R. B., 2005. **Dinâmica populacional do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* (Syngnathidae) no manguezal de Maracaípe, Ipojuca, PE.** Tese. (Doutorado em Zoologia). Porto Alegre, 2005. 127 f. Departamento de Zoologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul;
- SMITH, C. L., 1997. **National Audubon Society Field Guide to Tropical Marine Fishes of the Caribbean, the Gulf of Mexico, Florida, the Bahamas, and Bermuda.** 2ed. New York: Alfred A. Knopf, Inc. 718p;
- SOUZA, J.M.; PELUFFO, G.; RADI, R., 2008. **Protein tyrosine nitration: functional alteration or just a biomarker?** *Free Radic Biol Med* 45: 357–366;
- SPEARE, D. J., AND G. J. ARSENAULT. 1997. **Effects of intermitente hydrogen peroxide exposure on growth and columnaris disease prevention of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54:2653–2658;
- STAHL, C. E., REDEI, E., WANG, Y., BORLONGAN, C. V., 2002. **Behavioral, hormonal and histological stress markers of anxiety-separation in postnatal rats are reduced by prepro-thyrotropin-releasing hormone.** *Neurosci. Lett.* 321, 85–89;
- STEVENS, E. D., 1972. **Change in body weight caused by handling and exercise in fish.** *J. Fish. Res. Board Can.* 29:202-203;
- TANTARPALE, V.T.; RATHOD, S.H.; KAPIL, S. **Temperature Stress on Opercular Beats and Respiratory Rate of Freshwater Fish *Channa Punctatus*.** *International Journal of Scientific and Research Publications*, Volume 2, Issue 12, December 2012;
- THOMASSEN, J. M., 1993. **Hydrogen peroxide as a delousing agent for Atlantic salmon.** Pages 290–295 in G. A. Boxhall and D. Defaye, editors. *Pathogens of wild farmed fish: sea lice*. Ellis Horwood, London;
- TORT, J. M., WOOSTER, G. A., BOWSER, P. R., 2003. **Effects of hydrogen peroxide on hematology and blood chemistry parameters of walleye *Stizostedion vitreum*.** *J. World Aquacult. Soc.* 34 (2), 236–242;
- VALADARES, M. C. **Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “Era do Teste DL₅₀”.** *Revista Eletrônica de Farmácia*, 2006. Vol. 3(2), 93-98;
- VINCENT, A.C.J., 1994. **Seahorses exhibit conventional sex roles in mating competition, despite male pregnancy.** *Behaviour* 128 (1–2), 135–151;
- VINCENT, A. C. J., EVANS, K. L., MARSDEN, A. D., 2005. **Home range behavior on the monogamous Australian seahorse, *Hippocampus whitei*.** *Environmental Biology of Fishes*, v. 72, p. 1-12;

- VINCENT, A. C. J., SADLER, R. M., 1995. **Faithful pair bonds in wild seahorses, *Hippocampus whitei*.** *Animal Behavior*, v. 50, p. 1557-1569;
- YANONG, R. P. E., 2014. **Use of Hydrogen Peroxide in Finfish Aquaculture.** Fisheries and Aquatic Sciences in the School of Forest Resources and Conservation, UF/IFAS;
- WENDELAAR BONGA, S.E., 1997. **The stress response in fish.** *Physiol, Rev.* 77(3), 591-626;
- WEDEMEYER, G. A., AND D. J. MCLEAY., 1981. **Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors.** A.D. Pickering, editor. *Stress and fish*. Academic Press, London, Pages 247-275;
- WEDEMEYER, G. A., B. A. BARTON, and D. J. MCLEAY., 1990. **Stress and acclimation.** In C. B. Schreck and P. B. Moyle (eds.), *Methods for fish biology* pp. 451–489. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland;
- WINBERG, S., NILSSON, G. E., SPRUIJT, B. M., HÖGLUND, U., 1993. **Spontaneous locomotor activity in Arctic charr measured by a computerized imaging technique: role of brain serotonergic activity.** *J Exp Biol*, 179:213– 32;
- WILCOX, D.; DOVE, B.; MCDAVID, D. ; GREER, D, 2002. **UTHSCSA ImageTool Program, version 3.0.** University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas. Disponível em: <ftp:maxrad6.uthscsa.edu>;
- WILSON, M. J.; VINCENT; A. C. J., 1998. **Preliminary success in closing the life cycle of exploited seahorse species, *Hippocampus* spp., in captivity.** *Aquarium Sci. Cons.* v. 2n. 4, p. 179-196;
- WINTERBOURN, C.C., 2008. **Reconciling the chemistry and biology of reactive species.** *Nat Chem Biol* 4: 278–286;
- WINTERBOURN, C.C. e HAMPTON, M.B., 2008. **Thiol chemistry and specificity in redox signaling.** *Free Radic Biol Med* 45: 549–561;
- WOODS, C. M. C., 2000. **Preliminary observations on breeding and rearing the seahorse *Hippocampus abdominalis* (Teleostei: Syngnathidae) in captivity.** *New Zeland Journal of Marine and Freshwater Research*, v.34, p. 475-485;
- U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2002. **Title 21 Code of Federal Regulations Part 530 (21 CFR 530).** Available: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=530> (Junho, 2015);

CAPÍTULO III - ESTUDO INICIAL SOBRE A UTILIZAÇÃO DA Mn-PORFIRINA
(MnTE-2-PYP⁵⁺) COMO REGULADOR REDOX CATALÍTICO EM
HIPPOCAMPUS REIDI GINSBURG, 1933 (TELEOSTEI SYNGNATHIDAE)

1. INTRODUÇÃO

Na aquicultura de modo geral, é comum o manuseio dos peixes para diversos fins, como a medição, amostragem, marcação, transporte, entre muitos outros. Essas manipulações frequentemente induzem uma resposta primária de estresse, marcada pelo crescimento do cortisol plasmático e concentrações de glicose, podendo levar a resultados indesejáveis como imunossupressão e retardo do crescimento (GRUTTER e PANKURST, 2000; TREVES-BROWN, 2000; ROTLLANT et al, 2001; WEBER et al, 2009; HEO e SHIN, 2010). Respostas secundárias de estresse, que incluem alterações no plasma, nos níveis dos metabólitos, nos íons dos tecidos, nas características hematológicas e nas proteínas de choque térmico ou de tensão (PCT), todas relacionadas com os ajustes fisiológicos, como o metabolismo, a respiração, o estado ácido-base, equilíbrio hidromineral, função imune e respostas celulares (PICKERING, 1981; IWAMA *et al.*, 1997, 1998; MOMMSEN *et al.*, 1999) e respostas terciárias como alterações no crescimento, condição resistência total à doença, o escopo para a atividade metabólica, comportamento, e em última análise, a sobrevivência, resumidamente, aspectos do desempenho de todo o animal (WEDEMEYER e MCLEAY, 1981; WEDEMEYER *et al.*, 1990) ainda podem ocorrer, dependendo da intensidade e duração do stress. Essas respostas afetam os peixes em todos os níveis de organização, desde molecular e bioquímica à população e comunidade (ADAMS, 1990). Dhabhar e Mcewen (1997) definem stress como uma constelação de eventos, que começa com um estímulo (estressor), que precipita uma reação no cérebro (percepção de stress), que subsequentemente resulta na ativação de certos sistemas fisiológicos no corpo (resposta ao stress).

O estresse também pode resultar como uma consequência de outros fatores ambientais, incluindo condições adversas de temperatura, salinidade, pH ou oxigênio dissolvido (FLOS et al., 1988). Esse estado põe em risco a homeostase, que pode se restabelecer através de um conjunto complexo de respostas adaptativas (CHROUSOS,

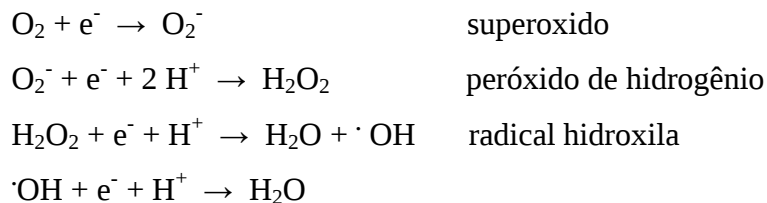
1998). Barton *et al.* (1986) e Flos *et al.* (1988) sugerem um efeito aditivo ou uma respostas fisiológicas cumulativa ao estresses. Se a intensidade do estressor é excessivamente severa ou duradoura, os mecanismos de resposta fisiológica podem ser comprometidos e tornar-se prejudiciais para a saúde e bem-estar dos peixes. Minimizar fatores que levem esses animais a essa má adaptação são de grande interesse dos gestores e aquicultores (SELYE, 1974; BARTON e IWAMA, 1991; BARTON, 2002).

1.1. O Estresse Oxidativo

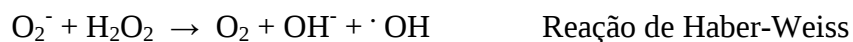
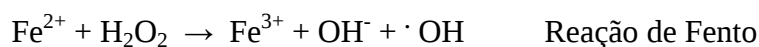
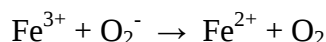
A produção de ATP (Adenosina Trifosfato) nas mitocôndrias está ligada diretamente ao O_2 que é absorvido pelos organismos, bem como está envolvida no grupo heme e na biossíntese dos centros de ferro-enzofre, de aminoácidos e do metabolismo do nitrogênio, e na modulação da homeostase do cálcio (STOREY, 1996; SCHEFFLER, 1999; MURPHY e SMITH, 2000; NICHOLLS e FERGUSON, 2002). Mais de 90% de todo o oxigênio absorvido pelo corpo humano é usado na citocromo oxidase que acrescenta quatro elétrons em cada molécula de O_2 para formar água ($O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2 H_2O$) (HALLIWELL, 1992).

