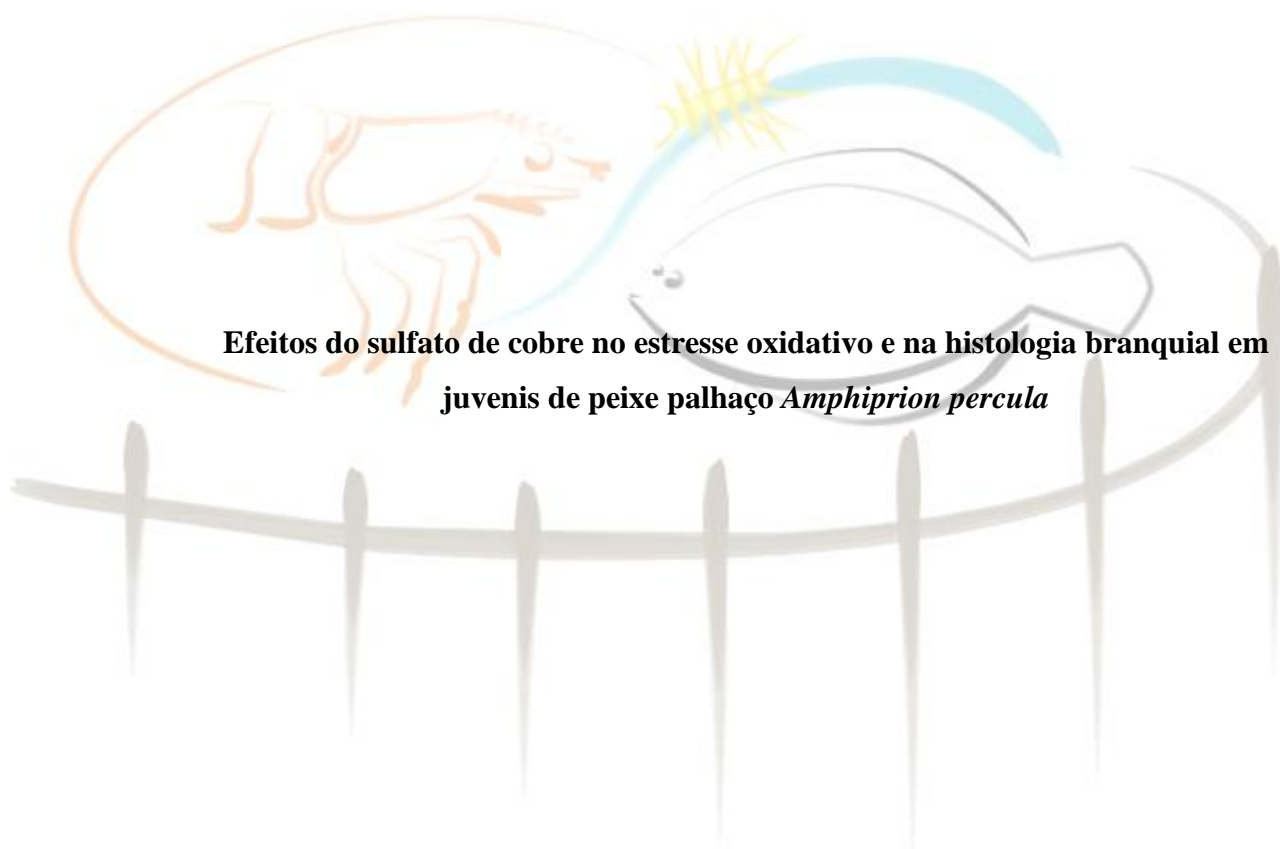




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



Efeitos do sulfato de cobre no estresse oxidativo e na histologia branquial em juvenis de peixe palhaço *Amphiprion percula*

FLÁVIA WEBER MARIN

RIO GRANDE, RS

2018

Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Instituto de Oceanografia

Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

FLÁVIA WEBER MARIN

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Aquicultura no programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

Orientador: Dr. Ricardo Vieira Rodrigues

Rio Grande, RS

Fevereiro, 2018

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação às pessoas mais especiais da minha vida: minha família! Em especial a minha avó, Milda e ao meu avô Benjamin (in memoriam), pelos ensinamentos ao longo da minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe Catarina, pelo apoio que sempre me foi dado, apesar de todas as dificuldades ela sempre estava disposta a me ajudar com palavras e atitudes de conforto.

A minha avó Milda que estavam sempre a minha espera para escutar minhas reclamações e me acalmar com todo amor que podia me ser dado.

Ao meu pai Flavio, e a minha madrasta Eliane que sempre estavam ali quando eu precisava, me apoiando e me mostrando que o amor ultrapassa qualquer dificuldade.

A minha irmã Ana Carolina e ao meu irmão Enzo por me perturbarem e me ajudarem nos estudos quando estava ao seu alcance.

Ao meu namorado Bernardo, por ter permanecido comigo e aguentado todas as minhas crises ao longo da conclusão deste trabalho.

Ao Lucas, meu colega e amigo que me acompanhou desde o princípio e sempre se disponibilizou para me dar a ajuda que fosse necessária para que eu chegasse onde cheguei.

Ao meu orientador e amigo Ricardo que sempre estava disponível e que me passou grande parte do conhecimento adquirido até o momento atual.

Ao pessoal da EMA, que sempre se disponibilizou para me ajudar quando necessário.

A todas as minhas amigas, por sempre estarem ao meu lado e me fazerem acreditar que tudo daria certo.

Ao CNPq, por me proporcionar a bolsa durante a realização desta dissertação.

A FURG por me proporcionar o início e a conclusão desta pós graduação.

Enfim, a todos que me ajudaram direta ou indiretamente para elaboração deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	9
1.1. Produção de peixes ornamentais	9
1.2. Descrição da espécie	10
1.3. Importância do cobre.....	11
1.4. Utilizações do sulfato de cobre na aquicultura.....	12
1.5. Efeitos dos estressores em peixes.....	14
1.5.1. Estresse oxidativo.....	14
1.5.2. Histopatologia.....	16
1.7. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. OBJETIVO GERAL.....	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3. CAPÍTULO I: Effects of copper sulfate on oxidative stress and gill histology on juvenile clown fish <i>Amphiprion percula</i>	23
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	46

RESUMO

O peixe palhaço *Amphiprion percula* apresenta grande importância econômica devido ao seu alto valor agregado. Na aquicultura, o sulfato de cobre (CuSO_4) é utilizado para controle de ectoparasitas em sistemas de produção de peixes, como algicida e herbicida em viveiros. Este trabalho teve como objetivo verificar os efeitos subletais da exposição a concentrações de CuSO_4 utilizadas para tratamento de ectoparasitas, e posterior recuperação em juvenis de peixe palhaço *A. percula*. No experimento I os peixes foram expostos durante 7 dias a três tratamentos: controle, sem adição de CuSO_4 , 0,5 e 1,5 mg/L de CuSO_4 , seguidos de mais 7 dias de recuperação, em água sem adição de sulfato de cobre. No experimento II os peixes foram expostos durante 14 dias nas mesmas concentrações do experimento I. Em ambos os experimentos os tratamentos foram realizados em triplicata e foram utilizados 16 juvenis por tanque (15L). Foram realizadas coletas nos dias 7 e 14 em ambos experimentos, para a realização das análises bioquímicas de peroxidação lipídica (TBARS), capacidade antioxidante total contra radicais peróxil (ACAP) e atividade da enzima Glutathione-S-Transferase (GST), e análises histopatológicas nas brânquias. No experimento I foi demonstrada apenas uma redução na ACAP dos peixes submetidos inteiros ao tratamento 0,5mg/L de CuSO_4 quando comparados aos tratamentos controle e 1,5mg/L de CuSO_4 após o período de recuperação. As histopatologias encontradas foram telangiectasia, fusão lamelar e fusão lamelar parcial, sendo que a fusão lamelar apresentou menor ocorrência no tratamento 1,5mg/L de CuSO_4 em relação aos demais ao final da recuperação. No experimento II, a atividade da enzima GST foi menor no tratamento 1,5mg/L de CuSO_4 em relação ao grupo controle e ao tratamento 0,5mg/L de CuSO_4 . As histopatologias encontradas foram telangiectasia, hiperplasia, hiperplasia de células de cloreto, hiperplasia parcial, fusão lamelar parcial e fusão lamelar completa, sem apresentar diferenças significativas entre os tratamentos. Portanto, as concentrações de 0,5mg/L de CuSO_4 e 1,5mg/L de CuSO_4 não induziram alterações histopatológicas ou uma condição de estresse oxidativo, e portanto, são seguras para o peixe palhaço *A. percula*.

Palavras-chave: estresse oxidativo; histopatologia; infestação parasitária; profilaxia; recuperação

ABSTRACT

The clown fish *Amphiprion percula* presents great economic importance due to its high added value. In aquaculture, copper sulfate (CuSO_4) is used to control ectoparasites in fish production systems, such as algicide and herbicide in ponds. This work aimed to verify the sublethal effects of exposure to CuSO_4 concentrations used to treat ectoparasites, and subsequent recovery in juvenile clown fish *A. percula*. In the experiment I the fish were exposed for 7 days to three treatments: control, without addition of CuSO_4 , 0.5 and 1.5 mg/L of CuSO_4 , followed by another 7 days of recovery, in water without addition of copper sulfate. In experiment II the fish were exposed for 14 days at the same concentrations of experiment I. In both experiments treatments were performed in triplicate and 16 juveniles per tank (15L) were used. Samples were collected on days 7 and 14 in both experiments for the biochemical analyzes of lipid peroxidation (TBARS), total antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) and activity of the Glutathione-S-Transferase (GST) enzyme, and histopathological analyzes in the gills. In the experiment I, only a reduction in the ACAP of the whole submitted fish to the treatment 0.5mg/L of CuSO_4 when compared to the control treatments and 1,5mg/L of CuSO_4 after the recovery period was demonstrated. The histopathologies found were telangiectasia, lamellar fusion and partial lamellar fusion, and lamellar fusion presented a lower occurrence in the treatment of 1.5 mg/L CuSO_4 in relation to the others at the end of the recovery. In the experiment II, the activity of the GST enzyme was lower in the treatment of 1.5 mg/L CuSO_4 in relation to the control group and 0.5 mg/L CuSO_4 treatment. Histopathologies were telangiectasia, hyperplasia, chloride cell hyperplasia, partial hyperplasia, partial lamellar fusion and complete lamellar fusion, without significant differences between treatments. Therefore, concentrations of 0.5 mg/L CuSO_4 and 1.5 mg/L CuSO_4 did not induce histopathological changes or an oxidative stress condition, and are safe for clown fish *A. percula*.

