

**Maik dos Santos Cividanes da Hora**

**Determinação de condições bióticas e abióticas ideais durante o estágio inicial de desenvolvimento de juvenis de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* em cultivo**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do grau de Doutor em Aquicultura.

**Orientadora:** Mônica Yumi Tsuzuki

Florianópolis – SC  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Hora, Maik dos Santos Cividanes da

Determinação de condições bióticas e abióticas ideais durante o estágio inicial de desenvolvimento de juvenis de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* em cultivo / Maik dos Santos Cividanes da Hora ; orientadora, Mônica Yumi Tsuzuki - Florianópolis, SC, 2015.

115 p.

- Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Syngnathidae. 3. Peixe ornamental. I. Tsuzuki, Mônica Yumi . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Determinação de condições bióticas e abióticas ideais durante o estágio inicial de desenvolvimento de juvenis de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* em cultivo**

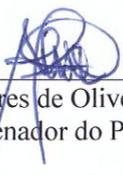
Por

MAIK DOS SANTOS CIVIDANES DA HORA

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

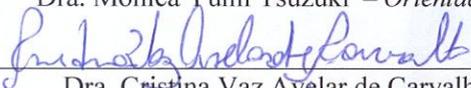
**DOUTOR EM AQUICULTURA**

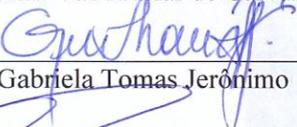
e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.  
Coordenador do Programa

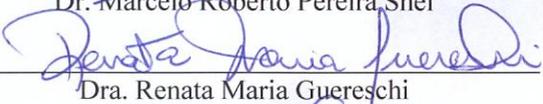
Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Mônica Yumi Tsuzuki – *Orientadora*

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Cristina Vaz Avelar de Carvalho

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Gabriela Tomas Jerônimo

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Marcelo Roberto Pereira Shei

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Renata Maria Gueschi

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Sergio Ricardo Floeter



*À minha linda e maravilhosa mãe, Yolanda.*



## AGRADECIMENTOS

*Os agradecimentos são um presente que nos obrigam a dar a nós mesmo ao lembrarmos das pessoas que marcaram nossa história nesta trajetória... Aprendemos com cada uma delas.*

Primeiramente gostaria de agradecer a pessoa a qual dedico este trabalho, a minha mãe, por me ensinar a bondade e fazer acreditar que somos capazes do que quisermos e que na vida mais vale as lágrimas de não ter conseguido do que o arrependimento de não ter tentado. Muito obrigado Dona Yolanda!!!

Ao meu avô e ao meu pai por me ensinarem a gostar e proteger a natureza.

Agradeço aos meus familiares e amigos por sempre me apoiarem e torcerem pelo meu trabalho mesmo nem sabendo direito como tudo isso funciona.

A professora Mônica pelo aprendizado, pela parceria e pela disponibilidade em me orientar.

Ao meu coorientador e amigo Jean, pelos conselhos de trabalho e de vida e pelos produtivos “brainstorms” matinais de quinta-feira.

A minha linda namorada, esposa e parceira, Cristielli, pela grande força, apoio, revisão da tese e principalmente pela enorme paciência em me aturar durante os meus estresses na escrita da tese.

Aos estagiários do Laboratório de Ictiologia e Maricultura Ornamental (LabMO – UFES): Helder Guabiroba e Felipe Sueti, pelo apoio na montagem do laboratório e na execução dos experimentos, mas principalmente pelo divertimento e risadas.

A todos os amigos do Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM - UFSC): Sayão, Danieli, Ana Paula, Ana Silvia, Douglas, Wesley, Raoani, Renata Técnica, Renata, Redna, Marina, Cris, Paulo, Daner, Yuri, Igor... E todos que passaram pelo laboratório. Valeu pela parceria, aprendizado e divertimento!!!

Aos amigos do Laboratório de Ictiologia (Ictiolab – UFES), Thiony, Raphael Macieira, Luana e Caio pelo grande divertimento e aprendizado.

A Márcia Vanacor (Incaper – ES) pela parceria em um dos capítulos da tese e pelo cultivo de copépodes. Ao professor Luiz Fernando Loureiro Fernandes por ceder espaço no Laboratório de Cultivo (UFES) e toda a sua equipe, principalmente ao Rodrigo pelo grande apoio.

Ao Professor Renato Neto por ceder o Laboratório de Geoquímica Ambiental (UFES) para as análises de ácidos graxos e toda

a sua equipe, principalmente o César Alexandro pelos grandes auxílios nas análises e na interpretação dos dados.

Ao grande amigo Rossi, o Sr. disposição, pelo enorme apoio na captura dos cavalos-marinhos e pelas diversas noites “passeando” de barco para capturar zooplâncton.

Aos amigos da república da casa 309, Gabriel, Raoani, Wesley, Titi, Emílio e Douglas, pelo companheirismo, festas, discussões e principalmente pelo divertimento.

Aos amigos donos da Demarco (produtora de cavalos-marinhos), Pablo e Alejandro, pela doação de equipamentos, informações fornecidas e grande parceria.

Aos amigos do chalé de Santa Cruz, Minduca, Andreas e Halysson, pelo grande companheirismo.

Aos amigos e funcionários da Base Oceanográfica da UFES... Quanta história para contar. Valeu galera!!!

A todos os membros da Sub-rede cavalo-marinho, pelo grande aprendizado e trabalho realizado, em especial a amiga Lília.

Ao amigo Ricardo Vieira pelas ideias, revisões e pelas análises realizadas de osmolalidade.

Ao Luis André Sampaio (FURG) pela disponibilidade do uso do osmômetro em seu laboratório.

Ao amigo Alexandre Kassuga pelas revisões.

Aos professores, funcionários e colegas do programa.

Aos membros da banca, Gabriela Jerônimo, Marcelo Shei, Renata Guereshi, Sérgio Floeter e a amiga Cristina Carvalho. Agradeço também aos membros que não puderam participar da banca devido ao corte orçamentário do governo, Levy Gomes e Wagner Valenti. Obrigado pela disponibilidade e sugestões.

Ao secretário do Programa, Carlito, pela dedicação e enorme paciência com nos alunos.

Ao colega Alexandre Wainberg, membro da sub-rede cavalo-marinho, que antecipadamente nos deixou, um grande abraço!!!

A CAPES, ao CNPq e ao MPA, pelo financiamento do projeto através da sub-rede cavalo-marinho e pela bolsa de estudo.

Ciência infinita  
“Ao final, descobrimos que mais coisas devem ser  
descobertas para contribuir com o que descobrimos”  
(Eu)



## RESUMO

A espécie de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* é uma das mais procuradas no mercado da aquariofilia. Entretanto, altas taxas de mortalidade são observadas no cultivo nos primeiros dias de vida, sendo um dos principais entraves para o desenvolvimento comercial do cultivo da espécie. Assim, o objetivo deste trabalho foi gerar informações para melhorar o protocolo de cultivo para as primeiras semanas de vida da espécie. Foram realizados quatro trabalhos (capítulos): 1) Tolerância à salinidade (TL<sub>50</sub>), sobrevivência e crescimento durante os primeiros 10 dias de vida nas salinidades de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 psu e determinação do ponto isosmótico de animais adultos; 2) Efeito do fotoperíodo (06 horas de Luz: 18 horas de Escuro, 10L:14E, 12L:12E, 14L:10E, 18L:06E e 24L:00E) e da cor de tanque (azul, branco, preto, transparente e vermelho) 3) Efeito da densidade de estocagem (1, 3, 6 e 15 indivíduos/L) e 4) Efeito de quatro dietas: rotífero (Dieta R), rotífero mais zooplâncton selvagem (Dieta R+ZS), zooplâncton selvagem (Dieta ZS) e rotífero mais copépode *Paracalanus quasimodo* cultivado (Dieta R+CC) na primeira alimentação da espécie. Também foi avaliada a eficiência de uma dieta comercial para o cultivo de copépode. A maior TL<sub>50</sub> foi observada para a salinidade 10 psu, e a menor TL<sub>50</sub> foi verificada para 5 psu. No experimento de crescimento, foi observada uma relação negativa entre salinidade e peso final e salinidade e altura final de acordo com as regressões realizadas, de forma que quando diminui a salinidade de 35 até 10 psu, maior o crescimento. Maior sobrevivência foi observada entre 10-25 psu. O ponto isosmótico da espécie foi determinado em 11,68 psu (303,38 mOsm/kg). Não houve diferença significativa no crescimento e na sobrevivência entre os juvenis submetidos de 10 a 24 horas de luz. Os animais expostos a 06L:18E mostraram um menor crescimento em altura e peso e baixa sobrevivência. Não houve diferença no crescimento e na sobrevivência entre juvenis submetidos às diferentes cores de tanque, nem para as diferentes densidades de estocagem. Foi observada uma maior sobrevivência e crescimento nas Dietas R+ZS, ZS e R+CC em relação à Dieta R. A dieta inerte revelou ser eficiente no cultivo de *P. quasimodo*, podendo ser um possível substituto da microalgas. *P. quasimodo* demonstrou ser resistente as condições de cultivo, podendo ser uma grande candidata para produção intensiva.

**Palavras-chave:** Aquicultura, Syngnathidae, Peixe ornamental



## ABSTRACT

High mortality rates are observed along the seahorses *Hippocampus* sp. production, especially at the initial days of life. *Hippocampus reidi* is one of the most sought species destined for the aquarium trade. The goal of this work was to generate information for the elaboration of a cultivation protocol for the first weeks of life of *H. reidi*. Four studies (chapters) were conducted: 1) salinity tolerance ( $LT_{50}$ ), survival and growth during the first 10 days of life in the salinities: 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35 psu and determining the isosmotic point of adults; 2) Effect of photoperiod (06 hours light: 18 hour dark, 10L:14D, 12L:12D, 14L:10D, 18L:06E and 24L:00E) and the tank color (blue, white, black, transparent and red); 3) Effect of stocking densities (1, 3, 6 and 15 individuals / L) and 4) Effect of four diets: rotifer (Diet R), rotifer plus wild zooplankton (Diet R+ZS), wild zooplankton (Diet ZS), and rotifer plus cultivated copepod *Paracalanus quasimodo* (Diet R+DC), at the first feeding of the species. The effectiveness of a commercial diet was evaluated for the copepod culture. The highest  $LT_{50}$  was observed at 10 psu salinity, and the lowest observed at 5 psu. In the growout experiment, a negative relationship was observed between salinity and final weight, and salinity and the final height according to the regressions performed, so that when reducing the salinity from 35 to 10 psu, greater was the growth. Higher survival was observed between 10-25 psu. The isosmotic point of the species was determined in 11.68 psu (303.38 mOsm/kg). No significant differences in growth and survival among juveniles submitted to 10-24 hours of light. The animals exposed to 06L: 18E showed less growth in height and weight and low survival. No difference in growth and survival of juveniles submitted to different tank colors, or different stocking densities were detected. Greater survival and growth was observed in diets R+ZS, ZS and R+CC in relation to Diet R. The inert diet was effective in the cultivation of *P. quasimodo* and may be a possible replacement for microalgae. *P. quasimodo* proved to be resistant to cultivation conditions, and can be a great candidate for intensive production.

**Keywords:** Aquaculture, Syngnathidae, Ornamental fish.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	19
1.1 CAVALOS-MARINHOS .....	19
1.1.1 Comércio de organismos aquáticos ornamentais e de cavalos-marinhos .....	22
1.2.2 Cultivo de ornamentais de organismos aquáticos ornamentais e do cavalo-marinho .....	24
1.2.3 Principais entraves para o cultivo de cavalos-marinhos .....	26
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	28
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>Tolerância e crescimento do cavalo-marinho <i>Hippocampus reidi</i> a diferentes salinidades</b> .....	29
1 <b>INTRODUÇÃO</b> .....	30
2 <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
2.1 CONDIÇÕES GERAIS DE MANUTENÇÃO.....	31
2.2 EXPERIMENTO 1- TOLERÂNCIA DE JUVENIS A SALINIDADE.....	32
2.3 EXPERIMENTO 2 - SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE JUVENIS EM DIFERENTES SALINIDADES .....	33
2.3.1 <b>Desenho experimental</b> .....	33
2.3.2 <b>Alimentação</b> .....	33
2.3.3 <b>Coleta de dados</b> .....	34
2.4 EXPERIMENTO 3 - DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOSMÓTICO DE <i>Hippocampus reidi</i> .....	35
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	36
3 <b>RESULTADOS</b> .....	36
3.1 EXPERIMENTO 1- TOLERÂNCIA A SALINIDADE DE JUVENIS.....	36
3.2 EXPERIMENTO 2 - SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE JUVENIS EM DIFERENTES SALINIDADES .....	37
3.3 EXPERIMENTO 3 - DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOSMÓTICO DE <i>Hippocampus reidi</i> .....	40
4 <b>DISCUSSÃO</b> .....	41
5 <b>REFERÊNCIAS</b> .....	44

## CAPÍTULO 2

<b>Condições abióticas para o crescimento e a sobrevivência de juvenis de cavalo-marinho <i>Hippocampus reidi</i>: Efeito do fotoperíodo e da cor de tanque</b> .....	49
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	50
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	52
2.1 ORIGEM E MANUTENÇÃO DOS REPRODUTORES .....	52
2.2 Desenho experimental.....	53
2.2.1 Experimento de Fotoperíodo.....	54
2.2.2 Experimento de cor de tanque .....	54
2.3 BIOMETRIA .....	54
2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	55
<b>3 RESULTADOS</b> .....	55
3.1 EXPERIMENTO DE FOTOPERÍODO .....	55
3.2 EXPERIMENTO DE COR DE TANQUE .....	59
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	65
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	66

## CAPÍTULO 3

<b>Densidade de estocagem no cultivo do cavalo-marinho <i>Hippocampus reidi</i> na fase pelágica e reflexões para a fase bentônica</b> .....	71
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	72
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	73
2.1 BIOMETRIA .....	74
2.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	75
<b>3 RESULTADOS</b> .....	75
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	78
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	80
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	80

## CAPÍTULO 4

<b>Primeira alimentação do cavalo-marinho <i>Hippocampus reidi</i>: efeito do copépole <i>Paracalanus quasimodo</i> cultivado, zooplâncton selvagem e rotíferos</b> .....	85
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	86
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	88
2.1 CULTIVO DO COPÉPODE <i>Paracalanus quasimodo</i> E OUTROS ALIMENTOS VIVOS UTILIZADOS.....	88

2.2	ORIGEM E CONDIÇÕES GERAIS DE MANUTENÇÃO DOS CAVALOS-MARINHOS .....	89
2.3	DESENHO EXPERIMENTAL.....	89
2.4	BIOMETRIA.....	91
2.5	ANÁLISES DE ÁCIDOS GRAXOS .....	91
2.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	92
3	<b>RESULTADOS</b> .....	92
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	97
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	100
6	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	100
	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	105
	<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	107
	<b>ANEXOS</b> .....	112



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 CAVALOS-MARINHOS

Segundo Nelson (2006), os cavalos-marinhos apresentam a seguinte classificação sistemática:

Classe: Actinopterygii

Sub-classe: Neopterygii

Divisão Teleostei

Ordem: Gasterosteiformes

Sub-ordem: Syngnathoidei

Família: Syngnathidae

Gênero: *Hippocampus*

Dentro da família Syngnathidae, que engloba 52 gêneros, estão os cavalos-marinhos, dragões-marinhos, peixes-cachimbo e cavalos-cachimbo. Os cavalos-marinhos são encontrados em todo o mundo, geralmente ocupando águas rasas, em regiões tropicais e temperadas, habitando bancos de fanerógamas marinhas, manguezais, estuários ou formações recifais (VINCENT, 1996a; LOURIE et al., 1999).

Todos os cavalos-marinhos apresentam praticamente as mesmas características morfológicas corporais e funcionais básicas: uma “cabeça de cavalo” formando um ângulo aproximadamente reto em relação ao eixo longitudinal do corpo; olhos independentes um do outro; focinho longo e tubular, sem dentes, que permite ao animal sugar a comida; trato digestório sem estômago diferenciado; pele esticada em cima de uma série de anéis ósseos ao redor do tronco e da cauda, e uma cauda preênsil para se agarrar ao substrato (FIGUEIREDO e MENEZES, 1980; FOSTER e VINCENT, 2004).

Além da sua morfologia bastante diferenciada, os cavalos-marinhos apresentam grande variação nos padrões de coloração e alguns podem desenvolver filamentos dérmicos que auxiliam na camuflagem. Essas características contribuem para que a taxonomia do gênero ainda apresente grandes discordâncias acerca do número de espécies consideradas válidas (LOURIE et al., 2004). De acordo com Integrated Taxonomic Information System (ITIS, 2015) e Kuitert (2009), há até 74 espécies de cavalos-marinhos, enquanto que apenas 54 espécies são relatadas na base de dados FishBase (FROESE E PAULY, 2015), 47 espécies são reconhecidas pelo Project Seahorse (PROJECTSEAHORSE, 2014) e apenas 38 espécies são listados pela

IUCN (International Union for the Conservation of Nature) (IUCN, 2014).

No litoral brasileiro, são encontradas três espécies de cavalos-marinhos *H. reidi*, *H. erectus* e *H. patagonicus* (SILVEIRA et al., 2014). *H. reidi*, também conhecido como “longsnout” ou cavalo-marinho brasileiro, apresenta maior abundância (FIGUEIREDO e MENEZES, 1980; LOURIE et al., 1999; ROSA et al., 2002), distribuindo-se dos EUA até o Rio Grande do Sul no Brasil (FROESE e PAULY, 2014). Esta espécie pode atingir até 24 cm de comprimento (HORA et al., 2010).

Diferente de muitos outros peixes, os cavalos-marinhos não apresentam nenhum tipo de defesa de território. Isto provavelmente ocorre porque eles não possuem a necessidade de proteger locais de desova (FOSTER e VINCENT, 2004). Eles geralmente apresentam baixa mobilidade, pequeno território, alta fidelidade com o parceiro e baixa fecundidade, que pode ser compensada por um longo período de cuidado parental (FOSTER e VINCENT, 2004). Uma das características mais peculiares destes animais é em relação à reprodução, uma vez que são os machos, ao invés das fêmeas, que ficam “grávidos”.

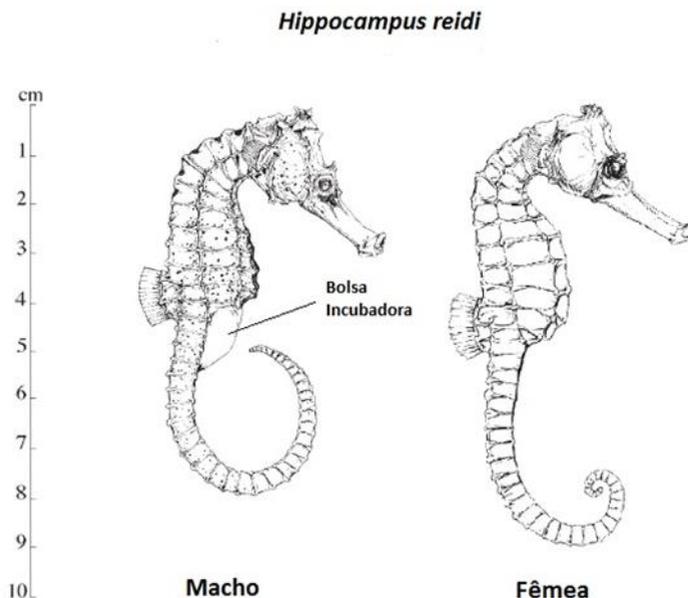
A maior parte das espécies de cavalos-marinhos estudadas na natureza formam pares monogâmicos, no qual um macho e uma fêmea acasalam repetida e exclusivamente (FOSTER e VINCENT, 2004; LOURIE et al., 2004). Para *H. reidi*, não se conhece ainda este comportamento no ambiente natural, porém, em cativeiro, tanto machos quanto fêmeas podem trocar de parceiros a cada acasalamento (HORA et al., 2010). Woods (2000a) também reporta este mesmo comportamento para *H. abdominalis* em cativeiro.

Em cativeiro, *H. reidi* se reproduz ao longo do ano, e para acasalar o macho realiza uma corte que pode durar horas (SILVEIRA, 2009; HORA et al., 2010). O macho muda sua coloração, ficando pálido e abre o poro da bolsa incubadora, podendo inflá-la. Ele mostra comportamento ativo, indo de encontro à potencial parceira, agarrando-a com a sua cauda preênsil e nadando junto a ela. O macho coloca a abertura da bolsa incubadora na direção do poro genital da fêmea para que esta deposite os oócitos na bolsa incubadora onde serão fertilizados (SILVEIRA, 2009; HORA et al., 2010). O macho guarda os ovos fecundados até a liberação dos filhotes completamente formados.

Esta incomum bolsa incubadora (Figura 1) localizada ventralmente no corpo do macho dos cavalos-marinhos tem a função de proteger os embriões, nutrí-los e agir como um órgão osmorregulador,

funcionando como uma “pseudo placenta” (KORNIENKO, 2001; CARCUPINO, 2002). O tempo de gestação dos cavalos-marinhos varia de 9 a 45 dias dependente da espécie (FOSTER e VINCENT, 2004), em *H. reidi*, a gestação dos filhotes dura em média duas semanas (ROSA et al., 2002). O aumento ou a diminuição da temperatura da água na gestação pode ocasionar maior ou menor tempo de gestação (HORA et al., 2010). Aparentemente, quanto maior o tempo de gestação mais saudável é a prole e maior é a chance de chegar à idade adulta (ROSA et al., 2002). No momento da liberação dos filhotes, o macho contrai a bolsa e expulsa os filhotes de dentro dela. A partir deste momento o macho já esta apto a acasalar novamente.

**Figura 1:** Macho e Fêmea de *Hippocampus reidi*. Adaptado de Lourie et al., 2004.



No ambiente natural, a principal dieta do gênero *Hippocampus* são pequenos crustáceos. Assim que nascem já são capazes de se alimentar e ingerirem inicialmente copépode e copepoditos, mas ao

longo do seu crescimento alteram sua dieta, preferindo presas maiores a medida que aumentam de tamanho (FOSTER e VINCENT, 2004). Quando adultos, se alimentam principalmente de anfípodos, pequenos camarões carideos e misidáceos (CASTRO et al., 2008; KENDRICK e HYNDES, 2005; TEIXEIRA e MUSICK, 2001).

### **1.1.1 Comércio de organismos aquáticos ornamentais e de cavalos-marinhos**

A indústria de organismos aquáticos ornamentais, que inclui equipamentos, serviços e animais, tem valor estimado em 15 bilhões de dólares (MOORHEAD e ZENG, 2010). No início dos anos 2000, estimavam-se que a coleta de ornamentais marinhos movimentava entre 28 e 44 milhões de dólares (WOOD, 2001) com a coleta de 25-40 milhões de peixes para suprir a demanda de cerca de 1,5 a 2 milhões de aquários marinhos em todo o mundo (WOOD, 2001; WABNITZ et al., 2003). Apesar da escassez de dados atualizados, possivelmente, com o desenvolvimento de novas tecnologias para manter aquários marinhos domésticos, esse valor seja superior.

Também no início dos anos 2000, o Brasil esteve entre os 10 maiores fornecedores de peixes ornamentais do mundo, e era um dos principais exportadores de cavalos-marinhos (WOOD, 2001; MONTEIRO-NETO et al., 2003; WABNITZ et al., 2003). Na metade da década de 2000, o país era o maior consumidor de cavalos-marinhos da América Latina, porém, estatísticas oficiais sobre a magnitude deste comércio são subestimadas (ROSA, 2005).

Os cavalos-marinhos são comercializados tanto vivos quanto mortos (secos). Os animais vivos atendem à indústria de peixes ornamentais (aquariofilia) (Figura 2). Já os indivíduos secos, que constituem a maior parte dos cavalos-marinhos comercializados no mundo, têm como destino a medicina tradicional, principalmente chinesa, ou, em menor grau, são usados como souvenirs e artesanatos (VINCENT, 1996b).

O Brasil explora cavalos-marinhos para a aquariofilia desde a década de 1990. As exportações são principalmente sustentadas por *H. reidi* que é uma das espécies mais procuradas para o mercado de aquariofilia mundial e em aquários públicos (BULL, 2002). Devido a grande exploração destes animais, Rosa et al. (2007) relatam baixa densidade populacional de *H. reidi* em várias localidades do Brasil. No estado do Ceará, o tamanho médio dos indivíduos adultos é menor que em outros estados devido à pressão de captura sobre os maiores animais

destinados para a aquarioria. Adicionalmente, diversos pescadores já relatam a diminuição populacional de cavalos-marinhos ao longo dos anos (ROSA et al., 2005). Tanto em volume quanto em número de espécies comercializadas, os cavalos-marinhos são os Syngnathides mais explorados.

**Figura 2:** **A:** Cavalos-marinhos comercializados através da internet. **B:** Cavalos-marinhos secos e conchas comercializados na praia de Guarapari-ES. **C:** Cavalos-marinhos *H. reidi* capturados destinados para aquarioria em uma empresa exportadora de ornamentais marinhos no estado do Espírito Santo, Brasil.

Fotos: A- [www.indomahseer.wordpress.com](http://www.indomahseer.wordpress.com). B e C- Maik S. C. Hora.



O consenso da necessidade do ordenamento do comércio de cavalos-marinhos culminou em 2004 com a inserção de todas as espécies do gênero *Hippocampus* no Apêndice II da CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna) (CITES, 2014), e na lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN (International Union for the Conservation of Nature) como vulneráveis. Na última atualização da lista vermelha em 2012, 10 espécies estão listadas como "vulnerável", 26 espécies como "dados insuficientes", uma espécie "ameaçada" e uma espécie como "menor preocupação"

(IUCN, 2014). Espécies inscritas no apêndice II da CITES estão autorizados a ser comercializadas; no entanto, os países exportadores são obrigados a garantir a manutenção das populações selvagens.

No Brasil, a fim de controlar e assim diminuir a sua captura para fins de aquariofilia, a Instrução Normativa nº 56/2004 do IBAMA estabelece cotas de exportação para *H. reidi* e *H. erectus*. Por sua vez, *Hippocampus patagonicus* foi registrada recentemente no país (SILVEIRA et al., 2014), por isso não há permissão de coleta para a espécie. Assim, cada empresa tem o direito de exportar 250 indivíduos de cada espécie por ano (IBAMA, 2004). Porém, a maioria dos exportadores, pescadores e fiscais não discriminam uma espécie da outra (ROSA, 2004; observação pessoal). Assim, *H. reidi* que é mais abundante está mais exposto a ser capturado.

Além disso, não existe restrição para os animais comercializados internamente no país. *H. reidi* também foi catalogada pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) como “sobreexplorada ou em risco de sobreexploração” (MMA, 2004), o que levou o IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Hídricos), a elaborar em 2009, com auxílio de especialistas de todo o Brasil, a “Proposta do Plano de Gestão para Uso Sustentável de Cavalos-Marinheiros do Brasil”, de forma a assegurar que o status de uso das espécies de cavalos-marinheiros seja revertido. O documento corresponde a uma proposta preliminar para discussão e elaboração do “Plano Nacional de Gestão para o Uso Sustentável dos Cavalos-Marinheiros”.

Porém, após cinco anos, poucas foram as discussões em cima da proposta para a implementação do plano. Recentemente todas as três espécies de cavalos-marinheiros que ocorrem no Brasil foram colocadas como vulneráveis na “Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção” (MMA, 2014).

### **1.2.2 Cultivo de organismos aquáticos ornamentais e do cavalo-marinho**

Ao contrário de espécies ornamentais de água doce, onde mais de 90% dos peixes comercializados são produzidas em cativeiro, a grande maioria dos peixes marinhos são oriundos da coleta no ambiente, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (WOOD, 2001; MONTEIRO-NETO et al., 2003; WABNITZ et al., 2003). Das mais de 1.400 espécies de peixes ornamentais marinhos comercializados

(WABNITIZ et al., 2003), apenas 72 espécies eram produzidas em cativeiro até 2003 (MOE, 2003).

Esta atividade é caracterizada como extrativista, e em muitos casos ocorre de forma desordenada e impactante para o meio ambiente (TLUSTY, 2002). Por exemplo, alguns comerciantes menos conscientes continuam a consumir organismos oriundos de pesca destrutivas, como o uso de cianeto para anestesiá-las espécies de peixes mais valiosas e mais difíceis de capturar com as técnicas tradicionais (OLIVOTTO et al., 2011). O uso deste veneno não somente causa malefícios as espécies alvo, mas também as não-alvos como outros peixes e invertebrados marinhos (MAK et al., 2005).