A cadeia respiratória mitocondrial é a maior fonte de superóxido (O_2^-), podendo formar outras espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($OH^\bullet$), e peroxinitrito ($ONOO^-$). Outros componentes enzimáticos dentro da mitocôndria podem formar ROS (FINKEL, 2011; MURPHY, 2009). ROS são muitas vezes gerados na fase aquosa de plasma, por exemplo, O_2 e H_2O_2 pode surgir a partir de enzimas, compostos oxidantes e células fagocíticas ativadas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). Todos os componentes celulares são susceptíveis ao ataque por ROS (O_2 , H_2O_2 e $OH^\bullet$), particularmente por $OH^\bullet$ (STOREY, 1996). Danos oxidativos patológicos para as mitocôndrias em doenças e envelhecimento são consequências da produção de ROS, embora haja muitas respostas protetoras e adaptativas para prevenir e reparar os danos oxidativos (WALLACE, 1999; SHIGENAGA et al, 1994).

O ânion superóxido é desintoxicado pela Mn superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD) ou pela SOD citoplasmática (Cu,ZnSOD) para o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e H_2O_2 é convertido em H_2O pela glutathione peroxidase (GPx) (WALLACE, 1999):



A redução de H_2O_2 por superóxido (a reação de Haber-Weiss) produz a maior parte dos radicais hidroxila *in vivo*. O H_2O_2 , na presença de metais de transição reduzidos (Fe^{2+} , algumas vezes Cu^+), pode ser convertido também no radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), que é altamente reativo, pela reação de Fenton.



O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio celular no qual os níveis normais de oxidantes (espécies reativas) predominam sobre os níveis normais de antioxidantes (endógenos), ocasionando, eventualmente, danos oxidativos. Este desequilíbrio tem implicação em uma série de doenças e estados fisiopatológicos que compreendem desde processos inflamatórios simples, a doenças neurodegenerativas e até mesmo o câncer (BATINIĆ-HABERLE et al, 2010).

Mn-porfirinas têm se destacado em estudos pré-clínicos como uma das classes mais importantes classes de reguladores redox catalíticos e encontram-se hoje entre uns dos melhores modelos biomiméticos das enzimas SOD (TSE et al, 2004; MOELLER et al, 2004; ZHAO et al, 2005; REBOUÇAS et al, 2008a). Estudos *in vivo* com Mn-porfirinas apareceram há apenas alguns anos, mas os resultados em diversos modelos animais de fisiopatologias de caráter oxidativo têm sido excelentes (ASLAN et al, 2001; PIGANELLI et al, 2002; BENOVA et al, 2005; CROW et al, 2005; CSONT et al, 2005; WU et al, 2007; GAUTER-FLECKENSTEIN et al, 2008; REBOUÇAS et al, 2008b; SOMPOL et al, 2008). Entre as Mn-porfirinas que se destacam nesses estudos, encontram-se a *meso*-tetraquis (*N*-etilpiridínio-2-il)porfinatomanganês(III) (MnTE-2-PyP^{5+}) e a *meso*-tetraquis(*N*-hexilpiridínio-2-il)porfinatomanganês(III) ($\text{MnTnHex-2-PyP}^{5+}$) (BATINIĆ-HABERLE et al, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Verificar se a Mn-porfirina MnTE-2-PyP⁵⁺ (MnP) é um antioxidante catalítico em potencial para manutenção e cultivo de *H. reidi*;

2.2. Específicos:

- Avaliar se MnP é capaz de minimizar os impactos causados por tratamentos de altas concentrações de H₂O₂ em *H. reidi*;
- Mensurar, de forma preliminar, tempo de exposições e concentrações ideais e/ou mínimas para que MnP traga benefícios a saúde de *H. reidi*, através de um estudo etológico;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Qualidade da água

As variáveis físico-químicas dos aquários de populações estoque, bem como dos demais aquários onde foram realizados os experimentos, foram controladas constantemente. As variáveis de temperatura, salinidade e pH foram mantidas em 25°C, 27ppm e 8.2 respectivamente. Os demais parâmetros químicos da água NH_3 , NO_2 foram monitorados diariamente e não excederam os limites adequados para cavalos-marinhos variando entre: 0 – 0,25 (KOLDEWEY, 2005). Foi estabelecido também um fotoperíodo de 10L : 14E, utilizando luz branca fria acima dos tanques, com intensidade luminosa de cerca de 500lx na superfície da água.

3.2. Metodologia do Desenho Experimental: Matrizes Doehlert

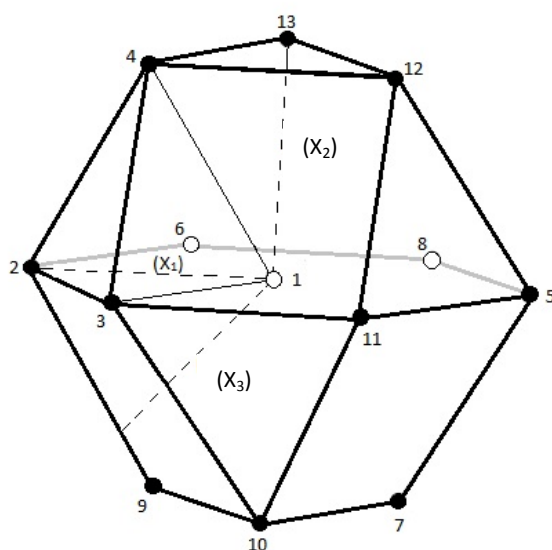
Um desenho experimental é o meio mais eficiente para chegar a conclusões com um mínimo de ensaios e a utilização de técnicas de desenho experimental multivariados vem sendo cada vez mais difundido em vários campos de pesquisa (BENSALAH et al, 2010). Neste experimento, foi usado um design Doehlert. Matrizes Doehlert (DOEHLERT, 1970) apresentam a vantagem de, através de poucos experimentos, varrer de forma mais eficiente todo o domínio experimental, considerando a interação entre as variáveis (QUIGNON et al., 1997). O design Doehlert também tem vantagens sobre outros modelos (como *Central Composite* (CCD), *Box–Behnken* e *Plackett–Burman*), devido à possibilidade de aumentar o domínio experimental por adição de outro fator, sendo mais eficientes e podendo mover-se através do domínio experimental (KIRAN et al, 2010; SAUTOUR et al, 2001), considerando também o efeito das interações entre as variáveis (KIRAN et al, 2010). Outras vantagens das Matrizes Doehlert são: (1) apresenta um domínio experimental esférico com uma uniformidade no espaço experimental, (2) a sua capacidade de explorar a totalidade do domínio, e (3) o seu potencial de reutilização consecutiva, onde os experimentos podem ser reutilizados quando os limites não foram bem escolhidos inicialmente (BENSALAH et al., 2010).

Este desenho experimental permitiu não só a avaliação da influência relativa dos parâmetros testados a baixo custo (necessidade de 13 combinações no lugar de 81 para um design clássico completo, onde seria usado 3 posições (valores) para cada uma das três variáveis testadas), mas também para determinar as interações inesperadas entre alguns destes parâmetros.

3.3. Desenho Experimental

A matriz Doehlert foi aplicada para encontrar uma tendência a uma possível diminuição do estresse oxidativo em *H. reidi*. O número de experimentos necessários (N) é dado por $N = n + n^2 + n_0$, onde “n” é o número de variáveis e “ n_0 ” é o número de pontos centrais. Neste experimento, o valor “ n_0 ” foi fixada em 2, assim, com três fatores (concentração de MnTE-2-PyP⁵⁺, concentração de peróxido de hidrogênio e tempo de exposição MnTE-2-PyP⁵⁺), o total de pontos na matriz foi 13 (**Fig. 1**). As réplicas Doehlert foram realizadas no nível central das variáveis a fim de validar o modelo por meio de uma estimativa de variância experimental.

Figura 1. Cuboctaedro apresentando a localização dos pontos (13) experimentais para três diferentes fatores codificados (X_1 , X_2 e X_3). Foram obtidos: ao longo do eixo X_2 , em um trecho mediano, seis experimentos localizados nos vértices (2, 3, 5, 6, 8 e 11) e um no centro de um hexágono, em ambos os lados; três experimentos (4, 12 e 13) estão localizados no trecho superior e outros três experimentos (7, 9 e 10) em trecho menor.



Os experimentos foram feitos utilizando soluções estoque de H_2O_2 a 3% de ingrediente ativo (Rioquímica) e concentração de 882 mM e de Mn-porfirina - Mn(III) meso-tetraquis(N-etilpiridínio-2-il)porfirina - de concentração igual a 1,99 mM.

A Mn-porfirina (MnP) foi estudado em cinco níveis, o peróxido de hidrogênio em sete e o tempo de exposição ao MnP em 3, com seus domínios experimentais definidos entre: 0-10 μM (MnP), 0-654 μM (H_2O_2) e 0-60 min (exposição ao MnP). As concentrações de H_2O_2 testadas foram determinadas com base nos experimentos do **Capítulo 2**.