Keywords: oxidative stress; histopathology; parasitic infestation; prophylaxis recovery

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Produção de peixes ornamentais

Segundo Wood (2001) o comércio de peixes ornamentais teve seu início na década de 1930 no Sri Lanka, porém a partir de 1950 houve um aumento desta atividade caracterizando-a de forma mais concretizada. Em meados de 1970 ocorreu uma expansão, abrangendo em média 80 países ao redor do mundo. No Brasil, a produção de peixe palhaço está concentrada nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, os quais possuem os maiores mercados consumidores (Medeiros 2013; Vidal 2002).

Segundo a FAO (2016) os maiores produtores e fornecedores de peixes ornamentais marinhos são a China, seguida pela Indonésia, os Estados Unidos e a Federação Russa. No ano de 2014 a produção mundial de aquicultura de peixes representou 44,1% do total da produção de peixes, incluindo para uso não alimentar onde se enquadram as espécies ornamentais, este tipo de produção está entre os setores mais lucrativos da aquicultura, e arrecadou em média 3,0 bilhões de dólares por década (FAO 2016).

De acordo com dados da FAO (2012) os valores de exportação de organismos ornamentais têm crescido 14% ao ano ao redor do mundo. Lima (2004) relatou que neste ano a criação de espécies ornamentais marinhas obteve uma taxa de crescimento de 14% ao ano, quando comparado aos de peixes de corte que cresceu 9,2% ao ano e a pesca extrativista 11,4% ao ano. Essas informações demonstram que este setor está cada vez mais se expandindo ao redor do mundo.

A criação de peixes ornamentais apresenta um baixo custo de implantação e gera um produto final com alta rentabilidade. Por apresentarem estas características, os peixes palhaços, dentre uma grande variedade de espécies ornamentais, são organismos amplamente produzidos ao redor do mundo. Além disso, são considerados um modelo para estudos fisiológicos devido a facilidade de manejo e manutenção em laboratório e seu protocolo de larvicultura já ser bem estabelecido (Olivotto 2011).

Diversos impactos ambientais estão relacionados a extração e comercialização de peixes ornamentais, que são em sua maioria coletados no ambiente e resultam em uma

diminuição das populações de algumas espécies, alterações na ecologia dos ambientes naturais, e a extinção de algumas espécies específicas (Wood 2001).

1.2. Descrição da espécie

Os peixes ornamentais geralmente são pequenos, apresentam cores atrativas, e possuem grande capacidade de se adaptarem em cativeiro, e para algumas espécies a biologia e o manejo já estão bem difundidos atualmente. Este mercado está em constante desenvolvimento, e constitui uma alternativa de geração de renda para produtores de pequena escala, visualizando que estes organismos podem ser cultivados em pequenas áreas e geram um produto final com um alto valor de mercado (Tlusty 2002).

Os peixes palhaços pertencem a família Pomacentridae, e a subfamília Amphiprionae. A família Pomacentridae compreende 30 espécies, onde 29 são do gênero *Amphiprion* e apenas 1 do gênero *Premnas*. A família Pomacentridae compreende espécies pequenas (até 30 cm) e sua distribuição é ampla em regiões costeiras e recifais (tropicais e temperadas). Esta família apresenta um grande número de espécies utilizadas na aquicultura (James Cooper et al. 2009; Wood 2001). Dentro deste gênero existem as espécies *Amphiprion percula* e *Amphiprion ocellaris*. A espécie *A. percula* é popularmente conhecida como o “peixe-palhaço verdadeiro”.

Fautin & Allen (1992) relatam que os peixes palhaços podem ser encontrados desde o sudeste Asiático até a Austrália, sendo nativos dos Oceanos Índico e Pacífico. A espécie *A. ocellaris* já foi capturada nas Ilhas Andanam, Nicobar e Ryukyu, Filipinas e Austrália, enquanto a espécie *A. percula* já foi capturada na Nova Guiné, Nova Bretanha, Nova Irlanda, Ilhas Salomão e Vanuatu, sendo estes os locais de coleta que diferem a ocorrência entre estas duas espécies.

Estes peixes apresentam características sexuais hermafroditas protândricas, ou seja, as gônadas têm função primária ativa masculina, podendo mudar para o sexo feminino quando em um determinado ambiente há so macho, um deles torna-se fêmea para que continue o ciclo reprodutivo. Possuem comportamento agressivo, onde somente os organismos mais resistentes conseguem concluir o processo de mudança de sexo. Devido a

hierarquia que se estabelece dentro dos aquários, as fêmeas sempre apresentam um tamanho maior em relação aos machos. Este gênero produz desovas em tempos regulares, com fecundação e desenvolvimento externo, onde a quantidade de ovos está relacionada ao tamanho e a idade da fêmea, e os ovos apresentam características demersais, aderidos em algum substrato (Faution e Allen 1992).

Estes organismos chegam a desovar de 400 a 2000 ovos, e a sobrevivência após a larvicultura pode chegar a 75% (Kumar et al. 2010). A espécie *A. percula* possui desovas de até 650 ovos e durante a larvicultura, as sobrevivências podem ultrapassar 80%. Com seis meses na fase juvenil atingem o tamanho padrão comercial (Hoff 1996). O maior tempo para comercialização dos juvenis, comparado a *A. ocellaris* (3 meses) encarece o preço desta espécie, porém seu maior valor de mercado compensa sua produção. Além disso, o domínio do pacote tecnológico de produção é outro aspecto favorável ao cultivo (Hoff 1996). Esses fatores contribuem para que esta espécie permaneça aumentando seu potencial dentro da piscicultura ornamental utilizando da aplicação de tecnologias de produção já disponíveis no cenário atual da aquicultura.

1.3. Importância do cobre

Dentro dos sistemas aquáticos existem muitos poluentes, entre eles os metais, essenciais e os não essenciais, que estão dissolvidos na coluna d'água. Como metal essencial temos o cobre que pode ser encontrado em diferentes formas, tanto particulada como dissolvida. Sua concentração varia de acordo com sua forma química e sua biodisponibilidade pode ser afetada por fatores bióticos e abióticos, podendo em certos casos ocasionar malefícios aos diferentes tipos de vida que ali habitam (Roy 1997).

Existe a necessidade de utilizar o cobre para o funcionamento normal de órgãos e tecidos dos organismos, esta utilização é regulada por mecanismos do controle homeostático, e sua toxicidade está relacionada à sua afinidade por grupos tiol, além de ser capaz de se ligar à cisteína, histidina e metionina formando complexos e tornando as macromoléculas não funcionais. Porém este mecanismo só pode ocorrer se o organismo é exposto a elevadas concentrações, ou quando um determinado órgão é sobrecarregado e o

mesmo não é capaz de reparar ou suprir este composto e excretá-lo (Monteiro et al. 2009).

O íon de cobre, pode apresentar “status redox” na forma oxidada (Cu^{2+}) e reduzida (Cu^+) e serve como importante catalisador de reações dentro das estruturas proteicas, que são fundamentais para o bem-estar fisiológico e crescimento dos organismos. Estas estruturas podem ser caracterizadas pela Cu-Zn superóxido dismutase, enzima envolvida no processo de detoxificação de radicais livres, ou pela citocromo C-oxidase transportadora de elétrons na mitocôndria e pela metalotioneína que é sequestradora de cobre (Pena et al. 1999).

De acordo com Sanchez et al. (2005) o mecanismo de ação deste metal dependerá da absorção dentro dos organismos e principalmente da competição à ligação ao sítio de ação. Sua toxicidade pode ser reduzida quando há um aumento na dureza, ou seja, os cátions e ânions não interagem diretamente com o cobre, o que reduz a biodisponibilidade do metal na água e conseqüentemente diminui sua toxicidade. Esta redução na toxicidade pode estar relacionada a complexação do cobre com o aumento no pH e alcalinidade (hidróxidos e carbonatos), geralmente associados a alta dureza (Allen & Hansen 1996; Boyd & Massaut 1999). O cobre pode precipitar ou ser adsorvido estando disponível em diversas formas para diferentes espécies de organismos aquáticos. Na forma Cu^{2+} pode ser mais solúvel em pH baixo, pois este elemento juntamente com o nitrato e o sulfato são solúveis em água, e pode formar complexos e precipitar com carbonatos ou fosfatos (Tong et al. 1999). De acordo com o CONAMA (2005) o nível máximo de cobre na água que é utilizada para aquicultura deve ser de 0,05 mg.

1.4. Utilização do sulfato de cobre na aquicultura

A utilização do cobre na aquicultura é realizada pela utilização de sulfato de cobre (CuSO_4) que é empregado para várias finalidades, é comum a prática como algicida e herbicida em viveiros. Concentrações usuais aplicáveis na aquicultura variam de 0,5 a 2,0 mg/L (Boyd & Massaut 1999).

O CuSO_4 é amplamente utilizado no controle de algas e parasitas em sistemas na aquicultura, porém este uso deve considerar o pH e a alcalinidade da água, visto que o

cobre interage com os componentes da água e também há interação de cada espécie frente a este agente. As respostas fisiológicas que resultam dos mecanismos bioquímicos causados por este composto podem gerar interferências aos organismos como perda de peso e diminuição do crescimento (Carvalho & Fernandes 2006).