Assim, o desenvolvimento da aquicultura comercial para espécies de peixes ornamentais marinhos, principalmente os mais vulneráveis, como é o caso dos cavalos-marinhos, auxiliaria na diminuição da pressão de sobreexploração e ajudaria a sustentar e desenvolver a indústria de cultivo de peixes ornamentais marinhos. Isso promoveria a geração de novas divisas socioeconômicas ao mesmo tempo em que atenderia medidas de conservação (HORA, 2007).

Koldewey e Martin-Smith (2010), apontam que na metade da década de 2000, haviam 28 empresas produtoras de cavalos-marinhos no mundo, no qual poucas delas produziam de maneira significativa uma das sete espécies, *H. abdominalis*, *H. barbour*, *H. breviceps*, *H. comes*, *H. ingens*, *H. kuda* e *H. reidi*. Austrália e Nova Zelândia eram os principais produtores, além desses, mais nove países eram responsáveis também por essa produção: Brasil, Hong Kong, Irlanda, México, Nova Caledônia, Siri Lanka, Reino Unido, EUA e Vietinam. As principais espécies produzidas são *H. barbour* e *H. kuda* (6 empresas cada), *H. reidi* (4), e *H. erectus* (4).

O Brasil é um dos quatro produtores de *H. reidi* (KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010). Os animais atendem exclusivamente o mercado de exportação e são comercializados com tamanho mínimo de 7,5 cm, com preço que varia entre 10-15 dólares a unidade, dependendo da cor e do tamanho. O preço também pode variar dependendo da concorrência com outros países. Em ordem decrescente, os mais valorizados são os vermelhos, laranjas e amarelos, os escuros não possuem valor de mercado para exportação. Os cavalos-marinhos produzidos no Brasil são destinados principalmente para os EUA, onde podem alcançar preços superiores a 150 dólares (J.P. Demarco, informação pessoal).

Comparado com outros peixes recifais, os cavalos-marinhos são relativamente novos na indústria da aquicultura e com elevado potencial econômico devido à crescente demanda e os altos preços de mercado. Embora a tecnologia de criação em escala comercial para essas poucas espécies exista, são necessárias melhorias para aumentar a produtividade (OLIVOTTO et al., 2011). Muitos produtores de cavalos-marinhos e de espécies ornamentais marinhas em geral, desenvolvem uma metodologia de produção e a mantêm em segredo, com medo que haja o surgimento de mais concorrentes, o que torna mais difícil o aumento da produção destes animais e dificulta o aprimoramento da técnica de cultivo desenvolvida. Apesar da ilusão de vantagem pelo produtor, essa atitude pode ser errônea, uma vez que o compartilhamento dessas informações, principalmente para a academia, poderia ajudar a aprimorar as técnicas de cultivo e dar um retorno para o produtor com informações capazes de melhorar sua produção.

### **1.2.3 Principais entraves para o cultivo de cavalos-marinhos**

O conhecimento sobre os aspectos essenciais para o cultivo de cavalos-marinhos são escassos, especialmente aqueles relacionados com o sucesso reprodutivo e a mortalidade de juvenis. Apesar da criação de cavalos-marinhos em cativeiro poder contribuir para melhor compreensão da biologia e fisiologia, pouco se sabe sobre a influência de fatores bióticos e abióticos no seu desenvolvimento, ainda há informações insuficientes sobre o crescimento, reprodução, alimentação e exigências nutricionais destes animais (OLIVOTTO et al., 2011). A criação de juvenis é conduzida de forma diferente para cada espécie, com cultivos realizados em água verde ou clara, sobfotoperíodo natural ou regimes contínuos, com diferentes tipos de enriquecimentos para o alimento vivo (OLIVOTTO et al., 2011), com diferentes tipos de estruturas de produção (recirculação, semi-aberto e aberto) (KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010) entre outros.

O gênero *Hippocampus* é considerado de difícil cultivo por diversos autores (FORTEATH, 1996; VINCENT, 1996a; VINCENT, 1996b; LOURIE et al., 1999; WOODS, 2000a e 2000b; GIWOJNA, 2002; FOSTER e VINCENT, 2004; WITTENRICH, 2007; OLIVOTTO et al., 2011). Porém, o número de estudos voltados ao cultivo desses animais em todo mundo é crescente e refere-se principalmente às espécies mais procuradas para aquarofilia e para a medicina tradicional chinesa (KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010).

Um dos grandes entraves na produção de cavalos-marinhos é a exigência nutricional na primeira alimentação (KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010; OLIVOTTO et al., 2011). Cavalos-marinhos juvenis são predadores obrigatórios que buscam presas vivas (FELÍCIO et al., 2006). O cultivo de alimento vivo é custoso (KOLDEWEY E MARTIN-SMITH, 2010) e a alimentação tradicional é comumente baseada na utilização de rotíferos *Brachionus* sp. e náuplios de *Artemia* sp., e, menos frequentemente, são utilizados copépodes.

Cavalos-marinhos também possuem outra desvantagem em relação a alimentação, uma vez que possuem trato intestinal simples, sem estômago funcional que pode dificultar digestão (PALMA et al., 2013). Aliado a isso, os náuplios de artemia apresentam baixa digestibilidade (PAYNE e RIPPINGALE, 2000; OLIVOTTO et al., 2011). Assim, o uso exclusivo de copépodes ou suplementado com *Artemia* sp. ou rotífero tem sido testado para melhorar a criação de juvenis, (PAYNE e RIPPINGALE, 2000; SHENG et al., 2006; OLIVOTTO et al., 2008; HORA e JOYEUX, 2009). Portanto, a oferta de presas em quantidades suficientes e nutricionalmente adequadas é essencial para garantir o crescimento e sobrevivência ideal durante a criação de cavalos-marinhos (MARTÍNEZ-CÁRDENAS e PURSER, 2007; SOUZA-SANTOS et al., 2013).

A influência de fatores abióticos (salinidade, temperatura, fotoperíodo, cor de tanque, luminosidade, pH, oxigênio e compostos nitrogenados entre outros) e bióticos (como densidade de estocagem, alimentação e genética) podem influenciar de diversas maneiras o cultivo de peixes (BOEUF E LE BAIL, 1999; BOEUF e PAYAN, 2001). A ação desses fatores tem sido estudada principalmente em relação ao seu efeito direto no crescimento e na reprodução de peixes (BOEUF e PAYAN, 1999; 2001). Mas eles também podem interferir na eficiência alimentar, gasto energético, atividade locomotora, reprodução, estresse entre outros. Tais fatores foram pouco estudados para cavalos-marinhos, e possivelmente influenciam de diferentes maneiras cada espécie, uma vez que tais peixes possuem distribuição global em diferentes ambientes. Assim, há a necessidade do conhecimento de melhores condições dos fatores bióticos e abióticos para o aprimoramento de um protocolo de cultivo.

Apesar de existirem pequenas produções comerciais para *H. reidi*, informações científicas geradas sobre o cultivo desta espécie são escassas, e só foram publicados recentemente (OLIVOTTO et al., 2008; HORA e JOYEUX 2009; WILLADINO et al., 2012; MELO-

VALENCIA et al., 2013; pham e lin, 2013; souza-santos et al., 2013), inexistindo um protocolo de cultivo. Assim, Olivotto et al. (2008) testaram diferentes tipos de alimentação e fotoperíodos para os primeiros estágios de vida; Hora e Joyeux (2009) analisam o crescimento entre o nascimento e a maturação sexual, também providenciando informações sobre a mortalidade ex situ, a razão sexual e aspectos reprodutivos de jovens adultos. Willadino et al. (2012), Pham e Lin (2013) e Souza-Santos et al. (2013), estudaram aspectos alimentares de juvenis nos primeiros dias de vida.

Mesmo com vários problemas de mortalidade, principalmente relacionado a doenças, de 2008 a 2014 foram produzidos e exportados aproximadamente 6.000 indivíduos na única empresa produtora desta espécie no Brasil (J.P. Demarco, comunicação pessoal). Essa quantidade equivale a cota de exportação de *H. reidi* selvagem de uma empresa exportadora de ornamentais por 24 anos ou de 24 empresas por ano. Isso demonstra a possibilidade de aumento de mercado e potencial de produção que a espécie possui e a necessidade de geração de informações para se criar um protocolo de produção da espécie.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVOS GERAIS**

Determinar condições bióticas e abióticas ideais de cultivo de juvenis do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* durante o estágio inicial de desenvolvimento.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar a tolerância à salinidade e o crescimento de juvenis de *H. reidi* durante os seus primeiros dias de vida e determinar o ponto isosmótico da espécie.

Determinar o melhor fotoperíodo e a cor de tanque para os juvenis de *H. reidi* nos primeiros 15 dias de vida.

Verificar a melhor densidade de estocagem para *H. reidi* durante a fase pelágica e no início do processo de transição para a fase bentônica.

Testar o uso do copépode calanóide *Paracalanus quasimodo* cultivado com uma dieta inerte juntamente com rotíferos em relação ao zooplâncton selvagem e rotíferos na primeira alimentação de *H. reidi*.

## CAPÍTULO 1

### **Tolerância e crescimento do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* a diferentes salinidades**

Maik dos Santos Cividanes da Hora<sup>a,b\*</sup>, Jean-Christophe Joyeux<sup>b</sup>, Ricardo Vieira Rodrigues<sup>c</sup>, Lília Pereira de Sousa Santos<sup>d</sup>, Levy Carvalho Gomes<sup>e</sup>, Mônica Yumi Tsuzuki<sup>a\*</sup>

#### **Resumo**

O *Hippocampus reidi* é umas das espécies de cavalo-marinhos mais populares na aquariorfilia. Uma alternativa para ajudar a diminuir a pressão pesqueira sobre suas populações naturais é o desenvolvimento do cultivo comercial para esta espécie. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi verificar a tolerância à salinidade, o crescimento e sobrevivência nas fases iniciais e determinar o ponto isosmótico da espécie. O maior tempo letal de 50% da população (TL<sub>50</sub>) foi observado para a salinidade 10 psu, seguido pelas salinidades 15 e 20 psu em sequência as salinidades 25, 30 e 35 psu e o menor TL<sub>50</sub> foi verificado para 5 psu. Na salinidade zero todos os animais morreram antes de seis horas de experimento. No teste de sobrevivência e crescimento, os cavalos-marinhos submetidos a salinidade 5 psu morreram no segundo dia. Foi observada relação negativa entre salinidade e peso final e salinidade e altura final de acordo com as regressões realizadas, de forma que quando diminuiu a salinidade, até a salinidade 10 psu, maior foi o crescimento em altura e peso. As maiores taxas de sobrevivência foram observadas entre as salinidades 10 e 25 psu. O ponto isosmótico da espécie foi determinado em 11.68 psu (303.38 mOsm/kg), o que está próximo a salinidade onde se obteve os melhores resultados nos dois primeiros experimentos. A utilização de uma salinidade intermediária para a produção em escala comercial dessa espécie é vantajosa porque, além de maximizar a sobrevivência e o crescimento da espécie, necessitaria de menor captação de água salgada ou compra de sal.

**Palavras chave:** Ponto isosmótico, cavalo-marinho do focinho longo, peixe ornamental.

## 1. INTRODUÇÃO

O cavalo-marinho *Hippocampus reidi* (Ginsburg, 1933) distribui-se da Carolina do Norte (EUA), Bermudas e Bahamas até o Rio Grande do Sul (Brasil) (Froese e Pauly, 2014) e é uma das espécies do gênero mais populares no mercado da aquariofilia. Tendo em vista a elevada pressão pesqueira destinada para este mercado, para fins de artesanato e principalmente para a medicina tradicional chinesa, além da degradação dos seus habitats naturais, desde 2004 todas as espécies de cavalos-marinhos constam no Apêndice II da CITES (CITES, 2014). No Brasil, a partir de 2004, a fim de controlar e assim diminuir a sua captura para fins de aquariofilia, foram estabelecidas cotas de exportação para duas das três espécies que ocorrem no país: *H. reidi* e *H. erectus* (Silveira et al., 2014) (*H. patagonicus* foi registrada recentemente no país, por isso não há permissão de coleta). Cada empresa tem o direito de exportar 250 indivíduos de cada espécie por ano. Porém, tanto os exportadores e pescadores quanto os fiscais não discriminam uma espécie da outra. Assim, *H. reidi*, que se encontra em maior abundância, esta propenso a ser mais capturado. Além disso, não existe restrição para os animais comercializados internamente no país.

Uma outra ferramenta para diminuir a pressão pesqueira sobre as populações naturais de *H. reidi* é o desenvolvimento da criação comercial, que já existe em pequena escala no Brasil (Hora e Joyeux, 2009; Koldewey e Martin-Smith, 2010). O ciclo de vida de *H. reidi* em cativeiro já é conhecido (Hora e Joyeux, 2009), entretanto, ainda são recentes os estudos sobre a produção dessa espécie (Olivotto et al., 2008; Willadino et al., 2012; Pham e Lin, 2013; Melo-Valencia et al., 2013; Souza-Santos et al., 2013). Essa carência de estudos faz com que os cultivos das diferentes espécies de cavalos-marinhos, apresentem ainda muitos problemas que geram altas taxas de mortalidade, principalmente nos primeiros dias de vida, onde os animais são mais frágeis e susceptíveis a doenças (Koldewey e Martin-Smith, 2010).

*H. reidi* habita principalmente regiões estuarinas e por isso naturalmente tolera grandes flutuações de salinidade (Foster e Vincent, 2004). Sabe-se que a salinidade é um dos parâmetros abióticos mais importantes da água que pode influenciar o desenvolvimento dos peixes em diferentes estágios de vida. Pode interferir desde a fertilização e incubação de ovos (Griffin et al., 1998; Zhang et al., 2010), no crescimento larval (Ostrowski et al., 2011; Tsuzuki et al., 2000) e também no desenvolvimento de juvenis e adultos (Lin et al., 2009;

Resley et al., 2006). Peixes marinhos e estuarinos quando em ambiente com nível de salinidade distinto da sua concentração corporal gastam mais energia para a osmorregulação. Este gasto pode variar de menos de 10% até 50% do seu metabolismo padrão (Boeuf e Payan, 2001), e pode afetar negativamente o crescimento e a sobrevivência dos animais. Assim, enquanto *H. kuda* com idade de 9 semanas revelam extrema tolerância a salinidade, o crescimento e a sobrevivência foram melhores em salinidades intermediárias (Hilomen-Garcia et al., 2003), as quais não foram testadas em juvenis ou em outras espécies de cavalos-marinhos (Lin et al., 2009), inclusive *H. reidi* (Melo-Valença et al., 2013).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a tolerância à salinidade e o crescimento de juvenis de *H. reidi* durante os seus primeiros dias de vida, bem como determinar o ponto isosmótico da espécie. Tais estudos irão contribuir com o aperfeiçoamento do cultivo e auxiliar na diminuição da sua captura no ambiente natural.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados três experimentos: I) tolerância à salinidade em juvenis de *H. reidi* nos primeiros dias de vida, II) sobrevivência e crescimento em diferentes salinidades e III) determinação do ponto isosmótico de animais adultos.

### 2.1 CONDIÇÕES GERAIS DE MANUTENÇÃO

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Ictiologia e Maricultura Ornamental, localizado na Base Oceanográfica da Universidade Federal do Espírito Santo, (Aracruz-ES, Brasil). Foram capturados na Baía do Espírito Santo (Vitória-ES, Brazil, 20°19' S, 40°20' W) um total de 51 adultos de *H. reidi* (autorização ICMBio SISBIO n° 23924-1), entre fêmeas e machos em adiantado estado de gravidez. No local da captura, a salinidade da água era de  $28,0 \pm 3,2$  psu.

Os reprodutores, cujos filhotes foram destinados aos experimentos I e II foram mantidos em aquários de 60 e 140 L pertencentes a um sistema de recirculação de água salgada de aproximadamente 4000L equipado com skimmer, filtro biológico de areia e de algas calcárias. Os parâmetros físico-químicos foram monitorados diariamente. A temperatura e a salinidade foram aferidos

com o medidor multiparâmetro (modelo EC300, YSI, USA), sendo que a temperatura variou de 25,8 °C a 26,5 °C, a salinidade foi mantida em 30 psu. O pH foi medido com pHmetro (modelo ph-700, Instrutherm, USA) e variou de 8,3 a 8,4. O nitrito e a amônia total, abaixo de 0,05 mg/L. O oxigênio dissolvido médio, medido com oxímetro (modelo MO-910, Instrutherm, USA), foi de  $6,6 \pm 0,3$  mg/L. Em todos os experimentos, os parâmetros de qualidade de água foram monitorados com os mesmos equipamentos.

O fotoperíodo nos experimentos foi mantido em 12 horas de luz e 12 horas escuro. A luz foi proveniente de lâmpadas fluorescentes de 15 W localizadas 30 cm acima dos aquários.

Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia, duas vezes pela manhã e duas a tarde até a saciedade. A alimentação consistia de camarões carídeos marinhos vivos, coletados no ambiente natural e misidáceos marinhos selvagens *Mysidium gracile* coletados e congelados. Os aquários foram sifonados três vezes ao dia, pela manhã, antes da primeira alimentação, no período da tarde, antes da oferta de alimento e uma hora depois da quarta alimentação para remover restos de alimento e fezes do fundo.

## 2.2. EXPERIMENTO I- TOLERÂNCIA DE JUVENIS A SALINIDADE

Assim que os filhotes foram liberados, 720 indivíduos foram sifonados e transferidos diretamente em grupos de 30 indivíduos para as unidades experimentais que consistiram em 24 tanques de 3L (10 ind./L) com aeração moderada. Foram testados oito tratamentos de salinidade 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 psu, com três repetições por tratamento.

Para reduzir a salinidade foi acrescentada água deionizada. Para aumentar a salinidade, a água foi aquecida para acelerar o processo de evaporação até atingir o nível salino desejado (Sampaio e Bianchini, 2002). Os animais não foram alimentados durante todo o período experimental. Trinta por cento da água foi renovada diariamente, a temperatura foi mantida em  $25,0 \pm 0,4$  °C (média  $\pm$  desvio padrão), o pH em  $7,3 \pm 0,8$ , o nitrito e a amônia abaixo de 0,05 mg/L. A contagem e retirada dos indivíduos mortos foi realizada a cada 6 horas durante as primeiras 72 horas e, posteriormente, a cada 12 horas. O experimento foi concluído quando todos os indivíduos haviam morrido. A morte foi definida na ausência de movimento opercular ou reação ao estímulo mecânico.

## 2.3. EXPERIMENTO II - SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE JUVENIS EM DIFERENTES SALINIDADES

### 2.3.1 Desenho experimental

A sobrevivência e o crescimento dos juvenis de *H. reidi* foram avaliados durante os primeiros 10 dias de vida em sete diferentes salinidades: 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 psu. Estabeleceu este período inicial de vida devido ao fato dos juvenis recém nascidos serem planctônicos (Hora e Joyeux, 2009), e em cultivo é quando ocorrem as maiores taxas de mortalidade, considerado portanto o período mais crítico na produção desta espécie (Olivotto et al., 2011). Os tratamentos foram realizados em triplicata usando recém nascidos de dez machos (matrizes). Cada macho forneceu de uma única prole dois grupos de 60 filhotes selecionados aleatoriamente (com exceção de prole da qual foram separados três grupos). Estes dois (ou três) grupos foram alocados em réplicas de salinidades diferentes.

Os tratamentos foram conduzidos em aquários de 40L (1,5 ind./L) com aeração moderada. Para aclimatar em cada uma das salinidades, todos os juvenis foram transferidos com a mesma água em que nasceram (salinidade 30 psu) para um tanque, e por gotejamento de água doce, a salinidade foi diminuída gradativamente a uma taxa de 2,5 psu por hora. Assim que a água alcançou a salinidade desejada, os juvenis eram alocados para seus respectivos tratamentos. Para aumentar a salinidade foi utilizado o mesmo método do experimento I e a mesma taxa anteriormente descrita. A salinidade zero não foi analisada uma vez que todos os animais submetidos a este tratamento morreram rapidamente no teste de tolerância (ver resultados: Experimento 1).

Durante o experimento, a temperatura média nos aquários foi  $25,3 \pm 0,5$  °C, o pH em  $7,6 \pm 0,6$ , o nitrito e a amônia total, medidos com teste colorimétrico, permaneceram abaixo de 0,05 mg/L, e 50% da água foi renovada diariamente

### 2.3.2. Alimentação

Do primeiro ao 5<sup>o</sup> dia de idade os juvenis foram alimentados exclusivamente com zooplâncton selvagem vivo coletado no estuário do rio Piraquê-Açu (Aracruz - ES, Brasil 40°09'14,41" O, 19°57'01,13" S) com auxílio de uma rede de plâncton cônica de malha 100µm. Posteriormente à coleta, o zooplâncton foi triado (300 µm) para a

retirada dos organismos maiores. A comunidade zooplanctônica estuarina no Piraquê-Açu é largamente dominada por copépodes *Acartia lilljeborgi*, *Temora turbinata*, *Parvocalanus crassirostris*, *Oithonao swaldocruzi*, *Oithonao culata*, *Euterpina acutifronse*, *Paracalanus pavus* (Nunes, 2010). A salinidade na saída do estuário apresentou valores mínimos e máximos de 11,60 a 34,05 psu, respectivamente com média de 30, 45. O zooplâncton coletado foi igualmente aclimatado, assim como os cavalos-marinhos, para cada uma das salinidades. A alimentação foi ofertada de duas a quatro vezes ao dia até a saciedade aparente.

A partir do 5<sup>o</sup> dia até o final do experimento foram ofertados metanúplios de *Artemia* sp. enriquecidos com Super Selco<sup>®</sup> (inve, Beugium), de acordo com metodologia do fabricante. A troca de alimentação ocorreu de maneira gradual segundo protocolo modificado de Hora e Joyeux (2009): no primeiro dia de transição (5<sup>o</sup> dia de vida dos juvenis) foi ofertado 75% de zooplâncton selvagem e 25% *Artemia sp.*, no segundo dia 50% de cada alimentação, no terceiro dia de transição foi oferecido 25% de zooplâncton selvagem e 75% de *Artemia sp.* e a partir do quarto dia (8<sup>o</sup> dia de vida) 100% de *Artemia sp.*

### 2.3.3. Coleta de dados

A mortalidade foi verificada diariamente enquanto os aquários eram sifonados. Os animais remanescentes ao término de cada experimento foram contabilizados, e quando existia uma diferença entre o número de mortos nas duas estimativas, considerou-se que os juvenis desaparecidos morreram no 1<sup>o</sup> dia, pois até esta idade os cavalos-marinhos mortos se degradam facilmente o que muitas vezes impossibilita a sua visualização. A sobrevivência foi calculada como:  $100 \times ((\text{número de sobreviventes no dia}) / (\text{número de juvenis inicial} - \text{número de juvenis amostrados}))$

A cada dois dias (2<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup>, 8<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dia), de seis a oito indivíduos de cada réplica foram eutanasiados aleatoriamente com uso do anestésico benzocaína (30mg/L) e preservados em álcool 70% (autorização do Comitê de Ética e Uso de Animais CEUA – UFES n<sup>o</sup> 037/2011). No dia 0 (dia do nascimento), oito animais não utilizados no experimento foram coletados para determinar a altura e peso inicial. Devido a total mortalidade em uma das três réplicas da salinidade 10, sem motivo identificado, a réplica foi removida das análises.

A altura (em mm), definida como a soma da altura da coroa, do comprimento do tronco e do comprimento da cauda (Lourie et al., 1999), foi estimada com a utilização de fotos graduadas utilizando o programa SigmaScan Pro 5. Para evitar que o efeito da distorção nas bordas das fotos (paralaxe) influenciasse nas medidas dos animais, as fotos foram realizadas com os cavalos-marinhos no centro das mesmas. A taxa de crescimento (em mm/dia) em cada réplica foi calculada como sendo a declividade ( $b$ ) da regressão linear ( $Altura = a + b \cdot idade$ ) entre o nascimento e 10 dias usando os dados individuais ( $n = 48$ ). Os indivíduos foram pesados (peso úmido) com uma balança analítica de precisão 0,001 g. A taxa de crescimento específico em peso (% dia<sup>-1</sup>) foi calculada como:

$$TCE = 100 \times (\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial}) / \text{tempo})$$

#### 2.4. EXPERIMENTO III - DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOSMÓTICO DE *Hippocampus reidi*

Quarenta cavalos-marinhos adultos, machos e fêmeas (média  $\pm$  desvio padrão: 18,3  $\pm$  2,4 cm e 23,6  $\pm$  7,8 g), foram expostos durante 12 dias a cinco salinidades (6, 12, 18, 24 e 30 psu), em duplicata, em aquários de 25 L com aeração moderada e com quatro indivíduos por réplica. Os animais foram aclimatados para cada uma das salinidades a uma taxa aproximada de 0,33 psu por hora. Durante todo o período, os cavalos-marinhos foram alimentados com misidáceo *M. gracile* congelado. Duas vezes por dia, os aquários eram sifonados para a retirada de resíduos de alimento e fezes e 60% da água foi renovada diariamente.

O pH permaneceu em 7,6  $\pm$  0,6, a amônia e o nitrito permaneceram abaixo de 0,05 mg/L, e o oxigênio variou de 6,3 a 7,3 mg/L. Após 12 dias, 100 mL de água de cada aquário foi coletada e os animais foram anestesiados com eugenol (50 mg/L) e o sangue retirado com auxílio de seringas de 3 mL contendo heparina sódica. O plasma foi obtido por meio da centrifugação do sangue a 6000  $\times$ g (Micro 22R Hettich Zentrifugen, Global Medical Instrumentation, Ramsey, MN, EUA) por 10 minutos. A concentração osmótica do plasma e da água foi medida em osmômetro de pressão de vapor (VAPRO 5600 Wescor, Utah, EUA).

## 2.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para o teste de tolerância, o tempo letal de 50% da população ( $TL_{50}$ ) e seu intervalo de confiança foram determinados por meio de análise *probit*. Para cada salinidade foi utilizado o tempo mais próximo em que 50% dos indivíduos haviam morrido em cada um dos tratamentos, uma vez que o experimento foi conduzido até que todos os animais de cada salinidade morressem.

Os dados do experimento II foram analisados com a utilização de regressão quadrática e linear com 5% de significância (Zar, 1999). O coeficiente de determinação (Pearson  $r$  e  $r$ -quadrado,  $r^2$ ) foi usado como indicador de qualidade da regressão. Diferenças em peso e altura inicial dos juvenis dos diferentes reprodutores foram testadas através de ANOVA one-way, seguida do teste de Tukey. Todos os testes estatísticos foram analisados com o software SPSS versão 16.0 e são apresentados no texto em média  $\pm$  erro padrão.

Para determinação do ponto isosmótico os resultados foram submetidos à análise de regressão linear, na qual foi calculada a equação de regressão entre a osmolaridade do plasma e a osmolalidade da água. O ponto de intersecção entre esta reta e a linha isosmótica é considerado o ponto isosmótico (Sampaio e Bianchini, 2002).

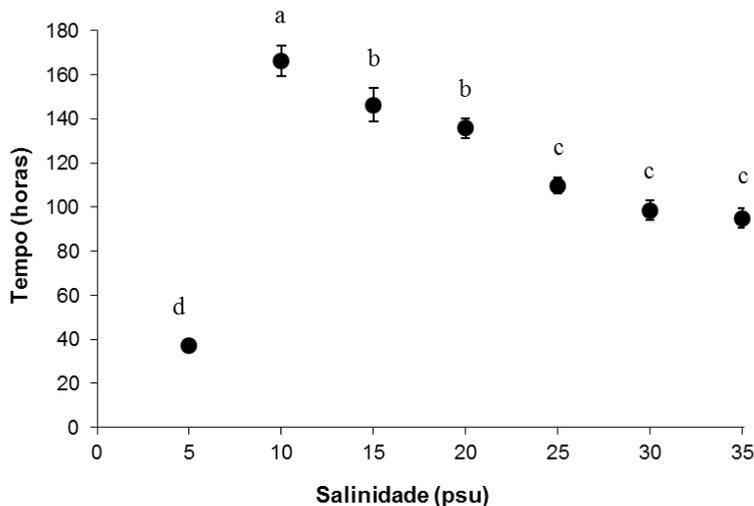
## 3 RESULTADOS

### 3.1 EXPERIMENTO I- TOLERÂNCIA À SALINIDADE DE JUVENIS

Todos os indivíduos submetidos à salinidade 0 psu morreram antes de 6 h de exposição. Em relação às demais salinidades, os juvenis de cavalo-marinho mostraram ser resistentes a transferência abrupta de salinidade.