O desenho experimental Doehlert é a distribuição uniforme dos experimentos em um espaço tridimensional (SAUTOUR et al., 2001). Assim, 12 experimentos são equidistantes a partir de um experimento central, tendo os valores codificados (0, 0, 0) e são distribuídos sobre uma esfera com um raio de 1 (**Fig. 1**). As variáveis experimentais X_i foram codificados como x_i de acordo com o trabalho de Sena et al (2012), uma vez que para configurar ambos, modelo e os experimentos, é necessário utilizar os valores iniciais e os valores codificados correspondentes a estes (**Tabela 1**), através da seguinte equação:

$$x_i = ((X_i - X_{0i}) / \Delta X_i) * \alpha_i$$

Onde “ x_i ” é o valor codificado da variável “ i ”, X_i é o valor natural, X_{0i} é o valor no ponto central, ΔX_i é o valor mudança, e α_i é o valor máximo da variável codificada (ou seja, 1,0, 0,866 e 0,816 por cinco, sete e três níveis, respectivamente) (KANARAM e MEDICHERLA, 2010) (**Tabela 2**).

Foram selecionados 14 animais com altura média e peso úmido equivalente a 15,7 g ($\pm 1,9$) e 12,2 g ($\pm 1,2$), respectivamente, provenientes da população estoque para cultivo experimental do LAPEC (Laboratório de Peixes – Ecologia e Conservação), Universidade Federal da Paraíba, Brasil. Os animais tiveram o comprimento estimado com auxílio do software gratuito UTHSCSA *Image Tool* (WILCOX et al., 2002) e o peso aferido com uma balança milesimal (Bel M-333).

Os tratamentos e durações foram concebidos com base na Matriz Doehlert (**Tabela 2**), seguindo o mesmo princípio dos experimentos do **Capítulo 2** desta dissertação, que foram baseados em protocolos que podem ser facilmente aplicadas em explorações agrícolas comerciais (GAIKOWSKI et al. 1999; A U. S. Food and Drug

Administration – EUA, 2002; YANONG, 2014): 60 minutos de imersão em diferentes concentrações de H_2O_2 , precedido por exposição de 0,35 ou 60 minutos de MnP..

Foi preparado um sistema de exposição que consiste em 1 aquários aquário pequeno de 140ml (7 x 4 x 8cm) com oxigenação constante para o tratamento com MnP e um aquário maior, de 20L (21 x 36 x 30cm) com recirculação contínua da água (Submersible Pump SP-2500, Boyu), para homogeneização do peróxido de hidrogênio e constante oxigenação, e um substrato de apoio (**Fig. 2**). Todos os experimentos ocorreram entre as 11:00am e 18:00pm, uma vez que sabe-se que a frequência respiratória em peixes se alteram ao longo do dia (BARRETO e VOLPATO, 2006).

Tabela 1: Valores originais e os valores correspondentes codificados para os experimentos com *H. reidi* em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.

Variáveis independentes	Valores codificados e naturais												
	-1	-0.866	-0.816	-0.577	-0.5	-0.289	0	0.289	0.5	0.577	0.816	0.866	1
V. MnP (μ l/mL)	X ₁	0			177		352.00		528				703
V. H_2O_2 (ml/L)	X ₂		0		50		100	150.00	200		250		300
TEMnP (min)	X ₃			10			35				60		

Tabela 2: Matriz experimental obtida pela metodologia de desenho experimental Doehlert por três fatores. Valores experimentais *H. reidi* em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.

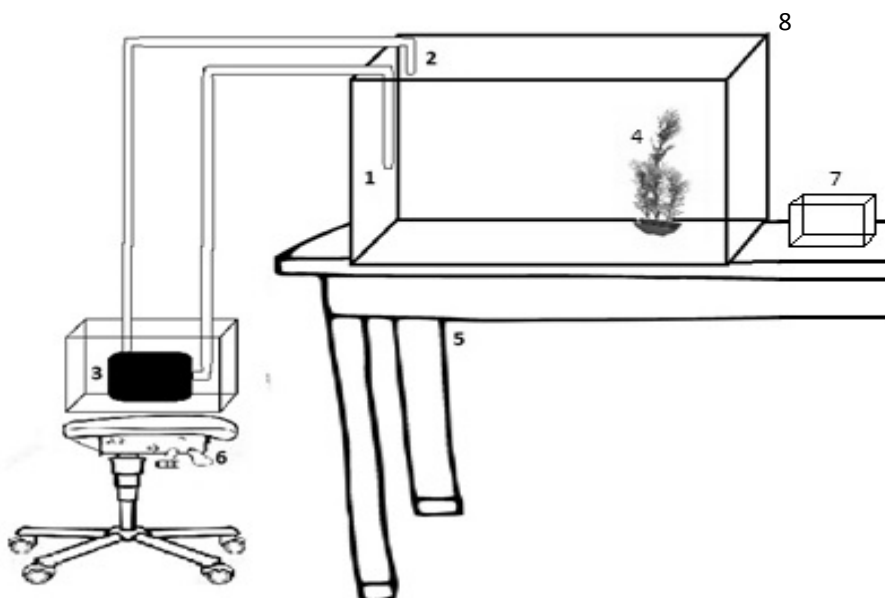
Experimentos	Valores codificados			Valores naturais			Concentrações utilizadas	
	X ₁	X ₂	X ₃	V. MnP (μ l)	V. H_2O_2 (ml/L)	TEMnP (min)	[MnP] (Mol/L)	[H_2O_2] (mM)
1	0	0	0	352	150	35	0.00199	872
2	0	-0.577	-0.816	352	50	10	0.00199	872
3	+1	0	0	704	150	35	0.00199	872
4	0	+0.577	+0.816	352	250	60	0.00199	872
5	-1	0	0	0	150	35	-	872
6	-0.5	-0.866	0	176	0	35	0.00199	-
7	+0.5	-0.866	0	528	0	35	0.00199	-
8	+0.5	-0.289	+0.816	528	100	60	0.00199	872
9	-0.5	-0.289	+0.816	176	100	60	0.00199	872
10	-0.5	+0.289	-0.816	176	200	10	0.00199	872
11	+0.5	+0.289	-0.816	528	200	10	0.00199	872
12	+0.5	+0.866	0	528	300	35	0.00199	872
13	-0.5	+0.866	0	176	300	35	0.00199	872

Os animais foram expostos, um por vez, a diferentes concentrações de MnP (0µl/ml, 1.26µl/ml, 2.51µl/ml, 3.77µl/ml e 5.03µl/ml) no aquário menor por um determinado tempo (10, 35 e 60 minutos) e, em seguida, transferidos para o aquário maior contendo diferentes concentrações de H₂O₂ (0 µM, 218 µM, 545 µM, 599 µM, 654 µM) (**Tabela 2**), onde permaneceram por 60 minutos. A transferência entre o aquário menor e o aquário maior não excedeu 10 segundos, não houve contato algum com os animais no processo.

Observações de aspectos biométricos, saúde e comportamento dos animais foram realizadas. Para quantificação da concentração de H₂O₂ nos aquários, foi retirada uma alíquota de água, no início e no final de cada experimento e medido a sua absorbância em um período máximo de 40 minutos, seguindo o método I₃⁻ de acordo com a fórmula e procedimento usual (ALLEN et al, 1952; KLASSEN et al, 1994).

Foi utilizada uma solução de H₂O₂ a 3% de ingrediente ativo (Rioquímica). Toda a água utilizada no experimento passou por filtragem mecânica (Manta Acrílica – Perlon e Malha 150µm) e ultravioleta (Filtro UV Atman-36W), utilizado comumente para controle de organismos planctônicos e microrganismos em sistemas de cultivo fechado, antes de cada experimento.

Figura 2. Sistema experimental com recirculação contínua de água, utilizada para exposição de *H. reidi* a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio e MnP. 1: saída de água do aquário; 2: entrada de água no aquário; 3: bomba de recirculação de água; 4: substrato de apoio; 5: Mesa; 6: cadeira para apoio do aquário com bomba de recirculação; 7: Aquário menor para exposição ao MnP; 8: Aquário maior para exposição ao H₂O₂.



3.3. Análise comportamental

Os experimentos foram realizados com uma população de *H. reidi* clinicamente saudável (ou seja, não haviam parasitas externos observados na pele, nadadeiras e brânquias; sem lesões externas; comportamento e alimentação normal; nenhuma mortalidade ou morbidade conhecida ou observada). Os animais foram filmados (HDR-XR160, Sony) e monitorados em todo o período de 60 minutos no aquário maior para análise comportamental e posterior contagem dos batimentos operculares por minuto (BARRETO e VOLPATO, 2006; TANTARPALE et al, 2012; AURÉLIO, 2012), utilizando-se de métodos não invasivos para mensurar o estresse oxidativo. Além disso, a cada 10 min durante o período do experimento (60min), o número total do tempo que os peixes passaram no fundo, em natação, em repouso, em exaustão e preso no substrato foi mensurado, bem como a frequência total de movimentos natatórios horizontais, no fundo, verticais e totais, a frequência de *clicks* e *gapes* e a frequência de batimentos operculares/min foram aferidos. Movimentos típicos de estresse em peixes também foram observados.

As medidas comportamentais foram escolhidas para análise com base nos experimentos do capítulo anterior, são elas:

- A proporção do tempo gasto por cada animal, na parte inferior do tanque;
- A proporção do tempo gasto por cada animal nadando;
- A proporção de tempo gasto por cada animal em repouso (estacionário);
- A proporção de tempo que o animal gasto pelo animal aderido ao substrato (segurando/preso sobre apoio) contra o tempo total que o animal estava em repouso;
- A proporção do tempo gasto por cada animal em exaustão;
- A frequência de movimentos de natação (horizontal, vertical e no fundo do aquário);
- A frequência de comportamentos característicos de estresse em peixes;
- Número de *Clicks*;
- Número de *Pipes*;
- Número de *Gapes*;
- Número de Batimentos Operculares por minuto.