O CuSO_4 também é aplicado em diversos peixes sadios como forma de profilaxia para prevenir surtos de epidemias e parasitas. Além disso, é utilizado como agente terapêutico para controlar doenças bacterianas (Rábago Castro et al. 2006). O CuSO_4 também protege os peixes contra infestações bacterianas causadas pelo *Flavobacterium columnare*. Esta proteção parece estar ligada à absorção do cobre pelo epitélio dos peixes (MacFarlane et al. 1986)

Este composto é utilizado no controle de saprolegniose, com banhos de uma hora, em concentrações de 15 ou 25 mg/L (Pavanelli et al. 2002). O mesmo autor recomenda também concentrações de 0,75 mg/L de solução de CuSO_4 por 14 dias para combater o protozoário *Amyloodinium ocellatum* (Pavanelli et al. 2002). Também pode ser utilizado para eliminar o *Prymnesium parvum* (Smith 2005). Abreu et al. 2005 utilizou o sulfato de cobre como agente profilático para a espécie *Paralichthys orbignianus* para combater o parasita *Amyloodinium ocellatum*.

O parasita mais comum dentro do sistema de piscicultura é o *Amyloodinium Ocellatum* que apresenta um ciclo de vida muito complexo, este ciclo é trifásico, onde o primeiro estágio é o trofante, onde o parasita se fixa e se alimenta das brânquias e do tecido epitelial do hospedeiro, o segundo estágio é o tomonte, onde o parasita se reproduz e infecta o hospedeiro, e o terceiro estágio dinosporo, onde no ambiente ele procura um hospedeiro suscetível (Brown 1934).

Em locais onde se utiliza cobre diariamente como forma profilática ou para controle de algas, é possível que embora esse cobre seja carregado para o fundo dos tanques e depositado no sedimento, é comum encontrá-lo na forma residual dissolvido na água do local onde a aplicação é ou já foi intensa, o que comprova que este elemento não é excluído da água onde foi adicionado (Mozeto & Zagatto 2006).

1.5. Efeitos dos estressores em peixes

1.5.1. Estresse oxidativo

Segundo Wenderlaar Bonga (1997) o estresse caracteriza-se pela perturbação da homeostase do indivíduo por ação de algum agente estressor, e podem ser classificados em três tipos: estresse primário, secundário e terciário. Primeiramente ocorre a ativação do sistema nervoso simpático o que eleva as concentrações do cortisol no plasma caracterizando assim o estresse primário. Quando o cortisol tem sua elevação e afeta outros componentes corpóreos como a glicose, por exemplo, ou até mesmo o dinamismo de outros tecidos este efeito representa a resposta secundária de estresse. Já quando os organismos estão diretamente afetados, onde seu desempenho zootécnico já apresentou mudanças, este está sofrendo das ações do estresse terciário, sendo estes três aspectos citados acima de suma importância para a aquicultura atual. De acordo com essas respostas, os organismos podem apresentar adaptações ao estresse e diminuir seu desempenho normal, apresentar danos fisiológicos e/ou diminuir seu crescimento, reprodução e bem-estar para tentar se readaptar e se proteger frente a algum agente estressor.

O estresse pode ser caracterizado como uma resposta dos organismos, de seus tecidos ou de suas células frente algum agente estressor. Dentro deste contexto, destacamos o estresse oxidativo, que ocorre quando há um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio ERO's (radicais superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH^-), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e/ou a redução das defesas antioxidantes. De acordo com Hermes Lima & Zenteno Savin (2001) existem as defesas enzimáticas antioxidantes que são catalase (CAT), glutathione redutase (GR), superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) e a glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), e as não enzimáticas que são a glutathione reduzida (GSH), o ácido ascórbico, o ácido úrico, as vitaminas C e E, o β - caroteno, os polifenóis e as bilirrubinas.

Como consequência do desbalanço do status oxidativo no organismo em favor dos pró-oxidantes, ocorre um aumento no dano oxidativo em macromoléculas como proteínas, lipídios, DNA e RNA além dos níveis basais, o que pode comprometer diversos processos fisiológicos, afetando a saúde e o bem-estar dos animais (Almeida et al., 2007; Halliwell &

Guteridge 2015). A descrição do status oxidativo, e suas consequências, sugere a situação fisiológica do organismo frente ao estresse (Martinez-Alvarez et al. 2002). Neste contexto, diversos marcadores bioquímicos são utilizados como os níveis de lipoperoxidação, que podem ser medidos através da técnica de TBARS (Oakes & Van der Kraak 2003), a capacidade antioxidante total (Amado et al. 2009), e a atividade da GST, que possibilita avaliar mecanismos de detoxificação dos organismos (Wang et al. 2015).

De acordo com Sanchez et al. (2005) a toxicidade do cobre varia de acordo com o ambiente e a exposição e da forma em que ele se encontra, o mecanismo de ação deste metal dependerá da absorção dentro dos organismos e principalmente da competição a ligação ao sítio de ação. Sua toxicidade também está amplamente ligada a dureza da água, os cátions e ânions não interagem diretamente com o cobre, esta toxicidade pode estar relacionada a complexação do cobre com os aumentos nas concentrações de pH e alcalinidade (hidróxidos e carbonatos) que geralmente estão associados a alta dureza, o que não reduz a biodisponibilidade do metal na água e conseqüentemente aumenta sua toxicidade (Allen & Hansen 1996). Fatores como a temperatura, pH, partículas em suspensão e cations e ânions inorgânicos que caracterizam a alcalinidade e dureza da água interferem na toxicidade do cobre (Grossel et al. 2007).

Os efeitos do cobre a nível de estresse oxidativo já foram demonstrados por Pretto et al. (2014) em jundiás (*Rhandia quellen*) expostos durante 45 dias a concentrações de 0,016mg/L e 0,029mg/L deste composto, sendo evidenciado um aumento na produção de ERO's no músculo e no fígado dos peixes. Um cenário pró oxidante resultando em aumento nos níveis de peroxidação lipídica (LPO) foi reportado no fígado e rim de *Cyprinus carpio* L. com o aumento das concentrações de cobre na água (Sevcikova et al. 2011). Carvalho et al. (2015) também reportaram alterações em enzimas antioxidantes como a GST, CAT, SOD, glutathiona peroxidase (GPx) e GR, bem como nas concentrações de metalotioneína e nos níveis de LPO em juvenis de curimatá *Prochilodus lineatus* expostos ao cobre em pH's variando em 4,5, 7,0 e 8,0 nas concentrações de 24,5µ/L, 7,25µ/L e 4,0µ/L respectivamente.

1.5.2. Histopatologia

A histopatologia é uma técnica rápida e de baixo custo, a qual é recomendada para avaliar o efeito de contaminantes aquáticos em peixes (Bernet 1999). Uma ampla classe de alterações histológicas pode ser utilizada neste tipo de avaliação, e certos tipos de lesões principalmente nas brânquias são indicadores biológicos seguros para determinar os efeitos tóxicos resultantes de exposição (AU 2004).

A brânquia dos peixes é um órgão envolvido em diversas funções vitais, como a respiração, a osmorregulação, a manutenção do equilíbrio ácido-base e a excreção de metabólitos (Cerqueira & Fernandes 2002). Sendo a principal via de absorção de metais nos peixes é a brânquia, pois representa uma grande área de superfície de trocas, onde a especiação do metal no ambiente pode se alterar de acordo com a secreção do muco branquial, em vista disso, os metais ligam-se ao muco branquial e diminuem a sua biodisponibilidade para contaminação dos organismos (Tao et al. 2002). A histopatologia é uma ferramenta bastante utilizada para avaliação dos efeitos do cobre em peixes, sendo que várias lesões já foram associadas ao cobre para várias espécies (Tao et al. 2015; Chen et al. 2011).

Entretanto, pode ser bastante afetada pelos poluentes, por estar em direto e permanente contato com o ambiente aquático e possuir uma área superficial elevada. A principal via de absorção de metais, incluindo o cobre, nos peixes ocorre neste órgão. As brânquias são também responsáveis pela depuração de contaminantes, onde a detoxificação e o metabolismo destes agentes tóxicos podem ocorrer. A secreção do muco branquial pode ainda afetar as interações do cobre no ambiente, através de ligações orgânicas e inorgânicas diminuindo a sua biodisponibilidade (Tao et al. 2002).

A partir da exposição a um determinado contaminante algumas das possíveis lesões à serem observadas nas brânquias são: a hiperplasia e/ou hipertrofia das células do epitélio estratificado; a proliferação de células mucosas e das células de cloreto, telangiectasia, fusão lamelar e necrose dos tecidos (Bernet et al. 1999).

Neste contexto, observar os tecidos afetados por moléculas tóxicas presentes no meio ambiente, como o cobre podem demonstrar se uma substância pode ou não ser usada com segurança. Esta ferramenta vem sendo frequentemente utilizada na avaliação dos

efeitos do cobre em várias espécies de peixes (Chen et al. 2011). Tao et al. (2015) expuseram juvenis de *Epinepheus coicoides* a concentrações de cobre que variaram entre 20µg/L e 100µg/L, além de nano partículas e demonstraram danos nas brânquias como hiperplasia na base das lamelas secundárias e aneurisma nos filamentos branquiais. Tavares-Dias et al. (2002) também submetem juvenis de *Piaractus mesopotamicus* a concentrações de 0,50 mg/L e de 1,00 mg/L de CuSO₄ e observaram hiperplasia das células basais e caliciformes com aumento da produção de muco, telangiectasia e hemorragia intersticial, inflamação moderada e infiltrado de células mononucleares, além de fusão das lamelas secundárias.

Entretanto, de acordo com as informações contidas na literatura referentes as utilizações do cobre e seus possíveis danos em peixes ornamentais marinhos, tanto quanto a possível recuperação dos organismos quando em água de qualidade adequada após um período de exposição. Os dados gerados neste estudo irão gerar conhecimento acerca das respostas fisiológicas dos peixes frente a toxicidade do cobre, e permitir o estabelecimento de critérios para aplicação do sulfato de cobre com segurança nos sistemas de produção do peixe palhaço *A. percula*.

1.6. Referências bibliográficas

ALLEN, H. E.; HANSEN, D. J. 1996. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. *Water Environ. Res.*, 68: 42-54.