A análise de *probit* dividiu os tratamentos em quatro grupos homogêneos (Figura 1) de acordo com o  $TL_{50}$ : *Grupo d*- peixes mantidos a 5 psu morreram mais cedo em relação as demais salinidades; *Grupo a*- indivíduos mantidos na salinidade de 10 psu apresentando o maior tempo de sobrevivência ( $TL_{50}$  de 166,2 horas), sendo que o último indivíduo morreu somente no 10<sup>o</sup> dia devido ao jejum; *Grupo b*- indivíduos mantidos nas salinidades de 15 e 20 psu com  $TL_{50}$  intermediários e *Grupo C*- indivíduos mantidos entre 25, 30 e 35 de salinidade com  $TL_{50}$  ainda menores.

**Figura 1** Tempo letal de 50% da população ( $TL_{50}$ ) determinado pela análise de *probit* ( $\pm$  erro). Letras a-d indicam grupos homogêneos de tratamentos.

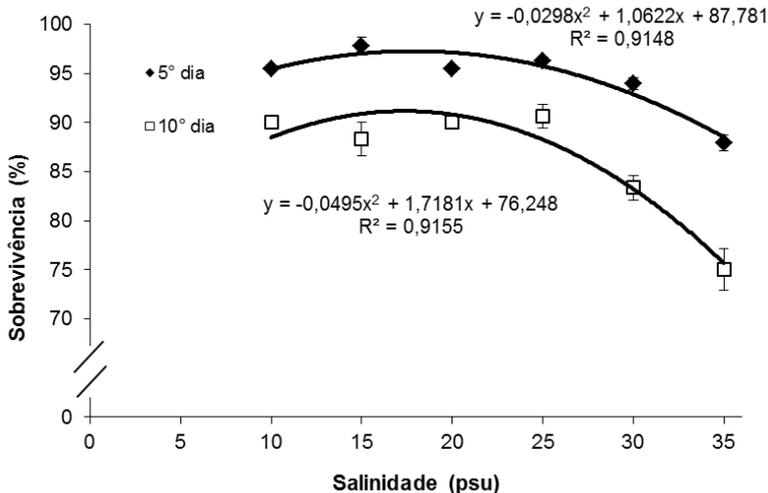


### 3.2 EXPERIMENTO II - SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE JUVENIS EM DIFERENTES SALINIDADES

Ao nascer, a altura ( $8,4 \pm 0,2$  mm) e o peso ( $12,70 \pm 1,50$  mg) dos juvenis de *H. reidi* não diferiram entre os diferentes reprodutores utilizados (ANOVAs, ambas  $P > 0,05$ ).

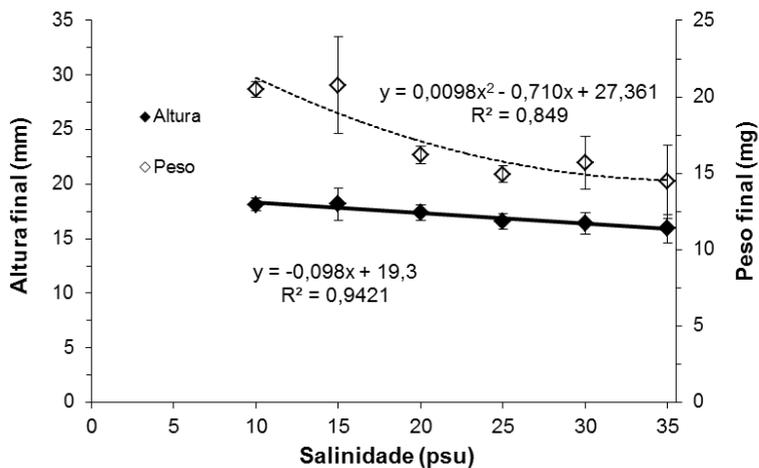
A sobrevivência mostrou ser dependente da salinidade no 5<sup>o</sup> e no 10<sup>o</sup> dia de vida dos juvenis de acordo com as regressões quadráticas (ambas  $P < 0,05$ ) (Figura 2). Na salinidade 5 psu foi observada mortalidade de 100% dos juvenis no segundo dia de exposição, dessa forma, essa salinidade não foi considerada. Mesmo após aclimação, o zooplâncton selvagem não foi capaz de sobreviver em 5 psu. Segundo as regressões da Figura 2, os melhores resultados de sobrevivência final foram observados entre 10 e 25 psu.

**Figura 2** - Sobrevivência média ( $\pm$  erro padrão) de juvenis de *Hippocampus reidi* submetidos a diferentes salinidades no 5<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dia de idade. A evolução da sobrevivência média em função da salinidade pode ser descrita pelas equações quadráticas mostradas.



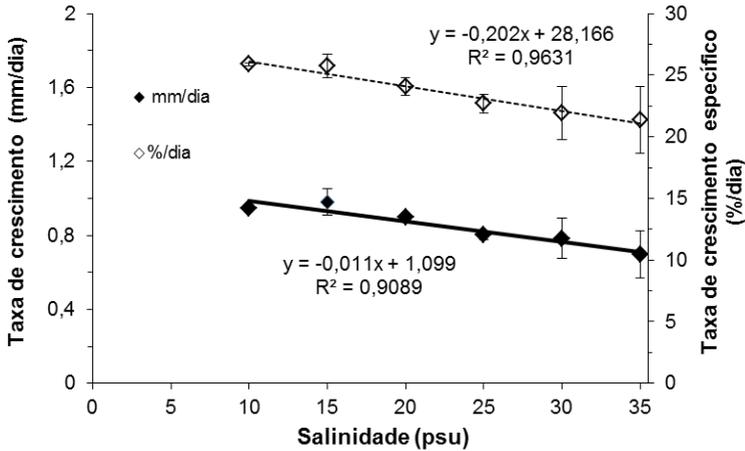
Altura e peso ao final do experimento foram negativamente correlacionados ao aumento da salinidade de 10 a 35psu ( $P < 0,05$ ;  $r_{\text{Altura}} = 0,970$ ;  $r_{\text{Peso}} = 0,921$ ) (Figura 3). A altura final aos 10 dias diminuiu a uma taxa aproximada de  $0,1 \text{ mm psu}^{-1}$  (valor da declividade  $b$ ; Figura 3). A redução no crescimento somente ficou detectável a partir do oitavo dia ( $P < 0,05$ ;  $r_{\text{Altura}} = 0,73$ ;  $b = -0,091$ ), não sendo detectado nos 2, 4 ou 6 dias (não apresentado). As maiores médias em altura final foram observadas em 10 psu ( $18,13 \pm 0,27 \text{ mm}$ ), 15 psu ( $18,18 \pm 0,62 \text{ mm}$ ) e 20 psu ( $17,39 \pm 0,28 \text{ mm}$ ) e em peso final nas salinidades 10 psu ( $20,50 \pm 1,83 \text{ mg}$ ) e 15 psu ( $20,75 \pm 2,68 \text{ mg}$ ).

**Figura 3** - Altura ( $\pm$  erro padrão) e peso final de *Hippocampus reidi* submetidos aos tratamentos de salinidade durante 10 dias. As equações referem-se à regressão quadrática (peso final) e regressão linear (altura final).



Correlação negativa com o aumento da salinidade também foi observada para a taxa de crescimento em altura e TCE em peso ( $P < 0,05$ ;  $r_{\text{mm}/\text{dia}} = 0,95$ ;  $r_{\%/\text{dia}} = 0,93$ ) (Figura 4).

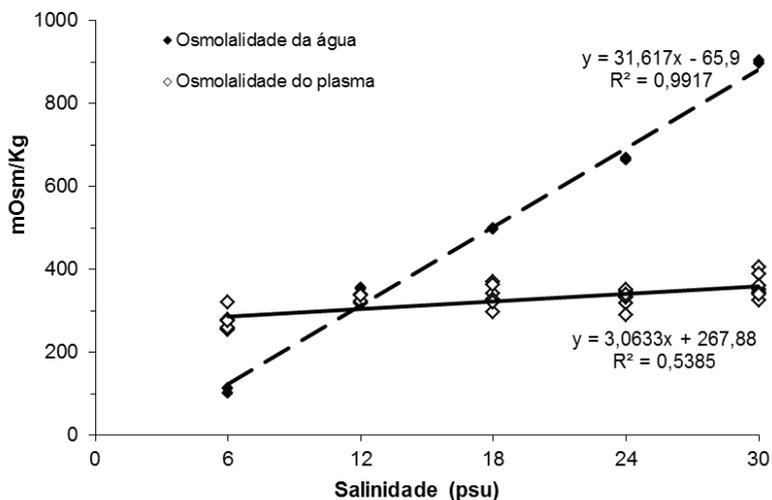
**Figura 4** - Taxa de crescimento em altura e taxa de crescimento específico (TCE) em peso ( $\pm$  erro padrão) de *Hippocampus reidi* submetidos a diferentes tratamentos de salinidades durante 10 dias. As equações das regressões lineares estão plotadas.



### 3.3 EXPERIMENTO III - DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOSMÓTICO DE *Hippocampus reidi*

A osmolalidade da água apresentou relação linear significativa ( $P < 0,05$ ;  $r = 0,98$ ) com a salinidade da água, enquanto que a relação com a osmolalidade do plasma foi mais suave, porém também apresentou significativa ( $P < 0,05$ ;  $r = 0,29$ ) e positiva relação linear com as salinidades testadas (Figura 5). O ponto isosmótico foi estimado em  $303,38 \text{ mOsm kg}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ , que corresponde a salinidade  $11,68 \text{ psu}$  (Figura 5).

**Figura 5** – Osmolalidade da água e do plasma de *Hippocampus reidi* expostos durante 12 dias a diferentes salinidades. O ponto isosmótico foi estimado em 11,68 psu (303,38 mOsm/kg).



#### 4 DISCUSSÃO

Juvenis recém nascidos de *H. reidi* mostraram ser resistentes tanto a um período prolongado sem alimentação, quanto a uma alteração abrupta de salinidade. Peixes mantidos em 10 psu sem alimentação apresentaram TL<sub>50</sub> de 166,2 horas (aproximadamente sete dias), enquanto que os mantidos em 30-35 psu, salinidade comumente utilizada no cultivo da espécie em experimentos (Olivotto et al., 2008; Willadino et al., 2012; Souza-Santos et al., 2013), mostraram TL<sub>50</sub> de aproximadamente 100 horas. Willadino et al. (2012) ao manterem *H. reidi* recém nascidos sem alimentação em salinidade 34,0 (± 1,2 psu) observaram que 50% dos animais morreram em aproximadamente 120 horas (cinco dias), o que está de acordo com os resultados do presente estudo. Corroborando com esta mesma ideia, foi sugerido que a causa da mortalidade de juvenis de *H. subelongatus*, *H. trimaculatus*, *H. kuda* e *H. reidi* (Payne e Rippingale, 2000; Sheng et al., 2006; Lin et al., 2008;

Hora e Joyeux, 2009) pode ter sido o jejum a partir do nascimento, o que levou a morte dos cavalos-marinhos aproximadamente neste mesmo período de tempo.

Em relação a tolerância à salinidade, na transferência de *H. reidi* de 30 psu para 5 até 35 psu, poucos indivíduos morreram nas primeiras 24 horas após esta troca. Esta capacidade de regular os íons do plasma mediante uma alteração rápida de salinidade reflete uma necessidade para peixes estuarinos poderem sobreviver a variações constantes que ocorrem neste ambiente (McCormick, 1995). Assim, *H. reidi* e outras espécies de cavalos-marinhos estuarinos, como *Hippocampus abdominalis*, *H. capensis* e *H. kuda*, possuem grande adaptabilidade as variações de salinidade (Foster & Vincent, 2004). Esta habilidade também foi observada por Hilomen-Garcia et al. (2003) para *H. kuda*, com nove semanas de vida, que foram transferidos bruscamente da salinidade de 33 psu para 10, 15, 20, 30, 40 e 50 psu, sem diferença significativa de sobrevivência e crescimento ao final de 18 dias. Outros juvenis e larvas de teleósteos marinhos e eurihalinos também mostraram ser resistentes à troca abrupta de salinidade como o *Siganus guttatus* (Young e Dueñas, 1993), *Lutjanus argentimaculatus* (Estudillo et al., 2000) e *Rachycentron canadum* (Faulk e Holt, 2006). Cavalos-marinhos, por apresentarem desenvolvimento precocial, no qual já nascem no formato do indivíduo adulto, possuem todos os órgãos desenvolvidos e já são capazes de se alimentar assim que nascem, aparentemente, por esses motivos, apresentam vantagem em relação à maioria dos teleósteos marinhos que possuem larvas planctônicas altriciais.

No ambiente natural, uma grande descarga fluvial no estuário poderia ocasionar grande diminuição de salinidade do ambiente, como ocorre no período chuvoso na região Nordeste do Brasil, onde estão sendo propostos cultivos de *H. reidi* em tanques-rede em região estuarina em tanques de camarões marinhos. Segundo Russell (1994) e Bell et al. (2003), apesar dos cavalos-marinhos estuarinos tolerarem flutuações de salinidade, um grande aporte de água doce no ambiente poderia ocasionar altas taxas de mortalidade, ainda mais se uma condição de baixa salinidade perdurasse por período de tempo prolongado. É importante enfatizar que, no presente estudo, na salinidade de 0 psu, todos os animais morreram no teste de tolerância. Hilomen-Garcia et al., (2003) ao transferir bruscamente juvenis de *H. kuda* de nove semanas de idade da salinidade 33 a 35 psu para a salinidade 0 psu, observou que entre 4 e 24 horas todos os indivíduos

morreram. Uma alternativa em períodos de baixa salinidade, no caso dos animais mantidos em tanques-rede, seria transferi-los para locais com pouca variação de salinidade ou para sistemas de recirculação.

Na salinidade de 5 psu, os juvenis nos testes de tolerância, bem como no experimento de crescimento também não sobreviveram muito mais que 48 horas. O zooplâncton selvagem ofertado aos animais durante o experimento de crescimento nesta salinidade também não suportou esta condição salina e morreu. Além do zooplâncton selvagem servir como alimento para os cavalos-marinhos, ele seria importante na reposição dos íons, pois em meio hipotônico os teleósteos tendem a perder íons, assim, para a manutenção homeostásica grande parte destes sais são ingeridos em forma de alimento. Além disso, eles possuem um eficiente sistema de reabsorção renal que evita a perda destes em excesso, ao mesmo tempo em que as brânquias trabalham no sentido de captar íons da água (Karnaky, 1998; Hwang e Lee, 2007).

O efeito da salinidade no crescimento de teleósteos marinhos e estuarinos pode variar consideravelmente para cada espécie e com a ontogenia, como relatado por Blanco Garcia et al. (2014). Entretanto, muitos destes organismos apresentam melhor crescimento (Woo e Kelly, 1995; Dutil et al., 1997; Tsuzuki et al., 2007; Imsland et al., 2008), conversão alimentar (Imsland et al., 2008) desenvolvimento larval (Griffin et al., 1998; Zhang et al., 2010) e atividade enzimática (Le François et al., 2004; Tsuzuki et al., 2007), em salinidades intermediárias, próximas da salinidade do meio osmótico interno. Corroborando com esses autores, o presente estudo obteve os melhores resultados de  $TL_{50}$ , sobrevivência e crescimento nas salinidades próximas ao valor do ponto isosmótico da espécie (11,68 psu).

Como também relatado neste trabalho, diversas outras espécies marinhas e estuarinas como, *Paralichthys orbignyanus* (Sampaio e Bianchini, 2002), *Siganus rivulatus* (Saoud et al., 2007), *Dicologo glossacuneata* (Herrera et al., 2009), *Sparus aurata* (Bodinier et al., 2010), *Pagrus pagrus* (Ostrowski et al., 2011), *Seriola lalandi* (Blanco Garcia et al., 2014) entre outros, possuem o ponto osmótico em torno de um terço da salinidade da água salgada (11- 14 psu; aproximadamente 350 mOsm/kg) (Boeuf e Payan, 2001; Nordlie, 2009). Quando expostos a um ambiente isosmótico em relação ao seu meio interno, os peixes tendem a gastar menos energia no processo de osmorregulação, direcionando-a assim para o seu crescimento (Boeuf e Payan, 2001; O'Neill et al., 2011). Porém, segundo Swanson (1998), a adaptação á salinidade em teleósteos eurihalinos é um processo

complexo que envolve uma série de respostas fisiológicas e comportamentais para ambientes com diferentes demandas osmorregulatórias. As alterações fisiológicas no crescimento de teleósteos marinhos em salinidades intermediárias parecem ser mais complexas do que a redução no custo metabólico para osmorregulação. O autor sugere que os peixes utilizam estratégias flexíveis na distribuição de energia para manter a atividade e o crescimento em resposta às variações ambientais.

As taxas de crescimento das salinidades 25, 30 e 35 psu ( $0,80 \pm 0,03$ ;  $0,78 \pm 0,11$  e  $0,69 \pm 0,12$  mm/dia) verificadas neste estudo foram equivalentes à observada por Hora e Joyeux (2009) ( $0,74 \pm 0,02$  mm/dia) para *H. reidi* cultivados em salinidades variando de 26,5 a 29,0 psu até o início da maturação sexual (60 dias). No presente estudo, as maiores médias de taxas de crescimento, altura final e peso final foram observadas para as salinidades 10 a 20 psu. Hilomen-Garcia et al. (2003) também encontraram melhor desenvolvimento em salinidade intermediária (15 e 20 psu) para *H. kuda* submetidos as salinidades de 0 a 85 psu. Já Lin et al. (2009), analisaram o efeito das salinidades 27 a 35 psu em jovens adultos de *Hippocampus erectus*, obtiveram melhor crescimento em salinidades entre 31 e 33 psu. Melo-Valença et al. (2013) observou para *H.reidi* submetidos ao intervalo de 27 a 36 psu que o melhor resultado encontrado de crescimento e sobrevivência foi para a menor salinidade testada.

O presente estudo verificou que as melhores salinidades para o cultivo de juvenis de *H. reidi*, levando-se em consideração a tolerância a salinidade, sobrevivência e crescimento, estão entre 10 e 25 psu e que o ponto osmótico da espécie foi estimado em 11,68 psu.

Assim, a utilização de salinidade intermediária para a produção em escala comercial é vantajosa porque, além de maximizar a sobrevivência e o crescimento da espécie, necessitaria de menor captação de água salgada ou compra de sal, o que facilitaria a produção em locais afastados da costa.

## 5 REFERÊNCIAS

- Bell, E. M., Lockyear, J. F., McPherson, J. M., Marsden, A. D. & Vincent, A. C. J., 2003. The first field studies of an endangered South African seahorse, *Hippocampus capensis*. *Envir. Biol. Fishes* 67, 35–46.

- Blanco Garcia, A., Partridge, G. J., Flik, G., Roques, J. a C., & Abbink, W. (2014). Ambient salinity and osmoregulation, energy metabolism and growth in juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi* Valenciennes 1833) in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture Research*, 1–9.
- Bodinier, C., Sucré, E., Lecurieux-Belfond, L., Blondeau-Bidet, E., Charmantier, G., 2010. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 157, 220-8.
- Boeuf, G., Payan, P., 2001. How should salinity influence fish growth? *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 130, 411-23.
- CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna), 2008. Appendices I, II e III. [www.cites.org](http://www.cites.org). Downloaded on 01 November 2014.
- Dutil, J.-D., Lambert, Y., Boucher, E., 1997. Does higher growth rate in Atlantic cod (*Gadus morhua*) at low salinity result from lower standard metabolic rate or increased protein digestibility? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 99-103.
- Estudillo, C.B., Duray, M.N., Marasigan, E.T., Emata, A.C., 2000. Salinity tolerance of larvae of the mangrove red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) during ontogeny. *Aquaculture* 190, 155-167.
- Faulk, C.K., Holt, G.J., 2006. Responses of cobia *Rachycentron canadum* larvae to abrupt or gradual changes in salinity. *Aquaculture* 254, 275-283.
- Foster, S.J., Vincent, A.C.J., 2004. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *J. Fish Biol.* 65, 1–61.
- Froese, R. & Pauly, D. (2013). FishBase. Available from: <http://www.fishbase.org> (accessed 1 November 2014).
- Griffin, F.J., Pillai, M.C., Vines, C.A., Kaaria, J., Hibbard-Robbins, T., Yanagimachi, R., Cherr, G.N., 1998. Effects of salinity on sperm motility, and development in the pacific herring, Chpeapallasi. *Biol. Buletim* 194, 25-35.
- Herrera, M., Vargas-Chacoff, L., Hachero, I., Ruíz-Jarabo, I., Rodiles, A., Navas, J.I., Mancera, J.M., 2009. Osmoregulatory changes in wedge sole (*Dicologoglos sacuneata* Moreau, 1881) after acclimation to different environmental salinities. *Aquac. Res.* 40, 762-771.

- Hilomen-Garcia, G. V., Delos Reyes, R., Garcia, C.M.H., 2003. Tolerance of seahorse *Hippocampus kuda* (Bleeker) juveniles to various salinities. *J. Appl. Ichthyol.* 19, 94-98.
- Hora, M.S.C., Joyeux, J.-C., 2009. Closing the reproductive cycle: Growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions. *Aquaculture* 292, 37-41.
- Hwang, P.P; Lee, T.H., 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion rich cells. *Comparative Biochemistry and Physiology* 148, 479-497.
- Imsland, A.K., Gústavsson, A., Gunnarsson, S., Foss, A., Árnason, J., Arnarson, I., Jónsson, A.F., Smáradóttir, H., Thorarensen, H., 2008. Effects of reduced salinities on growth, feed conversion efficiency and blood physiology of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 274, 254-259.
- Karnaky, K. J., 1998. Osmotic and ionic regulation. In: *The Physiology of Fishes*. Washington DC – NY. 544p.
- Koldewey, H.J., Martin-Smith, K.M., 2010. A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture* 302, 131–152.
- Le François, N., Lamarre, S., Blier, P., 2004. Tolerance, growth and haloplasticity of the Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) exposed to various salinities. *Aquaculture* 236, 659-675.
- Lin, Q., Lin, J., Zhang, D., 2008. Breeding and juvenile culture of the lined seahorse, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture* 277, 287–292.
- Lin, Q., Zhang, D., Lin, J., 2009. Effects of light intensity, stocking density, feeding frequency and salinity on the growth of sub-adult seahorses *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture* 292, 111-116.
- 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. 214 pp.
- McCormick, S.D., 1995. Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase activity. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 50, 656-658.
- Melo-Valencia, A.F., Ospina-Salazar, G.H., Gómez-León, J., Cortés-Pineda, F.A., 2013. Efecto de la salinidad en la supervivencia y crecimiento de crias de caballito de mar *Hippocampus reidi* Ginsburg en cautiverio. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 42, 193-201.

- Nordlie, F.G., 2009. *Environmental* influences on regulation of blood plasma/serum components in teleost fishes: a review. *Rev. Fish Biol. Fish.* 19, 481-564.
- Nunes, R. A., 2010. Composição e estrutura da comunidade zooplancônica de um estuário tropical (Espírito Santo, Brasil). Programa de pós-graduação em oceanografia ambiental. Vitória-ES, 70p.
- O'Neill, B., De Raedemaeker, F., McGrath, D., Brophy, D., 2011. An experimental investigation of salinity effects on growth, development and condition in the European flounder (*Platichthys flesus* L.). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 410, 39-44.
- Olivotto, I., Avella, M. a., Sampaolesi, G., Piccinetti, C.C., Navarro Ruiz, P., Carnevali, O., 2008. Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: Rearing and feeding studies. *Aquaculture* 283, 92-96.
- Olivotto, I., Planas, M., Simões, N., Holt, G.J., Avella, M.A., Calado, R., 2011. Advances in Breeding and Rearing Marine Ornamentals. *J. World Aquac. Soc.* 42, 135–166.
- Ostrowski, A.D., Watanabe, W.O., Montgomery, F.P., Rezek, T.C., Shafer, T.H., Morris, J. A., 2011. Effects of salinity and temperature on the growth, survival, whole body osmolality, and expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase mRNA in red porgy (*Pagrus pagrus*) larvae. *Aquaculture* 314, 193-201.
- Payne, M., Rippingale, R., 2000. Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched Artemia. *Aquaculture* 188, 353–361.
- Pham, N.K., Lin, J., 2013. The Effects of Different Feed Enrichments on Survivorship and Growth of Early Juvenile Longsnout Seahorse, *Hippocampus reidi*. *J. World Aquac. Soc.* 44, 435–446.
- Resley, M.J., Webb, K. a., Holt, G.J., 2006. Growth and survival of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, at different salinities in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture* 253, 398-407.
- Russell, I.A., 1994. Mass mortality of marine and estuarine fish in the Swartvlei and Wilderness Lake Systems, Southern Cape. *S. Afr. J. Aquatic Sci.* 20, 93–96.
- Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 269, 187-196.
- Saoud, I.P., Kreydiyyeh, S., Chalfoun, A., Fakih, M., 2007. Influence of salinity on survival, growth, plasma osmolality and gill Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-

- ATPase activity in the rabbitfish *Siganus rivulatus*. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 348, 183-190.
- Sheng, J., Lin, Q., Chen, Q., Shen, L., Lu, J., 2007. Effect of starvation on the initiation of feeding, growth and survival rate of juvenile seahorses, *Hippocampus trimaculatus* Leach and *Hippocampus kuda* Bleeker. Aquaculture 271, 469–478.
- Silveira, R.B., Siccha-ramirez, R., Rodrigo, J., Silva, S., Oliveira, C., 2014. Morphological and molecular evidence for the occurrence of three *Hippocampus* species (Teleostei: Syngnathidae) in Brazil 3861, 317–332.
- Souza-Santos, L.P., Regis, C.G., Mélo, R.C.S., Cavalli, R.O., 2013. Prey selection of juvenile seahorse *Hippocampus reidi*. Aquaculture 404-405, 35-40.
- Swanson, C., 1998. Interactive effects of salinity on metabolic rate, activity, growth and osmoregulation in the euryhaline milkfish *Chanos chanos*. J. Exp. Biol. 201, 3355-3366.
- Tsuzuki, M.Y., Sugai, J.K., Maciel, J.C., Francisco, C.J., Cerqueira, V.R., 2007. Survival, growth and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook (*Centropomus parallelus*) reared at different salinities. Aquaculture 271, 319-325.
- Willadino, L., Souza-Santos, L.P., Mélo, R.C.S., Brito, A.P., Barros, N.C.S., Araújo-Castro, C.M.V., Galvão, D.B., Gouveia, A., Regis, C.G., Cavalli, R.O., 2012. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. Aquaculture 360-361, 10-16.
- Woo, N.Y.S., Kelly, S.P., 1995. Effects of salinity and nutritional status on growth and metabolism of *Sparus sarba* in a closed seawater system. Aquaculture 135, 229-238.
- Young, P.S., Dueiias, C.E., 1993. Salinity tolerance of fertilized eggs and yolk-sac larvae of the rabbitfish *Siganus guttatus* (Bloch). Aquaculture 112, 363-377.
- Zar, J.H., 1999. Biostatistical analysis, 4th ed. Prentice-Hall, Upper Saddle River. 663 pp. + Appendices.
- Zhang, G., Shi, Y., Zhu, Y., Liu, J., Zang, W., 2010. Effects of salinity on embryos and larvae of tawny puffer *Takifugus flavidus*. Aquaculture 302, 71-75.