Os comportamentos foram descritos seguindo os resultados do **Capítulo 2**, onde foi possível descrever quais seriam os comportamentos de manutenção e de estresse para *H. reidi*. Nele, os comportamentos que ocorreram tanto na ausência de qualquer estímulo externo (adição de H_2O_2) como na presença, foram classificados como comportamento de manutenção (**Tab. 3**), são eles: presença dos animais na parte inferior do aquário, comportamentos de nado (horizontal, vertical e no fundo), repouso (estacionário) do animal no fundo do aquário e/ou aderido ao substrato (segurando/preso sobre apoio), *Clicks* e *Gapes*. Para este caso, foi medida a alteração do tempo gasto realizando estas ações e/ou sua frequência em relação aos animais controle. A posição é um artifício de confinamento e não são traduzíveis para o comportamento do cavalo-marinho em estado selvagem, porém, em um ambiente de aquário, cavalos-marinhos podem posicionar-se em zonas mais calmas do aquário (ANDERSON et al, 2011), assim foi incluída, quantificada e analisada. Nesse mesmo sentido, os comportamentos que só ocorreram na presença do peróxido de hidrogênio, foram categorizados como comportamentos de estresse (**Tab. 4**) para *H. reidi*, com base na literatura de comportamentos semelhantes descrito para outras espécies de peixes (FRANCIS-FLOYD, 1988; BARRETO e VOLPATO, 2006; DUBE e HOSETTI, 2010; ANDERSON et al, 2011).

Tabela 3: Etograma dos dados comportamentais de estresse em *H. reidi*.

Etograma de cavalo-marinho <i>Hippocampus reidi</i>	
Comportamento de estresse	
Posição	Posição do animal em relação ao tanque
Exaustão	Quando ocorre à perda da capacidade de realização de ações, onde o animal fica a deriva no aquário.
Locomoção	Posturas enquanto em locomoção
Nados irregulares	Os animais demonstram movimentos de natação irregulares, erráticos e dardejantes, seguidos de perda de equilíbrio, podendo ou não serem acompanhados do peixe ficar "pendurado" verticalmente na água.
Movimentos da cabeça	Movimentos da cabeça e suas partes
Pipe	O focinho do animal rompe a superfície da água enquanto os movimentos operculares continuam.
Cauda enrolada na cabeça	O animal enrola, insistentemente, a cauda na cabeça e/ou partes da mesma.

Tabela 4: Etograma dos dados comportamentais de manutenção em *H. reidi*.

Etograma de cavalo-marinho <i>Hippocampus reidi</i>	
Comportamento manutenção	
Posição	Posição do animal em relação ao tanque
Topo	Quando o corpo do animal se localiza em sua maior porção, na metade superior da altura vertical do tanque;
Fundo	Quando o animal está localizado, em sua maior porção, na metade inferior da altura vertical do tanque;
Estacionário	Posturas enquanto estiver parado
Empoleirado	O animal está em repouso no tanque, aderido ao substrato.
Sentado	O animal está em repouso no fundo do tanque, livre do substrato. Cabeça e tronco estão em uma posição vertical.
Locomoção	Posturas enquanto em locomoção
Nado horizontal	Animal se desloca na horizontal, lateralmente, através da água em uma posição vertical ou horizontal, nadadeira peitoral e barbatanas dorsais em movimento ondulatório. A cauda pode ser ondulada ou para a frente, estendendo-se abaixo ou atrás do animal.
Nado vertical	Animal se desloca na vertical, através da coluna d'água em uma posição vertical, nadadeira peitoral e barbatanas dorsais em movimento ondulatório. A cauda pode ser ondulada ou para a frente, estendendo-se abaixo ou atrás do animal.
Nado no fundo	O animal atravessa o fundo do tanque com o tronco em posição vertical ou obliquamente na posição vertical, nadadeira peitoral e barbatanas dorsais em movimento ondulatório. A cauda arrasta na parte inferior, estendida por trás do animal.
Movimentos da cabeça	Movimentos da cabeça e suas partes
Click	A cabeça se inclina para cima instantaneamente, o hioide se sobressai e a boca está aberta. Associado a um som de clique.
Gape	O animal abre a boca lentamente, com a cabeça um pouco inclina para cima e o hioide se projeta. Não há som de clique.

3.4. Medição Óptica

Um espectrofotômetro BEL Photonics SP 1105, que mede a 0.001 unidade de absorbância, foi utilizado. Os espectros apresentados no presente estudo tiveram o Branco subtraído. As medições de absorbância foram feitas ~4 minutos após a colocação da cubeta no espectrofotômetro, a fim de permitir que a temperatura das soluções se igualem as do espectrofotômetro. Todas as medições de absorbância foram feitas dentro da faixa de 24-25 °C.

A absorbância é proporcional à concentração de moléculas absorvedoras de luz na amostra e ao caminho óptico da substância através da qual a luz viaja. Sendo assim, a Lei de Beer expressa a dependência da absorbância (A) em relação ao caminho óptico (b) e a concentração (c):

$$A = \epsilon bc$$

3.5. Análises Estatísticas

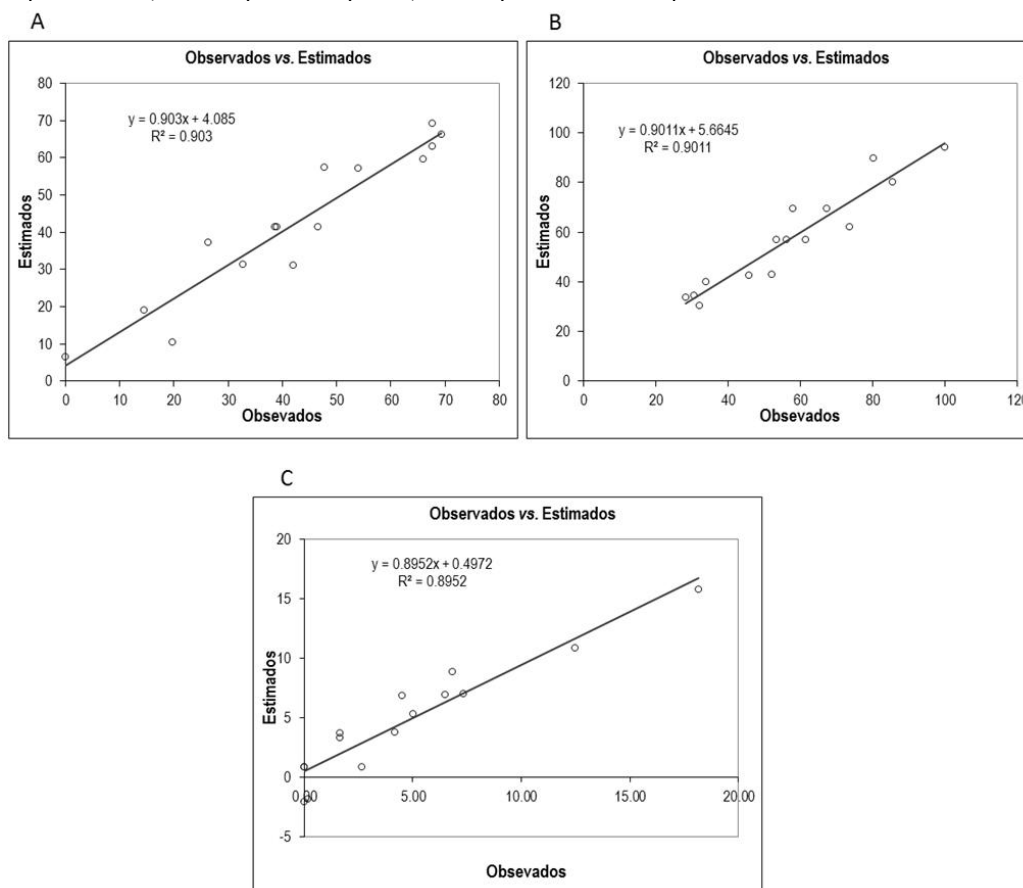
Os resultados foram processados em planilhas eletrônicas, utilizando-se do software Excel[®] da Microsoft para realizar cálculos de planejamentos fatoriais e otimização empregando Metodologias de Superfície de Resposta (RSM), desenvolvidos por Teófilo e Ferreira (2006), que tem seus resultados e cálculos validados através dos softwares *Matlab* 6.5 e *Statistica* 6.0.

Todos os testes foram considerados significativos quando seus resultados demonstraram um nível de $p \leq 0,05$. Dados referentes às análises são apresentados na forma de média $\pm$ erro ou porcentagem $\pm$ erro padrão.

4. RESULTADOS

Os resultados das análises de regressão múltiplas que forneceu as estimativas dos coeficientes do modelo estão listadas na **Tabela 3**. Os coeficientes de regressão, r^2 , foram iguais a 0.903, 0.901 e 0.895 (**Fig. 3**), respectivamente, para o tempo gasto pelo animal nadando, em repouso e a frequência de comportamentos típico de estresse; portanto, cerca de 90% da fração da variação em torno da média, para estes parâmetros, pode ser explicada pelos modelos (BOX e DRAPER, 1987). A variável ganho/perda de peso do animal e as variáveis comportamentais de cauda enrolada, nadados irregulares, *click* e batimento opercular, apresentaram r^2 com valores de 0.800, 0.771, 0.753, 0.800, 0.672. Isso claramente pode ser comprovado uma vez que o coeficiente de resposta, b_0 , apresenta os mesmos valores experimentais obtidos quando todos os fatores são ponderados com o nível codificada em 0, ou seja, b_0 = Condição Experimental 1 da **Tabela 2**. Nesse sentido, quanto maior for o valor absoluto dos coeficientes lineares, b_1 , b_2 e b_3 , mais importante foi a variável que influenciou a resposta.