ALMEIDA, EA, ACD BAINY, APM LOUREIRO, GR MARTINEZ, S MIYAMOTO, J ONUKI, L BARBOSA, CCM GARCIA, FM PRADO, GE RONSEIN, CA SIGOLO, CB BROCHINI, AMG MARTINS, MHG MEDEIROS & P DI MASCIO. 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. and Physio. Part A: Mol. & Integ. Physiol.*, 146: 588-600.

AU, DWT. 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marin. Pollut. Bullet.*, 48: 817-834.

- BERNET, D, SCHMIDT H, MEIER W, BURKHARDT-HOLM P & WAHLI, T. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.*, 22: 25–34.
- BOYD, CE, MASSAUT L. 1999. Risk associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquatic Engineer.*, 20:113-132.
- BROWN EM. 1934. On *Oodinium ocellatum* Brown, a parasitic dinoflagellate causing epidemic disease in marine fish. *Proceed. of the Soc. of Zool. of London.*, 583-607.
- CARVALHO, CS, FERNANDES MN. 2006. Effects of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture.*, 251: 109-117.
- CERQUEIRA, CCC, FERNANDES MN. 2002. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol. Environ.*, 52: 83-91.
- CARVALHO, CS, VA BERNUSSO, MN FERNANDES. 2015. Copper levels and changes in pH induce oxidative stress in the tissue of curimbata (*Prochilodus lineatus*). *Aquat. Toxicol.*, 167-220.
- CHEN, QL, LUO Z, ZHENG JL, LI XD, LIU CX, ZHAO YH & GONG Y. 2011. Protective effects of calcium on copper toxicity in *Pelteobagrus fulvidraco*: Copper accumulation, enzymatic activities, histology. *Ecotoxicol. Environ., Saf.* 76: 126–134.
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2005. Resolução no 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente, 23p.
- FAO. The state of world fisheries and aquaculture, 2010. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of The United Nations. Rome, 2009. 176p. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 11/12/2017.
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Fisheries and Aquaculture

Department. Rome. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 11/12/2017.

FAUTIN D, GR ALLEN. 1992. Anemonefishes and their host sea anemones. Western Australian Museum, Perth, 160 p.

GROSELL, M, J BLANCHARD, KV BRIX & R GERDES. 2007. Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. *Aquatic Toxicol.*, 84: 162-172.

HALLIWELL B.; JM GUTTERIDGE. 2015. Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, Estados Unidos da América.

HERMES-LIMA, M & ZENTENO-SAVIÍN T. 2001. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.*, 133: 537- 556.

HOFF JR, FH. 1996. Conditioning, spawning and rearing of fish with emphasis on marine clownfish. 1° ed. Aquaculture Consultants Inc. Dade City. 212p.

JAMES COOPER, W, SMITHLL & MW WESTNEAT. 2009. Exploring the radiation of a diverse reef fish family: Phylogenetics of the damselfishes (Pomacentridae), with new classifications based on molecular analyses of all genera. *Molec. Phylog. Evolut.*, 52: 1-16.

KUMAR, TTA, SK SETU, P MURUGESAN, T BALASUBRAMANIAN. 2010. Studies on captive breeding and larval rearing of clown fish [a¹], *Amphiprion sebae* (Bleeker, 1853) using estuarine water. *Indian J. Mar. Sci.*, 39: 114-119.

LIMA, AO. 2004. Aquicultura ornamental. *Panor. da Aquic.*, 83:58-59.

MACFARLANE, RD, BULLOCK GL, MCLAUGHLIN JJA. 1986. Effects of five metals on susceptibility of striped bass to *Flexibacter columnaris*. *Trans. Amer. Fisher.s Soc.*, 115: 227-231.

MARTÍNEZ-ALVAREZ, RM., MC HIDALGO, A DOMEZAIN, AE MORALES, M

GARCIA-GALLEGO & A SANZ. 2002. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. J. Exp. Biol., 205: 3699–3706.

MEDEIROS, AFF. 2013. Desenvolvimento de larvas do Peixe-palhaço *Amphiprion clarkii*: efeito da salinidade e da temperatura. Dissertação de Mestrado (Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina).

MONTEIRO, SM, SANTOS NMS, CALEJO M, FONTAINHAS – FERNANDES A, SOUSA M. 2009. Copper toxicity in gills of teleost fish, *Oreochromis niloticus*: Effects in apoptoses induction and cell proliferation. Aquat. Toxicol., 94: 219-228

OLIVOTTO, I, PLANAS M, SIMÕES N, HOLT GJ, AVELLA MA & CALADO R. 2011. Advances in breeding and rearing marine ornamentals. J. World Aquacul. Soc., 42: 135–166.

PAVANELLI, G. C., EIRAS, J.C. e TAKEMOTO, R.M. 2002. Doenças de peixes: profilaxia diagnóstico e tratamento. 305p.

PENA, MMO, LEE J & THIELE DJ. 1999. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. J. Nutrit., 129: 1251-1260.

PRETTO, A, VL LORO, VMM SILVA, J SALBEGO, CC MENEZES, CF SOUZA, CR GIODA & B BALDISSEROTTO. 2014. Exposure to sublethal concentrations of copper changes biochemistry parameters in silver catfish, *Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard. Environ. Contam. Toxicol., 92: 399–403

RÁBAGO, CJL, JG SANCHEZ, CA PÉREZ & GR GONZÁLES. 2006. Effects of the prophylactic use of copper sulfate on growth, condition and feeding indices in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture, 253: 343-349.

ROY, J. 1997. Environmental contaminants encyclopedia: copper entry. Fort Collins: National Park Service, Wat. Resour. Divis., 99.

SANCHEZ, W, O PALLUEL, L MEUNIER, M COQUERY, JM PORCHER & S AIT-

AISSA. 2005. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback, relationship with hepatic metal levels. *Environ. Toxicol. Pharm.*, 19: 177-183.

SEVCIKOVA, M, H MODRA, J BLAHOVA, R DOBSIKOVA, L PLHALOVA, O ZITKA, D HYNEK, R. KIZEK, M SKORIC & Z SVOBODOVA. 2016. Biochemical, haematological and oxidative stress responses of common carp (*Cyprinus carpio* L.) after sub-chronic exposure to copper. *Vet. Med.*, 6: 15–50

TAO, S, LONG A, XU F, DAWSON W. 2002. Copper speciation in the gill microenvironment of carp (*Cyprinus carpio*) at various levels of pH. *Ecotox. Environ. Saf.*, 52: 221-226.

TAO, W, X LONG, Y CHENG, Z LIU, & S YAN. 2015. A comparison effect of copper nanoparticles versus copper sulfate on juvenile *Epinephelus coioides*: Growth parameters, digestive enzymes, body composition, and histology Biomarkers. *Int. J. Genom.* 1-10.

TAVARES-DIAS, M, LM MARTINS, CHS SCHALCH, ME ONAKA, FIC QUINTANA, ERJ MORAES & RF MORAES. 2002. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae), tratado com sulfato de cobre (CuSO₄). *Acta Sci. Anim. Sci.*, 24: 554-557.

TLUSTY, M. 2002 The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. *Aquaculture*, 205: 203-219.

VAN DER OOST, RJ. & NVP BEYER. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13:57-149.

VIDAL, MVV. 2002. As boas perspectivas para a piscicultura ornamental. *Pan. Aquic.*, 71: 41-45.

WANG T., L XIAOHUA, Z LIU, Y CHENG & Y SHAOHUA. 2015. Effect of copper nanoparticles and copper sulfate on oxidation stress, cell apoptosis and immune responses in the intestines of juvenile *Epinephelus coioides*. *Fish Shellf. Immunol.*, 44: 674-682.

WENDELAAR-BONGA, SE. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77: 591-625.

WOOD, E. 2001 *Collection of coral reef fish aquaria: global trade, conservation issues and management strategies*. Londres: Marine Conservation Society. 80p.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do sulfato de cobre em diferentes concentrações após período de recuperação em juvenis de peixe palhaço *Amphiprion percula*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar os efeitos da exposição a concentrações de sulfato de cobre no sistema de defesa antioxidante (atividade da enzima Glutathione-S-Transferase (GST) e capacidade antioxidante total) e nos níveis de peroxidação lipídica em juvenis de peixe palhaço.

Avaliar os possíveis danos histopatológicos nas brânquias dos peixes decorrentes da exposição ao sulfato de cobre.

Determinar se ocorre a recuperação da homeostase dos animais após um período em água livre de sulfato de cobre.

CAPÍTULO 1

Effects of copper sulfate on oxidative stress and gill histology on juvenile clown fish

Amphiprion percula

ABSTRACT

The clownfish species are the most traded group of marine ornamental fish in the world. Copper sulfate (CuSO_4) is used to control bacterial and ectoparasitic infestations in aquaculture, including the marine ornamental fish, such as clownfish *Amphiprion percula*. However, copper is considered one of the most toxic metals for fish. This work aimed to verify the effects of CuSO_4 exposure at concentrations commonly applied to ectoparasites control and followed recovery in juveniles of *A. percula*. In the experiment the fish were exposed for 7 days to three treatments: 0.5 and 1.5 mg/L of CuSO_4 plus a control, followed by another 7 days in water without addition of sulfate copper to recovery. In the second experiment, fish were exposed to the same CuSO_4 concentrations utilized in experiment 1 during 14 days. In both experiments the treatments were carried out in triplicate in static system and 16 fish were randomly distributed in each tank (15L). The parameters of water quality were in accordance with the standard for the species and water was renewed daily with copper sulfate previously added. The biochemical analyzes of lipidic peroxidation (TBARS), total antioxidant capacity (ACAP) and GST activity were performed in whole fish, and histopathological analyzes in gills. In the first experiment, fish exposed to 0.5 mg/L CuSO_4 presented lower ACAP when compared to other treatments after the recovery period. The histopathologies found were telangiectasia, hyperplasia, chloride cell hyperplasia, complete and partial lamellar fusion. The complete lamellar fusion presented a lower occurrence in the treatment 1.5mg/L of CuSO_4 in relation to the others at the end of recovery. In the experiment II only the activity of the enzyme GST showed a lower values in the treatment of 1.5 mg/L of CuSO_4 in relation to control and to the treatment 0.5 mg/L

of CuSO₄ at day 7. Histopathologies found were similar that in the exp I. However, the occurrence of histopathologies did not present significant differences among experimental groups. In conclusion, the concentrations used in the present study of 0.5 mg/L CuSO₄ and 1.5 mg/L CuSO₄ did not induce histopathological changes or an oxidative stress condition, and therefore are safe for the clown fish *A. percula*.