## CAPÍTULO 2

### **Condições abióticas para o crescimento e sobrevivência de juvenis de cavalo-marinho *Hippocampus reidi*: Efeito do fotoperíodo e da cor de tanque**

Maik dos Santos Cividanes da Hora<sup>a,b\*</sup>, Jean-Christophe Joyeux<sup>b</sup>, Helder Coelho Guabiroba Júnior<sup>b</sup>, Mônica Yumi Tsuzuki<sup>a\*</sup>

#### **Resumo**

O efeito do fotoperíodo e da cor de tanque sobre a sobrevivência e o crescimento de juvenis de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* foi investigado nos primeiros 15 dias de vida. No primeiro experimento, os recém-nascidos foram expostos a 6 fotoperíodos (06 horas de Luz: 18 horas de Escuro, 10L:14E, 12L:12E, 14L:10E, 18L:06E e 24L:00E). No segundo experimento, os filhotes foram mantidos em tanques de diferentes cores (azul, branco, preto, transparente e vermelho). Não houve diferença significativa no crescimento e sobrevivência entre os juvenis submetidos de 10 a 24 horas de luz. Os animais expostos a 06L:18E revelaram menor crescimento em altura e peso (13,8 mm vs. 20,0 mm a 22,2 mm e 13,4mg vs. 37,2 mg a 43,2 mg) e baixa sobrevivência (80% vs. 88% a 95%). Não houve diferença no crescimento e na sobrevivência entre juvenis submetidos às diferentes cores de tanque. O fotoperíodo entre 10L:14E a 14L:10E é indicado para manter boa razão custo-benefício do cultivo.

**Palavras-chaves:** Cavalo-marinho do focinho longo, peixe ornamental, aquário.

## 1. INTRODUÇÃO

Assim como vários setores da aquicultura, o cultivo de organismos ornamentais marinhos cresce em todo o mundo. Como exemplo, no início dos anos 2000 nos Estados Unidos, a produção de peixes ornamentais era o quarto maior setor dentro da aquicultura (Tlusty, 2002). Mesmo assim, estima-se que apenas de 1 a 10% dos peixes ornamentais marinhos comercializados sejam provenientes de cultivo (Moorhead e Zeng, 2010), o restante é coletado diretamente no ambiente natural, o que provoca diversos prejuízos ambientais. Explosivos e venenos como o cianeto, utilizados em alguns dos principais países coletores como as Filipinas e a Indonésia são métodos destrutivos que provocam danos permanentes ao ecossistema recifal (Wood, 2001; Calado, 2006). Além disso há uma elevada taxa de mortalidade pós-coleta que só no Brasil foi estimada em 30 a 40% (Gasparini et al., 2005). Aliado a isso, alguns organismos ornamentais, por serem mais populares, estão expostos mais a sobrepesca (Tissot e Hallachert, 2014) como foi detectado por Rosa et al., (2007) para o cavalo-marinho *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 no Nordeste do Brasil.

Nos últimos anos, os cavalos-marinhos tem sido foco de esforços para conservação devido a sua grande demanda para a aquariofilia, artesanato e principalmente para a medicina tradicional chinesa, o que tem impactado as populações naturais. Uma possível alternativa para ajudar na conservação e suprir a demanda destes peixes, seria o aprimoramento de metodologias de cultivo (Tlusty, 2002).

Estudos sobre o cultivo de cavalos-marinhos têm crescido nas últimas duas décadas (Koldewey e Martin-Smith, 2010). Porém, trabalhos nesta área com a espécie *H. reidi* só foram publicados recentemente (Olivotto et al., 2008; Hora e Joyeux, 2009; Willadino et al., 2012; Pham e Lin, 2013; Souza-Santos et al., 2013; Melo-Valença et al., 2013). Dentre estes, Hora e Joyeux (2009) analisam o crescimento de *H. reidi* entre o nascimento e a maturação sexual, também fornecendo informações sobre a mortalidade *ex situ*, a razão sexual e aspectos reprodutivos de jovens adultos. Porém, a grande maioria dos trabalhos abordam aspectos alimentares, e poucos têm foco na avaliação do efeito de condições abióticas no crescimento e na sobrevivência destes animais em cativeiro.

A influência de fatores abióticos nos peixes tem sido estudada principalmente em relação ao seu efeito no crescimento e na reprodução.

Uma vez que *H. reidi* é um predador visual e diurno (Felfício et al., 2006), condições que favoreçam a ingestão de presas para maximizar o crescimento e a sobrevivência como a orientação luminosa, a intensidade da luz e o comprimento de onda, o contraste da presa contra o fundo, o fotoperíodo e a cor do tanque são essenciais para o aprimoramento de um protocolo de cultivo.

Dentre os fatores abióticos, o fotoperíodo é o que apresenta maior influência sobre o relógio biológico dos peixes afetando o ganho de peso, a ingestão de alimento, a eficiência alimentar, o gasto energético, a atividade locomotora, a reprodução, bem como outros parâmetros fisiológicos relacionados ao estresse (Boeuf e Le Bail, 1999; Biswas et al., 2005, 2010; Inslan et al., 2013). Desta forma, a manipulação do fotoperíodo tem sido utilizada com sucesso para aumentar o crescimento de juvenis de diversas espécies de peixes (Villamizar et al., 2011a). Contudo, a sua influência no crescimento e na sobrevivência varia, podendo ser espécie-específica, além de depender da fase de desenvolvimento do peixe (Boeuf e Le Bail, 1999). Em geral, um período maior de luz provoca maior taxa de crescimento e melhora a qualidade do cultivo larval (Boeuf e Le Bail, 1999; Villamizar et al., 2011a). Porém, Villamiza et al., (2011a) também ressaltam que uma iluminação constante pode afetar negativamente as larvas de teleosteos, resultando em má formação e baixa sobrevivência.

O *H. reidi* distribui-se da Carolina do Norte (EUA), Bermudas e Bahamas até o Rio Grande do Sul (Brasil) (Froese e Pauly, 2014), estando assim, exposto a um período diário de luz que varia de 10 a 14 horas dependendo da estação do ano e da localidade. A maior parte dos estudos com cavalos-marinhos em cativeiro utilizaram fotoperíodo de 12 horas de luz (Koldewey e Martin-Smith, 2010). Olivotto et al., (2008), testaram o efeito da alimentação juntamente com dois fotoperíodos (14 e 24 horas de luz) em *H. reidi*. Apesar dos melhores resultados encontrados serem para o fotoperíodo de 24 horas de luz, a mortalidade foi superior a 70% em três semanas.

A cor do tanque é outro importante fator a ser considerado na criação de peixes, uma vez que pode induzir a diferentes respostas em relação à conversão alimentar, crescimento, sobrevivência e estresse (Papoutsoglou et al., 2000, 2005, Rotllant et al., 2003). Para algumas espécies, esta também afeta a pigmentação da pele (Doolan et al., 2008), o comportamento agonístico e a atividade motora (Merighe et al., 2004). Tanques com paredes escuras são os preferidos para larvicultura de peixes marinhos (Naas et al., 1996), pois a detecção da comida pela

larva é uma questão de contraste entre o alimento e o plano de fundo (Browman e Marcotte, 1987). Em cavalos-marinhos, estudos foram realizados somente com *H. abdominalis* (Martinez-Cardenas e Purser, 2007; Woods, 2000) e *H. erectus* (Lin et al., 2009), não havendo uma preferência de cor para a primeira espécie, enquanto que a segunda apresentou maior crescimento em tanques pretos. A fim de contribuir para o aprimoramento do protocolo de cultivo de *H. reidi*, o objetivo deste estudo foi determinar o melhor fotoperíodo e a cor de tanque para os juvenis nos primeiros 15 dias de vida, fase mais crítica, onde ocorrem as maiores taxas de mortalidade na espécie (Olivotto et al., 2011).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Ictiologia e Maricultura Ornamental (LabIMO), da Universidade Federal do Espírito Santo, Aracruz-ES, Brasil.

### 2.1 ORIGEM E MANUTENÇÃO DOS REPRODUTORES

Seis casais de *H. reidi* foram capturados na Baía do Espírito Santo, Vitória-ES, Brasil (20°19' S, 40°20' W) (autorização ICM-Bio/SISBIO n° 23924-1) e acondicionados separadamente em aquários de aproximadamente 60L (40cm comprimento x 34cm largura x 45cm altura) pertencentes a um sistema de recirculação de aproximadamente 1000L, equipado com skimmer, filtro biológico de alga calcária (aproximadamente 150 kg), bag filtrante de 100µm e filtro ultravioleta de 35W e com um fluxo de água para os aquários de 100L.h<sup>-1</sup> (Anexo 1). O fotoperíodo para as matrizes foi de 12L (horas de Luz):12E (horas de Escuro). Os animais eram alimentados quatro vezes ao dia, duas vezes pela manhã e duas na parte da tarde até a saciedade. A alimentação consistia de misidáceos *Mysidium gracile* (CRUSTACEA: Misidacea) coletados no ambiente natural e congelados. Os aquários eram sifonados três vezes ao dia na parte da tarde, antes das duas ofertas de alimento e uma hora após a última alimentação para remover restos de alimento e fezes do fundo. As matrizes permaneceram no sistema por aproximadamente dois meses até a realização dos experimentos.

## 2.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram realizados dois experimentos, para cada um deles foram utilizadas duas ninhadas que nasceram no mesmo dia totalizando 1607 (experimento de fotoperíodo) e 1473 (experimento de cor de tanque) filhotes nascidos. Estes recém-nascidos foram alocados em um tanque, e os 120 indivíduos necessários para cada um dos tratamentos foram separados aleatoriamente. Os tratamentos foram realizados em triplicata usando aquários de 20L (2 indivíduos.L<sup>-1</sup>). Os filhotes remanescentes foram anestesiados com benzocaína, a uma concentração de 30 mg.L<sup>-1</sup>, e conservados em álcool 70%.

Foi utilizado um sistema de recirculação de água composto por 18 aquários de 20L (parte com água: 24,4 x 24,5 x 33,3 cm de altura), contendo os mesmos equipamentos do sistema onde foram mantidas as matrizes, sendo que o fluxo de água de cada aquário era de 40L/h.

A alimentação para os dois experimentos seguiu o protocolo de Hora et al. (*in prep. capítulo 1*) com modificações. Os recém-nascidos foram alimentados de três a quatro vezes ao dia até a saciedade aparente. Do primeiro ao 5<sup>o</sup> dia de idade os juvenis foram alimentados exclusivamente com zooplâncton selvagem vivo coletado no estuário do rio Piraquê-Açu, Aracruz - ES, Brasil (40° 09' 14,41"O, 19° 57' 01,13"S) com auxílio de uma rede de plâncton cônica de malha 100µm. Posteriormente à coleta, o zooplâncton foi triado (300µm) para a retirada dos organismos maiores. A comunidade zooplancônica estuarina no Piraquê-Açu é largamente dominada por copépodes *Acartia lilljeborgi*, *Temora turbinata*, *Parvocalanus crassirostris*, *Oithona oswaldocruzi*, *Oithona oculata*, *Euterpina acutifrons* e *Paracalanus parvus* (Nunes, 2010). A partir do 5<sup>o</sup> dia até o fim do experimento foi ofertado náuplios recém eclodidos e/ou metanáuplios de *Artemia sp.* enriquecidos com Super Selco® (Inve, Bélgica), de acordo com metodologia do fabricante. A troca de alimentação ocorreu de maneira gradual: No primeiro dia de transição (5<sup>o</sup> dia de vida dos juvenis) foi ofertado 75% de zooplâncton selvagem e 25% *Artemia sp.*, no segundo dia 50% de cada alimento, no terceiro dia de transição foi oferecido 25% de zooplâncton selvagem e 75% de *Artemia sp.* e a partir do quarto dia (8<sup>o</sup> dia de vida) 100% de *Artemia sp.*

Os parâmetros físico-químicos da água do sistema de recirculação foram aferidos diariamente. A temperatura da água se manteve em 25,7 ± 0,4°C (média ± desvio padrão), a salinidade em 20 psu, de acordo com os melhores resultados encontrado por Hora et al.

(*in prep. capítulo 1*), sendo aferidos com o medidor multiparâmetro YSI ec300 (precisão de 0,1). O pH foi mensurado com pHmetro elétrico (modelo ph-700, Instrutherm, USA) de precisão 0,1 e ficou entre 8,1 e 8,2. A amônia total e o nitrito, medidos com teste colorimétrico, permaneceram sempre abaixo de 0,05 mg.<sup>-1</sup>. O oxigênio foi aferido com um oxímetro (MO-910, Instrutherm, USA) e manteve-se entre 6,8 e 7,1 mg.<sup>-1</sup>.

### **2.2.1. Experimento de Fotoperíodo**

Foram testados 6 fotoperíodos: 06L:18E; 10L:14E, 12L:12E; 14L:10E, 18L:06E e 24L:00E. Todos os aquários foram cobertos com lona preta e isolados de qualquer iluminação externa e o fotoperíodo foi controlado por timer analógico.

Uma das réplicas do fotoperíodo de 18L:06E foi descartada da análise estatística devido a mortalidade total dos indivíduos, a causa não foi identificada.

### **2.2.2. Experimento de cor de tanque**

Foram testadas cinco cores de tanque: Azul; Branco; Preto; Vermelho e Transparente. Para a alteração da cor dos tanques, plásticos rígidos com as cores de cada tratamento foram colados nas paredes dos aquários, com exceção do tratamento Transparente. O fotoperíodo foi de 12L:12E.

## **2.3. BIOMETRIA**

O crescimento, tanto em altura quanto em peso, foi estimado como a média de seis indivíduos amostrados aleatoriamente no dia do nascimento (dia zero) e seis indivíduos amostrados aleatoriamente em cada unidade experimental no 5<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia (258 indivíduos mensurados no experimento de fotoperíodo, e 276 animais para o experimento cor de tanque). Os animais foram anestesiados com benzocaína (5 mg.<sup>-1</sup>), fotografados e pesados individualmente (precisão 0,1mg) usando como tara um bequer de 50mL com água do sistema e devolvidos em seu aquário de origem. Após a biometria, não houve alteração evidente de comportamento e os peixes foram capazes de se alimentar imediatamente. Fotos graduadas de cada indivíduo foram utilizadas para a medição dos animais no programa SigmaScan Pro 5<sup>®</sup>

(Anexo 2), sendo a altura dos cavalos-marinhos definida como a soma da altura da coroa, do comprimento do tronco e do comprimento da cauda (Lourie et al., 1999).

A partir dos dados biométricos, foram calculadas:

- Taxa de crescimento diário (*TCD*, em  $\text{mm.dia}^{-1}$ ):

como sendo a declividade *b* da regressão linear

$$\text{Altura} = a + b.\text{Idade}$$

- Taxa de crescimento específico em peso ( $\% \text{dia}^{-1}$ ):

$$\text{TCE} = 100 \times (\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial})) / \text{tempo}$$

- Coeficiente de variação da altura:

$$\text{CV} = 100 \times (\text{desvio padrão da altura} / \text{média da altura}).$$

## 2.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

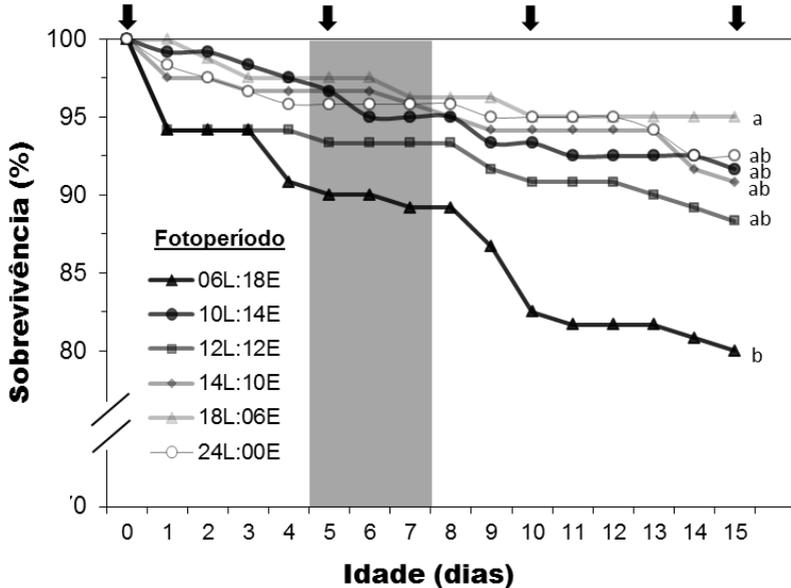
Os dados testados nas análises descritas em seguida são apresentados como médias  $\pm$  erro padrão das três réplicas. A normalidade e a homocedasticidade dos dados dos dois experimentos foram testados. Os dados de sobrevivência de ambos os experimento não foram normais nem homocedásticos e, portanto foram transformados por arco seno. Para cada idade testada, foi aplicada análise da variância ANOVA one way para verificar diferenças estatísticas entre os tratamentos. Em todas as idades (do 1<sup>o</sup> ao 15<sup>o</sup> dia) foram testadas para a sobrevivência enquanto somente no 5<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia foram testadas para as variáveis descrevendo o crescimento. Diferenças detectadas foram testadas por teste *post hoc* de Tukey HSD. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. Todas as análises foram realizadas assumindo nível de significância  $\alpha=0,05$  utilizando o programa SPSS 16.0.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 EXPERIMENTO DE FOTOPERÍODO

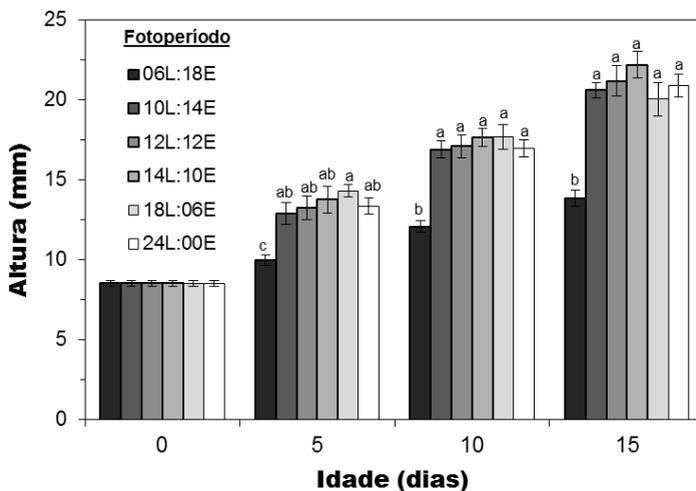
A partir do 11<sup>o</sup> dia, o teste de *post-hoc* de Tukey revelou a existência de dois grupos homogêneos que permaneceram até o final do experimento ( $P > 0,05$ ) (Figura 1), onde somente a menor taxa de sobrevivência ( $80,0 \pm 5,2\%$  para 06L:18E) foi significativamente diferente da maior taxa ( $95,0 \pm 2,5\%$  para 18L:06E). A baixa sobrevivência no fotoperíodo de 06L:18E esta relacionado a altas taxas de mortalidade antes e imediatamente depois da troca de alimentação.

**Figura 1** – Sobrevivência acumulada (%) de juvenis de *Hippocampus reidi* submetidos a diferentes fotoperíodos (os erros padrões foram omitidos para melhor visualização). Os grupos homogêneos detectados pelos testes *post-hoc* de Tukey HSD na ANOVA realizada no final do experimento são indicados pelas letras (letras diferentes indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ )). A faixa vertical cinza indica a transição da alimentação e as setas o dia de amostragem para a biometria.

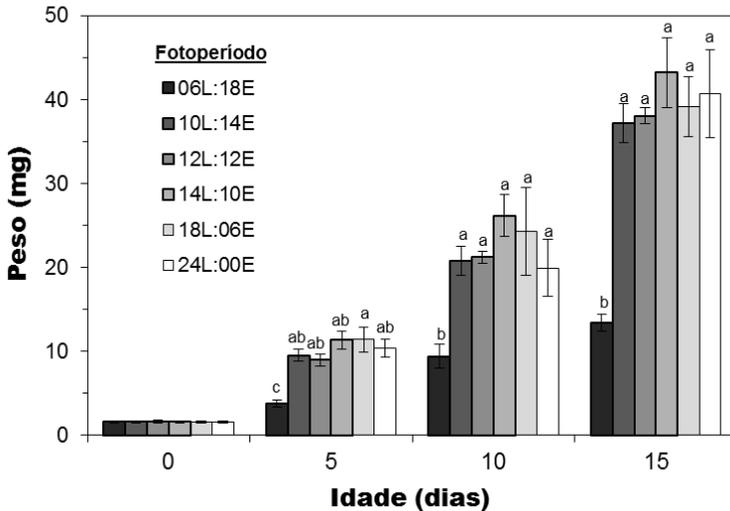


Os cavalos-marinhos nasceram com média de altura de  $8,52 \pm 0,16$  mm e peso de  $1,58 \pm 0,10$ mg. Em ambos os parâmetros (peso e altura), em todas as idades amostradas ( $5^{\text{o}}$ ,  $10^{\text{o}}$  e  $15^{\text{o}}$  dias de idade) foi observado menor crescimento no menor fotoperíodo testado (06L:18E) ( $P < 0,05$ ) (Figura 2 e 3). Os peixes no menor fotoperíodo apresentaram ao final do experimento ganho de altura e de peso aproximadamente 1,5 e 3,0 vezes menor que os demais tratamentos.

**Figura 2** – Altura média ( $\pm$  erro padrão) de juvenis de *Hippocampus reidi* no dia do nascimento e no 5<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias de vida sob diferentes fotoperíodos. Letras diferentes na mesma idade indicam diferença significativa entre tratamentos ( $P < 0,05$ ).



**Figura 3** – Peso médio ( $\pm$  erro padrão) de juvenis de *Hippocampus reidi* no dia do nascimento e nos 5<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias de vida sob diferentes fotoperíodos. Letras diferentes na mesma idade indicam diferença significativa entre tratamentos ( $P < 0,05$ ).



As menores TCD e TCE foram obtidas para o menor fotoperíodo (Tabela 1; ANOVAs, ambas com  $P > 0,05$ ). O teste não detectou diferença significativa no CV entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

Tabela 1: Estatísticas descritivas (média  $\pm$  erro padrão) para o crescimento e a sobrevivência de juvenis de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* submetidos a seis fotoperíodos: taxa de crescimento diário (TCD), coeficiente de variação da altura aos 15 dias de idade (CV) e taxa de crescimento específico (TCE). Letras diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos (testes *post-hoc* de Tukey HSD,  $P < 0,05$ ).

Fotoperíodo	TCD (mm.dia <sup>-1</sup> )	TCE (% dia <sup>-1</sup> )	CV (%)	Sobrevivência Final (%)
06L:18E	0,36 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	11,84 $\pm$ 0,51 <sup>b</sup>	13,7 $\pm$ 0,5	80,0 $\pm$ 5,2 <sup>b</sup>
10L:14E	0,80 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	17,15 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	16,9 $\pm$ 1,3	91,67 $\pm$ 3,6 <sup>ab</sup>
12L:12E	0,83 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	17,28 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	18,2 $\pm$ 0,1	88,3 $\pm$ 3,0 <sup>ab</sup>
14L:10E	0,89 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	17,71 $\pm$ 0,78 <sup>a</sup>	17,7 $\pm$ 0,6	90,8 $\pm$ 0,83 <sup>ab</sup>
18L:06E	0,75 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	18,19 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	15,1 $\pm$ 0,7	95,0 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>
24L:00E	0,80 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	16,84 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>	15,7 $\pm$ 1,5	92,5 $\pm$ 1,4 <sup>ab</sup>

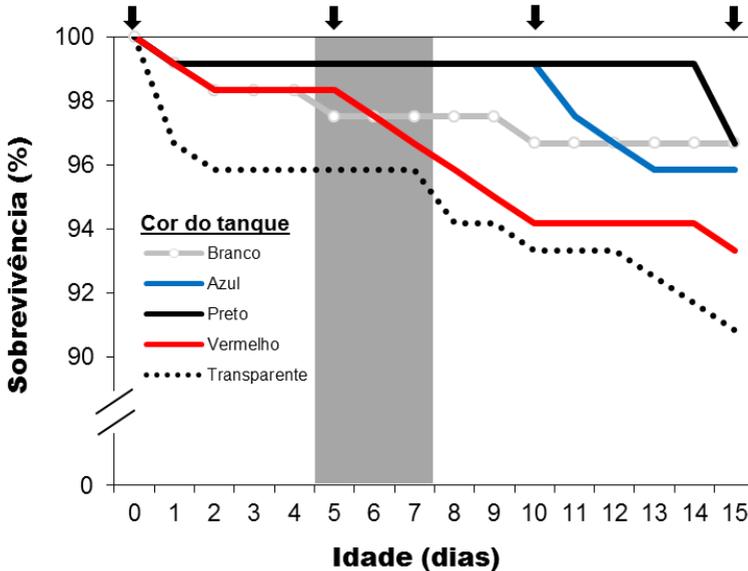
### 3.2 EXPERIMENTO DE COR DE TANQUE

Ao longo e ao final do experimento, não foram detectadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos em relação à sobrevivência (Figura 4). Também não foram observadas diferenças significativas em relação a taxa de crescimento, taxa de crescimento específico e coeficiente de variação ( $P > 0,05$ ) (Tabela 2).

Tabela 2: Estatísticas descritivas (média  $\pm$  erro padrão) para o crescimento e a sobrevivência de juvenis de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* submetidos a cinco cores de tanque distintas: taxa de crescimento diário (TCD), coeficiente de variação da altura aos 15 dias de idade (CV) e taxa de crescimento específico (TCE). Não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $P > 0,05$ )

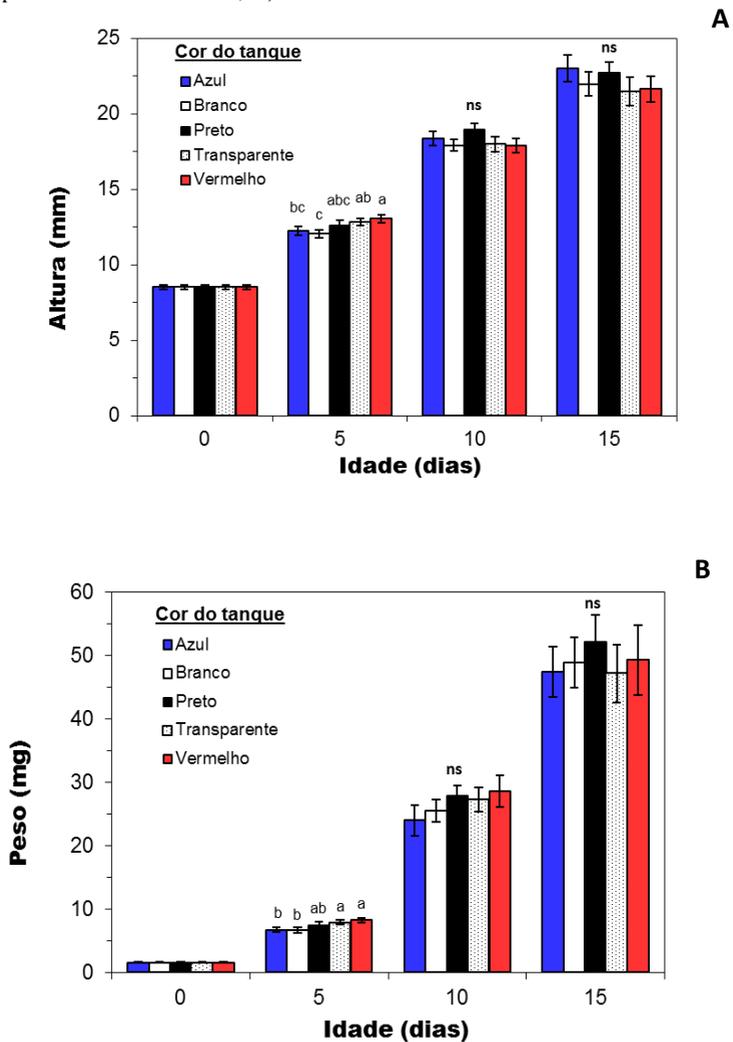
Cor de tanque	TCD (mm.dia <sup>-1</sup> )	CV	TCE (% dia <sup>-1</sup> )	Sobrevivênci a final (%)
Azul	0,99 $\pm$ 0,03	8,1 $\pm$ 1,5	22,67 $\pm$ 0,19	96,6 $\pm$ 2,2
Branco	0,92 $\pm$ 0,02	8,05 $\pm$ 3,3	22,87 $\pm$ 0,17	95,8 $\pm$ 2,2
Preto	0,97 $\pm$ 0,01	8,2 $\pm$ 0,3	23,30 $\pm$ 0,12	96,6 $\pm$ 1,6
Transparente	0,88 $\pm$ 0,04	10,3 $\pm$ 0,3	22,63 $\pm$ 0,21	93,3 $\pm$ 2,2
Vermelho	0,88 $\pm$ 0,01	9,8 $\pm$ 2,1	22,93 $\pm$ 0,15	90,8 $\pm$ 3,0

**Figura 4** – Sobrevivência (%) de juvenis de *Hippocampus reidi* submetidos a diferentes cores de tanque ao longo de 15 dias. Cada símbolo representa a média das três réplicas (os erros padrões foram omitidos para melhor visualização). Não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ). A faixa vertical cinza indica a transição da alimentação e as setas o dia de amostragem para a biometria.