Figura 3. Gráficos dos coeficientes de regressão para os experimentos utilizando H_2O_2 como estressor em *H. reidi* (n = 14) e a MnP como antioxidante em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.. A: Tempo de Nado; B: Tempo em Repouso; C: Frequência dos comportamentos totais de estresse.



Similar aos observado nos experimentos do **Capítulo 2**, o peróxido de hidrogênio (b_2) foi a substância que causou maior impacto sobre as variáveis estudadas (**Tabelas 5, 6 e 7**), influenciando de forma negativa ao bem-estar do animal em todos os parâmetros testados. A segunda variável que teve maior influência foi o tempo de exposição do animal ao MnP (b_3), seguido da concentração de MnP (b_1). O animal perde peso com o aumento da concentração de H_2O_2 (0-654 μM) e tende a ganhar com o aumento da concentração de MnP (0-10 μM) a que será exposto e com o aumento do tempo de exposição ao mesmo (0-60min) (**Tabela 5**). Todas as variáveis para esse parâmetro apresentaram um efeito quadrático (**Tabela 5**). Este resultado sugere que, dependendo dos valores dos parâmetros, o valor ótimo para essas variáveis está dentro do desenho amostral estudado. Foi demonstrada também uma interação significativa entre [MnP] e [H_2O_2] (b_{12}), [MnP] e tempo de exposição ao mesmo (b_{13}), [H_2O_2] e tempo de exposição ao MnP (b_{23}) (**Fig. 4**). Esses valores sugerem uma influência sinérgica de ambas as variáveis sobre ganho/perda de peso nos animais, com destaque para b_{13} que proporciona um ganho de peso em até 923.1 ± 55.1 mg ($t = 16.75$, $p < 0.004$) (**Tabela 5**).

Para o parâmetro locomoção, temos que aumento da concentração de H_2O_2 (0-654 μM) e do tempo de exposição ao MnP (0-60min) tendem a tornar o animal mais agitado, aumentando em até 28 e 16% o tempo que o animal está nadando e, consequentemente, diminui o tempo do animal em repouso em -29 e -16%, respectivamente (**Tabela 7**). O aumento da concentração de MnP (0-10 μM) não se demonstrou significativa, no entanto, foi observado um efeito quadrático para esse parâmetro (**Tabela 7**).

Os comportamentos descritos como comportamentos de estresse no **Capítulo 2**, apresentaram-se em menor frequência que no capítulo anterior, uma vez que os valores aqui achados, em alguns casos, como os da frequência de *pipe* e exaustão não se mostraram suficiente para os testes. Quanto aos demais comportamentos, como a frequência de Nados Irregulares e frequência de vezes que o animal enrolou a cauda na cabeça, é interessante notar o efeito sinérgico presente, onde em ambos os casos, novamente b_{13} mostrou uma mitigação desses comportamentos, chegando a diminuir a frequência em até -2.9 ± 0.1 e -4.5 ± 0.5 , respectivamente (**Tabela 6**). Esse efeito se torna ainda mais claro quando observamos a frequência de movimentos totais de estresse,

uma vez que b_{13} apresentou uma diminuição nesse parâmetro ainda maior, de -8.7 ± 2 (**Tabela 6**).

Os *clicks*, diferente do que se esperava, mostraram resultados semelhantes entre as variáveis, onde b_1 , b_2 e b_3 proporcionaram um aumento na sua frequência em 1.2 ± 0.1 , 1.9 ± 0.1 e 1.5 ± 0.1 , respectivamente (**Tabela 6**). Com um efeito quadrático em b_{22} e b_{33} . Também apresentou interação significativa em b_{23} , com um aumento em até 4.1 ± 0.3 na frequência de *clicks* (**Tabela 6**). No entanto, vale notar que por se tratar de um estudo inicial, mesmo não tendo a significância estipulada, as sinergias entre b_{12} e b_{13} não devem ser ignoradas, uma vez que estão próximos a esta, onde b_{12} apresentou uma diminuição na quantidade de *clicks* (-0.7 ± 0.3 , $t = 3,46$, $p = 0,07$) e b_{13} um aumento de 1 ± 0.3 ($t = 3,97$, $p < 0,06$) (**Tabela 6**).

Os batimentos operculares aumentaram sua frequência em b_2 (8.06 ± 0.82) e b_3 (4.83 ± 0.82), uma vez que para esses valores, os animais também ficavam mais agitados (**Tabela 6**). Todas as variáveis para esse parâmetro apresentaram um efeito quadrático, com destaque para b_2 , onde o efeito quadrático apresentou um valor negativo (-7.11 ± 1.49), contrário ao seu valor quando consideramos só a variável linear (**Tabela 6**).

Tabela 5: Os coeficientes dos modelos obtidos para os dados biométricos em *H. reidi* (n = 14) em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.

Respostas	Coeficiente	Biometria
		Ganho/Perda de Peso (mg)
	b_0	$323.3 \pm 24.7^{**}$
MnP	b_1	$205.1 \pm 21.4^{**}$
H ₂ O ₂	b_2	$-4519.7 \pm 21.4^{**}$
TEMnP	b_3	$170.1 \pm 21.4^{**}$
MnP ²	b_{11}	$-1031.3 \pm 39.0^{**}$
H ₂ O ₂ ²	b_{22}	$-8398.8 \pm 39.0^{**}$
TEMnP ²	b_{33}	$1551.9 \pm 37.0^{**}$
MnP.H ₂ O ₂	b_{12}	$-1038.7 \pm 49.3^{**}$
MnP.TEMnP	b_{13}	$923.1 \pm 55.1^{**}$
H ₂ O ₂ .TEMnP	b_{23}	$-2909.3 \pm 55.1^{**}$

Tabela 6: Os coeficientes dos modelos obtidos para os Movimentos de estresse e de cabeça para *H. reidi* (n = 14) em condições controladas, LAPEC, Brasil, 2015.

Respostas	Coeficiente	Mov. de Estresse			Mov. Cabeça	
		FCEC	FNI	FET	Clicks	BO
	b_0	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1	1.8 ± 0.9	$0.7 \pm 0.1^{**}$	$38.4 \pm 1^{**}$
MnP	b_1	0.4 ± 0.2	$0.4 \pm 0.1^{**}$	1.6 ± 0.8	$1.2 \pm 0.1^{**}$	-1.8 ± 0.8
H ₂ O ₂	b_2	$2.7 \pm 0.2^{**}$	$1.6 \pm 0.1^{**}$	$4.5 \pm 0.8^{**}$	$1.9 \pm 0.1^{**}$	$8.1 \pm 0.8^{**}$
TEMnP	b_3	$1.5 \pm 0.2^{**}$	$0.9 \pm 0.1^{**}$	$4 \pm 0.8^{**}$	$1.5 \pm 0.1^{**}$	$4.8 \pm 0.8^{**}$
MnP ²	b_{11}	-0.2 ± 0.4	-0.1 ± 0.1	3.6 ± 1.4	0.5 ± 0.2	5.6 ± 1.5
H ₂ O ₂ ²	b_{22}	$3.0 \pm 0.4^{**}$	$1.9 \pm 0.1^{**}$	4.6 ± 1.4	$4.0 \pm 0.2^{**}$	$-8.1 \pm 1.5^{**}$
TEMnP ²	b_{33}	$1.4 \pm 0.3^{**}$	$0.5 \pm 0.1^{**}$	3.7 ± 1.3	$2.6 \pm 0.2^{**}$	5.5 ± 1.4
MnP.H ₂ O ₂	b_{12}	$4.7 \pm 0.5^{**}$	$3.5 \pm 0.1^{**}$	$12.1 \pm 1.8^{**}$	-0.8 ± 0.2	3.3 ± 1.9
MnP.TEMnP	b_{13}	$-4.5 \pm 0.5^{**}$	$-2.9 \pm 0.1^{**}$	$-8.7 \pm 2^{**}$	1.0 ± 0.3	-2.6 ± 2.1
H ₂ O ₂ .TEMnP	b_{23}	$2.3 \pm 0.5^{**}$	$2.2 \pm 0.1^{**}$	-0.9 ± 2	$4.1 \pm 0.3^{**}$	1.6 ± 2.1

Valores com ** são significativos ($p \leq 0,05$).

TEMnP, Tempo de exposição de *H. reidi* ao MnP; FCEC, Frequência de vezes que o animal enrolou a cauda na cabeça; FNI, Frequência dos Nados Irregulares; FET, Frequência dos Movimentos de estresse totais; BO, Frequência dos Batimentos Operculares.

Tabela 7: Os coeficientes dos modelos obtidos para os percentual de posição e locomoção de *H. reiði*.