KEYWORDS: ornamental fish, histopathology, oxidative stress.

1. INTRODUCTION

The *Amphiprion percula* (Lacepède, 1802), popularly known as clownfish, occurs in the western region of the Indo - Pacific Ocean, mostly in the Indo-Australian archipelago (Allen et al. 1992). However, by its use like ornamental species, its production is distributed around the world. According to Allen et al. (1992) the clownfish group also offers advantages for experimentation, where its biology and management are already known, could be used as model for marine fish studies. It is already well understood the reproduction of the same in captivity, knowing that it was the first group of fish that successfully mastered the reproduction of ornamental fish, leading the ranking of ornamental organisms, and is the group of fish most produced in the world (Hoff 1996).

The use of copper is practiced in aquaculture for different purposes, such as an algaeicide in ponds (Boyd and Massaut 1999), in antifouling paint for nets of cages (Amara et al. 2018), and control ectoparasits (Abreu et al. 2005; Straus et al. 2016) and bacterial outbreaks (Rábago Castro et al. 2006). One of the most application of copper sulfate (CuSO_4) in aquaculture is to control ectoparasites on fish culture. Copper sulfate has been shown to be effective to control the dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum* in *Scophthalmus maximus* (Ramos and Oliveira 2001), and in the *Paralichthys orbignyanus* (Abreu et al. 2005). In several species of clownfish, CuSO_4 also has been used for treatment of the protozoans *A. ocellatum* and *Cryptocaryon irritans* (Hoff 1996).

In addition, few studies of its effectiveness have been fully demonstrated, since its chemical behavior in water may be toxic and stressful, making organisms more sensitive, for example, by eliminating mucus from the gills when administered by prolonged baths (Scott et al. 2000).

Physiological responses that result from the biochemical mechanisms caused by this compound can generate interference to organisms such as weight loss and decreased growth, and oxidative damage (Carvalho and Fernandes 2006). In addition to causing a number of histopathological lesions associated with this metal in different tissues (Chen et al. 2011).

Copper can bioaccumulate in the organs (Dautremepuits et al. 2004) and can influence the formation of reactive oxygen species (ROS) (Sanchez et al. 2005). This situation can induce high levels of lipid peroxidation and cell damage in different tissues, influencing the fluidity and integrity of biomolecules associated with the membrane, which can also cause histopathological alterations in tissues and osmoregulatory disorders (Al-Bairuty et al. 2013). As reported for the species (*Rhandia quellen*), which was exposed over a period of 45 days at concentrations of 0.016mg/L and 0.029 mg / L copper and presented the formation of reactive oxygen species in muscle and liver (Pretto et al. 2014). Monteiro et al. (2005) experimentally exposed the tilapia *Oreochromis niloticus* at 40 and 400 µg L⁻¹ and observed that there was an induction to a inhibition of NKA (sodium potassium ATPase) activity, was reported too the presence of hyperplasia and telangiectasia in the gills of the *Epinephelus cooides* exposed for 25 days at concentrations of 0.02 mg/L and 0.10 mg/L of copper sulfate (Tao et al. 2005).

According to McGeer et al. (2000) after exposure to copper, recovery begins as there is an increase in body biosynthesis, as well as protein synthesis, which assists in the repair of physiological damage. Thus, processes that neutralize or compete with metals are initiated by proteins such as metallothionein, attempting to minimize the effects of metals. With the increase of tolerance to compound stresses, the internal physiology of the organisms initiates the recovery processes returning the pre-exposure conditions.

In the present study, copper sulfate concentrations varied from 0.5 mg/L and 1.5 mg/L adapted according to the methodologies utilized by Hoff (1996) and Abreu et al. (2005) to ectoparasitic control. The specie of the present study *A. percula* is of great economic importance in the market of aquarium and much produced around the world.

Based on this, and in order to verify effects of copper sulfate that is also widely used for ectoparasite treatments of this species, the present study was carried out to evaluate and elucidate if the concentrations, between 0.5 and 1.5 mg/L of copper sulfate, that are currently used for treatment of ectoparasites in marine fish culture are safe and may cause some sublethal effect in exposed fish, and if this damage can be reversible in the next period.

2. MATERIAL AND METHODS

The experiments were carried out at the Laboratory of Marine Fish Culture from Marine Aquaculture Station (EMA), Institute of Oceanography (IO) of the Federal University of Rio Grande (FURG). The juveniles that were used in the present study were produced at EMA according to the methodology proposed by Hoff Jr. (1996).

The water used was pumped from Cassino Beach and previously filtered in a 5 μm filter, chlorinated (20 mg/L sodium hypochlorite) and dechlorinated (7 mg/L with sodium thiosulfate).

2.1. Experiment I: 7 days exposure cooper sulfate plus 7 days recovery

The experiment was carried out in nine circular fiberglass tanks with capacity of 15 L, where the useful volume used was 10 liters, which were kept in a thermostated bath with constant aeration, maintained with photoperiod 12/12 and in static system. Each experimental unit were stocked with 16 fish (1.01 ± 0.26 g and 40.5 ± 4.4 mm), totalizing 144 fish. Fish were exposed to two different concentrations of copper sulfate: 0.5 mg/L and 1.5 mg/L respectively for 7 days, plus a control treatment without addition of copper sulfate. After the exposure period, fish remained for more 7 days for assessment of recovery in copper sulfate-free water.

Approximately 90% of the water in each unit was renewed daily with copper sulfate already added in the respective experimental concentrations. During the experiment the animals were fed *ad libitum* twice a day (9:00 AM; 17:00 PM) with commercial fish feed (Inve, NRD 5/8[®], USA).

Water quality parameters were measured daily using a digital oximeter to measure dissolved oxygen and temperature (Oximeter 550A, YSI, USA), portable digital refractometer to measure salinity (Atago PAL - 6S) and bench pHmeter to measure pH (Mettler Toledo Five Easy Fe20, Switzerland). Alkalinity, total ammonia and nitrite were measured according to the methodologies compiled by UNESCO (1983). During the experiment the oxygen remained at 6.0 ± 0.39 mg/L, temperature 27.0 ± 1.02 °C, salinity

30 ± 1.23 pH 8.0 ± 0.08 , alkalinity 200 ± 17.2 mg of CaCO_3/L , total ammonia 0.24 ± 0.32 mg/L and nitrite 0.03 ± 0.02 mg/L.

2.2. Experiment II: 14 days exposure cooper sulfate

The experimental design was carried out according to the methodology of experiment I. Each experimental unit were conditioned with 16 fish (0.95 ± 0.24 g and 36.2 ± 2.8 mm), totalizing 144 fish. Fish were exposed to two different concentrations of copper sulfate: 0.5 mg/L and 1.5 mg/L plus a control treatment without addition of copper sulfate during 14 days.

The water quality parameters were measured according to the methodology described in Experiment I. During the experiment the oxygen remained at 6.37 ± 0.24 mg/L, temperature 25.1 ± 0.16 °C, salinity 30 ± 1 , pH 7.97 ± 0.10 , alkalinity 115 ± 5 mg of CaCO_3/L , total ammonia 0.55 ± 0.2 mg/L and nitrite (0.02 ± 0.01 mg/L).

2.3. Fish sampling

At the end of exposure and recovery period for the first experiment, and after 7 and 14 experimental days for the second experiment, 8 fish from each experimental unit were collected and euthanized in a solution of benzocaine hydrochloride (300 mg/L). After the euthanasia, the fish were measured with an ichthyometer and weighed in a 0.01g precision scale, and subsequently processed by histopathological and biochemical analysis accordingly itens 3.2.4 and 3.2.5.

2.4. Hystological analysis

After euthanasia, 3 fish from each tank ($n = 27$) were fixed in 10% buffered formalin for 24 h and then transferred to 70% ethanol. Subsequently the samples were dehydrated in increasing concentrations of ethanol and impregnated in paraplast. Histological sections of 5 μm were performed in a rotating micrometer and the slides were

stained with hematoxylin and eosin (HE). The histopathological evaluation of alterations by copper sulfate was performed on the gills of juvenile clown fish *A. percula* using the methodology described by Reiser et al. (2010).

2.5. Biochemical analysis

After euthanasia, samples from 5 fish from each tank (n = 15 per treatment) were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored in ultrafreezer at -80 °C for subsequent homogenization and oxidative stress analysis. The whole fish were homogenized (1:4; w/v) on ice cold buffer (100 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA and 0.1% triton X-100 (v/v), pH 7.8) as described by Castro et al. (2012) and then centrifuged at 10,000 × g for 30 minutes at 4 °C (SOLAB Centrifuge SL-703). The supernatant was pipetted and stored at -80 °C until the analyses. The biuret method was performed using commercial kits to measure the total protein content (Doles, Brazil) of homogenized samples using a microplate reader at 550 nm absorbance (BioTekSynergy HT, USA).

The lipid peroxidation levels were measured according Oakes and Van Der Kraak (2003) using 20 µL of the homogenate. This method quantifies malondialdehyde (MDA) levels, a by-product of lipid peroxidation, by measuring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), which are capable of being read in a spectrofluorimeter (BioTekSynergy HT, USA) at 515 nm (excitation) and 590 nm (emission). The values were expressed as nmol TMP mg wet tissue⁻¹, where TMP stands for tetramethoxypropane (ACROS Organics), employed to establish the standard curve.