A altura e o peso somente mostraram diferenças significativas no 5º dia (Figuras 5 A e B) ( $P < 0,05$ ). Neste dia, maior ganho de altura e peso foram obtidos nos tratamentos de cor preta, transparente e vermelha. Após esta data, não foi detectada diferença estatística para estes parâmetros entre os tratamentos testados.

**Figura 5** – Altura média (Figura 5<sup>A</sup>) e peso médio (Figura 5<sup>B</sup>) ( $\pm$  erro padrão) de juvenis de *Hippocampus reidi* no dia do nascimento e nos 5<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias de vida em tanques de diferentes cores. Letras diferentes na mesma idade indicam diferença estatística entre os tratamentos (ANOVA para o 5<sup>o</sup> dias com  $P < 0,05$ ).



## 4 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a manipulação do fotoperíodo influencia o crescimento e a sobrevivência de *H. reidi* nos primeiros 15 dias de vida. Já a cor do tanque não afetou estes parâmetros neste período.

As primeiras duas semanas de vida são consideradas críticas para a sobrevivência de cavalos-marinhos, uma vez que é neste período em que se observam as maiores taxas de mortalidade (Martinez-Cardenas e Purser, 2012). As principais causas apontadas são: (I) inanição, onde o animal não se alimenta ou o alimento não supre suas necessidades nutricionais o que leva a morte em aproximadamente 3 a 5 dias (Payne e Rippingale, 2000; Sheng et al., 2007; Lin et al., 2008; Hora e Joyeux, 2009; Willadino et al., 2012); (II) a troca de alimento (item e tamanho), que ocorre frequentemente após uma semana, normalmente de rotífero ou copépode para náuplio de *Artemia* (Lin et al., 2006; Sheng et al., 2006; Martinez-Cardenas e Purser, 2007) e (III) a flutuação dos juvenis quando eles ingerem ar da superfície ou das bolhas de ar (Woods, 2000; Wittenrich, 2007), o que leva a morte destes peixes em poucos dias. Os animais submetidos ao menor fotoperíodo (06L:18E), possivelmente comeram menos e apresentaram baixo crescimento, já detectado no 5<sup>o</sup> dia de idade, quando é o início da troca de alimentação. Assim, provavelmente parte dos indivíduos não foram capazes de se alimentar de um item maior no período de transição (*Artemia sp.*) o que acentuou a mortalidade após a troca de alimentação.

Os menores valores de sobrevivência verificada neste estudo (média de 82,5% em 6 horas de luz) está próximo ao encontrado por Hora e Joyeux (2009) de 93,5%, Pham e Lin, (2013) de 80% e Hora et al. (*in prep. capítulo 1*) de 75 a 90,6% utilizando a mesma alimentação (zooplâncton selvagem), e superior a outros estudos que utilizaram alimento vivo cultivado. Por exemplo, Olivotto et al. (2008) encontraram sobrevivência de 40 a 22%, Willadino et al. (2012) de 40 a 0% e Pham e Lin, (2013) 40 a 10% utilizando rotíferos, *Artemia sp.* e/ou copépodes cultivados. Desta forma, a alta taxa de sobrevivência final observada nos dois experimentos (geralmente superior a 90%), em relação a maioria dos outros estudos com o cultivo de *H. reidi*, possivelmente está associada ao item fornecido na primeira alimentação dos cavalos-marinhos, que consistiu de zooplâncton selvagem, em sua maioria copépodes. Apesar dos benefícios nutritivos dos copépodes

selvagens, principalmente por conter ácidos graxos essenciais para o desenvolvimento de peixes marinhos (como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA)) (Barroso et al., 2013), é necessário tomar cuidado com a sua utilização, pois pode ser veículo para a entrada de patógenos, ocasionando a contaminação do sistema de cultivo e consequentemente prejudicar a produção.

Nos fotoperíodos de 10L:14E a 24L:0E, juvenis de *H. reidi* cresceram igualmente bem e apresentaram baixa mortalidade, porém, alguns estudos encontraram correlação positiva entre um maior período de luz e o crescimento para larvas e juvenis de peixes marinhos (Tandler e Helps, 1985; Trotter et al., 2003; Biswas et al., 2005). Martinez-Cardenas e Purser (2012) ao cultivarem *H. abdominalis* em três diferentes fotoperíodos (8L:16E; 16E:08L; 24L:0E) por 6 semanas encontraram um melhor crescimento nos indivíduos submetidos ao fotoperíodo intermediário de 16L:08E. Olivotto et al., (2008) ao realizarem testes de alimentação em dois fotoperíodos (14L:10E e 24L:00E) para *H. reidi* por 21 dias, verificaram melhor performance no maior fotoperíodo. Além do diferente design experimental (i.e. número de indivíduos, volume do tanque, alimentação e período), a diferença entre os estudos pode ter ocorrido devido à temperatura utilizada nos dois experimentos. Enquanto neste estudo, a temperatura média foi de 25,7 °C, Olivotto et al, (2008) trabalharam com 28 °C. A combinação da elevada temperatura e um fotoperíodo contínuo pode levar a maior taxa de crescimento para *H. reidi*. Porém, mais estudos nesta linha devem ser conduzidos para melhor explicar o efeito da combinação destes dois fatores. Uma maior taxa de crescimento e sobrevivência foram observados no segundo experimento. Estudos indicam que a qualidade dos recém-nascidos varia entre os diferentes reprodutores, como também observado para *H. reidi* (Willadino et al., 2012; Pham e Lin, 2013) e comprovado para outras espécies de cavalos-marinhos (Dzyuba et al., 2006; Lin et al., 2008; Qin et al., 2012).

A utilização de um período contínuo de luz no cultivo de peixes ocasiona elevada taxa de consumo alimentar, assim, o tempo de evacuação intestinal do alimento passa a ser mais rápido, tornando as taxas de assimilação mais baixas, podendo reduzir o crescimento (Howell et al., 1998). Em cavalos-marinhos alimentados com *Artemia* sp., este problema pode se agravar, como relatado por Payne e Rippingale (2000) que observaram que as fezes de *Hippocampus subelongatus* apresentavam *artemia* intacta, indicando uma pobre digestão deste crustáceo, fato este também observado em *H. reidi*

(observação pessoal). Assim, juvenis de cavalos-marinhos alimentados com *Artemia* sp. e submetidos a um longo período de luz podem apresentar maior consumo de alimento, mas não necessariamente apresentar um crescimento elevado.

Ainda, segundo Martinez-Cardenas e Purser (2012), a qualidade nutricional da artemia depois de certo período não é adequada para compensar a energia gasta pelos cavalos-marinhos em fotoperíodo contínuo, uma vez que os metanúplios acabam consumindo e/ou eliminando o enriquecedor. É provável que os juvenis de cavalos-marinhos em fotoperíodo contínuo permaneçam ativos, gastando mais energia para procurar alimento do que a energia obtida na assimilação deste. Uma iluminação constante também pode resultar em má formação e baixa sobrevivência, como verificado para larvas do robalo europeu *Dicentrarchus labrax* (Villamizar et al., 2011b). É possível, no caso de larvas de robalo, que a iluminação contínua, apesar de boa para o crescimento, não seja adequada para o desenvolvimento normal dos peixes. Gines et al., (2004) também relataram um crescimento diário mais elevado de juvenis de pargo *Sparus aurata* sob um fotoperíodo estendido (16L:08E), em comparação com os peixes cultivados com iluminação contínua. Os autores também sugerem maior gasto de energia não produtiva associada ao aumento da atividade metabólica em 24L:00E.

Enquanto algumas espécies de peixes preferem tanques claros (Papoutsoglou et al., 2000; Tamazouzt et al., 2000) ou escuros (Ostrowski, 1989; Naas et al., 1996), *H. reidi* adaptou-se igualmente as diferentes cores nos primeiros 15 dias de vida, com sobrevivência e crescimento similares nos diferentes tratamentos, indicando que neste período eles não são influenciados pela cor do tanque, dentro das condições fornecidas no presente experimento. Apesar do peso e da altura apresentarem diferenças significativas no 5<sup>o</sup> dia, estas não persistiram nos dias seguintes. A explicação para esta diferença neste período não pode ser facilmente explicada, uma vez que o zooplâncton, o qual é essencialmente de cor marrom avermelhado, deveria ser melhor detectado em um fundo branco que em vermelho ou transparente. Tal diferença não tem significado biológico plausível, portanto, poderia provir de erro de medição, o qual é proporcionalmente maior (apesar de constante em valor absoluto) para menores tamanhos e pesos, ou de uma falha na escolha aleatória dos organismos destinados a biometria das réplicas.

Diferente de larvas altriciais, nas quais a visão ao nascimento é muito simples e não oferece a capacidade de distinguir entre diferentes condições luminosas (Neave, 1984), *H. reidi* (Felício et al., 2006) e outras espécies do gênero mostram ser capazes de se alimentar bem em uma grande faixa de intensidade luminosa (James e Heck, 1994; Lin et al., 2009; Wong e Benzie, 2003). Os cavalos-marinhos apresentam desenvolvimento precocial e supostamente já nascem com a visão e com outros órgãos desenvolvidos. Neste período juvenil, nem *H. reidi* (presente estudo, até 15 dias) nem *H. abdominalis* (Martinez-Cardenas e Purser, 2007, até 6 semanas) são influenciados pela cor do tanque no que tange a visualização da presa. Por outro lado, Woods (2000) verificou que tanques transparentes proporcionam maior taxa de ataque e sucesso na captura de artemia por *H. abdominalis* que tanques brancos e pretos apenas após a primeira semana de cultivo, entretanto, depois de um mês esta diferença não foi observada.

Já Lin et al., (2009) ao testarem seis diferentes cores de tanque (verde, preto, vermelho, laranja, 50% verde + 50% vermelho e 50% verde + 50% laranja) durante 6 semanas, observaram que *Hippocampus erectus* apresentou maior sobrevivência nos tanques de duas cores, porém o crescimento em peso a altura foi melhor no tanque preto. Os autores também verificaram que nos tanques de duas cores, mais indivíduos trocaram de cor. Em cavalos-marinhos este é um importante fator a se analisar, uma vez que o seu preço varia conforme a sua coloração, indivíduos amarelos, laranjas e vermelhos apresentam preços superiores aos pretos e marrons, que muitas vezes não apresentam valor de mercado (J. P. Demarco, *comunicação pessoal*). A coloração de *Hippocampus trimaculatus* também pode ser influenciada pela cor de tanque e pela cor dos pais, demonstrando que a coloração dos filhotes também pode ter origem genética. Neste estudo, não foi observada mudança de cor nos animais, pois para *H. reidi* esta alteração ocorre próxima aos 30 dias de idade (Hora e Joyeux, 2009).

## 5 CONCLUSÃO

Um período de luz equivalente ao natural é suficiente para juvenis de *H. reidi* se alimentar durante o dia e proporciona o mesmo crescimento que períodos longos e contínuos, assim, o fotoperíodo intermediário de 10L:14E a 14L:10E é indicado para manter uma boa razão custo-benefício. Os resultados mostram que as cores de tanques testadas não é crítico para o cultivo desta espécie, porém, a influência

deste fator deve ser melhor avaliada em relação a troca de cor dos cavalos-marinhos.

## 6 REFERÊNCIAS

- Barroso, M. V., de Carvalho, C.V. a, Antoniassi, R., Cerqueira, V.R., 2013. Use of the copepod *Acartia tonsa* as the first live food for larvae of the fat snook *Centropomus parallelus*. *Aquaculture* 388-391, 153–158.
- Biswas, A.K., Seoka, M., Inoue, Y., Takii, K., Kumai, H., 2005. Photoperiod influences the growth, food intake, feed efficiency and digestibility of red sea bream (*Pagrus major*). *Aquaculture* 250, 666–673.
- Biswas, A., Kazushige, I., Takii, K., 2010. Feeding interval and photoperiod influence the growth performance of striped knifejaw, *Oplegnathus fasciatus*. *Aquac. Res.* 41, 517–523.
- Boeuf, G., Le Bail, P.-Y., 1999. Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture* 177, 129–152.
- Browman, H.I., Marcotte, B.M., 1987. Effects of prey color and background color on feeding by Atlantic salmon alevins. *Prog. Fish-Cult.* 49, 141–143.
- Calado, R., 2006. Marine ornamental species from European waters: a valuable overlooked resource or a future threat for the conservation of marine ecosystems? *Sci. Mar.* 70, 389–398.
- Doolan, B.J., Allan, G.L., Booth, M. a., Jones, P.L., 2008. Effects of cage netting colour and density on the skin pigmentation and stress response of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider, 1801). *Aquac. Res.* 39, 1360–1368.
- Dzyuba, B., Van Look, K.J.W., Cliffe, A., Koldewey, H.J., Holt, W. V., 2006. Effect of parental age and associated size on fecundity, growth and survival in the yellow seahorse *Hippocampus kuda*. *J. Exp. Biol.* 209, 3055–61.
- Froese, R. & Pauly, D. (2014). FishBase. Available from: <http://www.fishbase.org> (accessed 1 November 2014).
- Felício, A.K.C., Rosa, I.L., Souto, A., Freitas, R.H. a., 2006. Feeding behavior of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933. *J. Ethol.* 24, 219–225.
- Gasparini, J.L., Floeter, S.R., Ferreira, C.E.L., Sazima, I., 2005. Marine ornamental trade in Brazil. *Biodivers. Conserv.* 14, 2883–2899.
- Gines, R., Afonso, J.M., Arguello, A., Zamorano, M.J., Lopez, J.L., 2004. The effects of long-day photoperiod on growth, body

- composition and skin colour in immature gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquac. Res.* 35, 1207–1212.
- Hora, M.D.S.C. Da, Joyeux, J.-C., 2009. Closing the reproductive cycle: Growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions. *Aquaculture* 292, 37–41.
- Howell, B.R.; Day, O.J.; Ellis, T.; Baynes, S.M. Early life stages of farmed fish. In: BLACK, K.; PICKERING, A. (Ed.). *Biology of farmed fish*. Sheffield, England: Sheffield Academic Press, 1998. p.27-66.
- Imsland, A.K., Gunnarsson, S., Roth, B., Foss, A., Le Deuff, S., Norberg, B., Thorarensen, H., Helming, T., 2013. Long-term effect of photoperiod manipulation on growth, maturation and flesh quality in turbot. *Aquaculture* 416-417, 152–160.
- James, P.L., K.L. Heck, Jr., 1994. The effects of habitat complexity and light intensity on ambush predation within a simulated seagrass habitat. *J. Exp. Mar. Bio. and Ecol.* 176: 187-200.
- Koldewey, H.J., Martin-Smith, K.M., 2010. A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture* 302, 131–152.
- Lin, Q., Lu, J., Gao, Y., Shen, L., Cai, J., Luo, J., 2006. The effect of temperature on gonad, embryonic development and survival rate of juvenile seahorses, *Hippocampus kuda* Bleeker. *Aquaculture* 254, 701–713.
- Lin, Q., Lin, J., Zhang, D., 2008. Breeding and juvenile culture of the lined seahorse, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture* 277, 287–292.
- Lin, Q., Lin, J., Huang, L., 2009. Effects of substrate color, light intensity and temperature on survival and skin color change of juvenile seahorses, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture* 298, 157–161.
- 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. 214 pp.
- Martinez-Cardenas, L., Purser, G.J., 2012. Effect of stocking density and photoperiod on growth and survival in cultured early juvenile pot-bellied seahorses *Hippocampus abdominalis* Lesson, 1827. *Aquac. Res.* 43, 1536–1549.
- Martinez-Cardenas, L., Purser, G.J., 2007. Effect of tank colour on *Artemia* ingestion, growth and survival in cultured early juvenile

- pot-bellied seahorses (*Hippocampus abdominalis*). *Aquaculture* 264, 92–100.
- Melo-Valencia, A.F., Ospina-Salazar, G.H., Gómez-León, J., Cortés-Pineda, F.A., 2013. Efecto de la salinidad en la supervivencia y crecimiento de crias de caballito de mar *Hippocampus reidi* Ginsburg en cautiverio. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 42, 193–201.
- Merighe, G.K.F., Pereira-da-Silva, E.M., Negrão, J.A., Ribeiro, S., 2004. Efeito da cor do ambiente sobre o estresse social em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Zootec.* 33, 828–837.
- Moorhead, J. a., Zeng, C., 2010. Development of Captive Breeding Techniques for Marine Ornamental Fish: A Review. *Rev. Fish. Sci.* 18, 315–343.
- Naas, K., Huse, I., Iglesias, J., 1996. Illumination in first feeding tanks for marine fish larvae. *Aquac. Eng.* 15, 291–300.
- Neave, D. a., 1984. The development of visual acuity in larval plaice (*Pleuronectes platessa* L.) and turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 78, 167–175.
- Nunes, R. A., 2010. Composição e estrutura da comunidade zooplanctônica de um estuário tropical (Espírito Santo, Brasil). Programa de pós-graduação em oceanografia ambiental. Vitória-ES, 70p.
- Olivotto, I., Avella, M. a., Sampaolesi, G., Piccinetti, C.C., Navarro Ruiz, P., Carnevali, O., 2008. Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: Rearing and feeding studies. *Aquaculture* 283, 92–96.
- Olivotto, I., Planas, M., Simões, N., Holt, G.J., Avella, M.A., Calado, R., 2011. Advances in Breeding and Rearing Marine Ornamentals. *J. World Aquac. Soc.* 42, 135–166.
- Ostrowski, A.C., 1989. Effect of rearing tank background color on early survival of dolphin larvae. *Prog. Fish-Cult.* 51, 161–163.
- Papoutsoglou, S.E., Karakatsouli, N., Chiras, G., 2005. Dietary L-tryptophan and tank colour effects on growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles reared in a recirculating water system. *Aquac. Eng.* 32, 277–284.
- Papoutsoglou, S.E., Mylonakis, G., Miliou, H., Karakatsouli, N.P., Chadio, S., 2000. Effects of background color on growth performances and physiological responses of scaled carp (*Cyprinus carpio* L.) reared in a closed circulated system. *Aquac. Eng.* 22, 309–318.

- Payne, M., Rippingale, R., 2000. Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched Artemia. *Aquaculture* 188, 353–361.
- Pham, N.K., Lin, J., 2013. The Effects of Different Feed Enrichments on Survivorship and Growth of Early Juvenile Longsnout Seahorse, *Hippocampus reidi*. *J. World Aquac. Soc.* 44, 435–446.
- Qin, G., Lin, Q., Gu, N., Lin, J., Huang, L., 2012. Effect of broodstock origin, background and substrate color on skin coloration of three-spotted seahorses *Hippocampus trimaculatus* Leach, 1814. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 416–417, 129–134.
- Rosa, I.L., Oliveira, T.P.R., Castro, A.L.C., Moraes, L.E.D.S., Xavier, J.H.A., Nottingham, M.C., Dias, T.L.P., Bruto-costa, L. V, Araújo, M.E., Birolo, A.B., Mai, A.C.G., Monteiro-neto, C., 2007. Population characteristics , space use and habitat associations of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei : Syngnathidae ) 5, 405–414.
- Rotllant, J., Tort, L., Montero, D., Pavlidis, M., Martinez, M., Wendelaar Bonga, S.E., Balm, P.H.M., 2003. Background colour influence on the stress response in cultured red porgy *Pagrus pagrus*. *Aquaculture* 223, 129–139.
- Sheng, J., Lin, Q., Chen, Q., Gao, Y., Shen, L., Lu, J., 2006. Effects of food, temperature and light intensity on the feeding behavior of three-spot juvenile seahorses, *Hippocampus trimaculatus* Leach. *Aquaculture* 256, 596–607.
- Sheng, J., Lin, Q., Chen, Q., Shen, L., Lu, J., 2007. Effect of starvation on the initiation of feeding, growth and survival rate of juvenile seahorses, *Hippocampus trimaculatus* Leach and *Hippocampus kuda* Bleeker. *Aquaculture* 271, 469–478.
- Souza-Santos, L.P., Regis, C.G., Mélo, R.C.S., Cavalli, R.O., 2013. Prey selection of juvenile seahorse *Hippocampus reidi*. *Aquaculture* 404–405, 35–40.
- Tamazouzt, L.; Chatain, B.; Fontaine, P. 2000. Tank wall colour and light level affect growth and survival of Eurasian perch larvae (*Perca fluviatilis*). *Aquaculture*, v.182, p.85–90.
- Tandler, A., Helps, S., 1985. The effects of photoperiod and water exchange rate on growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Linnaeus; Sparidae) from hatching to metamorphosis in mass rearing systems. *Aquaculture* 48, 71–82.
- Tissot, B.N., Hallachert, L.E., 2014. in of Aquarium Collectors Hawaii Reef Fishes. *Conserv. Biol.* 17, 1759–1768.

- Trusty, M., 2002. The benefits and risks of aquaculture production for the aquarium trade. *Aquaculture* 205, 203–219.
- Trotter, a. J., Battaglene, S.C., Pankhurst, P.M., 2003. Effects of photoperiod and light intensity on initial swim bladder inflation, growth and post-inflation viability in cultured striped trumpeter (*Latris lineata*) larvae. *Aquaculture* 224, 141–158.
- Villamizar, N., Blanco-Vives, B., Migaud, H., Davie, a., Carboni, S., Sánchez-Vázquez, F.J., 2011a. Effects of light during early larval development of some aquacultured teleosts: A review. *Aquaculture* 315, 86–94.
- Villamizar, N., García-Mateos, G., Sánchez-Vázquez, F.J., 2011b. Behavioral responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and *Artemia* sp. exposed to constant light or darkness vs. light/dark cycles of white, red or blue wavelengths. *Aquaculture* 317, 197–202.
- Willadino, L., Souza-Santos, L.P., Mélo, R.C.S., Brito, A.P., Barros, N.C.S., Araújo-Castro, C.M.V., Galvão, D.B., Gouveia, A., Regis, C.G., Cavalli, R.O., 2012. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. *Aquaculture* 360-361, 10–16.
- Wittenrich M.L. 2007. The complete illustrated breeder's guide to marine aquarium fishes. Neptune City, 304p.
- Wong, J.M., Benzie, J. a. H., 2003. The effects of temperature, *Artemia* enrichment, stocking density and light on the growth of juvenile seahorses, *Hippocampus whitei* (Bleeker, 1855), from Australia. *Aquaculture* 228, 107–121.
- Wood, E., 2001. Global advances in conservation and management of marine ornamental resources. *Aquarium Sci. Conserv.* 3, 65–77.
- Woods, C.M.C., 2000. Improving initial survival in cultured seahorses, *Hippocampus abdominalis* Leeson, 1827 (Teleostei: Syngnathidae). *Aquaculture* 190, 377–388.

## CAPÍTULO 3

### **Densidade de estocagem no cultivo do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* na fase pelágica**

Maik dos Santos Cividanes da Hora<sup>a,b\*</sup>, Jean-Christophe Joyeux<sup>b</sup>,  
Mônica Yumi Tsuzuki<sup>a\*</sup>

#### **Resumo**

Existem poucas informações sobre a melhor densidade de estocagem durante o cultivo de cavalos-marinhos, seja na fase pelágica ou durante a fase bentônica. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a densidade ideal para o cultivo de juvenis de *Hippocampus reidi* nos primeiros 15 dias de vida (fase pelágica e início da transição para fase bentônica) e recomendar uma nova metodologia de medição deste parâmetro na fase bentônica. Para isso, logo após o nascimento, os filhotes foram divididos em quatro densidades de estocagem: 1, 3, 6 e 15 indivíduos/L. Não foram observadas diferenças significativas de crescimento e sobrevivência durante e ao final do experimento. Porém a partir do 10<sup>o</sup> dia, alguns indivíduos já apresentam comportamento bentônico e se fixam ao substrato, não ficando mais distribuídos na coluna de água. Deste modo, na fase bentônica, a melhor maneira de determinar a densidade de estocagem seria medir linearmente os substratos e não somente por volume de água do tanque. É possível a utilização da maior densidade de estocagem na fase pelágica no cultivo de *H. reidi*, desde que tomados os devidos cuidados.

**Palavras-chaves:** Cavalo-marinho do focinho longo, peixe ornamental, aquariofilia, piscicultura, substrato de fixação.

## 1 INTRODUÇÃO

A piscicultura tem tendência ao uso de sistemas de cultivo cada vez mais intensivos, que buscam minimizar os custos de produção e maximizar a produtividade, sem redução substancial do crescimento e com sobrevivência satisfatória (Björnsson, 1994). Alguns estudos demonstram que existe relação inversa entre a densidade de estocagem e a taxa de crescimento e a sobrevivência (Holm et al., 1990; Lambert e Dutil, 2001; El-Sayed, 2002). Maiores adensamentos também propiciam interações sociais potencialmente estressantes, que podem comprometer o sistema imunológico e assim aumentar a suscetibilidade à doenças, o que normalmente eleva as taxas de mortalidade (Iguchi et al., 2003; Tapia-Paniagua et al., 2014). Porém, outros estudos não observam diferenças em termos de crescimento em diferentes densidades (Baskerville-Bridges e Kling, 2000; Andrade et al., 2015).

A densidade de estocagem mais adequada varia com a espécie, o sistema de criação e a idade, e também é determinada por fatores exógenos como temperatura, luz e taxa de alimentação (Jørgensen et al., 1993; Baskerville-Bridges e Kling, 2000). Portanto, um dos primeiros passos para o desenvolvimento de uma tecnologia de produção é a adequação da densidade de estocagem (Brandão et al., 2004), que não é conhecida para diversas espécies de peixes ornamentais marinhos cultivadas.

Os cultivos comerciais de cavalos-marinhos e ornamentais marinhos em geral utilizam sistemas intensivos em pequena escala caracterizados por altos níveis de controle humano e alta densidade de estocagem (Koldewey e Martin-Smith, 2010). O único cultivo comercial de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* no Brasil usa densidades de 6,0-0,6 indivíduos.L<sup>-1</sup> (J.P. Demarco, *comunicação pessoal*) na fase pelágica e bentônica, respectivamente. Normalmente, entre 15-30 dias de idade juvenis de *H. reidi* deixam a fase pelágica, para adquirir hábitos bentônicos (Hora e Joyeux, 2009). Com algumas exceções, esta transição se inicia aos 10 dias, no qual se prendem a alguma estrutura de fixação com a sua cauda preênsil. O tempo de permanência na fase pelágica e a transição para a fase bentônica varia com as espécies de cavalos-marinhos entre duas a oito semanas, com algumas espécies supostamente já nascendo com a capacidade de se prender a algum substrato (Foster e Vincent, 2004).

Esforços de pesquisa no cultivo de cavalos-marinhos para estabelecer um protocolo de cultivo têm focado principalmente em

descobrir melhores condições de alimentação, de fatores ambientais como temperatura, salinidade, intensidade luminosa e fotoperíodo (Zhang et al., 2010). Contudo, o efeito da estocagem tem recebido pouca atenção entre as 13 espécies de cavalos-marinhos cultivadas comercialmente (Koldewey e Martin-Smith, 2010). Destacam-se os trabalhos com as espécies *H. abdominalis*, *H. white* e *H. erectus*, nos quais, em sua maioria, indicam diminuição da densidade para evitar interações intraespecíficas, principalmente na fase bentônica (Wong e Benzie, 2003; Woods, 2003; Lin et al., 2009; Zhang et al., 2010; Martinez-Cardenas e Purser, 2012).

Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a melhor densidade de estocagem para *H. reidi* durante a fase pelágica e no início do processo de transição para a fase bentônica e recomendar uma nova metodologia de medição deste parâmetro nesta última fase.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Ictiologia e Maricultura Ornamental (LabIMO), da Universidade Federal do Espírito Santo, Aracruz-ES, Brasil, e teve duração de 15 dias.

Os tratamentos foram realizados em triplicata utilizando 1440 filhotes recém-nascidos (de um total de 1454) liberados por um dos machos do plantel de reprodutores que já pertenciam ao laboratório. Os filhotes foram distribuídos em 4 grupos experimentais com diferentes densidades de estocagem: **D1**: 1 indivíduo.L<sup>-1</sup> (20 juvenis em cada aquário); **D2**: 2 Ind.L<sup>-1</sup> (40 juvenis por aquário), **D6**: 6 Ind.L<sup>-1</sup> (120 juvenis por aquário), **D15**: 15 Ind.L<sup>-1</sup> (300 juvenis por aquário).