Respostas	Coeficiente	Posição	Locomoção							
		T. Fundo	T. Nado	T. Repouso	T. Substrato	FNH	FNF	FNV	FNT	
<u>MnP</u>	b_0	80.7 ± 4.8**	43.0 ± 2.4**	58.7 ± 2.7**	11.4 ± 11.4	10.9 ± 3.2	5.1 ± 2.2	37.6 ± 2.0**	53.6 ± 7.4**	
	b_1	-8.1 ± 4.2	-4.5 ± 2	4.0 ± 2.3	2.6 ± 9.9	3.2 ± 2.8	-0.4 ± 1.9	4.7 ± 1.7	7.5 ± 6.4	
	b_2	0.2 ± 4.2	28.1 ± 2**	-29.0 ± 2.3**	-31.2 ± 9.9	0.1 ± 2.8	6.8 ± 1.9	2.6 ± 1.7	9.5 ± 6.4	
<u>TEMnP</u>	b_3	-0.7 ± 4.2	16.0 ± 2**	-16.0 ± 2.3**	0.7 ± 9.9	-3.3 ± 2.8	1.6 ± 1.9	5.3 ± 1.7	3.6 ± 6.4	
<u>MnP</u> ²	b_{11}	10.7 ± 7.6	18.7 ± 3.7**	-20.4 ± 4.3**	-5.4 ± 18.1	-9.1 ± 5.1	3.5 ± 3.5	-26.7 ± 3.1**	-32.3 ± 11.7	
H ₂ O ₂ ²	b_{22}	16.3 ± 7.6	-14.2 ± 3.7	11.1 ± 4.3	52.6 ± 18.1	-8.9 ± 5.1	1.6 ± 3.5	-29.0 ± 3.1**	-36.3 ± 11.7	
<u>TEMnP</u> ²	b_{33}	-5.2 ± 7.2	-6.5 ± 3.5	5.2 ± 4.0	-23.2 ± 17.1	1.7 ± 4.8	4.1 ± 3.3	-19.1 ± 2.9**	-13.3 ± 11.1	
MnP.H ₂ O ₂	b_{12}	-8.5 ± 9.6	9.4 ± 4.7	-11.7 ± 5.4	-26.0 ± 22.9	3.5 ± 6.5	7.7 ± 4.5	18.9 ± 3.9**	30.0 ± 14.8	
<u>MnP.TEMnP</u>	b_{13}	10.9 ± 10.8	16.8 ± 5.3	-16.0 ± 6.0	5.8 ± 25.5	-8.9 ± 7.2	9.6 ± 5.0	-3.0 ± 4.4	-2.3 ± 16.5	
H ₂ O ₂ .TEMnP	b_{23}	-11.3 ± 10.8	-0.6 ± 5.3	0.1 ± 6.0	21.0 ± 25.5	6.3 ± 7.2	8.8 ± 5.0	0.3 ± 4.4	15.3 ± 16.5	

Valores com ** são significativos ($p \leq 0,05$).

TEMnP, Tempo de exposição de *H. reiði* ao MnP; T. Fundo, Percentual de tempo gasto por *H. reiði* no fundo do aquário durante o experimento; T. Nado, Percentual de tempo gasto por *H. reiði* nadando durante o experimento; T. Repouso, Percentual de tempo gasto por *H. reiði* em repouso durante o experimento; T. Substrato, Percentual de tempo gasto por *H. reiði* aderido ao substrato de apoio durante o experimento; FNH, Frequência de Nado na Horizontal; FNF, Frequência de Nados no Fundo; FNV, Frequência de Nados na Vertical; FNT, Frequência de Movimentos Natatórios Totais.

Figura 4. Superfície de resposta e valores de MnP vs. H_2O_2 no Ganho/Perda de peso de *H. reidi* (n = 14) 30 dias após o experimento, em condições controladas. LAPEC, Brasil, 2015.

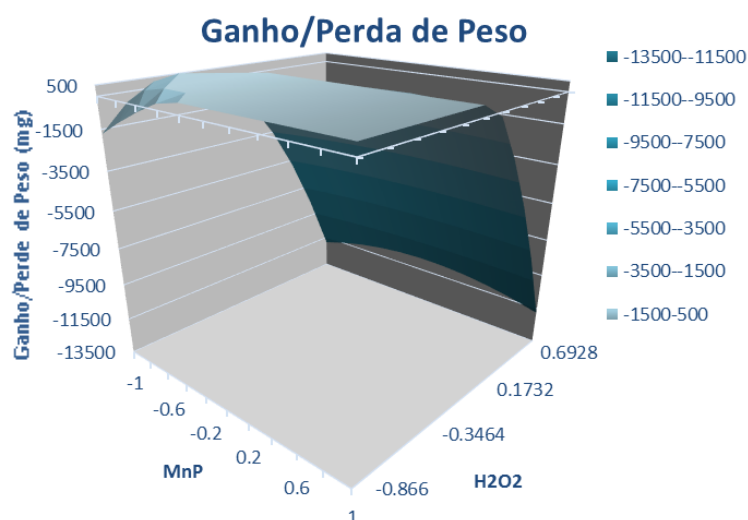


Figura 5. Superfície de resposta e valores de MnP vs. H_2O_2 no tempo gasto por *H. reidi* (n = 14) em repouso durante o experimento, em condições controladas. LAPEC, Brasil, 2015.

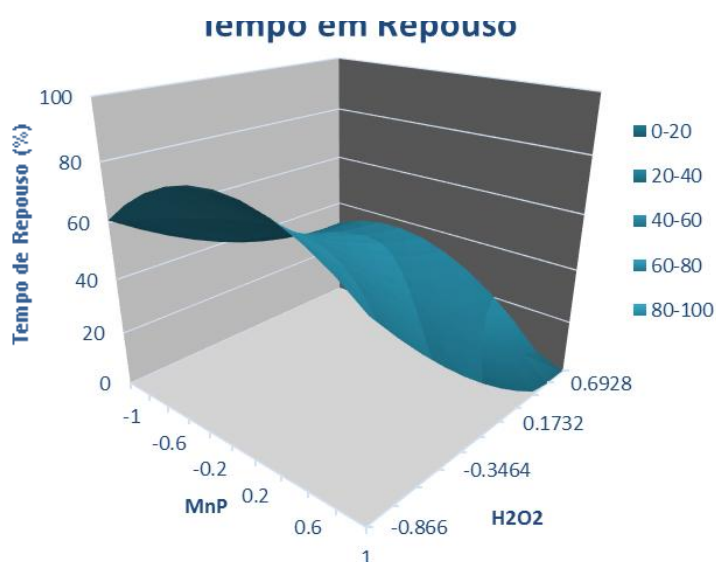
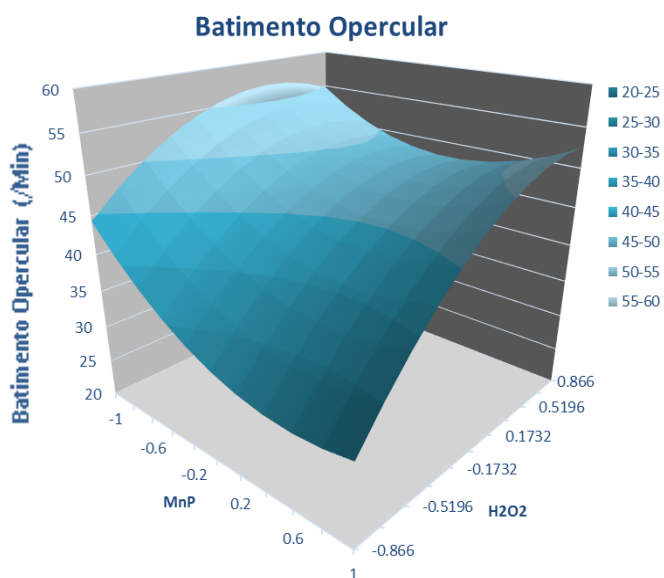


Figura 6. Superfície de resposta e valores de MnP vs. H_2O_2 na taxa respiratória de *H. reidi* durante o experimento, em condições controladas. LAPEC, Brasil, 2015.



5. DISCUSSÃO

As análises e parâmetros comportamentais foram selecionadas e realizadas com base nos resultados dos estudos já apresentados anteriormente no **Capítulo 2** e na bibliografia (ØVERLI et al, 2002; BARRETO e VOLPATO, 2006; FALEIRO et al, 2008; ANDERSON et al, 2011). Por outro lado, no presente estudo, um desenho experimental foi usado para avaliar a influência das variáveis independentes sobre o bem-estar dos animais, sob uma nova abordagem para mensurar o efeito combinado de diferentes concentrações de MnP (b_1) e H_2O_2 (b_2), e variados tempos de exposição de *H. reidi* ao MnP (b_3), por meio de um estudo comportamental associado.

O cortisol é, sabidamente, conhecido por diminuir a ingestão de alimentos em animais expostos, reduzindo seu peso (STEVENS, 1972; GREGORY e WOOD, 1999). Os experimentos realizados neste capítulo reforçam os resultados do **Capítulo 2**, uma vez que o desenho experimental demonstrou que o H_2O_2 em altas concentrações possui um efeito nocivo ao animal (**Tabelas 5, 6 e 7**). É interessante notar também que b_1 e b_3 , de forma isolada, ocasionaram um ganho no peso do animal e sua interação (b_{13}) em condições máximas de concentração e tempo de exposição ao MnP apresentou um sinal de ganho de peso ainda maior (**Tabela 5**), indicando que para esse parâmetro, o MnP se mostrou benéfico. Sua interação com H_2O_2 também demonstrou resultados satisfatórios, uma vez que tanto b_{12} quanto b_{23} apresentaram uma perda de peso menor quando em condições máximas do que se esperaria da variável H_2O_2 isoladamente (**Fig. 4**).