The activity of the Glutathione S-Transferase (GST) enzyme were followed according to Habig (1974) and Habig and Jakoby (1981) using 20 µl of homogenate reacting with the conjugate of 1 mM glutathione and 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) using reading fluorescence at 340 nm in a microplate reader (BioTekSynergy HT, USA).

Total antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) was determined through detection of ROS in samples treated or not with a peroxy radical generator, according to the method described by Amado et al. (2009). All samples were first diluted with

homogenization buffer to 2.0 mg protein mL⁻¹ and then exposed to peroxy radicals generated by thermal (37 °C) decomposition of 2,2'-azobis(2 methylpropionamide) dihydrochloride (ABAP, 4 mM). Peroxy radicals reacted with a fluorescent substrate (2',7' dichlorofluorescein diacetate-H2DCF-DA) and fluorometry (excitation 485 nm; emission 520 nm) were measured through a microplate reader (BioTekSynergy HT, USA) with readings every 5 min for 30 min.

The results were expressed as a relative area (the difference between the ROS area with and without ABAP relative to that without ABAP). For result interpretation purposes, a higher relative area means a lower antioxidant capacity.

2.6. Statistical analysis

Normality and homogeneity variance of all data were first verified by Shapiro-Wilk and the Levene tests, respectively. In the first experiment, histopathological indices up to 100% and oxidative stress parameters were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's test to check differences among treatments (CuSO₄ concentrations) within the same sampling day (exposure and recovery). Two-way ANOVA (factors: CuSO₄ concentrations and exposure time) and the Tukey's test were performed to check differences among treatments for oxidative stress parameters of second experiment. Otherwise, histopathological indices were compared by non-parametric tests of Kruskal-Wallis (different treatments within the same sampling day) and Mann-Whitney (same treatment among different days of exposure). All data are expressed as mean ± standard error. Statistica 7.0 software was used to perform the statistical analyzes and the significance level was set at 5% ($p < 0.05$).

3. RESULTS

The fish survival rate was 100% for all treatments in the both experiments.

3.1. Experiment 1

The activity of GST (Fig. 1a) did not present significant statistical difference among the fish of the different treatments in both exposition and recovery times. Fish exposed to 0.5 mg/L CuSO₄ showed lower ACAP compared to the control and to the treatment 0.5 mg/L CuSO₄ after recovery period (Fig. 1b). Otherwise the TBARS levels (Fig. 1c) did not present significant statistical difference among the fish of the different treatments in both exposition and recovery times. During the experimental period the following histopathologies were observed in *A. percula* gills: telangiectasia, hyperplasia, chloride cell hyperplasia, partial lamellar fusion and complete lamellar fusion. Only telangiectasia, complete lamellar fusion and partial fusion were present in all treatments. After recovery, lamellar fusion presented lower occurrence in gills of fish exposed to treatment 1.5 mg/L CuSO₄ when compared to control group and the treatment 0.5 mg/L CuSO₄ (Tab. 1).

3.1. Experiment 2

No significant differences were observed among treatments for ACAP (Fig. 2a). The GST activity was lower in fish exposed to 1.5 mg/L CuSO₄ when compared to the control and treatment 0.5 mg/L CuSO₄ at day 7 (Fig. 2b). The TBARS levels (Fig. 2c). were no differences observed among treatments during all the experimental period.

During the experimental period the following histopathologies were observed in *A. percula* gills: telangiectasia, chloride cell hyperplasia, partial hyperplasia, partial lamellar fusion and complete lamellar fusion. No significant differences were observed among treatments for histopathological analysis (Tab. 2).

4. DISCUSSION

Among the numerous organic compounds that enter aquatic ecosystems, copper is one of the most widespread, besides being already a natural component, can be found in different forms and present great biological importance being fundamental for the physiological well-being and growth of organisms (Pena et al. 1999). In aquaculture, the

copper sulfate is widely applied as algicide, parasitic infections treatment, as well is applied as prophylactic treatment to epidemis (Carvalho and Fernandes 2006; (Weirich et al. 2010). However, according to Matsuo et al. (2005), copper is consider one of the most toxic metals for fish and can lead to stress and some biological damages, including histopathological alterations (Tao et al. (2015), oxidative stress (Wang et al. 2018) and even death (Nunes et al. 2010).

Lethal concentrations (LC_{50}) of copper for fish is specie-specific. The (LC_{50}) 96h for fish Piauçu (*Leporinus macrocephalus*) was estimated in 0.09mg /L (Nunes et al. 2010), while for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) the (LC_{50}) 96h is 0.59 mg /L (Masutti et al. 2006). In the present study, copper sulfate concentrations of 0.5 mg / L and 1.5 mg / L, respectively, correspond to 0.12 and 0.36 mg / L of copper, which did not cause lethal effects for *A. percula* over a period of 14 days of exposure. It was demonstrated by the 100% survival in all treatments during the experiment. These results may be related to the composition of salt water, and its specifications, such as hardness, that for salt water is high, and may induce the reduction of the effects of the toxicity of copper sulfate to *A. percula*. The toxicity of copper is reduced by the increase in water hardness which is composed of cations that interact directly with copper reducing its bioavailability, its effect on toxicity may be partly due to the complexation of copper with increasing pH and alkalinity, usually associated with high hardness (Osuala et al. 2013). According to Grossel et al. (2007) the Na^+ gradients are the parameter that most influences the relative sensitivity to Cu in marine aquatic organisms. The same author tested different salinities and different concentrations of copper, and found for the fish *Fundulus heteroclitus* a (LC_{50}) of 96 h 0,29mg/L. Carvalho and Fernandes (2006) evaluated copper toxicity in curimbatá (*Prochilodus lineatus*) and obtained (LC_{50}) of 96 h values of 98 and 88 μg / L at pH 4.5 and 16 μg /L at pH 8.0, showing that this species was more sensitive to copper at basic pH than to acidic pH, suggesting that the decrease in copper toxicity at acidic pH may be due to the competition of hydrogen and copper for the same binding site in the gill epithelium (Mazon et al. 2002). The results found in the present study may be related to the mechanism of action of copper sulfate together with the physical chemical components of the water, resulting from these interactions the decrease of metal toxicity, since the concentration of

up to 1.5 mg/L CuSO₄ did not cause mortality, oxidative damage or histopathologies in *A. percula*.

Gills are an organ of extreme importance to evaluate the effects of toxic compounds on organisms, besides being involved in several vital functions, such as respiration, osmoregulation, acid-base balance, excretion (Cerqueira and Fernandes 2002), and copper uptake (Carvalho and Fernandes, 2008). From the exposure to a certain contaminant the possible lesions observed in the gills are: hyperplasia and or hypertrophy of the cells of the stratified epithelium; proliferation of mucosal and chloride cells and tissue necrosis (Bernet et al. 1999). In the case of copper was reported for juveniles of *Epinepheus coicoides* at copper concentrations ranging from 20 µg/L to 100 µg/L, in addition to nano particles, damage to the gills as hyperplasia at the base of the secondary lamellae and telangiectasia on the gill filaments (Tao et al. 2015). For the yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* exposed to 0.4 mg / L and 0.8 mg/L of copper sulfate, corresponding to 1 mg/L and 2.0 mg/L of copper for 7 days, several morphological lesions were observed (Chen et al. 2011). These lesions are considered normal and expected in the gills, which always present a certain portion of affected lamellae, because is an organ exposed and in permanent contact with the external environment. However, no negative effect was observed in the gills of *A. percula* juveniles during a 14-day exposure to copper sulfate in tested concentrations.

To protect against several oxidative damage compounds, fish have an antioxidant system with several enzymatic and non enzymatic defenses (Halliwell and Gutteridge 2015). The antioxidant system as a whole can be represented by the total antioxidant capacity of the organisms in front of some oxidizing agent, making no distinction between the defenses that make up the antioxidant system. In general, the antioxidant system of fish exposed to concentrations up to 1.5 mg/L of CuSO₄ were not affected, except for the fish exposed to the 0.5 mg/L treatment of CuSO₄ during the recovery period. This result can be relating to a decrease in antioxidant defences associated to a pro oxidant condition possibly related to the detoxification process at that lower concentration of copper sulfate. However, this condition did not result in enhanced oxidative damage, as demonstrated by unchanged TBARS level.

GST activity is involved in the cellular detoxification of xenobiotics such as metals

and endogenous metabolites, including oxidative damage products (Blanchette et al. 2007). Oss et al. (2013) demonstrated a 80% inhibition of GST activity in juvenile of fat snook (*Centropomus parallelus*) during subchronic exposure to 25 or 50 µg Cu/L of copper GST followed by the return to normal levels after 10 days of recovery. In 14 days of exposure there was demonstrated a temporary decrease in GST activity in the treatment 1.5 mg/L of CuSO₄ at day 7, which may be related to a possibly effect of copper, leading to a lower production of ROS and less need for the enzyme in the detoxification of oxidative damage products. This action may be related to a protective effect of copper, acting as a transition metal present in enzymes, such as copper-dependent superoxide dismutase (Cu-SOD) (Van der Oost et al. 2003) or the metabolic changes that copper may have caused, with less mitochondrial activity and a possible decrease in the generation of reactive oxygen species (ROS) (Sanchez et al. 2005). There were no changes in oxidative damage levels, since the TBARS that measured lipid damage remained within the baseline values. These results indicating that the use of copper sulfate did not induce an oxidative stress condition in juvenile *A. percula* at the concentrations used in the present study during the period of 14 days of exposure.

As reported in the present study, concentrations of copper sulfate ranging from 0.5 mg/L and 1.5 mg/L widely used in aquaculture did not generate any oxidative damage or major disturbance in antioxidant system *A. percula* juvenile. In addition, no histopathological damage were induced, stating that the concentrations tested can be used during parasitic infestation for the present species. This data corroborates the data found by Furuta et al. (2005) for false clownfish, which the use of copper in concentrations up to 0.64 mg/L of copper does not cause deleterious effects and promotes a greater growth during the larval phase, and with Nasser et al. (2017) which demonstrated that copper sulfate up to 3 mg/L can be used safely in the prophylaxis and treatment of *S. rivulatus* juveniles.