O experimento foi realizado em um sistema de recirculação (como descrito em Hora et al, *in prep.* capítulo 2) composto por 18 aquários de 20L com paredes azuis (parte com água: 24,4 x 24,5 x 33,3 cm de altura). O fluxo de água de cada aquário era de 60L.L<sup>-1</sup>. Os parâmetros físico-químicos da água do sistema de recirculação foram aferidos diariamente. A salinidade foi estabelecida de acordo com os resultados de Hora et al. (*in prep. capítulo 1*) e mantida em  $20,4 \pm 1,1$  psu (média  $\pm$  desvio padrão) e a temperatura em  $24,9 \pm 0,3$  °C, ambos sendo aferidos com medidor multiparâmetro YSI ec300 (precisão de 0,1). O pH foi mensurado com pHmetro elétrico de precisão 0,1 (modelo ph-700, Instrutherm, USA) e ficou entre  $7,8 \pm 0,62$ . A amônia total e o nitrito, medidos com teste colorimétrico, permaneceram abaixo

de 0,05ppm. O oxigênio foi medido com um oxímetro (MO-910, Instrutherm, USA) e manteve-se em  $6,9 \pm 0,06 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Do nascimento ao 7<sup>o</sup> dia de idade, os juvenis foram alimentados com zooplâncton selvagem coletado no estuário do rio Piraquê-Açu, Aracruz, ES, Brasil (40° 09' 14,41"O, 19° 57' 01,13"S) com auxílio de uma rede de plâncton cônica de malha 100 $\mu\text{m}$ . O zooplâncton foi triado (300 $\mu\text{m}$ ) para a retirada dos organismos maiores e ofertado aos cavalos-marinheiros de duas a cinco vezes ao dia até a saciedade aparente, mantendo o zooplâncton em densidade próxima a 3 ind.mL<sup>-1</sup>. Do 5<sup>o</sup> dia até o fim do experimento foi ofertado náuplio de *Artemia* sp. recém eclodidos e/ou metanauplios enriquecidos com Super Selco<sup>®</sup> (Inve, Bélgica) por 24 horas, de acordo com metodologia do fabricante. A troca de alimentação ocorreu de maneira gradual: no primeiro dia de transição (5<sup>o</sup> dia de vida dos juvenis) foi ofertado 75% de zooplâncton selvagem e 25% *Artemia* sp., no segundo dia 50% de cada alimento no terceiro dia de transição foi oferecido 25% de zooplâncton selvagem e 75% de *Artemia* sp. e a partir do quarto dia (8<sup>o</sup> dia de vida) 100% de *Artemia* sp.

Os aquários experimentais foram sifonados três vezes ao dia para a retirada de resíduos de alimento e excretas do fundo. Semanalmente, 20 a 30% da água dos sistemas foi renovada. O fotoperíodo durante o experimento foi de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, visto que Hora et al., (*in prep.* capítulo 2) não encontraram diferenças de crescimento para *H. reidi* submetidos a fotoperíodos de 10 a 24 horas de luz. A iluminação foi realizada através de lâmpadas fluorescentes de 9W instaladas a 25 cm da superfície de água de cada aquário, fornecendo uma média de  $2500 \pm 400 \text{ lux}$ .

## 2.1 BIOMETRIA

O crescimento, tanto em altura quanto em peso, foi estimado como a média de seis indivíduos amostrados aleatoriamente no dia do nascimento (dia zero), 5<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia de cada unidade experimental (n=276). Os animais foram anestesiados com benzocaína (5 mg.L<sup>-1</sup>), fotografados e pesados (precisão 0,0001g) usando como tara um becker de 50ml com água do sistema e devolvidos em seu aquário de origem. Não foi detectada alterações evidentes de comportamento após a biometria e os peixes foram capazes de se alimentar imediatamente. Fotos graduadas de cada indivíduo foram utilizadas para medição no programa SigmaScan Pro 5<sup>®</sup>. A altura foi definida como sendo a soma

da altura da coroa, do comprimento do tronco e do comprimento da cauda (Lourie et al., 1999).

A partir dos dados biométricos, foram calculados:

- Taxa de crescimento diário ( $TCD$ , em  $\text{mm.dia}^{-1}$ ): como sendo a declividade  $b$  da regressão linear

$$\text{Altura} = a + b \cdot \text{Idade}$$

- Taxa de crescimento específico em peso ( $\% \text{dia}^{-1}$ ), com peso em  $g$  e tempo em dias:

$$TCE = 100 \times (\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial})) / \text{tempo}$$

- Coeficiente de variação da altura:

$$CV = \text{desvio padrão da altura} / \text{média da altura}$$

## 2.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados testados nas análises descritas estão apresentados como médias  $\pm$  erro padrão das três réplicas, a réplica (e não o indivíduo) sendo a unidade amostral. A normalidade e a homocedasticidade dos dados dos dois experimentos foram testados. Ao contrário dos dados de altura e peso (e variáveis derivadas) a 5, 10 e 15 dias, os dados de sobrevivência não foram normais nem homocedásticos e, portanto foram transformados por arco seno. Para cada idade testada (5, 10 e 15 dias), foi aplicada análise da variância ANOVA one way para detectar diferenças entre tratamentos. As diferenças detectadas foram testadas por teste *post-hoc* de Tukey HSD. Todas as análises foram realizadas assumindo nível de significância  $\alpha=0,05$  utilizando o programa SPSS 16.0.

## 3 RESULTADOS

As diferentes densidades de estocagens testadas não apresentaram diferenças significativas em relação ao peso e a altura no 5<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup> dia (Figura 1 A e B).

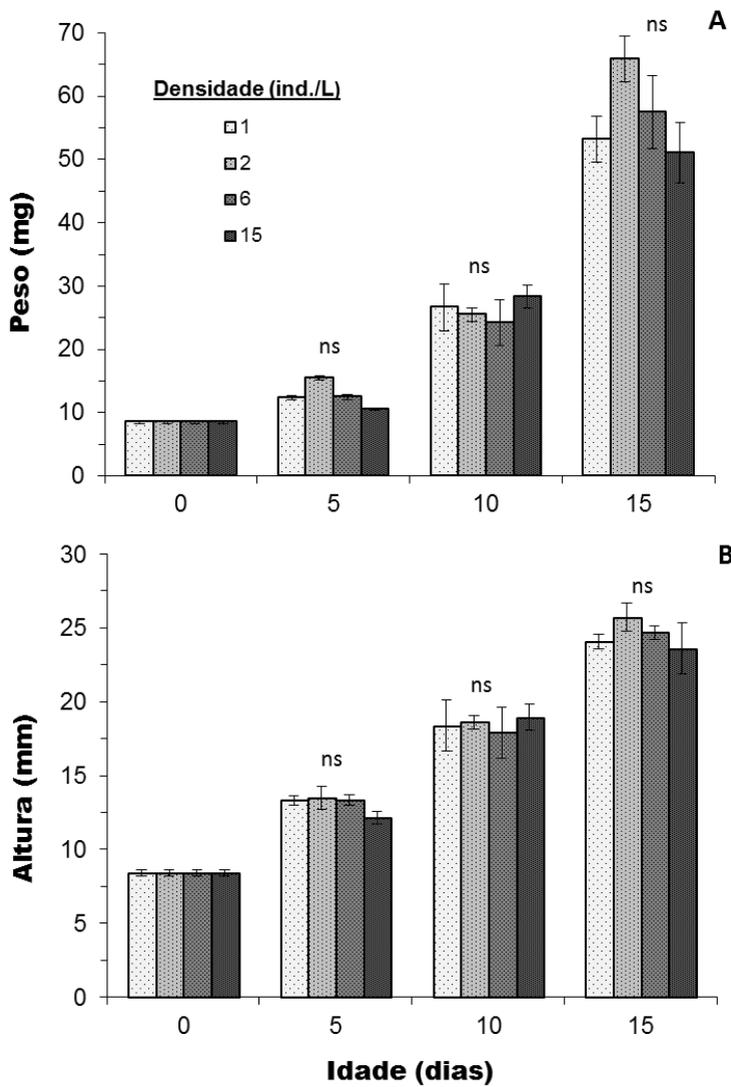
Apesar de não haver diferença estatística ( $P > 0,05$ ), a sobrevivência média para as diferentes densidades de estocagem variou entre 83,33-93,00%, a TCE foi de 22,05-23,79  $\% \text{dia}^{-1}$ . Também não diferiram CV e TCD (Tabela 1).

A partir do 10<sup>o</sup> dia, alguns indivíduos se prendiam em outros, evidenciando o início do comportamento bentônico.

Tabela 1: Sobrevivência e parâmetros de crescimento (média  $\pm$  erro padrão) para juvenis de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* submetidos a quatro densidades de estocagem após 15 dias. TCE: taxa de crescimento específico em peso, TCD: Taxa de crescimento diário em altura e CV: coeficiente de variação da altura Não houve diferença significativa entre tratamentos ( $P > 0,05$ ) para as variáveis testadas.

Densidade (Ind.L <sup>-1</sup> )	Sobrevivência (%)	TCD (mm.dia <sup>-1</sup> )	TCE (% dia <sup>-1</sup> )	CV (%)
1	86,6 $\pm$ 4,4	1,07 $\pm$ 0,07	22,3 $\pm$ 0,7	17,6 $\pm$ 7,1
2	90,8 $\pm$ 5,4	1,19 $\pm$ 0,06	23,7 $\pm$ 0,6	9,2 $\pm$ 1,3
6	83,3 $\pm$ 4,4	1,13 $\pm$ 0,10	22,8 $\pm$ 1,1	7,5 $\pm$ 2,5
15	93,0 $\pm$ 1,1	1,14 $\pm$ 0,13	22,0 $\pm$ 1,1	12,2 $\pm$ 8,3

**Figura 1** – Peso (A) e altura (B) ( $\pm$  erro padrão) de juvenis de *Hippocampus reidi* no dia do nascimento e nos 5<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias de vida em tanques com diferentes densidades de estocagem. (ns: não significativo).



## 4 DISCUSSÃO

Neste estudo foi observada elevada taxa de sobrevivência, geralmente superior a 85%, o que possivelmente está associado ao zooplâncton selvagem fornecido na primeira alimentação, pois os resultados são equivalentes à outros trabalhos com esta mesma espécie que utilizaram a mesma alimentação inicial (Hora e Joyeux, 2009; Pham e Lim 2013; Hora et al, *in prep. Capítulo1 e 2*).

Cultivos em altas densidades de estocagem requerem extremo rigor no manejo, incluindo a limpeza, a alimentação, a profilaxia visando à redução de consequentes acidentes e imprevistos. No presente estudo, dentro do intervalo 1-15 ind.L<sup>-1</sup>, a densidade de estocagem não influenciou a sobrevivência, o crescimento e a homogeneidade de tamanho dos juvenis de *H. reidi* até o 15<sup>o</sup> dia. Resultados similares foram reportados para *H. abdominalis* (Martinez-Cardenas e Purser, 2012) e *H. whitei* (Wong e Benzie, 2003) em experimentos de seis e quinze semanas de duração, respectivamente. Estes experimentos, que não diferenciaram as fases planctônica e bentônica, usaram densidades de 1-15 ind.L<sup>-1</sup> (*H. abdominalis*) e 0,5-1 ind.L<sup>-1</sup> (*H. whitei*). Entretanto, *H. erectus* do nascimento aos 25 dias apresentou melhor crescimento em menores densidades (1 e 3 vs 5 ind.L<sup>-1</sup>) (Zhang et al., 2010).

Densidades entre 2-5 ind.L<sup>-1</sup> foram usadas em estudos de cultivo de *H. reidi* na fase planctônica (Olivotto et al., 2008; Hora e Joyeux, 2009; Willadino et al., 2012; Pham e Lin, 2013) e o único cultivo comercial em atividade no Brasil utiliza 3-6 ind.L<sup>-1</sup> (J.P. Demarco, *comunicação pessoal*). As densidades utilizadas para cavalos-marinhos em geral são consideradas baixas em relação às reportadas para outras espécies de peixes marinhos (Martinez-Cardenas e Purser, 2012). Entretanto, comparações diretas não são passíveis de serem realizadas, uma vez que a família Syngnathidae apresenta desenvolvimento precocial, nascendo como juvenis, maiores e mais pesados que larvas altriciais. Enquanto muitas larvas de peixes altriciais usadas na aquicultura marinha nascem com aproximadamente 2mm, *H. reidi* nascem com 8mm, e em torno de 64 vezes mais pesado, considerando uma relação peso-comprimento de tipo cúbica (King, 1995; Froese, 2006). Larvas de *Gadus morhua* podem ser mantidas em densidades de 50 a 300 larvas.L<sup>-1</sup> por 36 dias sem comprometer seu desempenho (Baskerville-Bridges e Kling, 2000). Por comparação, em termos de biomassa no momento do nascimento, as maiores densidades

usadas no presente estudo (15 ind/L) correspondem a 960 larvas altriciais.L<sup>-1</sup>.

Adultos de *H. abdominalis* não respondem bem à alta densidade de estocagem devido ao aumento no estresse, o que o tornaria mais vulnerável às doenças (Woods 2003; Koldewey e Martin-Smith, 2010). Porém, cavalos-marinhos possuem vantagem por não apresentarem comportamento marcado de dominância nem de canibalismo, comportamentos estes que podem ser influenciados pela densidade (Hecht e Pienaar, 1993). Durante a fase pelágica, as interações devem ser minimizadas em relação ao que se espera em adultos, já que ambos, o alimento e os cavalos-marinhos, ficam bem distribuídos na coluna de água, portanto é provável que a competição seja baixa, desde que haja alimento disponível.

No fim da fase pelágica, cavalos-marinhos assentam, e ocupam uma pequena área vital (Vincent et al., 2005). No sistema de cultivo, eles se afastam do substrato de fixação somente para se alimentar. Nesta fase, jovens adultos de *H. abdominalis* e *H. erectus* e juvenis de *H. erectus* apresentam maior crescimento em menores densidades (Woods, 2003; Lin et al 2009; Zhang et al., 2010).

Segundo os autores acima citados, em altas densidades os cavalos-marinhos estão mais expostos a interações negativas tais como se prenderem um ao outro, ocasionando incomodo, estresse, impedimento do acesso ao alimento e excessivo gasto de energia para se soltar. Woods (2003) sugeriu que se aumente significativamente o substrato de fixação de modo que o contato entre indivíduos seja reduzido. Em cultivos de Pleuronectiformes, a densidade de juvenis bentônicos é medida por área (Björnsson, 1994; Andrade et al., 2015), apesar da densidade das larvas pelágicas ser medida por volume (Tagawa et al., 2004). Assim, de maneira semelhante, a densidade de estocagem para cavalos-marinhos na fase bentônica deve ser avaliada pela disponibilidade de substratos, que têm se mostrado importante na otimização de espaço e bem estar de animais de criação (Estevez et al., 2002; Hester, 2014).

Os cavalos-marinhos são extremamente sedentários (Vincent et al., 2005), a permanência em um único local esta provavelmente ligada a processos cognitivos relacionados à escolha e ao reconhecimento de locais específicos e à existência de espaçamento mínimo entre animais (Hester 2014) para minimizar interações e conflitos intraespecíficos (Grant et al., 1992). Assim, o reconhecimento de locais ou substratos com diferentes formas, cores e/ou materiais pelos cavalos-marinhos

deve ser testado, uma vez que as matrizes mantidas em casais permanecem a maior parte do tempo em um substrato escolhido (observação pessoal).

## 5 CONCLUSÃO

Até o 15<sup>o</sup> dia, não foram observados problemas relacionados ao crescimento e a mortalidade para *H. reidi* nas densidades testadas, sendo possível a utilização da densidade de 15 ind.L<sup>-1</sup> com melhor custo benefício. Porém, maiores densidades devem ser testadas, a fim de encontrar a densidade máxima suportada pela espécie durante a fase planctônica. A partir do 10<sup>o</sup> dia, substratos de fixação devem ser introduzidos no cultivo para os juvenis que se tornam bentônicos.

Estudos devem ser conduzidos na fase bentônica da espécie para verificar a melhor densidade de estocagem, sendo aqui sugerido escolher ou definir a densidade pela quantidade de substratos de maneira linear por indivíduo e não por volume.

## 6 REFERÊNCIAS

- Andrade, T., Afonso, A., Pérez-jiménez, A., Oliva-teles, A., De, V., Miguel, J., Serradeiro, R., Costas, B., 2015. Evaluation of different stocking densities in a Senegalese sole (*Solea senegalensis*) farm : Implications for growth , humoral immune parameters and oxidative status. *Aquaculture* 438, 6–11.
- Baskerville-Bridges, B., Kling, L., 2000. Larval culture of Atlantic cod (*Gadus morhua*) at high stocking densities. *Aquaculture* 181, 61–69.
- Björnsson, B., 1994. Effects of stocking density on growth rate of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared in large circular tanks for three years. *Aquaculture* 123, 259–270.
- Brandão, F.R., De Carvalho Gomes, L., Chagas, E.C., De Araújo, L.D., 2004. Densidade de estocagem de juvenis de tambaqui durante a recria em tanques-rede. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 39, 357–362.
- El-Sayed, A.-F., 2002. Effects of stocking density and feeding levels on growth and feed efficiency of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fry. *Aquac. Res.* 33, 621–626.
- Estevez, I., Tablante, N., Pettit-Riley, R.L., Carr, L., 2002. Use of cool perches by broiler chickens. *Poult. Sci.* 81, 62–69.

- Foster, S.J., Vincent, A.C.J., 2004. Life history and ecology of seahorses : implications for conservation and management. *J. Fish Biol.* 65, 1–61.
- Froese, R., 2006. Cube law, condition factor and weight-length relationships: History, meta-analysis and recommendations. *J. Appl. Ichthyol.* 22, 241–253.
- Grant, J. W. A.; Chapman, C. A.; Richardson, K. S. 1992. Defended versus undefended home range size of carnivores, ungulates and primates. *Behav. Ecol. Sociob.* 31, 149-161.
- Hester, P.Y., 2014. The effect of perches installed in cages on laying hens. *Worlds. Poult. Sci. J.* 70, 247–264.
- Hecht, T., Pienaar, A.G., 1993. A review of cannibalism and its implication in fish larviculture. *J. World Aquac. Soc.* 24, 246–261.
- Holm, J.C., Refstie, T., Bø, S., 1990. The effect of fish density and feeding regimes on individual growth rate and mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 89, 225–232.
- Hora, M.S.C., Joyeux, J.-C., 2009. Closing the reproductive cycle: Growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions. *Aquaculture* 292, 37–41.
- Iguchi, K., Ogawa, K., Nagae, M., Ito, F., 2003. The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture* 220, 515–523.
- Jørgensen, E.H., Christiansen, J.S., Jobling, M., 1993. Effects of stocking density on food intake , growth performance and oxygen consumption in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture* 110, 191–204.
- King, M.G. (1995). *Fisheries Biology, Assessment and Management*. Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford, England. 341 p.
- Koldewey, H.J., Martin-Smith, K.M., 2010. A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture* 302, 131–152.
- Lambert, Y., Dutil, J.-D., 2001. Food intake and growth of adult Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) reared under different conditions of stocking density, feeding frequency and size-grading. *Aquaculture* 192, 233–247.
- Lin, Q., Zhang, D., Lin, J., 2009. Effects of light intensity, stocking density, feeding frequency and salinity on the growth of sub-adult seahorses *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture* 292, 111–116.

- 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. 214 pp.
- Martinez-Cardenas, L., Purser, G.J., 2012. Effect of stocking density and photoperiod on growth and survival in cultured early juvenile pot-bellied seahorses *Hippocampus abdominalis* Lesson, 1827. *Aquac. Res.* 43, 1536–1549.
- Olivotto, I., Avella, M. a., Sampaolesi, G., Piccinetti, C.C., Navarro Ruiz, P., Carnevali, O., 2008. Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: Rearing and feeding studies. *Aquaculture* 283, 92–96.
- Pham, N.K., Lin, J., 2013. The Effects of Different Feed Enrichments on Survivorship and Growth of Early Juvenile Longsnout Seahorse, *Hippocampus reidi*. *J. World Aquac. Soc.* 44, 435–446.
- Tagawa, M., Kaji, T., Kinoshita, M., Tanaka, M., 2004. Effect of stocking density and addition of proteins on larval survival in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 230, 517–525.
- Tapia-Paniagua, S.T., Vidal, S., Lobo, C., Prieto-Álamo, M.J., Jurado, J., Cordero, H., Cerezuela, R., Banda, I.G. De, Esteban, M.A., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., 2014. Fish & Shellfish Immunology The treatment with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 of specimens of *Solea senegalensis* exposed to high stocking densities to enhance their resistance to disease 41.
- Vincent, A.C.J., Evans, K.L., Marsden, A.D., Sheffield, S., 2005. Home range behaviour of the monogamous Australian seahorse, *Hippocampus whitei* 1–12.
- Willadino, L., Souza-Santos, L.P., Mélo, R.C.S., Brito, A.P., Barros, N.C.S., Araújo-Castro, C.M.V., Galvão, D.B., Gouveia, A., Regis, C.G., Cavalli, R.O., 2012. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. *Aquaculture* 360-361, 10–16.
- Wong, J.M., Benzie, J. a. H., 2003. The effects of temperature, Artemia enrichment, stocking density and light on the growth of juvenile seahorses, *Hippocampus whitei* (Bleeker, 1855), from Australia. *Aquaculture* 228, 107–121.
- Woods, C.M., 2003. Effect of stocking density and gender segregation in the seahorse *Hippocampus abdominalis*. *Aquaculture* 218, 167–176.

Zhang, D., Zhang, Y., Lin, J., Lin, Q., 2010. Growth and survival of juvenile lined seahorse, *Hippocampus erectus* (Perry), at different stocking densities. Aquac. Res. 42, 9–13.



## CAPÍTULO 4

### **Primeira alimentação do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*: efeito do copépode *Paracalanus quasimodo* cultivado, zooplâncton selvagem e rotíferos**

Maik dos Santos Cividanes da Hora<sup>a,b\*</sup>, Márcia Vanacor Barroso<sup>c</sup>, Jean-Christophe Joyeux<sup>b</sup>, Cesar Alexandre Silva<sup>d</sup>, Felipe Sueti Magalhães<sup>b</sup>, Renato Rodrigues Neto<sup>d</sup>, Mônica Yumi Tsuzuki<sup>a\*</sup>

#### **Resumo**

Um dos principais gargalos no cultivo de cavalos-marinhos é a baixa sobrevivência na primeira alimentação. O uso de rotíferos geralmente tem mostrado resultados insatisfatórios de sobrevivência e crescimento, e copépodes tem sido apontados como melhores alimentos. Entretanto, para cultivar este alimento vivo, mais de duas microalgas devem ser utilizadas, tornando o cultivo mais restritivo devido ao aumento do custo e ao trabalho intensivo. Assim, o estudo visou implementar uma alimentação mais eficiente e com um alimento vivo com maior facilidade de produção para o cultivo de cavalos-marinhos. Foi testado o uso do copépode calanóide *Paracalanus quasimodo* cultivado com uma dieta inerte juntamente com rotíferos, zooplâncton selvagem, e rotíferos na primeira alimentação de *H. reidi*. Os tratamentos, testados em triplicata, foram: rotífero (Dieta R), rotífero mais zooplâncton selvagem (Dieta R+ZS), zooplâncton selvagem (Dieta ZS) e rotífero mais copépode *P. quasimodo* cultivado (Dieta R+CC). Estes alimentos foram oferecidos nos primeiros 5 dias e após este período foi ofertada *Artemia* sp. de forma gradual. O copépode foi alimentado com uma dieta comercial para rotíferos. O copépode cultivado juntamente com rotíferos na primeira alimentação de *H. reidi* mostrou resultados de sobrevivência e crescimento equivalentes à alimentação com zooplâncton selvagem, e bem superiores à alimentação somente com rotíferos, mostrando seu potencial para o cultivo do cavalo-marinho. O copépode calanóide *P. quasimodo* foi cultivado com sucesso somente com uma dieta comercial para o cultivo de rotíferos, que pode ser um possível substituto ao uso de microalgas. Além disto, demonstrou ser resistente às condições de cultivo, podendo ser uma boa opção para produção intensiva.

**Palavras-chave:** Alimento vivo, copépode calanóide, aquicultura ornamental, aquariofilia, ácido graxo.

## 1. INTRODUÇÃO

O declínio global das populações naturais de cavalos-marinhos no mundo vem ocorrendo principalmente como resultado da destruição dos habitats naturais e pela grande demanda destes animais à medicina tradicional chinesa e em menor grau para o comércio da aquariorfilia e artesanato (Vincent, 1996). Como consequência, todas as espécies de cavalos-marinhos constam no Apêndice II da CITES (CITES, 2014) e estão como vulnerável na lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN (IUCN, 2014).

*Hippocampus reidi*, que ocorre desde Carolina do Norte (EUA), até o Rio Grande do Sul (Brasil) (Froese e Pauly, 2014), é um dos mais procurados e valorizados para o mercado de aquariorfilia mundial (Bull e Mitchell, 2002). O Brasil foi um dos maiores fornecedores desta espécie para o mercado mundial entre os anos de 1998-2002 (Wabnitz et al., 2003), onde um cavalo-marinho vivo desta espécie pode ser vendido por \$ 300 nos EUA ([www.seahorse.com](http://www.seahorse.com)). *H. reidi* também está como vulneráveis na “Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção” (MMA, 2014).

O cultivo de cavalos-marinhos mostra um grande potencial não só como um produto comercial, mas também como uma importante ferramenta para a conservação (Koldewey e Martin-Smith, 2010), podendo auxiliar na diminuição do extrativismo. Embora os protocolos para o cultivo destes peixes tenham sido aprimorados e o fechamento do ciclo reprodutivo para algumas espécies tenha sido obtido (Koldewey e Martin-Smith, 2010), a alimentação e nutrição, principalmente devido a alterações na dieta ao longo do desenvolvimento destes animais, ainda constituem os principais desafios para sua produção.

Uma das principais limitações para a produção de cavalos-marinhos é a baixa sobrevivência dos juvenis nos primeiros dias de vida, devido à inadequação nutricional, tipo e tamanho do primeiro alimento (Payne e Rippingale, 2000; Lin et al., 2007; Olivotto et al., 2008b). Um protocolo de alimentação único e adequado para todas as espécies de cavalos-marinhos não é viável, uma vez que a biologia, tamanho dos recém-nascidos e capacidade digestiva são espécie-específica (Olivotto et al., 2011).

Rotíferos *Brachionus* sp. e a *Artemia* sp. são comumente utilizados nos primeiros dias de vida na larvicultura de peixes marinhos devido a praticidade e conveniência (Hoff e Snell, 2008). Entretanto, devido às maiores taxas de mortalidade encontradas na maioria dos

estudos com cavalos-marinhos alimentados com esses dois ítems (Olivotto et al., 2008a; Willadino et al., 2012; Pham e Lin, 2013), trabalhos vem testando o uso de copépodes cultivados (Celino et al., 2012; Olivotto et al., 2008a; Sheng et al., 2006; Willadino et al., 2012) e zooplâncton selvagem (Job et al., 2006; Hora e Joyeux, 2009; Pham e Lin, 2013).

Zooplâncton selvagem já é empregado com sucesso na primeira alimentação de juvenis de *H. reidi* em cultivo comercial (Hora et al., 2010). Entretanto, apesar dos seus benefícios nutricionais, este pode trazer patógenos e contaminação com outros organismos indesejáveis para o sistema de cultivo (Burhans e Melechinsky, 2000), além da sua composição ser variável com a sazonalidade (Hoff e Snell 2008), o que pode prejudicar a produção. Porém, ainda assim proporciona boa sobrevivência e crescimento para juvenis de *H. reidi* (Hora e Joyeux, 2009; Pham e Lin, 2013).

As vantagens dos copépodes (coletados ou cultivados) são principalmente devido ao elevado valor nutritivo, grande variedade de tamanho e a sua natação, que promove estímulos visuais às larvas de peixes (Støttrup e Norsker, 1997; Rajkumar e Kumaraguru 2006; Vu et al., 2014; Barroso et al., 2015). Copépodes são naturalmente ricos em ácidos graxos altamente insaturados (HUFA's), principalmente, ácido docosaheptaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA), ambos essenciais para os primeiros estágios de desenvolvimento dos peixes marinhos (Sargent et al., 1997).