Um padrão semelhante também foi observado para outros parâmetros quando consideramos as variáveis isoladas. Parâmetros como o tempo gasto nadando e em repouso (**Fig. 5**), e nas frequências de movimentos típicos de estresse como enrolar a cauda na cabeça, os nados irregulares e a soma dos movimentos totais de estresse, bem como na frequência dos batimentos operculares (**Fig. 6**), mostraram que um aumento em suas frequências (e diminuição, no caso do repouso) quando o H_2O_2 é avaliado de forma isolada (b_2) e uma diminuição em relação a b_2 desses valores em b_1 e b_3 e, quando observamos a interação entre as variáveis, os movimentos típicos de estresse se destacam, por praticamente inexistirem em b_{13} (**Tabelas 6 e 7**). Em nenhum dos casos anteriores, b_{12} e b_{23} se mostraram benéficos, o que pode indicar que as concentrações utilizadas de MnP ou o tempo de exposição ao mesmo, não foram suficientes para

antagonizar os efeitos nocivos dessas altas concentrações de H_2O_2 em um primeiro momento, porém, o ganho de peso dos animais após 30 dias de experimento pode demonstrar que houve uma minimização desses efeitos nocivos a longo prazo. Vale mencionar que nos experimentos do capítulo anterior, após 30 dias, não foi observado ganho de peso em nenhum animal exposto ao H_2O_2 .

O número de *Clicks* não pareceu se diferenciar quando consideramos as variáveis b_1 , b_2 e b_3 isoladas, em todos os casos houve um aumento no número de *clicks*. Esse aumento pode estar associado não necessariamente ao estresse, cerca de 90% dos *clicks* ocorreram nos primeiros minutos após a passagem do animal do aquário menor ao maior. Nesses primeiros minutos, os animais pareciam “clicar” repetidamente numa tentativa de limpar o focinho, uma vez que no aquário menor, eles estavam totalmente imersos em concentrações de MnP. Não obstante, a interação b_{12} apresentou um sinal de diminuição de *clicks*, apesar de seu valor não ser significativo ($t = 3,46$, $p = 0,07$), por este ser um trabalho de caráter exploratório, vale ser considerado.

Apesar de não se poder fazer uma comparação direta entre os experimentos deste capítulo com os do **Capítulo 2** por possuírem metodologias exploratórias diferentes, é válido notar que para todos os casos, os exemplares de *H. reidi* deste capítulo reduziram os comportamentos associados ao estresse (quando na presença de MnP) do que os animais do capítulo anterior, expostos apenas ao H_2O_2 . Também houve uma diminuição, visual e numérica, entre os valores de todos os parâmetros, onde parâmetros como Exaustão e frequência de *Pipes* não puderam participar das análises devido a uma limitação dos testes a valores muito baixos.

Por não haver trabalhos envolvendo MnP em estudos com animais marinhos, tampouco havendo estudos comportamentais, as informações existentes são difíceis de comparar devido aos distintos objetivos e metodologias. No entanto, trabalhos demonstrando o valor da MnP enquanto antioxidante catalítico *in vivo* são unanimidade. Benov et al (2005) demonstraram uma supressão da diabetes induzida por estresse oxidativo em ratos; Crow et al (2005) mostraram que MnP é um agente promissor para o tratamento de esclerose lateral amiotrófica em camundongos, quando tratada no início; Gauter-Fleckenstein et al (2008), através de medidas de frequência respiratória e avaliações histopatológicas em ratos Fisher expostos a radiação, mostraram uma capacidade de melhorar danos pulmonares e reduzir consideravelmente a expressão de

fatores pulmonares chave que desempenham um importante papel nas lesões pulmonares induzidas por radiação, entre outros (ASLAN et al, 2001; PIGANELLI et al, 2002; CSONT et al, 2005; WU et al, 2007; REBOUÇAS et al, 2008b; SOMPOL et al, 2008).

6. CONCLUSÃO

O uso de um desenho experimental não permitiu apenas estimar a importância relativa (coeficientes padronizados) dos diferentes efeitos sobre a resposta comportamental de *H. reidi*, mas também revelou interações específicas que podem facilmente não serem detectadas utilizando a metodologia clássica de “modificar um fator a cada vez”, como por exemplo, o tempo de exposição ao MnP *versus* a sua concentração, e a minimização dos efeitos do H₂O₂ em função do MnP.

Em conclusão, parece prudente julgar que os resultados do presente estudo mostraram, de forma preliminar e exploratória, que o MnP se demonstrou benéfico a *H. reidi*, uma vez que minimizou os impactos causados por tratamentos de altas concentrações de H₂O₂ a longo prazo. Um tempo mais prolongado de exposição ao MnP pelos cavalos-marinhos também tiveram um maior impacto sobre esses efeitos do que uma maior concentração da mesma em um menor tempo de exposição. No entanto, por se tratar de um primeiro estudo envolvendo o MnP para minimização de estresse oxidativo em animais marinhos, mais estudos são necessários para refinar esses resultados, utilizando outros valores de concentração e diferentes técnicas de exposição ao MnP.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, S.M. **Biological indicators of stress in fish.** Am. Fish. Sot. Symp. Ser. 1990
- ALLEN, A. O.; Davis, T. W.; Elmore, G.; Ghormley, J. A.; Haines, B. M.; Hochanadel, C. J. Oak Ridge Natl. Lab. Publ. 1949, ORNL 130;
- ANDERSON, P. A., BERZINS, I. K., FOGARTY, F., HAMLIN, H. J., GUILLETTE JR, L. J., 2011. **Sound, stress, and seahorses: The consequences of a noisy environment to animal health.** Aquaculture 311, 129–138;
- ASLAN, M.; RYAN, T. M.; ADLER, B.; TOWNES, T. M.; PARKS, D. A.; THOMPSON, J. A.; TOUSSON, A.; GLADWIN, M. T.; TARPEY, M. M.; PATEL, R. P.; BATINIĆ-HABERLE, I.; WHITE, C. R.; FREEMAN, B. A. **Oxygen radical inhibition of nitric-oxide dependent vascular function in sickle cell disease.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:15215–15220; 2001
- AURÉLIO, M. L., 2012. **Physiological and behavioral responses of temperate seahorses (*Hippocampus guttulatus*) to environmental warming.** Departamento de Biologia Animal, Universidade de Lisboa;
- BARTON, B. A. **Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids.** Integ. and comp. biol., 2002. 42:517–525
- BARRETO, R. E.; VOLPATO, G. L., 2006. **Ventilatory frequency of Nile tilapia subjected to different stressors.** Journal of Experimental Animal Science 43, 189–196
- BARTON, B. A. AND G. K. IWAMA. **Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids.** Ann. Rev. Fish Dis., 1991. 1:3–26.
- BARTON, B.A., SCHRECK, C.B. AND SIGISMONDI, L.A. **Multiple acute disturbances evoke cumulative physiological responses in juvenile chinook salmon.** Trans. Am. Fish. Sot., 1986. 115: 245-251
- BATINIĆ-HABERLE; REBOUÇAS, J.S.; SPASOJEVIĆ, I. **Superoxide Dismutase Mimics: Chemistry, Pharmacology and Therapeutic Potential.** Antioxid Redox Signal, 2010. 13, 877–918;
- BENOV, L.; BATINIĆ-HABERLE, I. **A manganese porphyrin SOD mimic suppresses oxidative stress and extends the life span of streptozotocin-diabetic rats.** Free Radic. Res. 38:81–88; 2005;
- BENSALAH, W. et al, 2010. **Thick and Dense Anodic Oxide Layers Formed on Aluminum in Sulphuric Acid Bath.** Journal of Materials Science and Technology, v. 26, n. 2, p. 113-118;
- BOX, G. E. P.; DRAPER, N. R., 1987. **Empirical Model-Building and Response Surfaces.** Wiley: New York.
- CHROUSOS, G. P. **Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response.** Ann. N.Y. Acad. Sci., 1998. 851:311–335
- CROW, J. P. et al, 2005. **Manganese Porphyrin Given at Symptom Onset Markedly Extends Survival of ALS Mice.** Ann Neurol 2005;58:258–265;

CSONT, T.; VIAPPIANI, S.; SAWICKA, J.; SLEE, S.; ALTAREJOS, J. Y.; BATINIĆ-HABERLE, I.; SCHULZ, R. The involvement of superoxide and iNOS-derived NO in cardiac dysfunction induced by pro-inflammatory cytokines. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39:833–840; 2005

DHABHAR, F. S., MCEWEN, B. S., & SPENCER, R. L. **Adaptation to prolonged or repeated stress — Comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress.** *Neuroendocrinology*, 1997. **65**, 360–368

DOEHLERT, D. H., 1970. **Appl. Statist.**, 19, 231.

DUBE, P.N.; HOSETTI, B.B., 2010. **Behaviour surveillance and oxygen consumption in the fresh water fish labes rohita exposed to sodium cyanide.** *Biotechnology in Animal husbandary*, 26(1-2), p. 91-103

FALEIRO, F., NARCISO, L. E VICENTE, L., 2008. **Seahorse behaviour and aquaculture: How to improve *Hippocampus guttulatus* husbandry and reproduction?** *Aquaculture* 282, 33–40;

FINKEL, T. **Signal transduction by reactive oxygen species.** *J. Cell Biol.* 2011. **194**, 7-15

FLOS, R., REIG, L., TORRES, P. AND TORT, L. **Primary and secondary stress responses to grading and hauhng in rainbow trout, *Salmo gairdneri*.** *Aquaculture*, 1988. 71: 99-106

FRANCIS-FLOYD, R., 1988. **Behavioral diagnosis.** *Vet. Clin. N. Am.-Small Anim. Pract.* 18 (2), 305–316;

GAIKOWSKI, M. P., J. J. RACH, AND R. T. RAMSAY, 1999. **Acute toxicity of hydrogen peroxide treatments to selected lifestages of cold-, cool-, and warmwater fish.** *Aquaculture*, 178:191–207;

GAUTER-FLECKENSTEIN, B.; FLECKENSTEIN, K.; OWZAR, K.; JIAN, C.; BATINIĆ-HABERLE, I.; VUJASKOVIĆ, Ž. **Comparison of two Mn porphyrin-based mimics of superoxidedismutase (SOD) in pulmonary radioprotection.** *Free Radic. Biol. Med.* 44:982–989; 2008

GREGORY, T. R., WOOD, C. M., 1999. **The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout.** *Physiol. Biochem. Zool.* 72 (3), 286–295;

GRUTTER, A. S.; PANKURST N. W. **The effects of capture, handling, confinement and ectoparasite on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish *Hemigymnus melapterus*.** *J Fish Biol*, 2000. 57, 391–401

HALLIWELL B. and GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 2nd edition. Clarendon Press; U.K, 1989

HALLIWELL, B.; 1992. **Reactive oxygen species and the central nervous system.** *J Neurochem.* Nov, 59(5):1609-23.