5. CONCLUSION

In conclusion, the exposure to concentrations between 0.5 and 1.5 mg/L of CuSO₄ up to 14 days did not induce histopathological changes or an oxidative stress condition in juvenile of clown fish *A. percula* and therefore its use can be considered safe for the species at this concentrations.

6. REFERENCES

Amara I., M. Wafa B. S. Rihab Ben and L. Neji. 2018. Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review., 57:115-130.

Amado, L. L., M. L. Garcia, P. B. Ramos, R. F. Freitas, B. Zafalon, J. L. R. Ferreira and J. M. Monserrat. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. Science of the Total Environment 407:2115-2123.

Abreu, C.P., R. B. Robaldo, L. A. Sampaio, A. Bianchini and C. Odebrecht. 2005. Recurrent Amylloidinosis on Broodstock of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*: dinospore monitoring and prophylactic measures. Journal of World Aquaculture Society 36:42-50.

Al-Baituty, G. A., B. J. Shaw, R. D. Handy and Henry, T. B. 2013. Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulfate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology 126:104-115.

Blanchette B., X. Feng, B. R. Singh. 2007. Marine glutathione S-transferases. Mar Biotechnol., 9:513-542.

Bernet, D., H. Schmidt, W. Meier, P. Burkhardt-Holm and T. Wahli. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. Journal of Fish Diseases 22:25–34.

Boyd, C.E. and L. Massaut. 1999. Risk associated with the use of chemicals in pond

aquaculture. Aquatic Engineering 20:113-132.

Carvalho, C. S., M. N. Fernandes. 2006. Effects of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. Aquac., 251:109-117.

Carvalho, C. S., M. N. Fernandes. 2008. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. Comp. Biochem. Physiol., 151:437–442.

Castro, C., A. Pérez-Jiménez, I. Guerreiro, H. Peres, M. Castro-Cunha and A. Oliveira-Teles. 2012. Effects of temperature and dietary protein level on hepatic oxidative status of Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis*). Compar. Biochem. Physio., 163: 372–378

Cerqueira, C. C. C. and M. N. Fernandes. 2002. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. Ecotoxicology Environmental 52, 83-91.

Chen, Q. L., Z. Luo, J. L. Zheng, X. D. Li, C. X. Liu, Y. H. Zhao and Y. Gong. 2011. Protective effects of calcium on copper toxicity in *Pelteobagrus fulvidraco*: copper accumulation, enzymatic activities, histology. Ecotoxicology and Environmental Safety 76:126–134.

Dautremepuits, C., S. Paris-Palacios, S. Betoulle and G. Vernet. 2004. Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp *Ciprinus carpio* induced by copper and chitosan. Comparative Biochemistry and Physiology 137:325–333.

Fautin, D. G. and G. R. Allen. 1992. Field guide to anemone- fishes and their host sea anemones, 1o ed. Western Australian Museum 120-160.

Furuta, T. N., K. Iwata, Kikuchi and K. Namba. 2005. Effects of copper on survival and growth of larval false clown anemonefish *Amphiprion ocellaris*. Fisheries Science 71:884-888.

- Grosell M., J. Blanchard. K.V. Brix and R. Gerdes.** 2007. Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. *Aquat. Toxicol.*, 84:162-172.
- Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby.** 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation, *Journal of Biological Chemistry* 249:7130–7139.
- Hoff, F.** 1996. Conditioning, spawning and rearing of fish with emphasis on marine clownfish. Dade City: Aquaculture Consultants Inc. 212 p.
- Monteiro, S. M., J. M. Mancera, A. Fontainhas- Fernandes and M. Sousa.** 2005. Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem and Physiol.*, 141:375-383.
- Oakes, K. D. and G. J. Van Der Kraak.** 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology* 63:447-463.
- Osuala, F. I. and K. A. Bawa- Allah.** 2013. Effects of Salinity Variations on Acute Toxicity of Copper Sulfate against *Oreochromis niloticus* Fingerlings in Laboratory Bioassays. *Journ. Environm. Sci.*, 6:22-27.
- Matsuo, A. Y. O., C. M. Wood and A. L. Val.** 2005. Effects of copper and cadmium on ion transport and gill metal binding in the Amazonian teleost tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water. *Aqua. Toxicol.*,74:351-364.
- McGeer, J. C., C. Szebedinszky, D. G. McDonald and C. M. Wood.** 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: iono- regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquat. Toxicol.* 50, 231–243.
- Pena, M. M.O., J. Lee and D. J. Thiele.** 1999. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *Journ. Nutrit.*129:1251-1260.

- Pretto, A., V. L. Loro, V. M. M. Silva, J. Salbego C. C. Menezes, C. F. Souza C. R. Gioda and B. Baldisserotto.** 2014. Exposure to sublethal concentrations of copper changes biochemistry parameters in silver catfish, *Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard. *Environmental Contamination and Toxicology* 92:399–403
- Halliwell, B and J. M. Gutteridge.** 2015. Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, Estados Unidos da América.
- Massuti, M. B., E. L. G. Eespindola, A. M. Nogueira and F. C. F. Simões.** 2006. Sensibilidade a cobre e cromo por *Oreochromis niloticus* e *Pistia stratiotes*. *Jour. Braz. Soc. Ecotox.*, 1:37-42.
- Mazon, A. F., C. C. C. Cerqueira and M. N. Fernandes.** 2002. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environm. Res.*, 88:52-63.
- Nasser N., J. Babikian, S. Monzer and I. P. Saoud.** 2017. Toxicity of Four Chemotherapeutic Agents to Rabbitfish *Siganus rivulatus* *Journ. Worl. Aquac Societ.*, 48:877-886.
- Nunes, P. M. Q., E. R. Foizer, L. C. Gomes and A. R. Chippari-Gomes.** 2010. Avaliação da toxicidade do cobre para o piauçu (*Leporinus macrocephalus*, Garavello and Britski, 1988) por meio de parâmetros leucocitários e enzimáticos. *Acta Scientiarum. Bio. Scie.*, 32:87-92.
- Oss, R. N., V. D. Baroni, R. M. Duarte, A. L. Val, V. M. Val and L. C. Gomes.** 2013. Recovery of fat snook, *Centropomus parallelus* (Teleostei: Perciformes) after subchronic exposure to copper. *Comparative Biochemistry Physiology*, 157:306-309
- Rábago, C. J. L., J. G. Sanchez, C. A. Pérez and G. R. Gonzáles.** 2006. Effects of the prophylactic use of copper sulfate on growth, condition and feeding indices in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 253:343-349.

Ramos, P. and J. M. Oliveira. 2001. *Amiloodiniose* em pregado, *Psetta maxima* (L.). Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias 96:201-205.

Reiser, S., J. P. Schroeder, S. Wuertz, W. Kloa and R. Hanel. 2010. Histological and physiological alterations in juvenile turbot (*Psetta maxima*, L.) exposed to sublethal concentrations of ozone-produced oxidants in ozonated seawater. Aquaculture 307: 157–164.

Riche M. A., R. C. Weirich, S. W. Paul, and R. M. Baptiste. 2013. Stocking Density Effects on Production Characteristics and Body Composition of Market Size Cobia, *Rachycentron canadum*, Reared in Recirculating Aquaculture Systems. Journal of the World Aquaculture Society. 44:259-266.

Sanchez, W., O. Palluel, L. Meunier, M. Coquery, J. M. Porcher and S. Aït-Aïssa. 2005. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metals levels. Environmental Toxicology and Pharmacology 19:177–183.

Scott, P. 2000. Terapeutica em aquicultura. In: Brown, L. (Org). Acuicultura para veterinaries: produccion y clínica de peces. Cap. 2, 187–196.

Straus, D.L., B.D. Farmer, C.K. Ledbetter, B.H. Beck, R.S. Williams, M.L. Clark and T.M. Freeze. 2016. Use of copper sulfate to control saprolegniasis at a commercial sunshine bass hatchery. Journal of World Aquaculture Society, 78:243-250.

Tao, W. X. Long, Y. Cheng, Z. Liu and S. Yan. 2015. A comparison effect of copper nanoparticles versus copper sulfate on juvenile *Epinephelus coioides*: Growth parameters, digestive enzymes, body composition, and histology Biomarkers. International Journal of Genomics 2015:1-10.

UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and Guides 12, IOC. Paris, França.

Van Der Oost, R. J. and N. V. P. Beyer. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in

environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13:57-149.

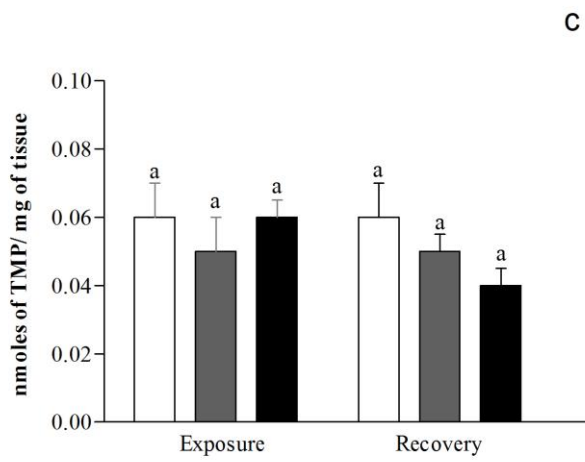
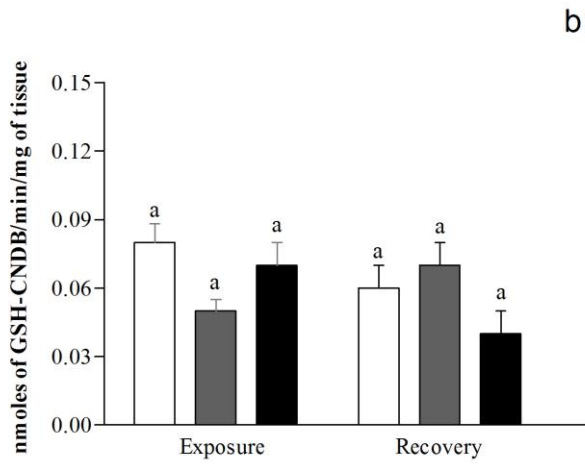
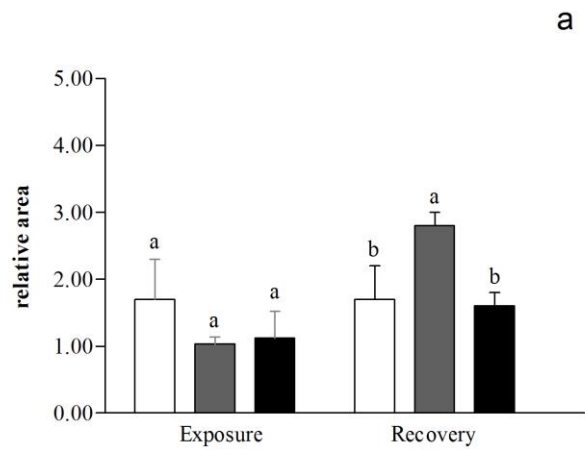
Wang H., Z. Haoyong, W. Xiaodan, E. Li, D. Zhenyu, Q. Jianguang and C. Liqiao. 2018. Comparison of copper bioavailability in copper-methionine, nano-copper oxide and copper sulfate additives in the diet of Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii* *Aquacult.*, 482:146-154.