Os copépodes calonóides e ciclopóides cultivados são considerados melhores como alimento para cavalos-marinhos em relação aos harpacticóides (Payne e Rippingale, 2000; Holt, 2003; Job et al., 2006; Olivotto et al., 2008a), uma vez que apresentam todas as fases de vida pelágicas, tornando-os mais fáceis de serem predados. Quando copépodes harpacticóides cultivados foram utilizados na alimentação de *H. reidi*, elevadas taxas de mortalidade foram observadas (Olivotto et al., 2008a; Willadino et al., 2012). Deve-se ressaltar que, para o cultivo de copépodes, normalmente é necessário a produção e uso de mais de duas espécies de microalgas para alimentá-los, o que torna o cultivo mais restritivo devido ao alto custo e o trabalho intensivo (Nanton e Castell, 1999; Knuckey et al., 2005; Vu et al., 2014). Deste modo, o uso de dieta inerte no cultivo de copépodes pode auxiliar na diminuição do custo de produção, facilitando a criação desses organismos, como já verificado por Barroso et al. (2015).

Assim, visando implementar métodos alternativos ou complementares na primeira alimentação de *H. reidi*, testou-se o uso do copépode calanóide *Paracalanus quasimodo* cultivado com uma dieta inerte juntamente com rotíferos em relação ao zooplâncton selvagem e rotíferos.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Ictiologia e Maricultura Ornamental (LabIMO), da Universidade Federal do Espírito Santo, Aracruz, ES, Brasil.

### 2.1 CULTIVO DO COPÉPODE *Paracalanus quasimodo* E OUTROS ALIMENTOS VIVOS UTILIZADOS

*Copépode*: para o cultivo do copépode, zooplâncton selvagem foi coletado no estuário do Rio Piraquê-Açú, Aracruz, ES, Brasil (40° 09' 14,41"O, 19° 57' 01,13"S) no mês de janeiro (verão), com auxílio de uma rede de planctôn cônica de 60 cm de diâmetro, malha de 200 µm, e copo cego durante cinco minutos, com velocidade de 1 nó. Os organismos maiores foram triados, permanecendo indivíduos entre 100-350 µm. Os indivíduos foram acondicionados em um tanque de 200 L com volume inicial de 20 L com água clorada e declorada e aeração moderada. Os copépodos foram alimentados somente com dieta comercial para o cultivo de rotíferos (Selco Parkle, Inve<sup>®</sup>, Bélgica) na quantidade de 1g por milhão de copépode segundo metodologia já utilizada para o cultivo de *Oithona* sp. (Barroso et al., 2015).

O tanque dos copépodes foi acrescido de 20% do volume por dia e uma vez por semana 100% da água era renovada, para manter boa qualidade de água. Semanalmente foi verificada a composição do zooplâncton e a densidade. Após uma semana, os copépodes *Paracalanus quasimodo* (Calanoida), *Temora* sp. (Calanoida) e *Oithona* sp. (Cyclopoida) predominaram no cultivo. Em três semanas, a espécie *P. quasimodo* predominou totalmente, chegando a uma densidade maior que 3 ind.mL<sup>-1</sup> em 200L de água. A temperatura e a salinidade do cultivo permaneceram entre 23,0 ± 1,0°C e 25,0 ± 1,0 (média ± desvio padrão) psu, respectivamente. Foram ofertados para os cavalos-marinhos somente copépodes menores que 350 µm.

*Zooplâncton selvagem*: foi coletado diariamente nos meses de janeiro e fevereiro (verão) no estuário do rio Piraquê-Açu com auxílio

de uma rede de plâncton cônica de malha 100  $\mu\text{m}$  e posteriormente triado (350  $\mu\text{m}$ ) para a retirada dos organismos maiores antes do fornecimento aos cavalos marinhos. A comunidade zooplânctônica estuarina no Piraquê-Açu é largamente dominada por copépodes *Acartia lilljeborgi*, *Temora turbinata*, *Parvocalanus crassirostris*, *Oithona oswaldocruzi*, *Oithona oculata*, *Euterpina acutifronse*, *Paracalanus pавus* (Nunes, 2010).

*Rotíferos e artemia*: rotíferos *Brachionus* sp. (50-220  $\mu\text{m}$ ) foram cultivados em tanques cônicos de 100 L, a uma densidade de 100 a 150 ind/ $\text{mL}^{-1}$ , e alimentados com S. parkle (Inve<sup>®</sup> Bélgica) de acordo com metodologia do fabricante. Os cistos de *Artemia* sp. eclodiam em um tanque cônico de 2 L a 28°C, e após 24 horas, os náuplios eram acondicionados em um tanque de 20 L contendo emulsão nutritiva Super Selco (Inve<sup>®</sup> Bélgica) por 24 horas, conforme metodologia do fabricante, antes do fornecimento aos cavalos-marinhos.

## 2.2. ORIGEM E CONDIÇÕES GERAIS DE MANUTENÇÃO DOS CAVALOS-MARINHOS

Foi utilizada uma ninhada de uma das matrizes já pertencentes ao plantel de reprodutores do laboratório. As matrizes eram alimentadas quatro vezes ao dia até a saciedade, duas vezes pela manhã e duas no período da tarde. A alimentação consistia de misidáceos *Mysidium gracile* (Crustacea: Misidacea) coletados no ambiente natural e congelados. Os aquários eram sifonados três vezes ao dia na parte da tarde, antes das duas ofertas de alimento e uma hora depois da última alimentação para remover restos de alimento e fezes do fundo. O fotoperíodo para as matrizes foi de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. A temperatura e a salinidade se mantiveram em  $25,1 \pm 0,2$  °C e  $20,4 \pm 0,3$  psu, respectivamente.

## 2.3. DESENHO EXPERIMENTAL

Após o nascimento, os filhotes de cavalos-marinhos foram divididos em aquários de 20 L (40 indivíduos por aquário - 2 indivíduos. $\text{L}^{-1}$ ) onde foram testados quatro alimentações do nascimento ao 7<sup>o</sup> dia (considerada como primeira alimentação), em triplicata.

**Dieta R**: rotífero - *Brachionus* sp. (10 indivíduos. $\text{mL}^{-1}$ ); **Dieta ZS** (controle): zooplâncton selvagem de 100 a 300  $\mu\text{m}$  (3 ind. $\text{mL}^{-1}$ ); **Dieta R+ZS**: rotífero - *Brachionus* sp. (5 ind. $\text{mL}^{-1}$ ) + zooplâncton selvagem

de 100 a 300  $\mu\text{m}$  ( $1,5 \text{ ind.mL}^{-1}$ ) e **Dieta R+CC**: Rotífero - *Brachionus sp.* ( $5 \text{ ind.mL}^{-1}$ ) + copépode cultivado *Paracalanus quasimodo* ( $1,5 \text{ ind.mL}^{-1}$ ). O zooplâncton selvagem possuía tamanho entre 100-350  $\mu\text{m}$ , os rotíferos entre 50-220  $\mu\text{m}$  e os copépodes cultivados 100 -350  $\mu\text{m}$ .

O zooplâncton selvagem foi incluído uma vez que este é o alimento mais utilizado na primeira alimentação de *H. reidi* em cultivo comercial no Brasil. Não foi utilizado um tratamento somente com copépode uma vez que sua produção em larga escala não foi possível neste estudo.

A partir do 5<sup>o</sup> dia até o final do experimento (12<sup>o</sup> dia) foi introduzido na alimentação metanaúplios de *Artemia sp.* ( $3 \text{ ind.mL}^{-1}$ ) de maneira gradual, sendo que no primeiro dia de transição (5<sup>o</sup> dia de vida dos juvenis) foi ofertado 75% da dieta habitual e 25% *Artemia sp.*, no segundo dia 50% de cada alimentação, no terceiro dia de transição foi oferecido 25% da dieta e 75% de *Artemia sp.*, e a partir do quarto dia (8<sup>o</sup> dia de vida), 100% de *Artemia sp.* Nos primeiros sete dias, o alimento foi ofertado aos animais duas vezes ao dia, a metade da densidade assim que acendiam as luzes pela manhã (09:00h) e a outra metade no início da tarde (14:00h), para garantir a qualidade nutricional dos alimentos. Do 8<sup>o</sup> dia até o final do experimento, *Artemia sp.* foi ofertada até a saciedade.

O experimento foi realizado em um sistema de recirculação de água equipado com skimmer, filtro biológico de alga calcárea e filtro ultravioleta de 36W em aquários de 20 L (34,5cm de altura x 24 cm de comprimento x 24 cm de largura) com paredes azuis. O fluxo de água de cada aquário era de  $40 \text{ L.h}^{-1}$ . Os parâmetros físico-químicos da água do sistema de recirculação foram aferidos diariamente. A temperatura da água foi de  $24,8 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , e a salinidade mantida em  $20,3 \pm 0,4 \text{ psu}$ , de acordo com os melhores resultados encontrados por Hora et al. (*in prep. capítulo 1*) sendo aferidos com o medidor multiparâmetro YSI ec300 (precisão de 0,1). O pH foi mensurado com pHmetro elétrico de precisão 0,1 (modelo ph-700, Instrutherm, USA) e manteve-se entre  $7,9 \pm 0,1$ . A amônia total e o nitrito, mensurados com teste colorimétrico, permaneceram abaixo de 0,05 ppm. O oxigênio mensurado com um oxímetro (MO-910, Instrutherm, USA) e manteve-se entre  $7,1 \pm 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ .

## 2.4 BIOMETRIA

O crescimento, tanto em altura quanto em peso, foi estimado como a média de seis indivíduos amostrados no dia do nascimento (dia zero), e aleatoriamente em cada unidade experimental (n=18 peixes por tratamento) no 5<sup>o</sup>, 8<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dia. Os animais foram anestesiados com benzocaína (5 mg.L<sup>-1</sup>), fotografados, pesados (precisão 0,1mg) usando como tara um béquer de 50 mL com água do sistema e devolvidos em seu aquário de origem. Após a biometria, não houve alteração de comportamento e os peixes foram capazes de se alimentar imediatamente. Fotos graduadas de cada indivíduo foram utilizadas para a medição dos animais no programa SigmaScan Pro 5<sup>®</sup>, sendo a altura definida como a soma da altura da coroa, do comprimento do tronco e do comprimento da cauda (Lourie et al., 1999).

A partir dos dados biométricos, foram calculadas:

- *Taxa de crescimento diário (TCD, em mm.dia<sup>-1</sup>)*: sendo a declividade *b* da regressão linear  $Altura = a + b.Idade$ .

- *Coefficiente de variação da altura (CV)* (calculado somente para 12<sup>o</sup> dia):

$CV=100x$  (desvio padrão da altura/média da altura)

- *Taxa de crescimento específico em peso (TCE)(% dia<sup>-1</sup>)*:

$TCE=100x$  (ln(Peso Final)-ln(Peso Inicial))/Tempo

- *Fator de condição (FC)*:

$FC=Peso/Altura^3$

## 2.5 ANÁLISES DE ÁCIDOS GRAXOS

Ao final do experimento, os animais não foram alimentados por 24 horas de três a seis cavalos-marinhos de cada aquário foram coletadas em triplicata para análises de ácidos graxos. Amostras dos alimentos também foram coletadas para análises de ácido graxo.

A análise de ácidos graxos foi realizada no Laboratório de Geoquímica Ambiental (LabGAm) da UFES seguindo a metodologia descrita por Neto et al. (2006) com modificações. As amostras foram liofilizadas (-30°C; 48h) e extraídas em diclorometano (DCM): metanol (9:1; v:v) por banho ultrasônico (15 min.) em três seções intercaladas por centrifugação (15 min.; 3000 rpm). A seguir, elas foram concentradas por evaporador-rotativo e o excesso de solvente removido sob fluxo de N<sub>2</sub> puro. Posteriormente, os extratos foram metilados (metanol: cloreto de acetila, v: v; 12h; 40°C) e silanizados (50 µL de

BSTFA (NiO-bis (trimetilsililtrifluoracetamida com 1% de trimetil-cloro-silano; 40 min; 60°C). Os extratos lipídicos foram diluídos em DCM (1000 µL) e alíquotas de 1µL foram injetadas no cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies, modelo 7890A) com detector de ionização em chama com injetor split/splitless e uma coluna capilar DB-5 (30 m x 250 µm.x 0,25 µm). O forno foi inicialmente aquecido a 60°C por 1 min., com sua temperatura elevada a 6°C/min até 300°C, permanecendo nesta temperatura por 20 min. A quantificação dos compostos foi baseada nas áreas dos picos sendo a concentração calculada a partir da injeção de uma mistura de padrões contendo 37 ácidos graxos metil ésteres (FAMES, Sigma-Aldrich) e padrão interno  $\alpha$ -colestano (100 µg.mL<sup>-1</sup>) que foi adicionado após a extração.

O equipamento utilizado para a leitura dos ácidos graxos (cromatógrafo gasoso), não detectou, por problemas técnicos, os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), que são os de maior interesse para os organismos marinhos. Posteriormente, será realizada nova leitura das amostras devidamente armazenadas com colunas cromatográficas específicas, cuja resolução permite a separação de ácidos graxos poliinsaturados e seus isômeros. Desta forma, os resultados de ácidos graxos saturados lidos estão apresentados no Anexo 3.

## 2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  erro padrão das três réplicas. Uma vez que somente os dados de sobrevivência e peso não foram normais nem homocedásticos, estes foram transformados por arco seno. Foi aplicada análise da variância ANOVA one way para verificar diferenças estatísticas entre os tratamentos. Em todas as idades (do 1<sup>o</sup> ao 12<sup>o</sup> dia) foram testadas a significância para a sobrevivência, enquanto para os dias 5<sup>o</sup>, 8<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> foram testadas para as variáveis descrevendo o crescimento. As diferenças detectadas foram testadas por Tukey HSD. As análises foram realizadas utilizando o programa SPSS 16.0 e assumindo um nível de significância  $\alpha=0,05$ , com exceção das análises sobre ácidos graxos onde foi  $\alpha=0,01$  devido ao grande número de testes.

## 3 RESULTADOS

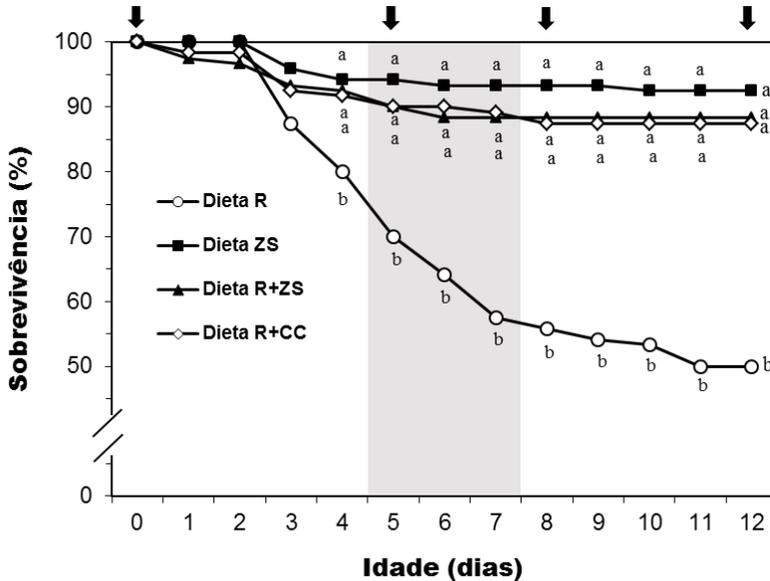
Os resultados do cultivo do copépode *P. quasimodo* utilizando a dieta comercial inerte foram bastante satisfatórios, uma vez que foi

obtido um crescimento populacional diário de 10-20% e uma população variando entre 2,9-4,0 copépodes.mL<sup>-1</sup>, numa distribuição de 10:3:1 para náuplios, copepoditos e adultos.

A utilização do copépode cultivado com rotíferos (Dieta R+CC) mostrou resultados de sobrevivência dos juvenis de cavalos-marinhos similares ao das dietas com rotífero e zooplâncton selvagem (R+ZS) e somente zooplâncton selvagem (ZS), e superiores ao de juvenis alimentados somente com rotífero (Dieta R). Com esta última dieta, observou-se queda significativa de sobrevivência a partir do 4º dia ( $P < 0,05$ ). Ao final dos 12 dias de experimento, as melhores percentagens de sobrevivência acumulada também foram observadas nas dietas que haviam uma combinação de itens alimentares (Dietas ZS, R+ZS e R+CC: 92,5±3,0; 88,3±1,44 e 87,5±0,0%, respectivamente) comparado com a dieta composta somente de rotífero (Dieta R: 50,0±7,2%) (Figura 1).

Em todas as idades testadas, os valores de peso dos juvenis das Dietas R+CC, R+ZS e ZS foram aproximadamente três vezes superiores aos da Dieta R e os de altura foram aproximadamente 40% maior (Figura 2). Os parâmetros de crescimento (TCD e TCE) também foram significativamente maiores para as Dietas R+CC, R+ZS e ZS em relação a Dieta R ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1). Não foram observadas diferenças significativas em relação ao coeficiente de variação (CV) e fator de condição (FC) ( $P > 0,05$ ).

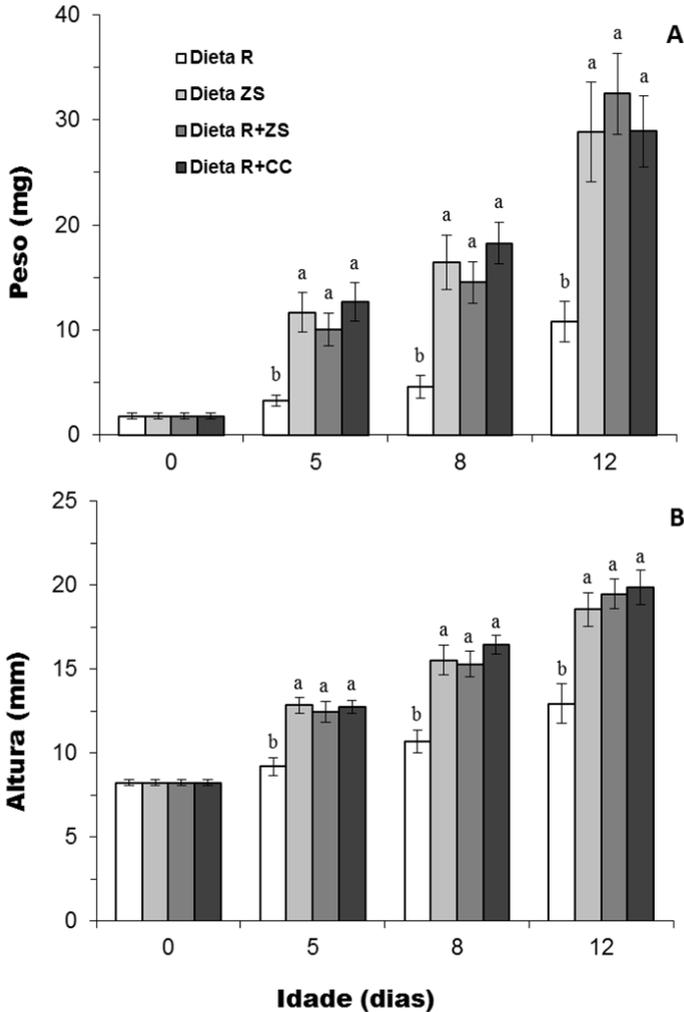
**Figura 1** – Média de sobrevivência acumulada (%) de juvenis de *Hippocampus reidi* submetidos a diferentes dietas (os erros padrões das médias entre réplicas foram omitidos para melhor visualização). Dieta R = rotíferos, Dieta ZS = zooplâncton selvagem, Dieta R+ZS = rotífero + zooplâncton selvagem, Dieta R+CC = rotífero + copépode cultivado. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). A faixa vertical cinza indica a transição da alimentação e as setas o dia de amostragem para a biometria.



**Tabela 1:** Taxa de crescimento diário (TCD), taxa de crescimento específico (TCE), fator de condição (FC) e coeficiente de variação da altura (CV) (média  $\pm$  erro padrão) para juvenis de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* submetidos a quatro dietas: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre dietas. Dieta R = rotíferos, Dieta ZS = zooplâncton selvagem, Dieta R+ZS = rotífero + zooplâncton selvagem, Dieta R+CC = rotífero + copépode cultivado.

Dieta	TCD (mm.dia <sup>-1</sup> )	TCE (% dia <sup>-1</sup> )	FC	CV
R	0,53 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	14,28 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	0,46 $\pm$ 0,06	15,11 $\pm$ 3,62
ZS	1,43 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	24,19 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	0,44 $\pm$ 0,03	9,33 $\pm$ 0,86
R+ZS	1,53 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	23,09 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup>	0,45 $\pm$ 0,04	7,03 $\pm$ 1,68
R+CC	1,58 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	23,19 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>	0,36 $\pm$ 0,01	8,61 $\pm$ 2,46

**Figura 2** – Peso médio (A) e altura média (B) ( $\pm$  erro padrão) de juvenis de *Hippocampus reidi* no dia do nascimento e no 5<sup>o</sup>, 8<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dia de vida, submetidos a diferentes dietas. Dieta R = rotíferos, Dieta ZS = zooplâncton selvagem, Dieta R+ZS = rotífero + zooplâncton selvagem, Dieta R+CC = rotífero + copépode cultivado. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferença significativa entre tratamentos ( $P < 0,05$ ).



## 4 DISCUSSÃO

O presente trabalho é inovador, uma vez que o cultivo do copépode *P. quasimodo* foi realizado com sucesso utilizando somente uma dieta comercial inerte. O uso de alimento inerte diminuiu consideravelmente o trabalho e o custo de produção do copépode, uma vez que não haveria a necessidade da produção de microalgas para alimentar os copépodas. Adicionalmente, o copépode *P. quasimodo* demonstrou ser mais resistente às condições de cativeiro que os demais copépodas selecionados na coleta de zooplâncton.

Mais importante, a sua utilização apenas como complemento alimentar, ofertado juntamente com rotífero, demonstrou ser tão eficiente quanto à alimentação com zooplâncton selvagem. Copépodas utilizados apenas como complemento alimentar, juntamente com rotíferos ou *Artemia sp.*, têm se mostrado mais eficientes na alimentação de juvenis de cavalos-marinhos e outros peixes marinhos que quando ofertado apenas um desses dois itens (Olivotto et al., 2008a, 2008b; Celino et al., 2012; Barroso et al., 2013). Ryer e Boehlert (1983), sugerem que o total de energia adquirida aumenta com a maior diversidade de itens alimentares na dieta de larvas de peixes.

Comparando-se com outros trabalhos, nenhum outro copépode cultivado obteve resultados tão satisfatórios na alimentação de *H. reidi* (Olivotto et al., 2008a; Willadino et al., 2012). Enquanto neste estudo, foram obtidas em média 87,5 % de sobrevivência nos 12 primeiros dias de vida com a Dieta R+CC, Olivotto et al. (2008a) e Willadino et al. (2012) obtiveram entre 20-40%, utilizando rotífero com o copépode harpacticóide *Tisbe sp.* cultivado. Assim, mais estudos devem ser realizados afim de aprimorar o cultivo de *P. quasimodo* com dietas comerciais e desenvolver um protocolo de cultivo.

Apesar dos resultados satisfatórios da utilização do copépode *P. quasimodo*, seu uso em larga escala para uma produção comercial de *H. reidi* ainda deve ser testado. Fazendo uma simulação para a produção de mil cavalos-marinhos, nas mesmas condições do tratamento da Dieta R+CC, seriam necessários aproximadamente 20 milhões de copépodas por dia, na primeira semana de cultivo. Ou seja, nas condições do presente estudo, tanques com 6 mil litros de água com densidade média de 3,0 copépodas.mL<sup>-1</sup> disponíveis diariamente. Deste modo, mais estudos devem ser realizados afim de avaliar a utilização de *P. quasimodo* individualmente na dieta de *H. reidi* ou com diferentes densidades juntamente com rotíferos.

O zooplâncton selvagem é o alimento natural das larvas de peixes, porém apresenta vantagens e desvantagens ao ser utilizado na aquicultura. As principais vantagens são o baixo custo, a elevada diversidade de espécies de tamanho variado, o alto valor nutritivo e as altas taxas de ácidos graxos em relação aos alimentos comumente utilizados (rotíferos e *Artemia* sp.), mesmo enriquecidos. Wittenrich (2007) relata que tais organismos providenciam elevada taxa de sobrevivência e larvas mais saudáveis. No cultivo comercial de cavalos-marinhos no Brasil, a primeira alimentação é constituída somente de zooplâncton selvagem (Hora et al., 2010). Porém, a coleta de zooplâncton apresenta algumas desvantagens. Entre outras, os locais de coleta, que normalmente são estuários ou regiões costeiras, podem estar contaminados, a abundância, a diversidade e a qualidade dos organismos são influenciadas pela sazonalidade e intempéries climáticas e organismos patogênicos e/ou oportunistas podem ser introduzidos ao sistema de cultivo. Deste modo, a escolha de um bom local de coleta e a triagem do zooplâncton são necessários para a sua utilização.

Embora o rotífero seja utilizado no cultivo de diversas espécies de larvas de peixes marinhos (Haché e Plante, 2011), sozinho, este alimento não foi eficiente na alimentação de recém-nascidos de *H. reidi*, corroborando os dados de Olivotto et al. (2008a), Willadino et al. (2012) e Pham e Lin (2013). O desempenho insatisfatório na Dieta R, também pode ser resultado de menor concentração de ácidos graxos altamente insaturados (HUFA's) neste alimento vivo em relação aos copépodes calanóides (Toledo et al., 1999; Olivotto et al., 2011; Barroso et al., 2015). Larvas e juvenis da maioria das espécies de peixes marinhos exigem presas com um alto teor nutricional, principalmente HUFA's que são essenciais na dieta (Sargent et al., 1999). Enquanto as exigências de ácidos graxos dos cavalos-marinhos, não são exatamente conhecidas, é sugerido que suas necessidades sejam similares as de outros peixes marinhos (Payne e Ripplingale 2000).

Outra hipótese para este baixo desempenho seria uma possível deficiência em fósforo e outros micronutrientes fornecidos através dos rotíferos. Diferente de qualquer outro peixe destinado para aquicultura, os cavalos-marinhos possuem pele esticada em cima de uma série de placas ósseas como anéis ao redor do tronco e da cauda (ver Foster e Vincent, 2004), formando uma armadura subdérmica flexível (Praet et al., 2012; Porter et al., 2013), o que provavelmente aumenta a porcentagem de peso corporal em osso em relação a maioria dos peixes teleósteos. É sabido que, para a formação e desenvolvimento do tecido

ósseo, são necessários vários minerais e micronutrientes, principalmente cálcio e fósforo (Martínez-valverde et al., 2000; Toppe et al., 2007). A exigência de cálcio em peixes é normalmente suprida pela absorção direta na água (Borba et al., 2012). Já a necessidade de fósforo é quase totalmente dependente da dieta (Dato-Cajegas e Yakupitiyage, 1996). Desta forma, a sua deficiência na alimentação em peixes ocasiona retardo no crescimento, baixa eficiência alimentar, acúmulo de gordura corporal e má formação óssea (Borba et al., 2012). *H. reidi*, nas primeiras semanas de vida está com o esqueleto em formação, uma vez que a condrogênese já está bem estabelecida desde o nascimento e a osteogênese é mais evidente a partir do 8<sup>o</sup> dia (Franz-odendaal e Adriaens, 2014). Deste modo, a exigência de minerais na dieta para a formação esquelética, que geralmente já é maior para larvas de peixes do que para adultos (Hamre et al., 2008), deve ser superior para a formação da grande estrutura óssea dos cavalos-marinhos recém-nascidos. No presente estudo, a composição mineral do rotífero possivelmente não deve ter suprido tais necessidades, como já verificado por Hamre et al. (2008), ao observar que mesmo enriquecendo rotíferos com emulsões enriquecedoras comerciais, óleos de algas e algumas espécies de microalgas, este alimento vivo, ao contrário dos copépodes selvagens, apresentaram deficiência em fósforo e vários micronutrientes requeridos para larvas de peixes marinhos.