HEO, G.J.; SHIN, G. **Efficacy of benzocaine as an anaesthetic for Crucian carp (*Carassius carassius*).** *Vet. Anaesth. Analg.*, 37 (2010), pp. 132–135

<http://www.microsoft.com>, acessada em julho 2015

IWAMA, G.K., PICKERING, A.D., SUMPTER, J.P., SCHRECK, C.B. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture.** *Society for Experimental Biology Seminar Series* 62, Cambridge University Press, Cambridge, 1997. 278pp

- MOELLER, B.J.; CAO, Y.; LI, C.Y.; DEWHIRST, M.W., 2004. **Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules.** *Cancer Cell*, 5, 429
- KANARAM, S. K.; MEDICHERLA, N. R., 2010. **Application of Doehlert experimental design for the optimization of medium constituents for the production of L-asparaginase from Palm Kernal cake (*Elaeis guineensis*).** *Microbial & Biochemical Technology*, v. 2, n. 1, p. 7-12;
- KIRAN, R. R. S. et al, 2010. **Statistical optimization of endo-polygalacturonase production by overproducing mutants of *Aspergillus niger* in solid-state fermentation.** *Journal of Biochemical Technology*, v. 2, n. 2, p. 154-157;
- KLASSEN, N. V., MARCHINGTON, D., MCGOWANT, H. C. E., 1994. **H₂O₂ Determination by the I₃⁻ Method and by KMnO₄ Titration.** Institute for National Measurement Standards, Ionizing Radiation Standards, National Research Council, Canada. *Anal. Chem.*, 66, 2921-2925;
- KOLDEWEY, H. J., 2005. **Syngnathid Husbandry in Public Aquariums: 2005 Manual, With Chapters Contributed by Members of the Syngnathidae Discussion Group.** Project Seahorse and Zoological Society of London. 137pp;
- Matlab, The Language of Technical Computing; Natick, USA, 2003
- MOMMSEN, T. P., VIJAYAN, M. M., MOON, T. W. **Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation.** *Reviews on Fish Biology and Fisheries*, 1999. 9: 211–268
- MURPHY, M. P. 2009. **How mitochondria produce reactive oxygen species.** *Biochem. J.* 417, 1-13
- MURPHY, M. P., SMITH, R.A.J., 2000. **Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine.** *Adv. Drug Deliv. Rev.* 41, 235–250;
- ØVERLI Ø., KOTZIAN S, WINBERG S., 2002. **Effects of cortisol on aggression and locomotor activity in rainbow trout.** *Horm Behav*, 42:53–61;
- NICHOLLS, D. G., FERGUSON, S. J., 2002. **Bioenergetics 3.** Academic Press, London;
- POWELL, M. D., CLARK, G. A., 2004. **Efficacy and toxicity of oxidative disinfectants for the removal of gill amoebae from the gills of amoebic gill disease affected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in freshwater.** *Aquaculture Research* 35:112–123;
- PICKERING. A.D. **Stress and fish.** Academic P&S, London, 1981. 367 pp.;
- PIGANELLI, J. D.; FLORES, S. C.; CRUZ, C.; KOEPP, J.; YOUNG, R.; BRADLEY, B.; KACHADOURIAN, R.; BATINIĆ-HABERLE, I.; HASKINS, K. A., 2002. **Metalloporphyrin superoxide dismutase mimetic (SOD mimetic) inhibits autoimmune diabetes.** *Diabetes* 51:347–355;
- QUIGNON, F., HUYARD, A., SCHWARTZBROD, L., THOMAS, F., 1997. **Use of Doehlert matrices for study of poliovirus-1 absorption.** *Journal of Virological Methods* 68, 33±44;
- REBOUÇAS, J.S.; SPASOJEVIĆ, I.; TJAHJONO, D.H.; et al., 2008a. **Redox modulation of oxidative stress by Mn porphyrin-based therapeutics: The effect of charge distribution.** *Dalton Trans.*, 1233–1242;

- REBOUÇAS, J.S.; DEFREITAS-SILVA, G.; SPASOJEVIC, I.; et al., 2008b. **The impact of electrostatics in redox modulation of oxidative stress by Mn porphyrins: Protection of SOD-deficient Escherichia coli via alternative mechanism where Mn porphyrin acts as a Mn-carrier.** Free Radic. Biol. Med., 45: 201–210
- ROTLLANT, J.; BALM, P.H.M, PEREZ-SANCHEZ, J. et al. 2001. **Pituitary and internal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress.** Gen Comp Endocrinol., 121, 333–342;
- SAUTOUR, M. et al., 2001. **Application of Doehlert design to determine the combined effects of temperature, water activity and pH on conidial germination of *Penicillium chrysogenum*.** Journal of Applied Microbiology, v. 91, p. 900-906;
- SCHEFFLER, I. E., 1999. **Mitochondria.** Wiley-Liss, New York;
- SELYE, H., 1974. **Stress without distress.** McClelland Stewart, Toronto;
- SENA, A. R. et al, 2011. **Production, purification and characterization of a thermostable β -1,3-glucanase (laminarinase) produced by *Moniliophthora perniciosa*.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 83, p. 599-609;
- SHIGENAGA, M. K., HAGEN, T. M., and AMES, B. N. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1994. 91, 19771–19778;
- SOMPOL, P.; ITTARAT, W.; TANGPONG, J.; CHEN, Y.; DOUBINSKAIA, I.; BATINIĆ-HABERLE, I.; ABDUL, H. M.; BUTTERFIELD, A.; ST. CLAIR, D. K., 2008. **A neuronal model of Alzheimer's disease: an insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury.** Neuroscience 153:120–130;
- Statistica, Data Analysis Software System; Tulsa, USA, 2001;
- STEVENS, E. D., 1972. **Change in body weight caused by handling and exercise in fish.** J. Fish. Res. Board Can. 29:202-203;
- STOREY, K. B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. Braz. J. Med. Biol. Res. 29, 1715-1733;
- TANTARPALE, V.T.; RATHOD, S.H.; KAPIL, S. 2012. **Temperature Stress on Opercular Beats and Respiratory Rate of Freshwater Fish *Channa Punctatus*.** International Journal of Scientific and Research Publications, Volume 2, Issue 12;
- TEÓFILO, R.F., FERREIRA, M.M.C., 2006. **Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial.** Quím. Nova, Abr, vol.29, no.2, p.338-350;
- TREVES-BROWN, K. M., 2000. **Anaesthesia. In: *Anaesthetics in Applied Fish Pharmacology*.** Treves-BrownKM (ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 206–217;
- TSE, H.M.; MILTON, M.J.; PIGANELLI, J.D., 2004. **Mechanistic analysis of the immunomodulatory effects of a catalytic antioxidant on antigen-presenting cells: implication for their use in targeting oxidation–reduction reactions in innate immunity.** Free Radical Biol. Med., 36, 233
- U.S. Food and Drug Administration. 2002. Title 21 Code of Federal Regulations Part 530 (21 CFR 530). Available: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/>
- CFRSearch.cfm?CFRPart=530 (Junho, 2015);

YANONG, R. P. E., 2014. **Use of Hydrogen Peroxide in Finfish Aquaculture**. Fisheries and Aquatic Sciences in the School of Forest Resources and Conservation, UF/IFAS

WALLACE, D. C. Science, 1999. **283**, 1482–1488;

WEBER, R. A.; PELETEIRO, J.B.; GARCÍA MARTÍN, L. O.; ALDEGUNDE, M., 2009. **The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858)**. Aquaculture, 288, pp. 147–150;

WEDEMEYER, G. A., AND D. J. MCLEAY., 1981. **Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors**. A.D. Pickering, editor. Stress and fish. Academic Press, London. Pages 247-275;

WEDEMEYER, G. A., B. A. BARTON, and D. J. MCLEAY., 1990. **Stress and acclimation**. In C. B. Schreck and P. B. Moyle (eds.), *Methods for fish biology*. pp. 451–489. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland;

WILCOX, D.; DOVE, B.; MCDAVID, D.; GREER, D, 2002. **UTHSCSA ImageTool Program, version 3.0**. University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas. Disponível em: <ftp:maxrad6.uthscsa.edu>;

WU, T. J.; KHOO, N. H.; ZHOU, F.; DAY, B. J.; PARKS, D. A., 2007. Decreased hepatic ischemiareperfusion injury by manganese-porphyrin complexes. Free Radic. Res. 41:127–134;

ZHAO, Y.; CHAISWING, L.; OBERLEY, T.D.; BATINIĆ-HABERLE, I.; ST. CLAIR, W.; EPSTEIN, C.J.; ST. CLAIR, D., 2005. **A Mechanism-Based Antioxidant Approach for the Reduction of Skin Carcinogenesis**. Cancer Res., 65, 1401;