Weirich, C. R., P. S. Wills, R. M. Baptiste, and M. A. Riche. 2010. Production characteristics and body composition of juvenile cobia fed three different commercial diets in recirculating aquaculture systems. *North Americ. Journ. Aquacult.*, 72:43–49.

Figure captions

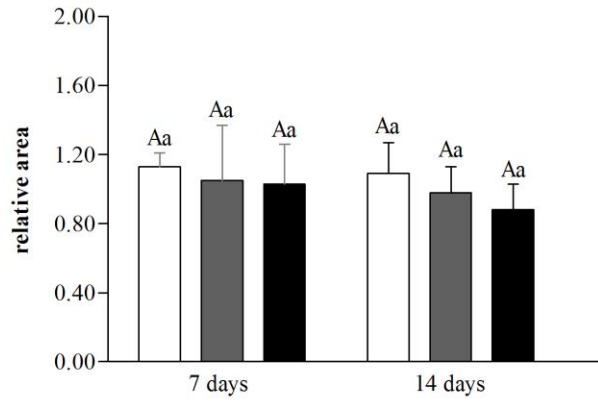
Fig. 1 Total antioxidant capacity against a peroxy radical (ACAP) (a), GST activity (b) and TBARS levels (c) in juveniles of *Amphiprion percula* exposed to different concentrations of copper sulfate during 7 days followed by a 7-days recovery period in copper sulfate-free water. Data were expressed as means \pm SD (n = 5). Different lowercase letters indicate significant differences among treatments within the same sampling day (Tukey's test, $p < 0.05$).

Fig. 2 Total antioxidant capacity against a peroxy radical (ACAP) (a), GST activity (b) and TBARS levels (c) in juveniles of *Amphiprion percula* exposed to different concentrations of copper sulfate during 14 days exposed copper sulfate. Data were expressed as means \pm SEM (n = 5). Different lowercase letters indicate significant differences among treatments within the sampling day (Tukey's test, $p < 0.05$). Different uppercase letters indicate significant differences among time within the sampling treatment (Test T $p < 0.05$).

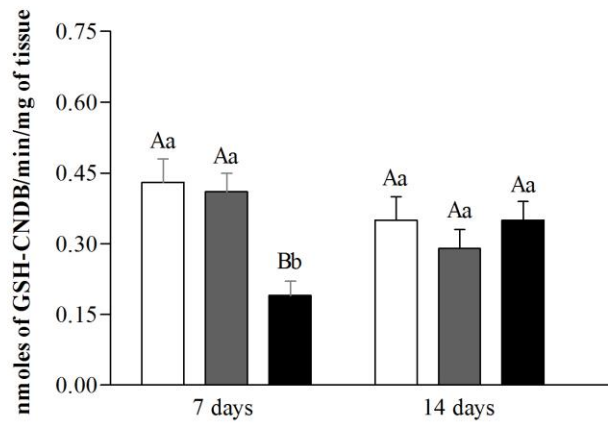


Control
 0.5 mg/L CuSO₄
 1.5 mg/L CuSO₄

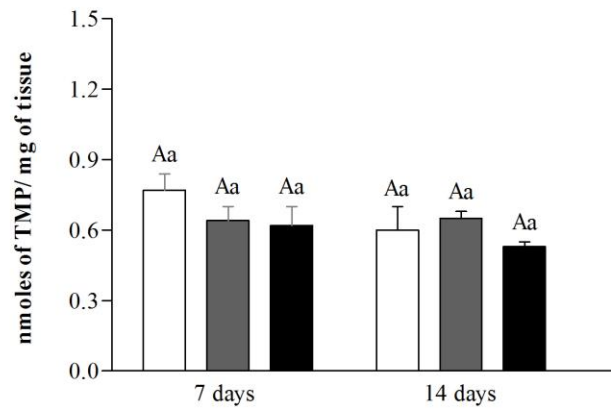
a



b



c



□ Control ■ 0.5 mg/L CuSO₄ ■ 1.5 mg/L CuSO₄

Table 1 – Histopathological parameters (mean \pm SD) in percentage per lamella affected in juvenile *Amphiprion percula* exposed to cooper sulfate (0.5 and 1.5 mg/L CuSO₄) during seven days followed by a 7-days recovery period.

Day	mg CuSO ₄ . L ⁻¹	Not affected	Lamelar fusion	Telangiectasia	Partial fusion	Hyperplasia	Hyperplasia chloride cell	Partial hyperplasia
Exposure	Control	81.6 \pm 8.32 ^a	9.33 \pm 6.72 ^a	3.48 \pm 2.52 ^a	7.03 \pm 8.46 ^a	1.00 \pm 0.47	0.55 \pm 0.56	1.77 \pm 3.01
	0.5	75.3 \pm 7.09 ^a	7.96 \pm 6.11 ^a	9.86 \pm 6.50 ^a	6.00 \pm 1.99 ^a	0.00 \pm 0.00	0.66 \pm 0.47	0.00 \pm 0.00
	1.5	80.1 \pm 9.56 ^a	4.20 \pm 2.47 ^a	3.86 \pm 4.84 ^a	6.30 \pm 6.50 ^a	3.33 \pm 1.57	0.77 \pm 0.15	0.55 \pm 1.57
Recovery	Control	82.3 \pm 15.0 ^a	10.5 \pm 8.25 ^a	3.33 \pm 2.51 ^a	3.06 \pm 4.71 ^a	0.00 \pm 0.00	0.33 \pm 0.94	0.55 \pm 0.41
	0.5	77.8 \pm 6.04 ^a	12.7 \pm 3.44 ^a	5.06 \pm 3.42 ^a	3.43 \pm 3.66 ^a	0.00 \pm 0.00	1.22 \pm 2.35	1.11 \pm 1.57
	1.5	92.0 \pm 3.60 ^a	0.10 \pm 0.17 ^b	4.33 \pm 2.86 ^a	3.80 \pm 1.65 ^a	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.44 \pm 0.62

Different lower case letters indicate significant differences among treatments within the same day (Tukey`s test; p < 0.05).

Table 2 – Histopathological parameters (mean \pm SD) in percentage per lamella affected in juvenile *Amphiprion percula* exposed to cooper sulfate (0.5 and 1.5 mg/L CuSO₄) during 7 and 14 days.

Day	mg CuSO ₄ . L ⁻¹	Not affected	Lamelar fusion	Telangiectasia	Partial fusion	Chloride cell hyperplasia	Partial hyperplasia
7	Control	85.5 \pm 6.76 ^{aA}	3.60 \pm 2.33 ^{aA}	10.50 \pm 1.89 ^{aA}	3.48 \pm 2.52 ^{aA}	3.11 \pm 0.87	0.22 \pm 0.41
	0.5	84.5 \pm 9.98 ^{aA}	5.40 \pm 0.79 ^{aA}	5.43 \pm 4.78 ^{aA}	9.86 \pm 6.50 ^{aA}	1.11 \pm 1.13	0.33 \pm 0.94
	1.5	87.0 \pm 4.35 ^{aA}	3.23 \pm 1.07 ^{aA}	3.20 \pm 1.45 ^{aA}	3.86 \pm 4.84 ^{aA}	1.88 \pm 0.31	0.00 \pm 0.00
14	Control	82.8 \pm 5.34 ^{aA}	3.80 \pm 1.25 ^{aA}	6.50 \pm 3.50 ^{aA}	3.33 \pm 2.51 ^{aA}	2.33 \pm 1.09	0.00 \pm 0.00
	0.5	82.6 \pm 19.6 ^{aA}	4.86 \pm 4.33 ^{aA}	4.00 \pm 4.00 ^{aA}	5.06 \pm 3.42 ^{aA}	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
	1.5	87.0 \pm 4.44 ^{aA}	3.10 \pm 3.56 ^{aA}	4.83 \pm 4.25 ^{aA}	4.33 \pm 2.86 ^{aA}	0.33 \pm 0.15	0.33 \pm 0.94

Different lower case letters indicate significant differences among treatments within the same day (Multiple comparisons of mean ranks; $p < 0.05$). Different uppercase letters indicate significant differences among time within the sampling treatment (Mann-Whitney $p < 0.05$).

4. CONCLUSÕES GERAIS

De modo geral, o sistema de defesa antioxidante não foi afetado pela utilização do CuSO_4 , exceto por uma alteração pontual e temporária na atividade da GST.

A utilização do sulfato de cobre não induziu dano lipídico ou alterações histopatológicas em juvenis de peixe-palhaço expostos durante 14 dias a concentrações de 0,5mg/L de CuSO_4 e 1,5mg/L de CuSO_4 .

Concluindo que a exposição a concentrações entre 0,5 e 1,5 mg/L de CuSO_4 tipicamente utilizadas durante um período de até 14 dias são seguras para o tratamento de infestações parasitárias para o peixe-palhaço *A. percula*.