Adicionalmente, o rotífero pode ser muito pequeno para satisfazer adequadamente o apetite dos cavalos-marinhos ou mesmo atrair o seu interesse, fato este comprovado por Willadino et al. (2012), que mostraram que poucos ou nenhum rotífero foi ingerido por *H. reidi*. Parece duvidoso que cavalos-marinhos se beneficiariam com a energia de tal dieta devido ao custo global negativo envolvido para a sua captura (Hora e Joyeux, 2009) ou que gastariam muita atenção em presas menores e menos energéticas (Payne e Ripplingale, 2000; Hora e Joyeux, 2009). Em contrapartida, em um único trabalho, Pham e Lin (2013), enriquecendo rotíferos com um produto comercial (Dan's Feed, Florida, EUA), encontraram desempenho equivalente ao tratamento com zooplâncton selvagem para *H. reidi*. Assim, outros enriquecedores industriais e outras espécies de rotíferos também devem ser testados para alimentação inicial da espécie a fim de melhorar a suplementação com copépodes.

## 5 CONCLUSÃO

A primeira alimentação de *H. reidi* com copépode cultivado juntamente com rotíferos mostrou resultados de sobrevivência e crescimento equivalentes à alimentação com zooplâncton selvagem, e superiores à alimentação somente com rotíferos.

O copépode calanóide *Paracalanus quasimodo* foi cultivado com sucesso somente com uma dieta comercial para o cultivo de rotíferos, que pode ser um possível substituto ao uso de microalgas. *P. quasimodo* demonstrou ser resistente às condições de cultivo, podendo ser um potencial candidato para produção intensiva. Porém estudos adicionais são necessários.

## 6 REFERÊNCIAS

- Barroso, M. V., Carvalho, C.V. a, Antoniassi, R., Cerqueira, V.R., 2013. Use of the copepod *Acartia tonsa* as the first live food for larvae of the fat snook *Centropomus parallelus*. *Aquaculture* 388-391, 153–158.
- Barroso, M. V., Barroso Boss, B., Antoniassi, R., Fernandes, L.F.L., 2015. Use of the copepod *Oithona* sp . as a bioencapsulator of essential fatty acids. *Brazilian J. Oceanogr.* 63, 20.
- Borba, M. R. Sá, M. V. C. Abreu, J. S. Vitaminas e Minerais. In: Fracalossi, D.M., Cyrino, E.P. *Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira*. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p.185-208, 2012.
- Burhans, R. A., D. Melechinsky. 2000. Seahorse husbandry and propagation. Birch Aquarium at Scripps, Scripps Institution of Oceanography, La Jolla, California, USA.
- Celino, F.T., Hilomen-Garcia, G. V., del Norte-Campos, A.G.C., 2012. Feeding selectivity of the seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker), juveniles under laboratory conditions. *Aquac. Res.* 43, 1804–1815.
- CITES, 2014 – *Convention on international trade in endangered species of wild flora and fauna*. Disponível em: [www.cites.org](http://www.cites.org). Acesso em: 07 de Jan de 2014.
- Dato-Cajegas, C.R.S., Yakupitiyage, A., 1996. The need for dietary mineral supplementation for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultured in a semi-intensive system. *Aquaculture* 144, 227–237.

- Foster, S.J., Vincent, A.C.J., 2004. Life history and ecology of seahorses : implications for conservation and management. *J. Fish Biol.* 65, 1–61.
- Franz-odendaal, T.A., Adriaens, D., 2014. Comparative developmental osteology of the seahorse skeleton reveals heterochrony amongst *Hippocampus sp.* and progressive caudal fin loss Comparative developmental osteology of the seahorse skeleton reveals heterochrony amongst *Hippocampus sp.* and progr. *Evodevo* 45, 1–11.
- Froese, R. & Pauly, D. (2013). FishBase. Available from: <http://www.fishbase.org> (accessed 1 November 2014).
- Garcia, A. S., Gonsçalves, L.U., Cavalli, R. O., Viegas, E. M. M. In: Fracalossi, D.M., Cyrino, E.P. Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p.185-208, 2012.
- Haché, R., Plante, S., 2011. The relationship between enrichment, fatty acid profiles and bacterial load in cultured rotifers (*Brachionus plicatilis* L-strain) and Artemia (*Artemia salina* strain Franciscana). *Aquaculture* 311, 201–208.
- Hamre, K., Srivastava, a., Rønnestad, I., Mangor-Jensen, a., Stoss, J., 2008. Several micronutrients in the rotifer *Brachionus sp.* may not fulfil the nutritional requirements of marine fish larvae. *Aquac. Nutr.* 14, 51–60.
- Hoff, F. and T. Snell. 2008. Plankton culture manual. Florida Aqua Farms, Dade City, Florida, USA.
- Hora, M.D.S.C. Da, Joyeux, J.-C., 2009. Closing the reproductive cycle: Growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions. *Aquaculture* 292, 37–41.
- Hora, M. S. C., J. C. Joyeux, e M. T. L. Carlos. Cultivo de Cavalomarinheiro (*Hippocampus reidi*). In: *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil, 2ª ed.*, por B. BALDISSEROTTO e L. C. GOMES, págs. 401-428. Santa Maria: Editora UFSM, 2010.
- Holt, G.J., 2003. Research on culturing the early life history stages of marine ornamental species. In: Cato, J.C., Brown, C.L. (Eds.), *Marine Ornamental Species: Collection, Culture and Conservation*. Iowa State Press, Ames, IO, pp. 251–254.
- IUCN 2014. *Red list of threatened species*. Disponível em: [www.redlist.org](http://www.redlist.org). Acesso em 10 Agosto de 2014.

- Job, S., Do, H., Meeuwig, J., Hall, H., 2002. Culturing the oceanic seahorse, *Hippocampus kuda*. *Aquaculture* 214, 333–341.
- Job, S.; Buu, D.; Vincent, A. 2006. Growth and survival of the tiger tail seahorse, *Hippocampus comes*. *J. World Aquac. Society*. 37, 322–327.
- Knuckey, R.M., Semmens, G.L., Mayer, R.J., Rimmer, M. a., 2005. Development of an optimal microalgal diet for the culture of the calanoid copepod *Acartia sinjiensis*: Effect of algal species and feed concentration on copepod development. *Aquaculture* 249, 339–351.
- Koldewey, H.J., Martin-Smith, K.M., 2010. A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture* 302, 131–152.
- Lin, Q., Gao, Y., Sheng, J., Chen, Q., Zhang, B., Lu, J., 2007. The effects of food and the sum of effective temperature on the embryonic development of the seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker. *Aquaculture* 262, 481–492.
- 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, Londres, Inglaterra, 214 p.
- Martínez-valverde, I., Jesu, M., Periago, Â., Santaella, M., Ros, G., 2000. The content and nutritional significance of minerals on the fish flesh in the presence and absence of bone. *Food Chem.* 71, 503–509.
- Nanton, D. a., Castell, J.D., 1999. The effects of temperature and dietary fatty acids on the fatty acid composition of harpacticoid copepods, for use as a live food for marine fish larvae. *Aquaculture* 175, 167–181.
- Neto, R.R. ; Wolff, G ; Bellett, D ; Mackenzie, K ; Thompson, A. 2006. The influence of changing food supply on the lipid biochemistry of deep-sea holothurians. *Deep-Sea Research. Part 1, Oceanographic Research Papers*, v.53, n.3, p.516-527.
- Nunes, R. A., 2010. Composição e estrutura da comunidade zooplânctônica de um estuário tropical (Espírito Santo, Brasil). Programa de pós-graduação em oceanografia ambiental. Vitória-ES, 70p.
- Olivotto, I., Avella, M. a., Sampaolesi, G., Piccinetti, C.C., Navarro Ruiz, P., Carnevali, O., 2008a. Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: Rearing and feeding studies. *Aquaculture* 283, 92–96.

- Olivotto, I., Capriotti, F., Buttino, I., Avella, a. M., Vitiello, V., Maradonna, F., Carnevali, O., 2008b. The use of harpacticoid copepods as live prey for *Amphiprion clarkii* larviculture: Effects on larval survival and growth. *Aquaculture* 274, 347–352.
- Olivotto, I., Planas, M., Simões, N., Holt, G.J., Avella, M.A., Calado, R., 2011. Advances in Breeding and Rearing Marine Ornamentals. *J. World Aquac. Soc.* 42, 135–166.
- Payne, M., Rippingale, R., 2000. Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched Artemia. *Aquaculture* 188, 353–361.
- Pham, N.K., Lin, J., 2013. The Effects of Different Feed Enrichments on Survivorship and Growth of Early Juvenile Longsnout Seahorse, *Hippocampus reidi*. *J. World Aquac. Soc.* 44, 435–446.
- Porter, M.M., Novitskaya, E., Castro-Ceseña, A.B., Meyers, M. a., McKittrick, J., 2013. Highly deformable bones: Unusual deformation mechanisms of seahorse armor. *Acta Biomater.* 9, 6763–6770.
- Praet, T., Adriaens, D., Cauter, S. van, Masschaele, B., Beule, M. de B., Verheghe, B., 2012. Coupled electromechanical model of the heart: parallel finite element formulation. *Int. j. numer. method. biomed. eng.* 28, 72–86.
- Rajkumar, M., Kumaraguru vasagam, K.P., 2006. Suitability of the copepod, *Acartia clausi* as a live feed for Seabass larvae (*Lates calcarifer* Bloch): Compared to traditional live-food organisms with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture* 261, 649–658.
- Ryer, C.H., Boehlert, G.W., 1983. Feeding chronology, daily ration, and the effects of temperature upon gastric evacuation in the pipefish, *Syngnathus fuscus*. *Environ. Biol. Fishes* 9, 301–306.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., Estevez, A., 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177, 191–199.
- Sargent, J.R., McEvoy, L. a., Bell, J.G., 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155, 117–127.
- Sheng, J., Lin, Q., Chen, Q., Gao, Y., Shen, L., Lu, J., 2006. Effects of food, temperature and light intensity on the feeding behavior of three-spot juvenile seahorses, *Hippocampus trimaculatus* Leach. *Aquaculture* 256, 596–607.

- Støttrup, J.G., Norsker, N.H., 1997. Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture* 155, 231–247.
- Vanacor Barroso, M., Barroso Boss, B., Antoniassi, R., Fernandes, L.F.L., 2015. Use of the copepod *Oithona* sp. as a bioencapsulator of essential fatty acids. *Brazilian J. Oceanogr.* 63, 20.
- Vu, M.T.T., Jepsen, P.M., Hansen, B.W., 2014. A comprehensive and precise quantification of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana) for intensive live feed cultures using an automated ZooImage system. *Aquaculture* 422-423, 225–231.
- Wabnitz, C., Taylor, M., Green, E., Razak, T., 2003. From ocean to aquarium. UNEP-WCMC, Cambridge. 65 pp.
- Willadino, L., Souza-Santos, L.P., Mélo, R.C.S., Brito, A.P., Barros, N.C.S., Araújo-Castro, C.M.V., Galvão, D.B., Gouveia, A., Regis, C.G., Cavalli, R.O., 2012. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. *Aquaculture* 360-361, 10–16.
- Wittenrich, M. L. 2007. The complete illustrated breeder's guide to marine aquarium fishes. TFH Publications Inc., Neptune City, New Jersey, USA.

## CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo apresentou dados para um aprimoramento do cultivo de cavalos-marinho *H. reidi* nos primeiros dias de vida, servindo de subsídio para a formulação de um protocolo de cultivo da espécie.

As melhores salinidades para o cultivo de juvenis de *H. reidi*, estão entre 10 e 25 psu e que o ponto osmótico da espécie foi estimado em 11,68 psu.

Um período de luz equivalente ao natural é suficiente para juvenis de *H. reidi* se alimentar durante o dia assim, o fotoperíodo intermediário de 10L:14E a 14L:10E é indicado para manter uma boa razão custo-benefício.

As cores de tanques e as densidades testadas não influenciaram no crescimento e sobrevivência de *H. reidi*. É possível a utilização da maior densidade testada (15 ind.L<sup>-1</sup>) com um melhor custo benefício, desde que sejam tomados os cuidados necessários. A partir do 10<sup>o</sup> dia, substratos de fixação devem ser introduzidos no cultivo para os juvenis que se tornam bentônicos. Na fase bentônica é sugerido escolher ou definir a densidade pela quantidade de substratos de maneira linear por indivíduo e não por volume.

A primeira alimentação de *H. reidi* com copépode cultivado juntamente com rotíferos mostrou resultados de sobrevivência e crescimento equivalentes à alimentação com zooplâncton selvagem, e superiores à alimentação somente com rotíferos.

O copépode calanóide *Paracalanus quasimodo* foi cultivado com sucesso somente com uma dieta comercial para o cultivo de rotíferos, que pode ser um possível substituto ao uso de microalgas. *P. quasimodo* demonstrou ser resistente às condições de cultivo, podendo ser um potencial candidato para produção intensiva. Porém estudos adicionais são necessários.

Estudos adicionais com cultivo de *H. reidi* durante todo o seu desenvolvimento devem ser realizados a fim de aprimorar e estabelecer um o protocolo de cultivo da espécie



## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- BAUM, J.K.; MEEUWIG, J.J.; VINCENT, A. Bycatch of lined seahorses (*Hippocampus erectus*) in a Gulf of Mexico shrimp trawl fishery. **Fish. Bull.**, v. 101, p.721–731. 2003.
- BULL, C. **Seahorse husbandry in public aquaria: Manual, with chapters contributed by members of the Syngnathid Discussion Group**. Chicago, John G. Shedd Aquarium, 56p. 2002.
- BOEUF, G.; PAYAN, P. How should salinity influence fish growth? **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.**, v.130, p.411-23. 2001.
- BOEUF, G.; LE BAIL, P.-Y. Does light have an influence on fish growth? **Aquaculture**, v.177, p.129–152. 1999.
- CARCUPINO, M. Functional significance of the male brood pouch in the reproductive strategies of pipefishes and seahorses: a morphological and ultrastructural comparative study on three anatomically different pouches. **J. Fish Biol.**, v. 61, p. 1465–1480, 2002.
- CASTRO, A.L.D.C., DINIZ, A.D.F., MARTINS, I.Z., VENDEL, A.L., OLIVEIRA, T.P.R., ROSA, I.M.D.L. Assessing diet composition of seahorses in the wild using a non destructive method: *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae) as a study-case. **Neotrop. Ichthyol.**, v.6, p.637–644, 2008.
- CITES – *Convention on international trade in endangered species of wild flora and fauna*. Disponível em: [www.cites.org](http://www.cites.org). Acesso em: 07 de Jan de 2014.
- FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil**. III. Teleostei (2) Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 90p. 1980.
- FROESE, R.; PAULY, D. (2015). FishBase. Disponível em: <http://www.fishbase.org>. Acesso em: 15 Janeiro de 2014.
- FOSTER, S.J.; VINCENT, A.C.J. Life history and ecology of seahorses : implications for conservation and management. **J. Fish Biol.**, v.65, p.1–61, 2004.
- GILES, B.G.; KY, T.S.; HOANG, D.H.; VINCENT, A.C.J. The catch and trade of seahorses in Vietnam. **Biodivers. Conserv.**, v.15, p.2497–2513. 2006.
- HORA, M. S. C. **Cultivo de cavalo marinho *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae) até a maturidade sexual**. Espírito Santo, Monografia, graduação em Oceanografia, Universidade Federal do Espírito Santo, 39p. 2007.

HORA, M.S.C.; JOYEUX, J.-C. Closing the reproductive cycle: Growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions. **Aquaculture**, v.292, p.37–41. 2009.

HORA, M. S. C., J. C. JOYEUX, E M. T. L. CARLOS. **Cultivo de Cavalo-marinho (*Hippocampus reidi*)**. In: *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil, 2ª ed.*, por B. BALDISSEROTTO e L. C. GOMES, págs. 401-428. Santa Maria: Editora UFSM, 2010.

IBAMA (*Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis*). Instrução normativa nº.56, de 23 de novembro de 2004. Diário Oficial da União, Seção 1. n.225, p.50-51, 2004.

ITIS, 2013. *Integration Taxonomic Information System*. Disponível em: <http://www.itis.gov>. Acesso em: Dezembro, 2014.

IUCN 2014. *Red list of threatened species*. Disponível em: [www.redlist.org](http://www.redlist.org). Acesso em 10 Agosto de 2014.

KENDRICK, A.J.; HYNDES, G. A. Variations in the dietary compositions of morphologically diverse syngnathid fishes. **Environ. Biol. Fishes**, v.72, p.415–427. 2005.

KOLDEWEY, H.J.; MARTIN-SMITH, K.M. A global review of seahorse aquaculture. **Aquaculture** v.302, p.131–152, 2010.

KORNIENKO, E.S. Reproduction and Development in Some Genera of Pipefish and Seahorses of the Family Syngnathidae. **Embriology**, v.27, p.15–26, 2001.

KUITER, R. H. **Seahorses and their relatives**. Seaford: Aqua Photographics, 2009. 334p.

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

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

MAK, K.K.W.; YANASE, H.; RENNEBERG, R. Cyanide fishing and cyanide detection in coral reef fish using chemical tests and biosensors. **Biosens. Bioelectron.** v.20, p.2581–2593, 2005.

MARTINEZ-CARDENAS, L.; PURSER, G.J. Effect of tank colour on *Artemia* ingestion, growth and survival in cultured early juvenile pot-bellied seahorses (*Hippocampus abdominalis*). **Aquaculture**, v.264, p.92–100. 2007.

- MCPHERSON, J.M.; VINCENT, A.C.J. Assessing East African trade in seahorse species as a basis for conservation under international controls. **Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.**, v.14, p.521–538, 2004.
- MELO-VALENCIA, A.F.; OSPINA-SALAZAR, G.H.; GÓMEZ-LEÓN, J.; CORTÉS-PINEDA, F.A. Efecto de la salinidad en la supervivencia y crecimiento de crías de caballito de mar *Hippocampus reidi* Ginsburg en cautiverio. **Bol. Invest. Mar. Cost.**, v.42, p.193–201, 2013.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Lista nacional das espécies de invertebrados aquáticos e peixes sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração**. Instrução Normativa nº 05, de 21 de Maio de 2004. Diário Oficial da União. n.102, p.136-142, 2004.
- MOE, M. A., 2003. Culture of marine ornamentals: for love, for money and for science. In: Cato, J.C., Brown, C.L. (Eds.), **Marine ornamental species: collection, culture and conservation**. Iowa State Press, Ames, pp.11–28.
- MONTEIRO-NETO, C.; ANDRADE, F.E.D.E.; NOTTINGHAM, M.C.; ELIZABETH, M., ROSA, L.; LEITE, G.M. Analysis of the marine ornamental fish trade at Ceará State , northeast Brazil. **Biodiv. Conserv.** v.12, p.1287–1295, 2003.
- MOORHEAD, J. A.; ZENG, C. Development of Captive Breeding Techniques for Marine Ornamental Fish: A Review. **Rev. Fish. Sci.** v.18, p.315–343, 2010.
- OLIVOTTO, I.; PLANAS, M.; SIMÕES, N.; HOLT, G.J.; AVELLA, M.A.; CALADO, R., Advances in Breeding and Rearing Marine Ornamentals. **J. World Aquac. Soc.** v.42, p.135–166, 2011.
- PAYNE, M.; RIPPINGALE, R. Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched Artemia. **Aquaculture**, v.188, p.353–361. 2000.
- PALMA, J.; BUREAU, D.; ANDRADE, J.P. The effect of diet on ontogenic development of the digestive tract in juvenile reared long snout seahorse *Hippocampus guttulatus*. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 40, 1-12. 2013.
- PHAM, N.K.; LIN, J. The Effects of Different Feed Enrichments on Survivorship and Growth of Early Juvenile Longsnout Seahorse, *Hippocampus reidi*. **J. World Aquac. Soc.** v.44, p.435–446. 2013.
- PROJECT SEAHORSE *The seahorse trade*. Disponível em: <<http://www.projectseahorse.org>>, Acesso em 07 de Abr. de 2014.

- ROSA, I.L.; DIAS, T. L. P.; BAUM, J. K. 2002. Threatened fishes of the world: *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Syngnathidae). **Environ. Biol. Fish** v.64, p378.
- ROSA, I.M.; ALVES, R.R.; BONIFÁCIO, K.M.; MOURÃO, J.S.; OSÓRIO, F.M.; OLIVEIRA, T.P.; NOTTINGHAM, M.C.; Fishers knowledge and seahorse conservation in Brazil. **J. Ethnobiol. Ethnomed.** 1, 12. 2005.
- ROSA, I.L.; OLIVEIRA, T.P.R.; CASTRO, A.L.C.; MORAES, L.E.D.S.; XAVIER, J.H.A.; NOTTINGHAM, M.C.; DIAS, T.L.P.; BRUTO-COSTA, L. V.; ARAÚJO, M.E.; BIROLO, A.B.; MAI, A.C.G.; MONTEIRO-NETO, C. Population characteristics , space use and habitat associations of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei : Syngnathidae ). **Neotrop. Ictiol.**, 5, 405–414. 2007.
- SHENG, J.; LIN, Q.; CHEN, Q.; GAO, Y.; SHEN, L.; LU, J. Effects of food, temperature and light intensity on the feeding behavior of three-spot juvenile seahorses, *Hippocampus trimaculatus* Leach. **Aquaculture** v.256, p.596–607. 2006.
- SILVEIRA, R.B., Sobre o comportamento sexual do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* Ginsburg , 1933 (Pisces: Syngnathidae ) em laboratório 1933, **Biociências**, v.17, p 20–32. 2009.
- SILVEIRA, R.B.; SICCHA-RAMIREZ, R.; RODRIGO, J.; SILVA, S., OLIVEIRA, C. Morphological and molecular evidence for the occurrence of three *Hippocampus* species (Teleostei: Syngnathidae) in Brazil. **Zootaxa**, v.3861, p.317–332, 2014.
- SOUZA-SANTOS, L.P., REGIS, C.G., MÉLO, R.C.S., CAVALLI, R.O. Prey selection of juvenile seahorse *Hippocampus reidi*. **Aquaculture**, v.404-405, p.35–40. 2013.
- TEIXEIRA, R.L.; MUSICK, J. A. Reproduction and food habits of the lined seahorse, *Hippocampus erectus* (Teleostei: Syngnathidae) of Chesapeake Bay, Virginia. **Braz. J. Biol.**, v.61, p.79–90. 2001.
- TLUSTY, M., 2002. The benefits and risks of aquaculture production for the aquarium trade. **Aquaculture**, v.205, p.203–219.
- VINCENT, A. C. J. **The international trade in seahorses**. TRAFFIC International, Cambridge, 163p. 1996a.
- VINCENT, A. C. J. **An uncertain future for seahorses**. *Marine Conservation*. v.9, n.3, p.8-9, 1996b.
- WILLADINO, L.; SOUZA-SANTOS, L.P.; MÉLO, R.C.S., BRITO, A.P.; BARROS, N.C.S.; ARAÚJO-CASTRO, C.M.V.; GALVÃO, D.B.; GOUVEIA, A.; REGIS, C.G.; CAVALLI, R.O. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed

exclusively on cultured live food items. **Aquaculture**, v.360-361, p.10–16, 2012.

WABNITZ, C.; TAYLOR, M.; GREEN, E.; RAZAK, T. **From ocean to aquarium**. UNEP-WCMC, 431 Cambridge, 2003, 65p.

WOOD, E. Collection of coral reef fish for aquaria: global trade, conservation issues and management strategies. UK. **Mar. Conserv. Soc.** 80p. 2001.

WITTENRICH, M. L.. **The complete illustrated breeder's guide to marine aquarium fishes**. TFH Publications Inc., Neptune City, New Jersey, USA. 2007.

## ANEXOS

**Anexo 1:** Sistema de Recirculação para realização dos experimentos e sistema de recirculação para manutenção das matrizes. Ambos equipados com skimmer, filtro biológico de alga calcárea, bag filtrante de 100 $\mu$ m e filtro ultravioleta de 35W.



**Anexo 2:** Foto graduada do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* para medição.



**Anexo 3:** Composição de ácidos graxos saturados e insaturados de *Hippocampus reidi* submetidos a quatro diferentes dietas ao final de 12 dias (mg.g-1 de peso seco). Os somatórios dos ácidos graxos saturados (SFA) e monoinsaturados (MUFA) são fornecidos. Os grupos homogêneos detectados pelos testes post-hoc de Tukey HSD nas ANOVAs ( $P < 0,01$ ) são indicados pelas letras (a representa o grupo homogêneo de maior média e b de menor média).

Ácidos graxos	Nomenclatura dos ácidos graxos <sup>1</sup>	Dieta R	Dieta R+ZS	Dieta ZS	Dieta R+CC	P
C14:0	Mirístico*	16,3 ± 1,4	16,2 ± 1,63	17,9 ± 3,2	28,8 ± 3,3	0,025
C15:0	Decanóico	5,4 ± 0,6	6,9 ± 0,7	7,83 ± 1,7	11,9 ± 1,5	0,035
C16:0	Palmítico*	340,4 ± 28,0	160,9 ± 17,4	203,0 ± 48,0	215,8 ± 19,4	0,017
C17:0	Tetradecanóico	9,9 ± 0,7	12,3 ± 1,42	13,2 ± 3,2 <sup>ab</sup>	20,4 ± 2,8	0,057
C18:0	Estearíco*	147,8 ± 13,8	73,6 ± 9,5	100,5 ± 30,7	111,0 ± 18,2	0,141
C20:0	Araquídico*	8,1 ± 1,6	2,3 ± 0,3	3,2 ± 1,2	3,0 ± 0,72	0,023
C21:0	Docosanóico	11,5 ± 0,5	19,1 ± 5,4	16,4 ± 1,5	1,9 ± 0,9	0,013
C22:0	Beénico*	45,9 ± 18,3	10,0 ± 2,3	23,7 ± 15,5	14,4 ± 3,5	0,241
<b>C23:0</b>	<b>Tricosanóico</b>	<b>23,0 ± 5,7<sup>a</sup></b>	<b>2,7 ± 0,4<sup>b</sup></b>	<b>2,8 ± 1,1<sup>b</sup></b>	<b>2,7 ± 0,6<sup>b</sup></b>	<b>0,003</b>
C24:0	Tetracosanóico	2,1 ± 0,5	1,2 ± 0,1	3,7 ± 2,3	1,4 ± 0,1	0,473
∑ SFA		642,1 ± 50,4	312,2 ± 24,0	399,1 ± 30,7	417,6 ± 33,1	0,053
C14:1		0,269	0,75 ± 0,12	1,02 ± 0,54	1,00 ± 0,39	0,779
C15:1		4,95 ± 0,79	1,39 ± 0,40	1,48 ± 0,44	2,50 ± 0,65	0,011
<b>C16:1</b>	<b>Inclusive Palmiteico (n-7)*</b>	<b>33,4 ± 2,5<sup>b</sup></b>	<b>77,1 ± 8,4<sup>a</sup></b>	<b>77,6 ± 15,7<sup>a</sup></b>	<b>130,3 ± 21,1<sup>a</sup></b>	<b>0,008</b>

Continua

## Continuação Anexo 3

C17:1		14,6 ± 0,7	20,1 ± 2,3	21,0 ± 4,5	31,1 ± 5,5	0,07
C18:1	Inclusive Petrolínico (n-12), Oléico (n-9) e Cis-vaccênico (n-7)*	65,4 ± 5,4	112,9 ± 11,1	129,3 ± 35,5	147,4 ± 22,5	0,127
C20:1		4,5 ± 1,7	1,0 ± 0,1	1,6 ± 0,8	1,5 ± 0,3	0,134
C22:1	Inclusive Erúico (n-9)*	315,9 ± 109,8	38,8 ± 0,3	92,5 ± 63,6	37,1 ± 19,3	0,460
C24:1	Inclusive Nervônico (n-9)*	2,5 ± 0,8	0,97 ± 0,19	1,34 ± 0,61	1,46 ± 0,14	0,250
∑ MUFA		441,89 ± 58,7	253,23 ± 23,04	326,07 ± 28,13	352,57 ± 33,62	0,497
C18:2	Inclusive Linoleico (n-6)*	116,2 ± 19,8	179,6 ± 22,0	153,8 ± 84,0	288,9 ± 59,3	0,171
<b>C20:2</b>	<b>inclusive Eicosadienóico (n-6)</b>	<b>11,6 ± 1,4<sup>a</sup></b>	<b>2,6 ± 1,5<sup>b</sup></b>	<b>3,4 ± 1,5<sup>b</sup></b>	<b>3,4 ± 0,8<sup>b</sup></b>	<b>0,001</b>
Totais		1069,5 ± 19	568,0 ± 81,4	728,7 ± 276,2	773,6 ± 168,9	0,398

\* Principais ácidos graxos (Garcia et al., 2013) O prefixo n indica a saturação normal não ramificada da cadeia de carbono.